

## **La contamination fécale des eaux du bassin de la Seine**

Les travaux sur la thématique de la qualité microbiologique des eaux du bassin de la Seine réalisés en 2005 ont porté sur :

- (1) la validation des prédictions des teneurs en coliformes fécaux dans l'axe fluvial de la Seine dans l'agglomération parisienne calculées par l'applicatif du modèle SENEQUE. L'impact de modification de l'assainissement en région parisienne sur la qualité microbiologiques des eaux de la Seine a de plus fait l'objet de divers scénarios.
- (2) une évaluation de l'efficacité de la désinfection aux UV des *Escherichia coli* par diverses méthodes d'énumération
- (3) la poursuite de la collecte de données sur les apports de bactéries fécales aux rivières en zones urbaines via les réseaux unitaires (exemple du réseau parisien).
- (4) une première évaluation de l'antibiorésistance des bactéries fécales présentes dans les cours d'eau du bassin de la Seine.

Chacune de ces thématiques fait l'objet d'un rapport distinct ; la structure du rapport est présentée ci-dessous.

## Sommaire

La contamination fécale des eaux du bassin de la Seine .....	1
Modélisation du niveau de contamination fécale de la Seine en région parisienne : situation présente et future. ....	3
1. Introduction .....	4
2. Apports de bactéries fécales aux rivières .....	4
2.1. Apports de bactéries fécales par les rejets de station d'épuration .....	4
2.2. Apports de bactéries fécales en zone rurale.....	5
3. Description du devenir des bactéries fécales en rivières .....	6
4. Validation de la modélisation de la dynamique des coliformes dans la Seine .....	7
5. Scénarios de contamination des eaux de la Seine.....	10
6. Références .....	12
Evaluation de l'efficacité de la désinfection aux UV des <i>Escherichia coli</i> par diverses méthodes d'énumération.....	13
1. Introduction .....	14
2. Méthodes .....	14
3. Résultats .....	15
4. Conclusions .....	18
5. Références .....	19
Bactéries indicatrices fécales dans le réseau d'eaux usées parisien.....	20
1. Introduction .....	21
2. Méthodologie.....	21
3. Résultats .....	23
3.1. Evolution des teneurs .....	23
3.2. Comportement en temps de pluie.....	25
4. Conclusion.....	27
5. Références .....	27
Première évaluation de l'antibiorésistance des bactéries fécales en Seine.....	28
1. Introduction .....	29
2. Méthodes .....	29
3. Résultats .....	30
4. Conclusions .....	32
5. Références .....	33

# **Modélisation du niveau de contamination fécale de la Seine en région parisienne : situation présente et future.**

Pierre Servais <sup>1</sup>, Tamara Garcia-Armisen <sup>1</sup>, Gilles Billen <sup>2</sup> et Olivier Rousselot <sup>3</sup>

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

*2 UMR Sisyphe, Université Pierre & Marie Curie, Paris*

*3 Syndicat Interdépartemental d'Assainissement de l'Agglomération Parisienne*

## **1. Introduction**

Dans le bassin de la Seine, la qualité microbiologique des eaux est un enjeu considérable tant pour la production d'eau potable que pour la reconquête de la baignabilité, objectif affiché par nombre de communautés locales à l'amont du bassin. Pour cette raison, le programme PIREN mène depuis plusieurs années des actions visant à évaluer les sources de contamination microbienne, à étudier la dynamique des micro-organismes d'origine fécale dans les rivières du bassin avec l'objectif de développer un modèle prédictif validé de la contamination fécale à l'échelle de l'ensemble du bassin.

Les travaux expérimentaux menés sur les bactéries fécales dans le bassin de la Seine ont permis d'intégrer un compartiment « Coliformes fécaux » (CF) à l'applicatif SENEQUE pour former le modèle CF-SENEQUE. Ce modèle permet la prédiction des fluctuations spatiales et temporelles de l'abondance des CF dans toutes les rivières du bassin (Servais et al., 2003, 2005). Des premières validations de ce modèle par comparaison des calculs du modèle CF-SENEQUE avec des données de terrain collectées dans le cadre du PIREN avaient été présentées dans les rapports précédents pour la Seine, la Marne, la Vesle (Servais et al., 2003, 2005). En 2005, ce travail de validation a été poursuivi notamment en utilisant les données de suivis de qualité microbiologique effectués par le SIAAP dans l'agglomération parisienne. Une fois validé, ce modèle peut être utilisé comme un outil d'aide à la décision en matière de gestion des eaux de surface.

Ce rapport synthétise rapidement les travaux expérimentaux qui ont été nécessaires à la modélisation, décrit le modèle CF-SENEQUE, montre et discute des validations du modèle pour la simulation de la qualité microbiologique des eaux de la Seine dans l'agglomération parisienne et finalement présente des exemples de scénarios de modification de l'assainissement en région parisienne sur la qualité microbiologique des eaux de la Seine.

## **2. Apports de bactéries fécales aux rivières**

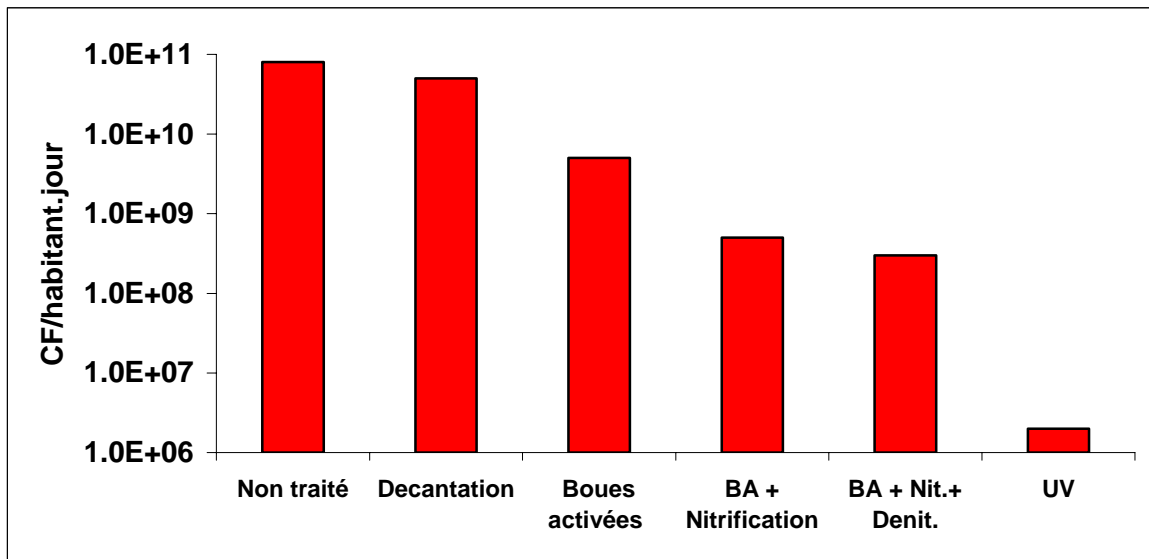
Le travail de modélisation nécessite tout d'abord de décrire correctement les apports de bactéries fécales vers les rivières. Deux types d'apports ont été quantifiés : les apports par les rejets de station d'épuration et les apports par ruissellement et lessivage des sols en zones rurales.

### **2.1. Apports de bactéries fécales par les rejets de station d'épuration**

Dans les bassins versants anthropisés, les rejets d'eaux usées domestiques constituent, à priori, la source principale de contamination fécale du milieu naturel. Dans le cadre des travaux du PIREN, des efforts ont été accomplis pour quantifier les apports en bactéries fécales par les rejets de stations d'épuration (STEPS) caractérisées par des traitements divers.

Par temps sec, la plupart des rejets domestiques urbains sont aujourd'hui traités en stations d'épuration (STEPS). L'objectif de ce traitement est en priorité d'éliminer les matières en suspension et la matière organique des effluents et, pour les plus performantes d'entre les STEPs, 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. Les études réalisées dans le cadre du programme PIREN Seine ont montré que les stations d'épuration classiques abattaient en général la pollution d'origine fécale de un à trois ordres de grandeur. L'efficacité de l'abattement dépend à la fois du bon fonctionnement de la STEP et du type de traitement. Ainsi le temps de séjour de l'eau dans les systèmes à boues activées influence l'efficacité de traitement tout comme la présence ou pas de biofiltres (George et al., 2002). A partir des données collectées à l'entrée et à la sortie des

STEPS échantillonnées, la charge spécifique (quantité de CF rejetée par habitant et par jour) pour divers types de traitement d'épuration (Figure 1).



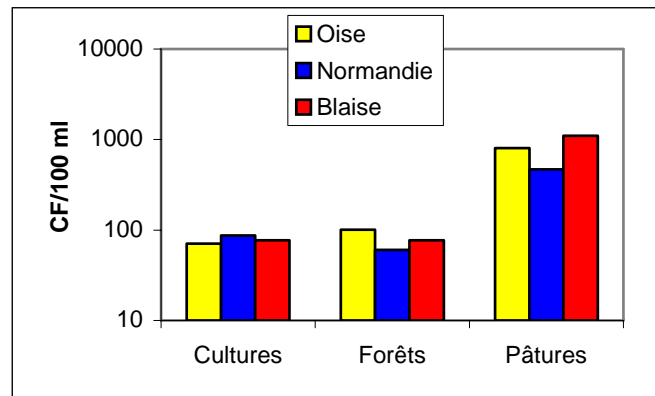
*Figure 1. Charge spécifique en CF rejetée par habitant et par jour en fonction du type de station d'épuration.*

Malgré les abattements observés dans les STEPs, les eaux usées issues des stations d'épuration classiques sont encore très riches en bactéries fécales et constituent à l'échelle du bassin de la Seine la première source de contamination microbiologique des eaux (Garcia-Armisen et al., 2004 ; Garcia-Armisen et Servais, 2006). Une amélioration de la qualité microbiologique passe donc par une augmentation de l'efficacité d'abattement de la pollution fécale des STEPs et, donc, par l'intégration dans les filières de traitement des eaux usées d'une étape de désinfection. Le traitement aux UV semble aujourd'hui la voie la plus prometteuse de désinfection des eaux usées. Ce type de traitement est d'ailleurs actuellement mis en oeuvre par le SIAAP à la STEP de Noisy-le-Grand. Les eaux d'entrée et de sortie d'une unité pilote de désinfection aux UV installée à la STEP de Noisy-le-Grand en banlieue parisienne ont été échantillonnées ce qui a permis d'établir l'équivalent habitant CF pour ce type de traitement (Figure 1).

Dans l'optique de modélisation, les apports par les STEPs sont calculés en multipliant la capacité de chaque STEP par la charge spécifique dépendant du type de traitement utilisé.

## **2.2. Apports de bactéries fécales en zone rurale**

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 (ruissellement et lessivage des sols). Des données ont été acquises sur l'importance de ces types d'apport dans le cadre du programme PIREN Seine (George et al., 2004; Garcia-Armisen et Servais, 2006); les résultats de ces travaux ont portés sur les apports de coliformes fécaux aux rivières du bassin de la Seine. Pour évaluer les apports diffus de coliformes fécaux, des prélèvements ont été effectués dans des petits ruisseaux en amont de tout rejet domestique, de manière à s'affranchir des apports d'origine humaine. Des ruisseaux s'écoulant en zones forestières, en zones cultivées et en zones de pâtures ont été échantillonnés. Cette stratégie d'échantillonnage a été utilisée dans le bassin amont de l'Oise, en Normandie (sous-bassins de l'Andelle, la Risle et l'Eure) et dans le sous bassin de la Blaise. La synthèse de ces résultats est présentée à la figure 2.



**Figure 2.** Concentration en coliformes fécaux résultant du lessivage des sols forestiers et du ruissellement dans diverses zones du bassin (sous bassin de l'Oise, sous bassins de la Risle, de l'Andelle et de l'Eure en Normandie et dans le sous bassin de la Blaise).

En zones forestières et en zones cultivées, les valeurs d'abondance en coliformes fécaux résultant du ruissellement et du lessivage des sols sont de l'ordre de 100 CF/100 ml quelque soit la zone du bassin concernée. En zones de pâtures, les abondances moyennes sont toujours significativement plus élevées (de l'ordre de 1000 CF/100 ml).

Dans l'optique de modélisation, les apports diffus sont calculés sur base de ces résultats expérimentaux en tenant compte dans chaque petit bassin versant de l'usage du sol.

### 3. Description du devenir des bactéries fécales en rivières

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 ; Ruelland et Billen, 2004) et actuellement opérationnel sur l'ensemble du bassin de la Seine. 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.

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. Dans le cadre de nos travaux, nous avons étudié et quantifié la vitesse de mortalité des *Escherichia coli* dans les rivières du bassin de la 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., 2001; Menon et al., 2003, Servais et al., 2005). Il a ainsi été montré que :

- Le mortalité répondait à une cinétique d'ordre 1
- Le taux de mortalité ne dépendait pas de l'ordre des rivières (Servais et al., 2005) mais qu'il dépendait de la température.
- Le broutage 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. Diverses études avaient déjà montré l'importance prépondérante du broutage par les protozoaires (flagellés et ciliés) dans la

mortalité des bactéries autochtones, mais aussi dans celle des bactéries d'origine fécale dans les milieux aquatiques naturels (Servais *et al.*, 1989, 1992 ; Menon *et al.*, 2003).

- Dans les grandes rivières, la vitesse de disparition hors sédimentation (mortalité + perte de cultivabilité) était 1.5 fois supérieure à la vitesse de mortalité mesuré par la méthode basée sur la marquage radioactif des bactéries fécales (Servais *et al.*, 2006) .

Sur base des résultats expérimentaux, une nouvelle variable d'état, l'abondance en coliformes fécaux (CF) cultivables, a été ajoutée dans l'applicatif SENEQUE; cette variable est intitulée FEC. La manière dont les apports diffus et ponctuels de CF sont pris en compte dans le modèle e été décrite à la section 2. Du point de vue des processus, le modèle décrit le devenir des CF par l'équation suivante :

$$dCF/dt = - k_d * CF - (V_{dec}/Prof) * CF$$

avec  $k_d$ : constante du premier ordre décrivant la mortalité et la perte de cultivabilité

$V_{dec}$  : vitesse de sédimentation

Prof : profondeur de la rivière

Le premier des deux termes de l'équation décrit le processus de mortalité. Puisque nous cherchons à simuler la dynamique des CF cultivables, ce terme inclut la perte de cultivabilité des CF suite au stress engendré par le milieu aquatique. La valeur de la constante du premier ordre  $k_d$  est dépendante de la température.

Le second terme décrit la sédimentation des CF. Une vitesse de sédimentation uniforme (qui s'applique à l'ensemble du compartiment) est considérée.

#### **4. Validation de la modélisation de la dynamique des coliformes dans la Seine**

Des simulations avaient été réalisées dès 2003 à l'aide de l'applicatif SENEQUE sur l'axe principal de la Vesle et de la Marne (Garcia-Armisen *et al.*, 2004). En 2004, l'applicatif SENEQUE a été étendu à l'ensemble du bassin de la Seine en ce compris l'axe fluvial de la Seine en aval de Paris. Un exemple de calcul est présenté à la figure 3. Il s'agit dans le cas présenté d'une simulation en conditions estivales de l'abondance en CF le long de la Seine entre l'amont de la confluence avec l'Yonne et Poses. Cette simulation est comparée aux données expérimentales acquises en septembre 1998 dans le cadre du programme PIREN (George *et al.*, 2001). 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 d'Achères sont bien reproduits.

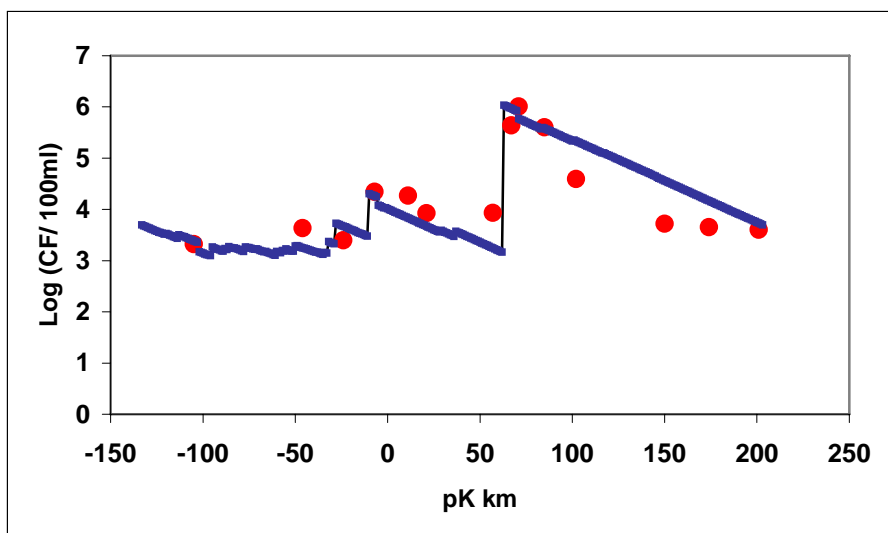


Figure 3 : Abondance en CF cultivables dans la Seine. Résultats de modélisation obtenus avec CF-SENEQUE (-) et résultats expérimentaux (•) de Septembre 1998 (George et al., 2001). Pk : échelle kilométrique avec le zéro au Pont Marie (Paris)

En 2005, nous avons poursuivi les comparaisons de résultats de terrain avec des calculs du modèle CF-SENEQUE. Ce travail de validation a été effectué notamment en utilisant les données de suivi de qualité microbiologique effectué par le SIAAP dans l'agglomération parisienne. La figure 4 présente les données de terrain et les calculs du modèle CF-SENEQUE en 4 stations sur la Seine en région parisienne (Choisy-le-Roi en amont de la STEP Seine-Amont à Valenton, Suresnes en aval de Paris, Conflans à l'aval de la STEP Seine-Aval à Achères mais en amont de la confluence avec l'Oise et Poissy situé en aval de la confluence Seine Oise).



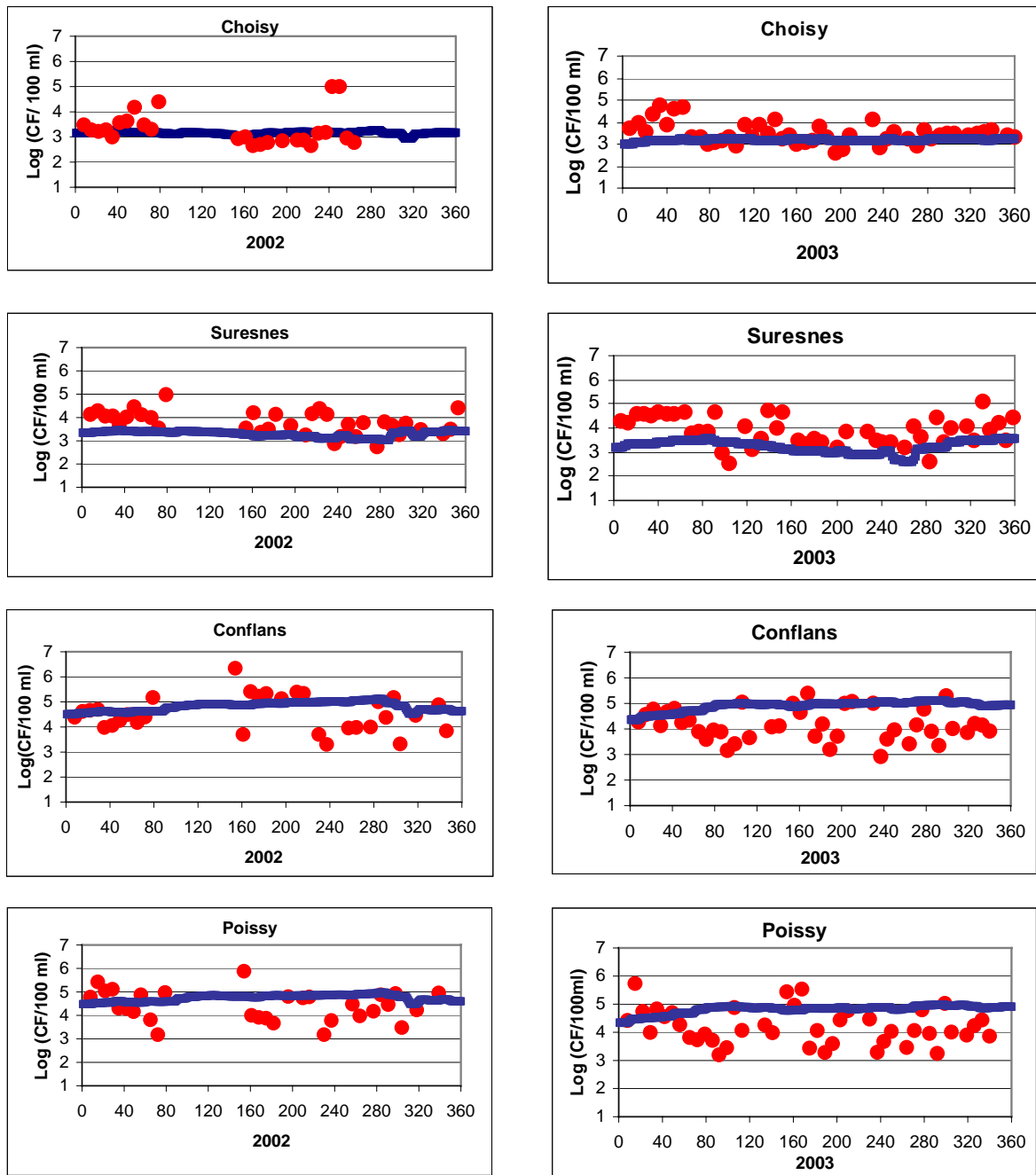


Figure 4: Abondance en CF cultivables en 2002 et 2003 dans la Seine en 4 stations de la région parisienne : Choisy-le-Roi, Suresnes, Conflans et Poissy. Résultats de modélisation obtenus avec CF-SENEQUE (-) et résultats expérimentaux (●).

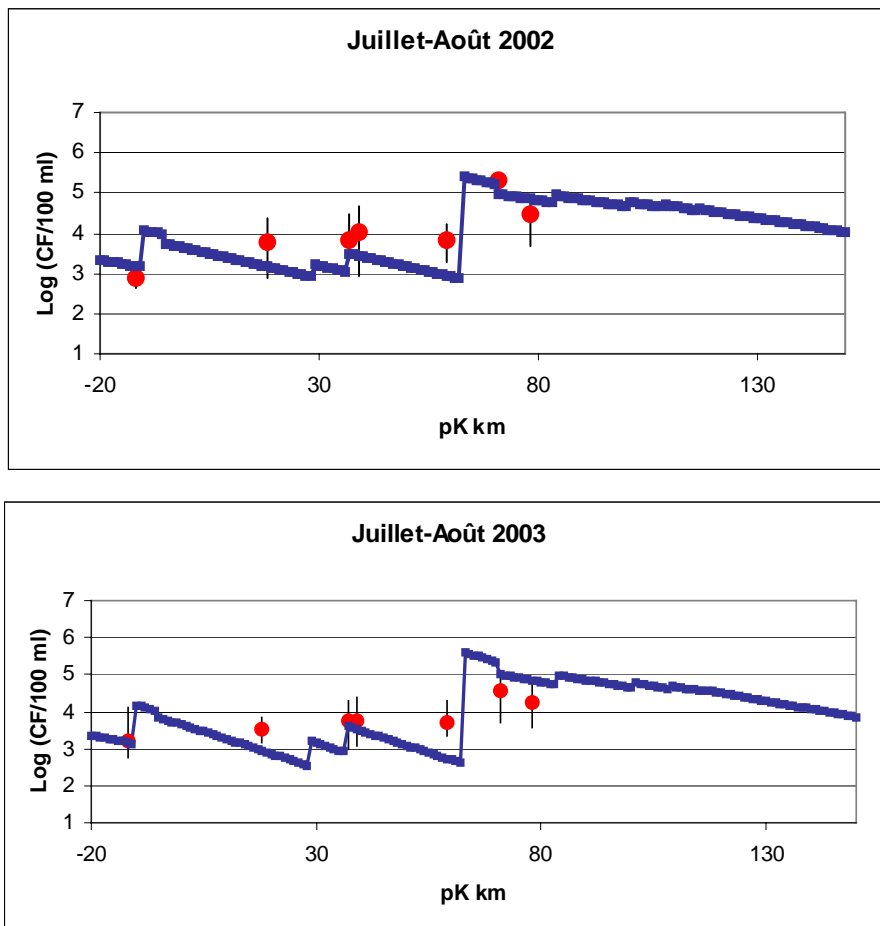


Figure 5: Profils longitudinaux dans la région parisienne de l'abondance en CF cultivables en situations estivales (moyenne des mois de juillet et août) en 2002 et 2003. Résultats de modélisation obtenus avec CF- SENEQUE (-) et résultats expérimentaux (•).

Ces exemples de comparaison de simulations et de données expérimentales sur l'axe fluvial de la Seine ainsi que celles précédemment présentées (Garcia-Armisen et a.l., 2004) sur les axes de la Marne et de la Vesle montrent que le modèle est tout à fait à même de décrire correctement les grandes tendances des fluctuations des bactéries indicatrices de contamination fécale que sont les coliformes fécaux. La figure 4 montre aussi que les fluctuations des résultats expérimentaux sont plus grandes que celles des simulations. Ceci est dû au fait que le modèle SENEQUE effectue des calculs qui sont moyennés par décade alors que les résultats de terrain sont tout à fait ponctuels; de plus, le modèle SENEQUE ne prend en compte les situations de temps de pluie où des rejets directs en Seine peuvent être effectués. La figure 5 montre que, pour les situations estivales, les calculs du modèle reproduisent correctement les fluctuations longitudinales des abondances en CF dans la région parisienne.

## 5. Scénarios de contamination des eaux de la Seine

Une fois validé, le modèle peut être utilisé comme outil de prédiction pour tester l'impact de modifications de l'assainissement sur la qualité microbiologique des eaux de la Seine. Le premier scénario testé visait à calculer l'impact des modifications envisagées à l'horizon 2007 par le SIAAP dans les STEPs de l'agglomération parisienne. Celles-ci sont les suivantes : doublement du débit traité à Seine-Amont (de 300000 à 600000 m<sup>3</sup>/j) et amélioration du traitement (traitement biologique du phosphore) ; pas de modification à Seine-Centre (Colombes), diminution du volume traité à Seine-Aval (de 2000000 à 1700000 m<sup>3</sup>/j) et ajout de biofiltration pour la nitrification et la dénitrification ;

100000 m<sup>3</sup>/j traités aux Grésillons (incluant le débit traité actuellement à Carrières-sous-Poissy) avec une triple biofiltration pour le traitement du carbone, la nitrification et la dénitrification. La figure 6 présente l'impact de ces modifications sur la qualité microbiologique des eaux de la Seine.

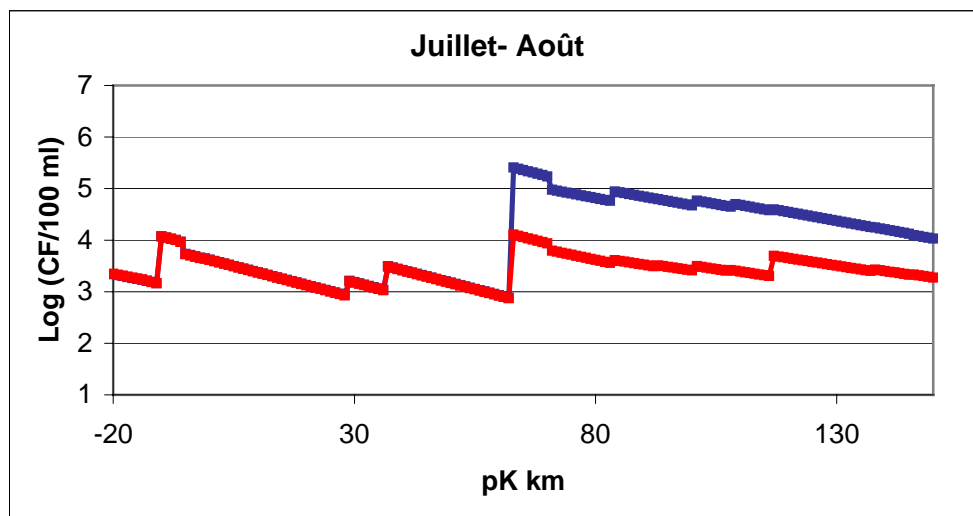


Figure 6: Profils longitudinaux dans la région parisienne de l'abondance en CF cultivables en situation estivale. Résultats de modélisation obtenus avec CF-SENEQUE pour la situation présente (-) et pour le scénario 1 (-).

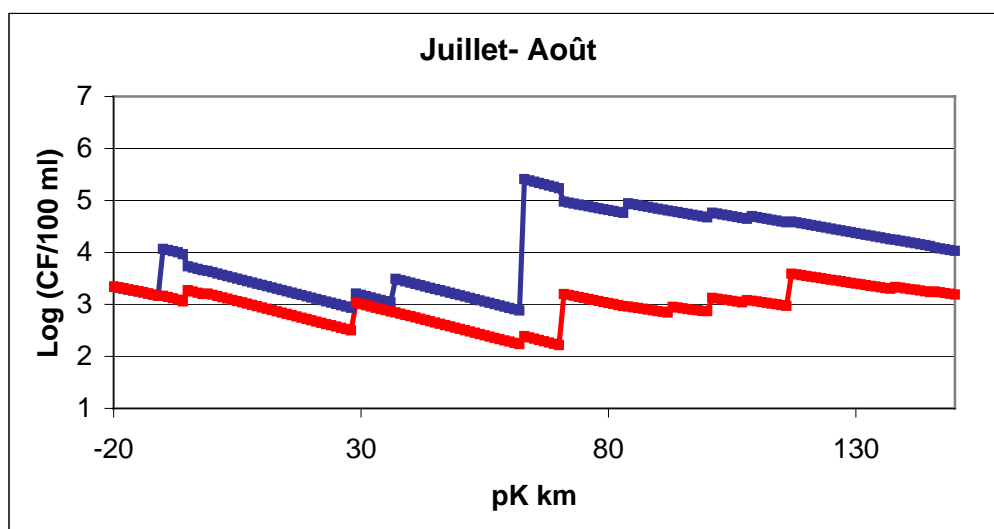


Figure 7: Profils longitudinaux dans la région parisienne de l'abondance en CF cultivables en situation estivale. Résultats de modélisation obtenus avec CF-SENEQUE pour la situation présente (-) et pour le scénario 2 (-).

La figure 6 montre que ce scénario ne modifie en rien la qualité microbiologique à l'amont de la STEP Seine-Aval à Achères. En effet, l'amélioration du traitement à Seine-Amont compense simplement l'augmentation du volume traité et le flux de bactéries fécales sortant de Seine-Amont reste identique. Par contre, une augmentation très significative de la qualité est observée à l'aval d'Achères.

Un second scénario a été testé. Il inclut l'addition d'une étape de désinfection au UV à Seine-Amont (débit traité : 600000 m<sup>3</sup>/j), à Seine-Centre (pas de modification du débit traité), à Seine-Aval (diminution du volume traité à 1500000 m<sup>3</sup>/j), et aux Grésillons (augmentation du volume traité à 300000 m<sup>3</sup>/j). La figure 7 présente les résultats de ce scénario; on observe une amélioration très significative de la qualité microbiologique des eaux de la Seine sur l'ensemble de la région parisienne et à l'aval de celle-ci. Il faut néanmoins garder à l'esprit que ce scénario doit être à ce stade considéré

comme optimiste pour deux raisons : (i) Le modèle SENEQUE ne prend pas en compte les rejets de temps de pluie qui peuvent, de manière temporaire, dégrader considérablement la qualité micro biologique des eaux ; (ii) l'effet des UV tel que considéré dans le scénario 2 ne prend pas en compte une possible réactivation dans la rivière des bactéries fécales qui auraient perdu momentanément leur cultivabilité suite à l'irradiation aux UV. Ce dernier est développé dans la partie suivante du rapport.

## 6. Références

- Billen G., Garnier J., Hanset P. 1994. Modelling phytoplankton development in whole drainage networks: the RIVERSTRAHLER model applied to the Seine river system. *Hydrobiologia* 289: 119-137.
- Garcia Armisen, T., Servais, P. 2006. Respective contributions of point and non point sources of *E. coli* and Enterococci in a large urbanised watershed (the Seine river, France). *Journal of Environmental Management*. In press.
- Garcia-Armisen, T., Mercier, P., Servais, P. 2004. Les bactéries indicatrices de contamination fécale dans les eaux du bassin de la Seine. *Rapport PIREN Seine Février 2004*
- 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(6b): 994-1002.
- 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.
- Menon P., Billen G., Servais P. 2003. Mortality rates of autochthonous and fecal bacteria in natural aquatic ecosystems. *Water Research*. 37 : 4151-4158
- Ruelland, D. et Billen, G. (2004) Applicatif SENEQUE 3 : notice d'utilisation (2001-2004). *Rapport PIREN-Seine 2003, développements méthodologiques et scénarios tendanciels*. CNRS, Paris. 30 p.
- Servais, P., Billen, G., Vives-Rego, J. 1985. Rate of bacterial mortality in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 : 1448-1454.
- Servais P., Garcia Armisen T., Mercier P., Lizin P., Anzil A. 2003. Etude et modélisation de la qualité microbiologique des eaux du bassin de la Seine. *Rapport PIREN Seine Février 2002*.
- Servais, P., Garcia-Armisen, T., Espinel, N., Fouqueray, M., Mouchel, J.M. 2005. La contamination d'origine fécale des eaux du bassin de la Seine. *Rapport PIREN Seine 2004*
- Servais P., Garcia Armisen T., George, I Billen, G. 2006. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): sources, fate and modelling. *Science of the Total Environment*. Soumis

**Evaluation de l'efficacité de la désinfection aux UV des  
*Escherichia coli* par diverses méthodes d'énumération.**

Pierre Servais et Thomas Lequertier

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

## 1. Introduction

Afin de réduire le niveau de contamination des eaux de surface par des micro-organismes pathogènes, la désinfection des eaux usées est aujourd'hui sérieusement envisagée dans de plus en plus de stations d'épuration. A l'heure actuelle, la désinfection des eaux usées traitées par irradiation aux ultraviolets est la solution technique qui semble la plus intéressante d'un point de vue économique et écologique. Alors que dans les STEPs n'incluant pas d'étape de désinfection, l'abattement maximum en coliformes fécaux (CF) est de trois unités Log, dans les STEPs incluant une désinfection aux UV l'abattement des CF peut atteindre jusqu'à 5 unités Log. Cela signifie que, le gain d'abattement lié à l'étape de traitement aux UV est très considérable. La quasi totalité des résultats présentés dans la littérature sur l'abattement des bactéries fécales par un traitement de désinfection aux UV est basée sur des énumérations de bactéries fécales par des méthodes basées sur la mise en culture (dénombrement sur milieu gélosé spécifique ou mise en culture en tubes multiples). Il semble néanmoins que les méthodes de mise en culture surestiment l'efficacité réelle de l'étape de désinfection aux UV. Nous avons montré dans notre rapport de 2004 (Servais et al., 2005) sur base de mesures effectuées avant et après l'étape de traitement aux UV dans différentes STEPs utilisant ce type de traitement que les abattements des *E. coli*, qui constituent la très grosse majorité des CF dans les eaux du bassin (Servais et al., 2003), estimés par des méthodes basées sur la mise en culture étaient significativement supérieurs à ceux mesurés pour les *E. coli* viables mesurés par la méthode d'hybridation in situ couplée à une mesure de viabilité développée dans notre laboratoire (Garcia-Armisen et Servais, 2004a, b; Garcia-Armisen et al., 2004). Suite à ces résultats, la question qui se pose aujourd'hui est de savoir, en terme de risque sanitaire, quelle est la méthode la plus pertinente pour évaluer correctement l'effet d'un traitement aux UV. Ceci a justifié l'étude entreprise sur la thématique de la désinfection aux UV dans le cadre du programme PIREN en 2005.

Dans la présente étude, l'efficacité de la désinfection aux UV a été étudiée en prenant comme modèle de micro-organismes entériques les *Escherichia coli* qui constituent le groupe de bactéries indicatrices de contamination fécale le plus couramment utilisé. Nous avons testé quelle était l'influence des conditions expérimentales sur l'évaluation de l'efficacité de la désinfection aux UV. L'impact de divers facteurs a été étudié : origine des *E. coli* irradiés (culture pure versus eaux usées), méthode d'énumération (méthode de mise en culture versus méthode moléculaire) et possibilité de réactivation après l'irradiation. Pour ce faire, des expériences d'irradiation aux UV (doses appliquées de 5 à 40 mJ/cm<sup>2</sup>) et de réactivation à la lumière et au noir ont été réalisées sur des cultures pures d'*E. coli* et sur des échantillons de sortie de STEPs classiques. Pour chacune de ces expériences, nous avons estimé le nombre d'*E. coli* à la fois par des techniques classiques de dénombrement basées sur la cultivabilité (méthodes de mise en culture) et par une technique moléculaire qui couple l'hybridation in situ par une sonde fluorescente avec un marqueur de viabilité (méthode DVC-FISH) (Garcia-Armisen et Servais, 2004a, b). Cette dernière méthode a été recommandée dans une publication récente comme étant la mieux adaptée à évaluer l'effet d'un traitement de désinfection (Villarino et al., 2000)

## 2. Méthodes

Les expériences d'exposition aux UV ont été réalisées sur 2 types d'échantillons:

- Cultures pure d'*E.coli*. Les souches pures ATCC 11775 et ATCC 29079 ont été mises en culture en milieu liquide, ensuite lavées à plusieurs reprises et resuspendues dans de l'eau minérale
- Echantillons d'eaux de sortie d'une station d'épuration possédant un traitement primaire de décantation suivi d'un traitement par boues activées avec clarification.

Les irradiations ont été réalisées en laboratoire ; la source UV est générée à partir d'une lampe à basse pression de puissance 16W émettant un rayonnement d'une longueur d'onde de 254 nm. L'intensité du

rayonnement sur l'échantillon est de 2000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ; des temps d'irradiation variables sont appliqués pour obtenir des doses d'UV reçues comprises entre 5 à 40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ .

Pour les expériences de réactivation à la lumière, les échantillons irradiés aux UV sont incubés sous agitation à 22 °C sous trois lampes de 13 W. Pour la réactivation au noir, les échantillons irradiés sont incubés sous agitation à 22 °C dans une bouteille préalablement recouverte d'une feuille d'aluminium.

Trois techniques ont été utilisées pour le dénombrement des *E. coli* dans les expériences décrites dans ce rapport. Les deux premières sont basées sur la mise en culture et estiment donc l'abondance des bactéries cultivables tandis que la troisième méthode basée sur une technique moléculaire estime l'abondance des bactéries viables.

- Dénombrement sur milieu gélosé spécifique (milieu Fluorocult). Le principe de la méthode repose sur la mise en évidence des *E. coli* par la détection d'une de leurs enzymes (la  $\beta$ -D-glucuronidase) dont le substrat est compris dans le milieu. Ce substrat est du MUGlu (4 méthylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide) ; en présence de l'enzyme, celui-ci libère un composé (methylumbellifère) qui va donner, sous une lampe UV, la fluorescence aux colonies de *E. coli*. Les boîtes de Pétri sont incubées à 44°C pendant 24h.
- Dénombrement des *E. coli* par la méthode des microplaques. Le principe de la méthode repose sur la mise en évidence des *E. coli* par la détection d'une de leurs enzymes (la  $\beta$ -D-glucuronidase) dont le substrat est déshydraté dans les cupules de la microplaque. Le substrat déshydraté au fond des 96 puits est du MUGlu (4 méthylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide) ; sa réhydratation est effectuée par des dilutions de l'eau à analyser. En présence de l'enzyme, le substrat libère un composé fluorescent révélé dans l'ultraviolet. Une analyse statistique, fondée sur la loi de Poisson, permet, une fois la lecture terminée, de dénombrer les *E. coli* présents dans l'échantillon en fonction du nombre de puits fluorescents. L'incubation de la microplaque à 44°C dure de 36h à 48 h.
- Dénombrement par la méthode DVC-FISH. Cette méthode permet de dénombrer les *E. coli* présents dans un échantillon grâce à la combinaison d'une hybridation in situ (FISH) et d'une mesure de viabilité (DVC = Direct Viable Count). Dans un premier temps, l'échantillon filtré est incubé en présence d'un milieu riche comprenant des antibiotiques. Ces derniers vont empêcher les bactéries de se diviser (méthode DVC) ; les bactéries actives vont donc s'allonger. Ensuite, on emploie la méthode FISH qui est basée sur l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique spécifique d'*E. coli* (sonde Colinsitu) (Regnault et al., 2000) lié à un fluorochrome (CY3) qui va permettre leur visualisation en microscopie à épifluorescence. Le protocole détaillé est décrit dans les publications de Garcia-Armisen et Servais (2004a, b). Cette technique permet de dénombrer à la fois les *E. coli* cultivables ainsi que les *E. coli* viables mais non cultivables (Garcia-Armisen et Servais, 2004a, b).

### 3. Résultats

Dans un premier temps, nous avons comparé l'impact de diverses doses d'UV sur deux souches pures et sur deux échantillons d'eaux usées traitées dans une STEP classique (Figure 1). Les *E. coli* ont été dénombrés par mise en culture sur milieu gélosé. Les résultats montrent que, quelque soit l'échantillon testé, le nombre de *E. coli* après irradiation diminue avec l'augmentation de l'intensité de l'irradiation. On voit aussi que la sensibilité des *E. coli* dépend de la souche pure utilisée et que la sensibilité des souches pures de *E. coli* semble plus grande que celle des *E. coli* contenu dans les eaux usées testées. Ceci remet donc en cause les très nombreux résultats de la littérature où l'efficacité du procédé de désinfection aux UV est estimé en utilisant des souches pures de micro-organismes.

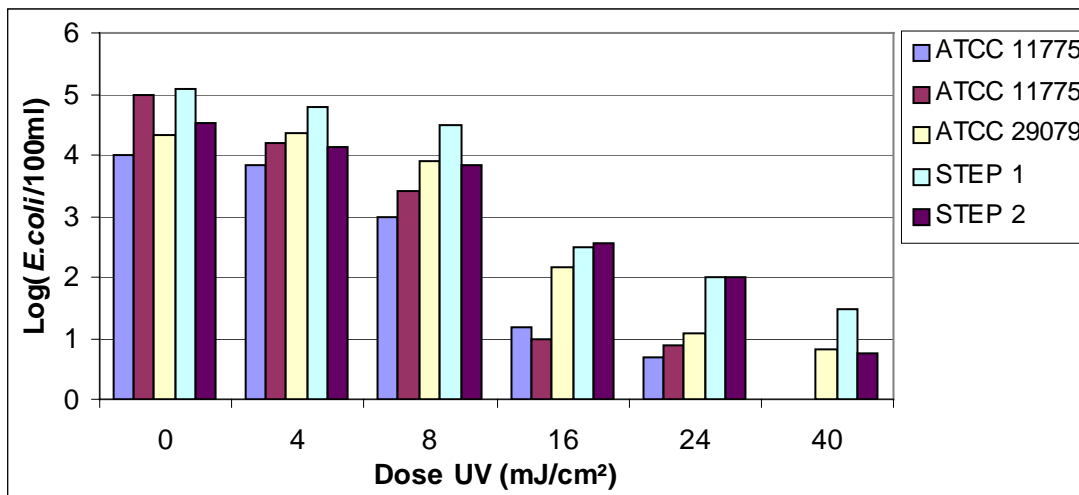


Figure 1. Effet de la dose UV appliquée sur le nombre de *E. coli* cultivables (dénombrement sur gélose).

Dans un second temps, nous avons comparé l'impact de diverses doses d'UV sur un échantillon d'eau usée traitée dans une STEP classique en dénombrant les *E. coli* par deux méthodes basées sur la mise en culture (méthodes Fluorocult et microplaque) et une méthode de dénombrement des *E. coli* viables (méthode DVC-FISH) (Figure 2).

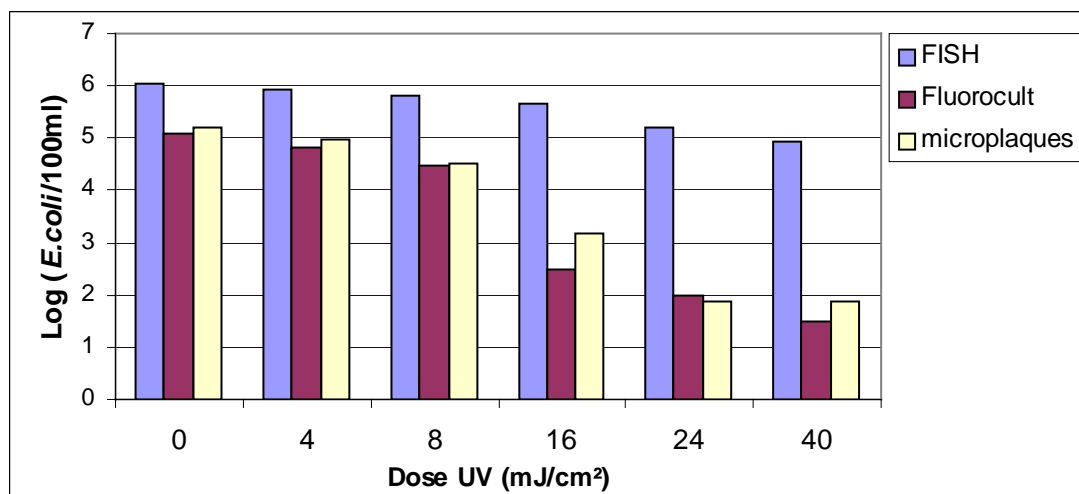


Figure 2. Effet de la dose UV appliquée sur le nombre de *E. coli* cultivables (dénombrement sur gélose Fluorocult et par microplaque) et viables (méthode DVC-FISH).

Quelque soit la méthode de dénombrement utilisée, on observe un abattement croissant des *E. coli* avec l'augmentation de la dose UV appliquée mais cet abattement est très significativement plus élevé quand on utilise les méthodes de dénombrement basées sur la mise en culture. Ainsi, pour la dose d'UV la plus forte testée ici 40 mJ/cm<sup>2</sup> (qui correspond à une dose classiquement utilisée en STEP), on observe un abattement de plus de 3 unités Log des *E. coli* cultivables alors que cet abattement est de 1.1 unité Log pour les *E. coli* viables (méthode DVC-FISH). Ceci montre que l'irradiation aux UV génère une population importante de *E. coli* viables mais non-cultivables. On peut avancer l'hypothèse suivante pour expliquer cette différence entre bactéries viables et cultivables : le traitement aux UV affecte prioritairement l'ADN en favorisant la formation de dimères entre les bases de l'ADN ce qui empêche, par conséquent, la réplication et donc la division cellulaire qui est absolument nécessaire à l'énumération bactérienne par les méthodes basées sur la mise en culture. Il est à noter que cette



formation de dimère peut être réversible car il existe des mécanismes de réparation principalement à la lumière (mécanismes de photoréactivation). La méthode DVC-FISH n'implique pas de division cellulaire mais simplement d'avoir une machinerie cellulaire intacte, elle est donc moins sensible aux UV.

Afin de tester si le stade viable non cultivable généré par l'irradiation aux UV est réversible, nous avons incubé des échantillons d'eaux usées irradiés à une intensité de 40 mJ/cm<sup>2</sup> pendant 24 h à la lumière et au noir. Le nombre de *E. coli* a été suivi par dénombrement sur gélose (Figure 3) et par la méthode DVC-FISH (Figure 4). Un contrôle (échantillon non irradié) a été réalisé pour voir comment l'échantillon d'eau usée pouvait évoluer dans le temps.

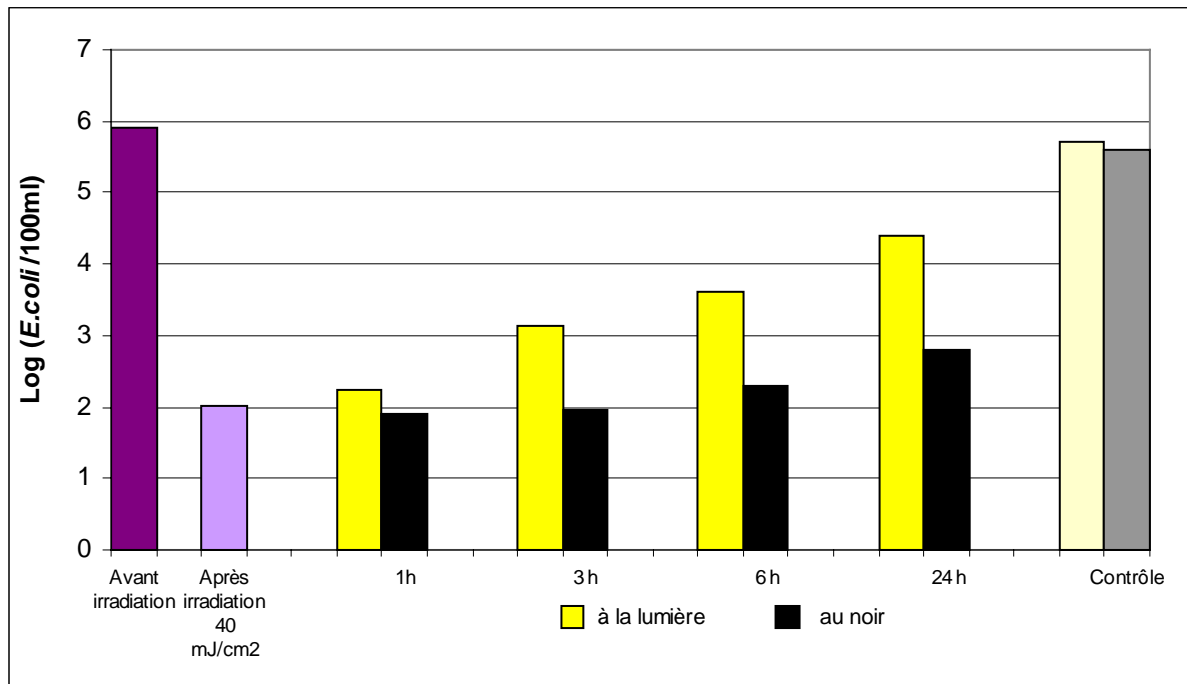


Figure 3. Effet de l'irradiation UV (40 mJ/cm<sup>2</sup>) et de la réactivation au noir et à la lumière sur le nombre de *E. coli* cultivables (dénombrement sur gélose Fluorocult).

La figure 3 montre que durant l'incubation après irradiation, le nombre de *E. coli* cultivables augmente. Cette augmentation est plus rapide et plus importante pour l'échantillon irradié et ensuite incubé à la lumière que lorsque l'échantillon est incubé au noir. Cette augmentation ne peut vraisemblablement pas s'expliquer par une croissance réelle du nombre de *E. coli* en effet le nombre dans le contrôle non irradié est stable et il n'y a aucune raison qu'une croissance soit plus rapide à la lumière qu'au noir. L'augmentation du nombre de *E. coli* durant l'incubation doit donc être due aux processus de réparation de l'ADN de certains *E. coli* irradiés. Ces processus, plus intenses à la lumière (photoréparation), permettent à certains *E. coli* de retrouver l'état cultivable qu'ils avaient perdu après l'irradiation aux UV. La figure 4 montre que le nombre de *E. coli* viables reste constant pendant l'incubation qui suit l'irradiation, il n'y donc pas, au contraire de ce que l'on observe pour la cultivabilité, de processus de reprise de viabilité durant l'incubation qui suit l'irradiation.

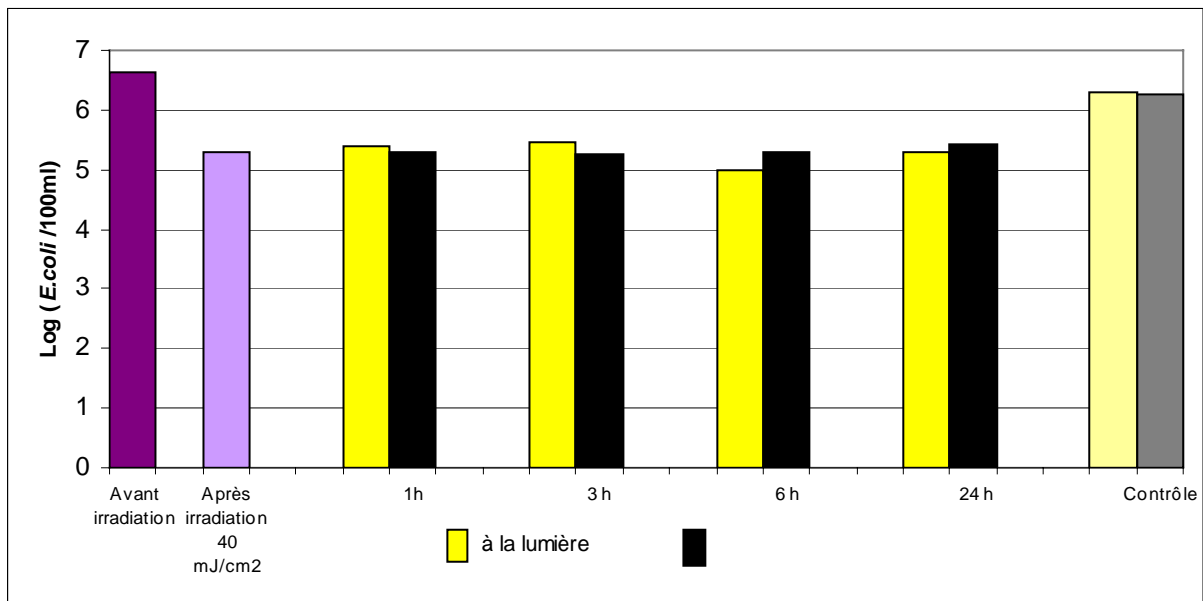


Figure 4. Effet de l'irradiation UV ( $40 \text{ mJ/cm}^2$ ) et de la réactivation au noir et à la lumière sur le nombre de *E. coli* viables (méthode DVC-FISH).

Ces expériences montrent clairement que dans l'avenir il faudra prendre en compte l'effet d'une possible réactivation après irradiation dans l'évaluation de l'efficacité des UV si l'on utilise des méthodes d'énumération bactérienne basées sur la mise en culture ou alors utiliser des méthodes basées sur la viabilité. Les expériences de réactivation présentées ici montrent qu'il existe un risque de réactivation des bactéries irradiées aux UV après leur rejet dans le milieu naturel et donc de surestimation de l'impact réel d'un traitement aux UV. Elles ne permettent pas par contre de conclure sur l'importance du processus de réactivation dans les conditions du milieu naturel puisque ces expériences de réactivation ont été réalisées en conditions de laboratoire éloignées des conditions du milieu naturel en terme entre autres de température, lumière, concentration en bactéries fécales et en substrats.

## 4. Conclusions

En résumé, les expériences décrites ci-dessus montrent que :

- La sensibilité aux UV est variable d'une souche à l'autre de *E. coli* et les *E. coli* de culture sont plus sensibles aux UV que les *E. coli* présents dans les eaux usées.
- Les UV affectent plus la cultivabilité des *E. coli* que leur viabilité. L'irradiation aux UV génère donc un nombre important de *E. coli* viables mais non cultivables
- L'incubation à la lumière et, dans une moindre mesure au noir, permet à une partie des *E. coli* viables mais non cultivables générés par l'irradiation UV de redevenir cultivables. Le nombre de *E. coli* viables n'est pas affecté par cette incubation.
- l'évaluation de l'efficacité des UV en STEP doit être effectuée sur l'eau à désinfecter et non sur des souches pures. Par ailleurs, si l'on examine l'effet des UV immédiatement après irradiation par des méthodes basées sur la mise en culture, on peut surestimer l'effet réel de la désinfection aux UV pour le milieu naturel, en ne considérant pas une possible réactivation après irradiation.

## 5. Références

- Garcia Armisen, T. & Servais, P. 2004a. Combining direct viable count (DVC) and fluorescent in situ hybridization (FISH) to enumerate viable *E. coli* in rivers and waste waters. *Water Science and Technology*. 50 : 271-275.
- Garcia Armisen, T. & Servais, P. 2004b. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods*. 58 : 269-279.
- Garcia-Armisen, T., Mercier, P. & Servais, P. 2004. Les bactéries indicatrices de contamination fécale dans les eaux du bassin de la Seine. *Rapport PIREN Seine 2003*
- 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.
- 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 2002*.
- Servais, P., Garcia-Armisen, T., Espinel, N., Fouqueray, M., Mouchel, J.M. 2005. La contamination d'origine fécale des eaux du bassin de la Seine. *Rapport PIREN Seine 2004*
- Villarino, A., Bouvet, O.M.M., Regnault, B., Martin-Delautre, S. & Grimont, P.A.D. 2000. Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli* : evaluation of different viability markers in life and heat- or UV-killed cells. *Res. Microbiol.* 151 : 755-768.

# **Bactéries indicatrices fécales dans le réseau d'eaux usées parisien**

Priyanka Jamwal<sup>1,2</sup>, Manuela Fouqueray<sup>1</sup> et Jean-Marie Mouchel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*CEREVE  
Ecole Nationale des Ponts et Chaussées  
6-8 Rue Blaise Pascal, Cité Descartes  
Champs-sur-Marne F-77455  
Marne La Vallée Cedex 2*

<sup>2</sup>*Indian Institute of Technology  
Department of Environmental Engineering  
Haus Khas  
Delhi  
INDE*

## 1. Introduction

Le réseau d'assainissement, est une source potentielle d'apports au milieu récepteur: apports directs en cas de surverse ou de mise en chômage d'ouvrage ou apport indirect au travers de la station d'épuration. Les processus à l'œuvre dans le réseau auront donc des conséquences (plus ou moins importantes selon des modalités de rejet) sur le milieu. Dans de nombreuses stations de traitement des eaux, les coliformes thermo-tolérants sont éliminés à près de 99% (deux unités log). Avec de telles performances, il est évident qu'une faible de fuite d'eaux usées hors de la ville sans passer par la station de traitement aura des conséquences très importantes dans le milieu en moyenne annuelle. Si les fuites en question sont des rejets urbains de temps de pluie, les augmentations attendues des teneurs en coliformes dans le milieu auront lieu sur de courtes périodes de temps, avec des très fortes surconcentrations.

Cependant, le devenir des bactéries d'origine humaine dans les réseaux s'assainissement est peu étudié (Jefferies et al. 1990, Ashley et Dabrowski, 1995, Ellis et Wang, 1995). Les résultats rapportés visent à éclairer cette question. L'évolution des teneurs en coliformes fécaux a été suivie par temps sec et par temps de pluie. Les sources possibles de coliformes (sites d'érosion) ont été examinées, et la possible croissance des coliformes dans le réseau envisagée.

Le travail a pu être réalisé grâce à une collaboration avec le programme OPUR (Observation des Polluants Urbains), grâce auquel nous avons pu accéder à des sites d'échantillonnage équipés, des données de débit et de qualité de l'eau et une expertise sur le fonctionnement du réseau. Quelques séries de données ont également été obtenues à l'entrée de la STEP de Noisy-le-Grand grâce au soutien du SIAAP.

## 2. Méthodologie

Les sites d'études sont basés sur la structure mise en place dans le cadre du programme OPUR au sein du réseau d'assainissement unitaire de la ville de Paris (Kafi-Benyahia, 2006). Les stations de mesure utilisées dans le cadre de ce projet sont celle du bassin du Marais (41 ha, 10450 habitants), du collecteur des quais (P213, 844 ha, 170000 habs<sup>1</sup>), de Clichy-Centre (P219, 1364 ha, 290000 habitants) et de Clichy Aval (P120, 3003 ha, 800000 habs). Quelques séries de données ont également été acquises à l'entrée de la station de traitement des eaux de Noisy-le-Grand (Marne-Aval, 125000 équivalents habitants) ou le réseau est de type séparatif mais avec des augmentations de débit identifiables pour de fortes pluies. Les campagnes d'échantillonnage ont été réalisées au printemps 2004 et au printemps 2005.

---

<sup>1</sup> Pour les stations P213, P219 et P120, une partie de la population (en rive gauche de Seine) a été extrapolée

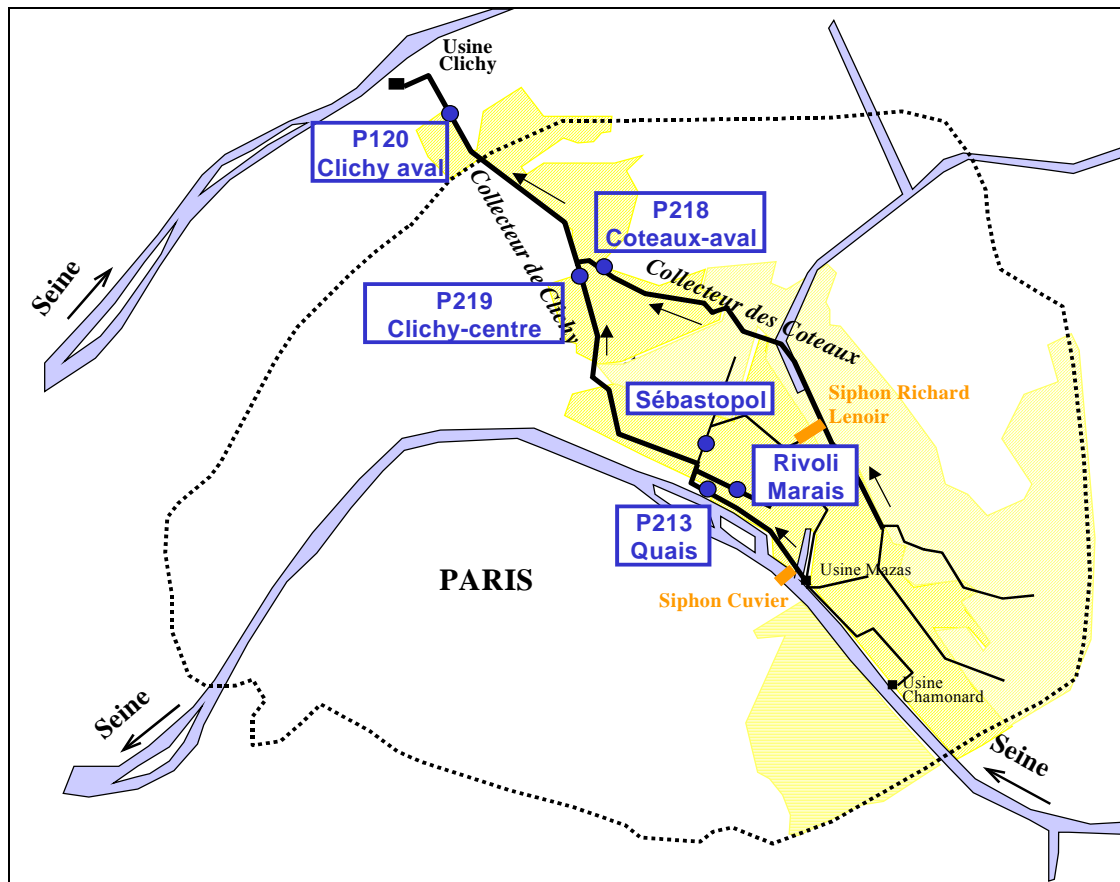


Figure 1 : Position des points de mesure installés dans le cadre du programme OPUR.

Plusieurs essais préliminaires ont confirmé qu'il n'était pas possible de conserver les échantillons plus de quelques heures à température ambiante, sans prendre le risque d'une évolution significative de la teneur en coliformes thermo-tolérants. Des échantillonneurs réfrigérés sont donc indispensables, en particulier pour l'évaluation des caractéristiques de temps sec qui demandent un cycle d'échantillonnage de 24 heures. Cependant, les contraintes techniques en réseau d'assainissement sont telles qu'il est souvent impossible d'installer de tels dispositifs (accessibilités, règles de sécurité concernant l'utilisation de matériel électrique...). Des systèmes réfrigérés étaient installés sur les sites du Marais, des quais et à l'entrée de la station de Noisy-le-Grand. Sur les autres sites, bien qu'on se soit efforcé de collecter les échantillons le plus rapidement possible, des réserves doivent être émises notamment pour les échantillons du début de la nuit (échantillonnage de 8:00 à 8:00).

Les analyses de coliformes thermo-tolérants ont été réalisées selon le protocole standard sur boîte de Pétri (sur gel Tergitol en présence de TTC) avec une période d'incubation de 24 heures à 44°C. De 3 à 5 répliquats étaient faites pour chaque dilution. On mesure de nombre d'unités formant colonie (UFC).

Par ailleurs des échantillonnages complémentaires dans plusieurs types de dépôts en réseau ont été fait pour caractériser les différentes sources potentielles par temps de pluie, ainsi que des essais de laboratoire ont été pour évaluer les facteurs de croissance des coliformes dans le réseau.

### 3. Résultats

#### 3.1. Evolution des teneurs

Elles varient dans une fourchette de  $10^6$  UFC/100 ml à  $5 \cdot 10^7$  UFC/100ml, ce qui correspond bien à la fourchette déjà annoncée pour les eaux usées (par exemple par George et al., 2002). En moyenne pour toutes les stations et pour les journées de temps sec, on obtient environ  $7 \cdot 10^{10}$  UFC pour 45 g de  $DBO_5$ , ce qui correspondrait à l'équivalent habitant parisien.

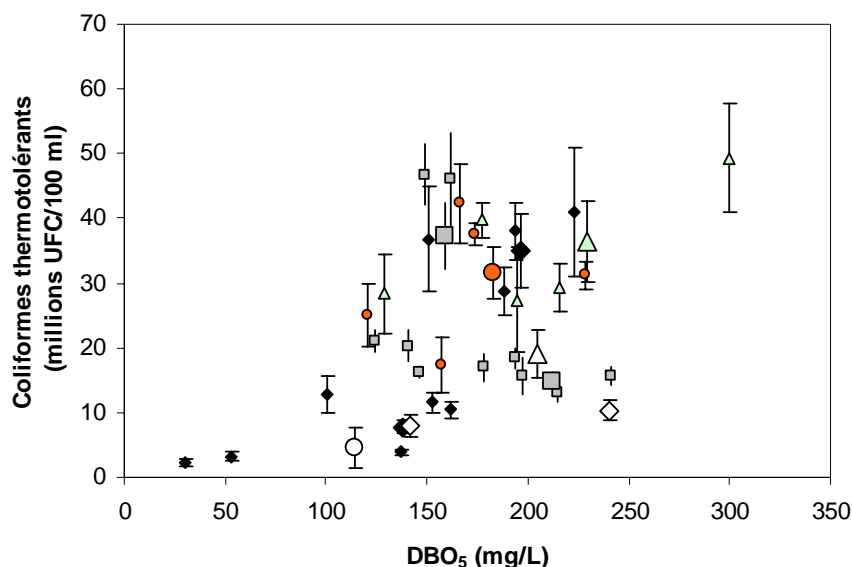


Figure 2 : Relation entre les teneurs en coliformes thermo-tolérants et la  $DBO_5$ , en général utilisée pour définir l'équivalent habitant. Données de 2004. Les losanges représentent la station du Marais, les carrés le point P213, les triangles le point P219 et les cercles le point P120. Les symboles pleins représentent les données de temps sec, par périodes de quelques heures pour les petits symboles, en moyenne journalière pour les grands symboles. Les symboles vides représentent des teneurs moyenne par événement pluvieux. Toutes les moyennes, par temps sec et par temps de pluie, ont été calculées ou mesurées pour des échantillons intégrés proportionnellement au débit.

Les écarts-types obtenus pour l'année 2004 sont de 29% en moyenne pour tous les échantillons traités (Figure 2). Ces écart-types sont issus de tests de répétabilité (3 à 5) de l'étalement sur les boîtes de Pétri après dilution, ils augmenteraient encore si l'étape de dilution était incluse dans les répliquats. Avec de tels écarts sur les mesures, il serait illusoire de vouloir atteindre une régression parfaite. On doit garder en mémoire que l'évaluation des coliformes est toujours entachée d'erreurs (et généralement présentée en échelle log, ce qui n'est pas le cas ici). Au vu de la Figure 2, il semble délicat d'établir une corrélation suffisamment nette pour évaluer la teneur en coliformes thermo-tolérants à partir d'un paramètre plus couramment mesuré.

La DCO particulière semble pouvoir être un meilleur indicateur, au moins pour l'année 2005 pour le site du Marais (Figure 3). Cependant les données de l'année 2004, pour partie acquises au Marais également et dans les mêmes conditions d'échantillonnage, ne confirment pas totalement la relation. Les données 2005 sont dans la partie basse des données Marais de 2004 constituée d'une des deux journées de référence de temps sec et les données moyennes de pluie. La station du Marais, la plus amont et la plus étudiée en 2005, semble donc avoir une spécificité par rapport aux autres stations avec en règle générale (mais pas systématiquement) un rapport coliforme sur autres paramètres ( $DBO_5$ , DCO) plus faible que dans les autres stations. Cette observation confirme partiellement l'idée qu'il y a

moins de coliformes thermo-tolérants dans les petits bassins versants (George et al., 2002). Cependant l'idée d'une augmentation progressive des teneurs en coliformes avec la taille du réseau n'est pas confirmée par nos données, en particulier celles du plus grand bassin versant (station P120), qui ne montre pas les plus fortes teneurs en coliformes. Si ce type d'hypothèse peut éventuellement être validée en moyenne, il est clair qu'elle est invalide sur une période courte (une journée donnée ou un événement pluvieux).

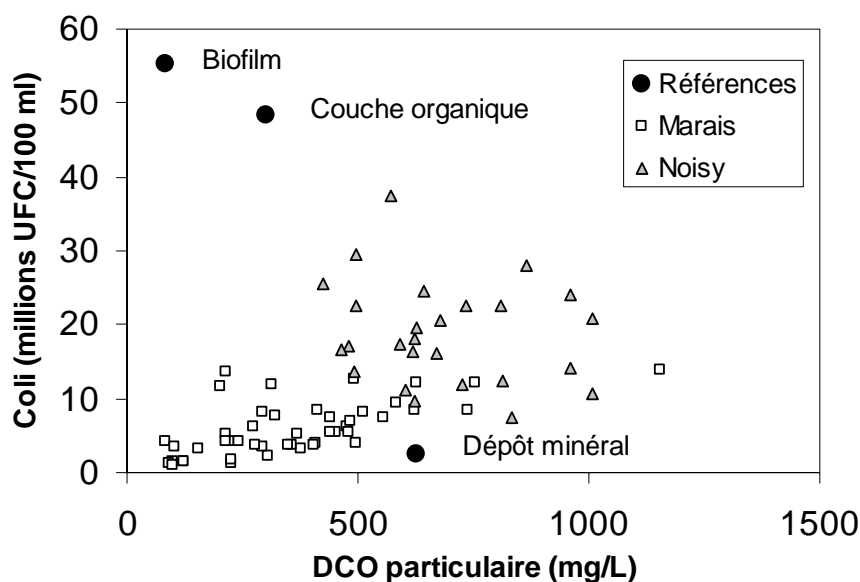


Figure 3 : Teneurs en coliformes thermo-tolérants et DCO particulaire. Résultats obtenus en 2005 à la station du Marais et à l'entrée de la STEP de Noisy-le-Grand. Échantillons de temps sec et de temps de pluie non distingués. Les ronds noirs représentent les teneurs mesurées par gramme humide des trois principaux types de dépôts rencontrés dans les réseaux : le sédiment minéral, en fond de canalisation, la couche organique, dépôt très peu consolidé au dessus du sédiment minéral, et le biofilm qui se développe dans la zone de battement de l'eau au cours du cycle jour/nuit (Ashley et al., 2004).

La relation satisfaisante avec les données de DCO particulaire suggère que les coliformes sont largement fixés sur des particules dans le réseau. Effectivement, les données de vitesse de chute acquises selon le protocole VICPOL (Gromaire et al., 2003), basé sur l'utilisation d'une cellule de décantation indépendante pour chaque pas de temps d'échantillonnage, sont similaires ou plus élevées que les vitesses de chute mesurées par la même méthode et pour le même échantillons pour des données clairement associées aux particules comme les MES ou la DCO particulaire.

Tableau 1 : Vitesse de chute de différents paramètres pour le temps sec et les pluies du 19 et du 30 avril 2004 au Marais. La moitié de l'échantillon a une vitesse de chute supérieure à  $V_{50}$ .

$V_{50}$ en m/h	MES	DCO particulaire	UFC
Temps sec	0,18	0,108	0,54
Pluie 19 avril	0,72	0,72	0,108
Pluie 30 avril	1,8	1,8	2,52



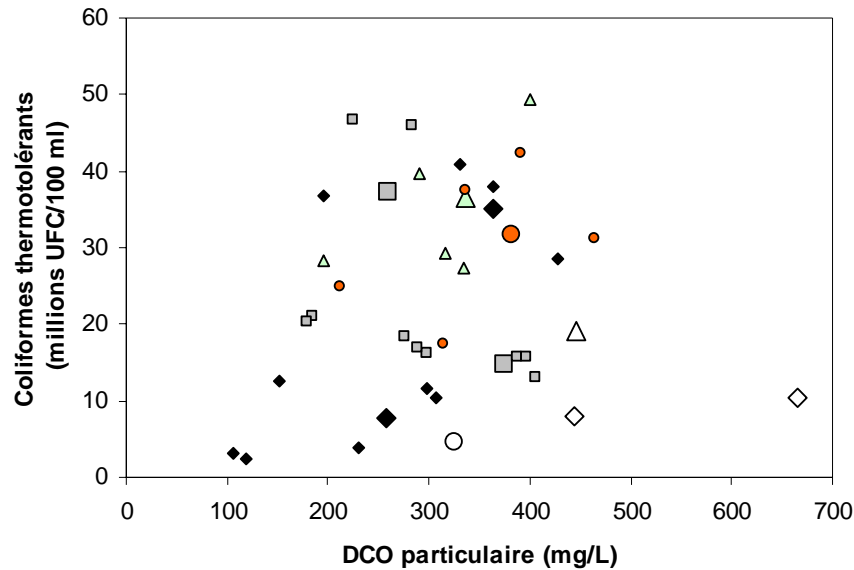


Figure 4 : Relation des coliformes thermo-tolérants à la DCO particulaire. Données 2004. Voir légende de la Figure 2.

### 3.2. Comportement en temps de pluie

Plusieurs événements pluvieux ont pu être analysés, aux différentes stations. La Figure 4 montre que les échantillons de temps de pluie (symboles ouverts) sont dans la partie basse de la figure, leurs teneurs en UFC sont donc moins élevées, en valeur absolue, mais aussi en rapport avec les autres paramètres de la qualité de l'eau.

Plus en détail, la Figure 5 montre une diminution des teneurs en coliformes thermo-tolérants en cours de pluie. D'autres données acquises en 2004 confirment le phénomène. Pour les deux pluies présentées, la DCO et mieux encore la DCO particulaire suit le même mouvement. On a donc un effet évident de dilution au cours de la pluie. Le débit de base la pluie pour chacun des événements est proche de celui de la journée du 20 mars (Figure 5), que nous prendrons comme référence, et qui indiquerait un possible pic d'érosion en début de pluie (concentrations plus élevées, à la fois en coliformes et en DCO).

L'effet de dilution progressive en cours d'événement, bien visible sur les courbes, ne doit pas masquer le fait que les quantités totales de coliformes exportées au cours de la pluie sont largement supérieures aux quantités qui auraient été exportées durant une période de temps sec équivalente, le rapport entre les deux quantités est de 5.5 et de 11.5 pour les deux événements. Il existe donc une très forte source de coliformes qui s'ajoute aux eaux usées en période de pluie, elle pourrait être constituée des eaux de ruissellement sur les chaussées, cours ou toitures, dont la qualité n'est hélas pas connue, ou encore des différents types de dépôts présents dans le réseau. Dans le cas des matières organiques (DCO, DBO), les travaux antérieurs menés sur le bassin versant du Marais ont montré que les dépôts en réseau constituaient une forte source de matière organique au moment des pluies (Gromaire et al., 2001).

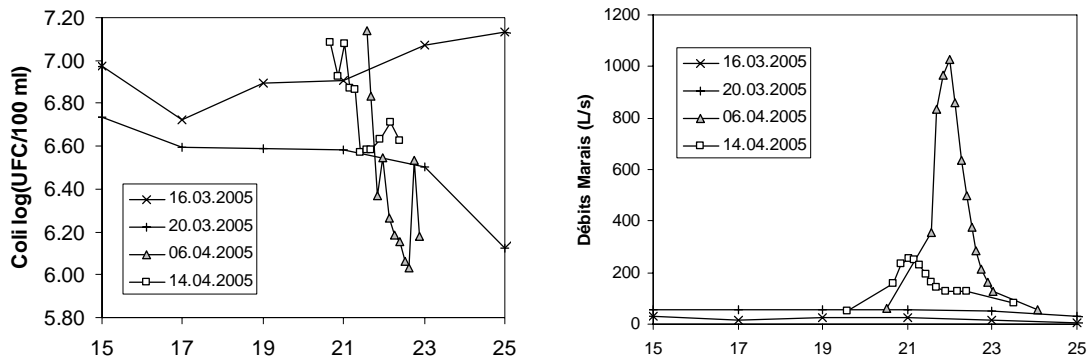


Figure 5 : Evolution des teneurs en coliformes au cours de deux événements pluvieux (6.4.1005 et 14.4.2005) sur le site du Marais. Les deux pluies, d'intensités très différentes sont arrivées en soirée, comme en témoigne les heures portées en abscisse. Les références de temps sec sont celles du 16.3.2005 et 20.3.2005.

Les solides de références de la Figure 3 indiquent comment se positionnent les principales sources potentielles de matière organiques particulaires et de coliformes dans le réseau. Si les sources principales sont bien à rechercher parmi les dépôts bien identifiés dans le réseau, nous devons conclure que le matériel transporté par temps de pluie provient pour une large part (en ce qui concerne les coliformes) du dépôt minéral et dans une moindre mesure de la couche organique et des biofilms, fortement enrichis en coliformes. D'autres éléments (bilan quantitatif des dépôts notamment) devraient cependant être apportés pour étayer cette hypothèse.

L'enrichissement de la couche organique et des biofilms en coliformes thermo-tolérants pourrait avoir plusieurs origines. D'une part, il est probable que la couche organique est en grande partie composée d'un matériel naturellement riche en coliformes fécaux, à savoir les matières fécales elles-mêmes, mais l'hypothèse d'une croissance effective des coliformes thermo-tolérants dans ces milieux particulièrement riches en matières organiques facilement dégradables ne doit pas être négligée, malgré les températures relativement basses qui règnent dans les réseaux. Des essais de laboratoire (Figure 6) ont confirmé l'importance des fortes concentrations en matières organiques, y compris particulaires, sur la croissance d'une souche d'*Escherichia Coli*.

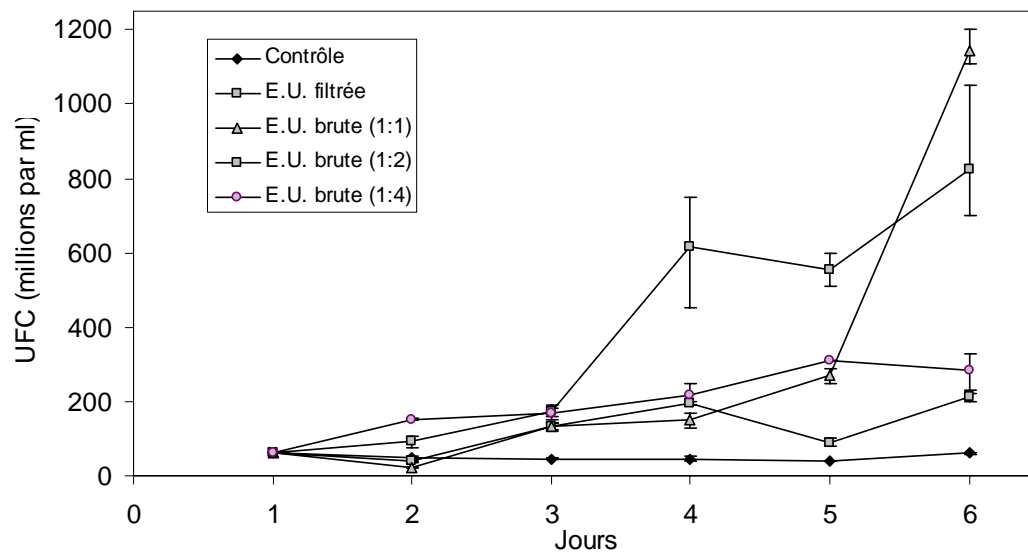


Figure 6 : Croissance de d'E. Coli dans différents milieux constitués à partir d'eaux usées du réseau parisien.

## 4. Conclusion

Ce travail a partiellement confirmé l'hypothèse précédemment émise d'une croissance possible des coliformes thermo-tolérants dans un réseau d'assainissement. Des différences ont été observées entre le plus petit bassin versant (environ 40 ha) et les autres (170000 ha et plus).

Par temps de pluie, les teneurs en coliformes sont relativement peu variables, eut égard aux très fortes variations de débit enregistrées. Les effets de dilution progressive au cours de la pluie sont des phénomènes mineurs par rapport au fait que les flux total exporté par temps de pluie est largement supérieur au flux de temps sec, ce qui suggère une source interne dans le réseau.

Cette source est probablement constituée d'un mélange de différents types de dépôts dans lesquels la croissance des coliformes est favorisée par un temps de séjour potentiellement très long et une très forte charge en matières organiques.

## 5. Références

- Ashley R.M. and Dabrowski W., Dry and storm weather transport of coliforms and fecal streptococci in combined sewage, *Water Science and Technology*, 1995, vol.31, p.311-320.
- Ashley R.M., Bertrand-Krajewski J.L., Hvitved-Jacobsen T., Verbanck M. Eds. (2004). Solids in sewers. Characteristics, effects and control of sewer solids and associated pollutants. IWA publishing, 340 pages.
- Bryan Ellis J. and Yu Wang, Bacteriology of urban runoff: the combined sewer as a bacterial reactor and generator, *Water Science and Technology*, 1995, vol.31, p.303-310.
- Chandran A., and Hatha Mohamed A.A. Survival of escherichia coli in a tropical estuary. *S. Pac. J. Nat. Sci*, 2003, vol 21, p. 41-46.
- Georges I., Crop P. and Servais P. (2002). Fecal coliforms removal in wastewater treatment plants by plate counts and enzymatic methods, *Water Research*, 2002, vol.36, p.2607-2617
- Gromaire M.C., Garnaud S., Saad M., Chebbo G. (2001). Contribution of different sources to the pollution of wet weather flows in combined sewers. *Water Research*, 2001, 35(2):521-533.
- Gromaire M.C., Saad M., Chebbo G. (2003). Répartition des polluants des eaux urbaines par classe de vitesses de chute. Partie B : Analyse des méthodes de mesure. *TSM*, 59-97.
- Jefferies C., Young H.K. and McGregor I. Microbial aspects of sewage and sewage sludge in Dundee, Scotland. *Water Science and Technology*, 1990, vol 22, p.47-52.
- Kafi-Benyahia K. (2006). Variabilité spatiale des caractéristiques et des origines des polluants des temps de pluie dans le réseau d'assainissement unitaire. Thèse ENPC, 328 pages.

# **Première évaluation de l'antibiorésistance des bactéries fécales en Seine.**

Pierre Servais et Sophie Reis

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

## 1. Introduction

La présence de microorganismes pathogènes d'origine fécale dans les eaux de surface pose d'importants problèmes sanitaires quand ces eaux sont utilisées pour la production d'eau potable, pour l'activité nautique ou l'irrigation. Les maladies infectieuses causées par ces bactéries sont traitées depuis de nombreuses années grâce à l'emploi d'antibiotiques. Cependant, l'usage croissant et massif d'antibiotiques a induit une certaine résistance des bactéries envers ces substances. En effet, les antibiotiques sont utilisés en médecine humaine mais également intensivement en médecine vétérinaire. On rencontre couramment des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les milieux où les antibiotiques sont utilisés mais également dans divers environnements comme le milieu aquatique. La présence de pathogènes antibiorésistants entraîne un risque sanitaire accru si les infections qu'ils causent ne sont pas guérissables grâce à un traitement aux antibiotiques. Ce travail s'est donc intéressé à la présence de bactéries fécales résistantes aux antibiotiques dans les eaux de surface.

L'étude de ce phénomène a été réalisée en analysant la résistance à douze antibiotiques de souches d'*Escherichia coli* isolées à partir d'échantillons d'eaux de rivière. En effet, cette espèce, appartenant au groupe des coliformes fécaux, est utilisée comme indicateur de contamination fécale. On fait l'hypothèse que la présence de souches d'*E. coli* résistantes en milieu aquatique témoigne de la présence de pathogènes d'origine fécale antibiorésistants. Différents milieux aquatiques, dont l'origine de la contamination fécale était connue ou du moins présumée, ont également été échantillonnés : eaux usées domestiques (*E. coli* d'origine humaine), eaux usées hospitalières (*E. coli* d'origine humaine, population massivement traitée aux antibiotiques), eaux de surface soumises au lessivage de terres agricoles (*E. coli* provenant d'animaux d'élevage) et enfin ruisseaux forestiers (*E. coli* provenant d'animaux sauvages non traités aux antibiotiques).

## 2. Méthodes

L'analyse de la résistance aux antibiotiques des *E. coli* a été réalisée à la fois sur des échantillons d'eau de rivières et sur des échantillons d'eau dont l'origine de la contamination fécale était connue ou du moins présumée. Des échantillons ont été prélevés dans les grandes rivières du bassin de la Seine en amont de l'agglomération parisienne : la Seine (Choisy-le-Roi), la Marne (Neuilly-sur-Marne) et l'Oise (Méry-sur-oise). Un échantillon de la Blaise (affluent de la Marne) a également été analysé ainsi qu'un échantillon prélevé dans le Robec, un affluent de l'estuaire de Seine, fortement contaminé par des eaux usées domestiques (Garcia-Armisen et al., 2005).

Par ailleurs, des eaux ont été prélevées à l'entrée et à la sortie de différentes STEPs, ainsi qu'en sortie d'un collecteur réceptionnant des eaux usées hospitalières (contamination fécale principalement d'origine humaine). Des ruisseaux agricoles dont le bassin versant était dominé par des zones pâturées ont été échantillonnés en amont de tout rejet domestique de manière à ce que la contamination fécale soit dûe au ruissellement et au lessivage des sols agricoles (contamination fécale provenant principalement d'animaux d'élevage). Finalement des ruisseaux forestiers ont également été échantillonnés en amont de tout rejet domestique (contamination fécale provenant principalement d'animaux sauvages).

La méthode utilisée dans ce travail pour déterminer la résistance aux antibiotiques est la méthode de diffusion de disques (méthode standardisée et préconisée par le Comité Français de l'Antibiogramme). Pratiquement, elle consiste à isoler tout d'abord des souches d'*Escherichia coli* à partir des boîtes de cultures initiales. Pour chaque échantillon, dix souches pures environ sont utilisées pour l'étude de

l'antibiorésistance. Celles-ci sont isolées à partir des milieux de culture Chromocult Coliform Agar ou Fluorocult. Chaque souche isolée est placée dans un tube stérile contenant 20 ml de milieu liquide Trypticase Soy Broth (TSB). Les tubes sont ensuite incubés à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une solution de turbidité égale ou supérieure à 0,5 unités McFarland, équivalant environ à 10<sup>8</sup> UFC/ml. A partir de la culture pure, on dilue la solution au 1/100 dans du Ringer stérile afin d'obtenir une densité de 10<sup>6</sup> UFC/ml et on ensemence les boîtes avec l'agar de Mueller-Hinton (gélose riche composée d'infusion de viande de bœuf, de peptone et d'amidon). Après séchage des boîtes, les disques de papier contenant des doses connues des antibiotiques à tester sont appliqués sur la gélose (six disques par boîte de Pétri) au moyen d'un distributeur. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition (zone où une croissance bactérienne n'est pas visible) est réalisée pour chaque antibiotique après 18 à 24 h d'incubation à 37 °C. A partir de ce diamètre, il est possible de déterminer la sensibilité de la souche vis-à-vis de l'antibiotique ; plus la souche est résistante , plus la zone d'inhibition est faible.

Le Tableau 1 reprend la liste des antibiotiques testés dans cette étude.

Antibiotique	Abréviation	Usage	Classe
1. Pénicilline G	P	-	Pénicilline
2. Amoxicilline	AMX	Domestique et Vétérinaire	Aminopénicilline
3. Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	Vétérinaire et Domestique	Aminopénicilline
4. Céfalotine	CF	Hospitalier et Vétérinaire	Céphalosporine 1
5. Céfotaxime	CTX	Hospitalier	Céphalosporine 3
6. Ceftiofur	XNL	Vétérinaire	Céphalosporine 3
7. Amikacine	AN	Hospitalier	Aminoside
8. Gentamicine	GM	Surtout vétérinaire	Aminoside
9. Tétracycline	TE	Vétérinaire et Hospitalier	Tétracycline
10. Acide nalidixique	NA	Domestique	Quinolone
11. Ciprofloxacine	CIP	Domestique	Fluoroquinolone
12. Enrofloxacin	ENR	Vétérinaire	Fluoroquinolone
13. Cotrimoxazole	SXT	Domestique et Vétérinaire	Sulfamide

Tableau 1. Récapitulatif des antibiotiques testés, leur utilisation et leur classe.

### 3. Résultats

Au total sur l'ensemble des échantillons analysés, 289 souches de *E. coli* ont été isolées et la résistance de chaque souche à 12 antibiotiques a été testée. Nous avons trouvé 47.1 % de souches d'*E. coli* qui étaient résistantes à au moins un antibiotique autre que la Penicilline G. Le Figure 1 reprend, tous échantillons confondus, le pourcentage de résistance à chacun des antibiotiques testés.

On remarque que toutes les souches testées sont résistantes à la pénicilline G. La pénicilline G n'est pas utilisée contre les bactéries Gram négatif en raison de la résistance naturelle de ces bactéries envers elle. C'est pourquoi cet antibiotique a été utilisé ici à titre de contrôle Ceci permet de confirmer la fiabilité de la méthode. Cet antibiotique a été remplacé en cours d'étude par le ceftiofur qui est une céphalosporine à usage strictement vétérinaire.

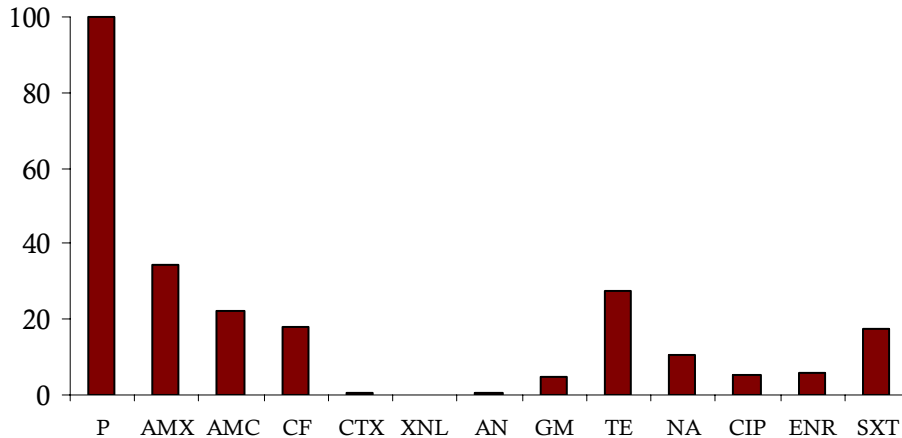


Figure 1. Pourcentage des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques

On observe, ensuite, que les taux de résistance varient nettement d'un antibiotique à l'autre. En effet, une grande partie des souches testées résiste aux antibiotiques amoxicilline, tétracycline, céfalotine et à l'association amoxicilline/acide clavulanique. Par contre, de très faibles pourcentages de résistance ont été rapportés pour la céfotaxime, l'amikacine, la gentamicine ou encore le ceftiofur.

Après avoir considéré l'antibiorésistance des souches dans leur ensemble, les taux de résistance ont été analysés en groupant les souches par type de milieu. La figure 2 présente le pourcentage de résistance aux antibiotiques pour les souches isolées des eaux de rivières et des diverses sources de contamination fécale étudiées.

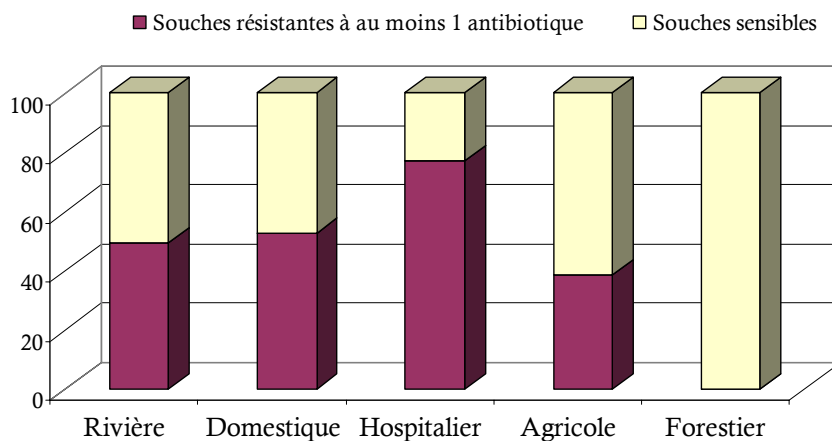


Figure 2. Pourcentage des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques par type de milieu

On remarque que les types de milieu ciblés pour les prélèvements des échantillons se différencient clairement par leur taux de résistance. On peut classer les types de milieux par taux de résistance décroissant : eaux usées hospitalières, eaux usées domestiques, rivière, rejets agricoles et enfin ruisseau forestier. Les souches prélevées dans les rejets hospitaliers présentent, de loin, les taux de résistance les plus élevés. En outre, ces pourcentages de résistance élevés sont observés envers la plupart des antibiotiques testés. On remarque que les souches provenant des eaux de rivière présentent des taux de résistance en moyenne relativement élevés et envers la quasi-totalité des antibiotiques testés excepté le ceftiofur et l'amikacine. Par contre, les souches issues des rejets agricoles présentent

des résistances relativement faibles et envers uniquement des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire excepté l'acide nalidixique. Aucune résistance n'a été observée dans les échantillons issus de ruisseaux forestiers, à l'exception de la résistance à la pénicilline G. Une analyse statistique des résultats a permis de mettre en évidence un lien clair entre les profils de résistances aux antibiotiques des *E. coli* et l'origine de la contamination fécale.

L'étude a également permis de montrer que 38.4 % des souches testées étaient multirésistantes, c'est-à-dire résistantes à au moins deux antibiotiques. Cela signifie que moins de 9 % des souches résistent à seulement un antibiotique étant donné que 52.9 % étaient sensibles à tous les antibiotiques (excepté la pénicilline). On peut donc dire que lorsqu'une souche est résistante, elle est la plupart du temps multirésistante.

La figure 3 présente les taux de multirésistance aux antibiotiques (sensibilité à au moins deux antibiotiques) par type de milieu.

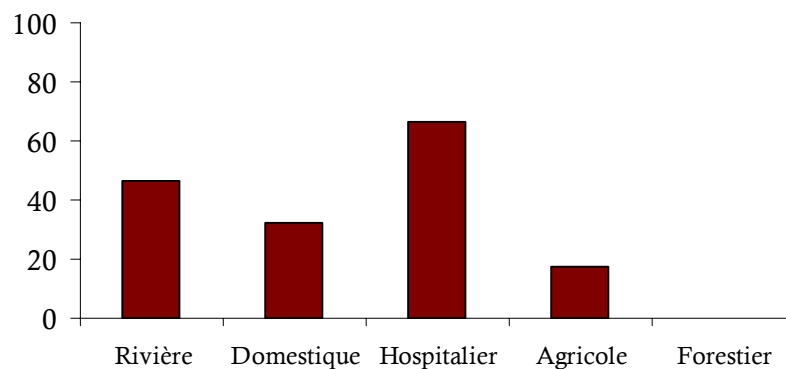


Figure 3. Pourcentages de souches *E. coli* multirésistantes dans les différents milieux.

On observe le plus grand nombre de souches multirésistantes dans les rejets hospitaliers. Ensuite, on retrouve les souches issues de rivières qui présentent de plus hauts taux de multirésistance que celles provenant de rejets domestiques ce qui est relativement surprenant. On a aussi observé que l'association de résistance la plus souvent rencontrée est celle tétracycline-amoxicilline. Ce sont également les antibiotiques auxquels le plus de souches testées résistent.

Sur l'ensemble des 289 souches de *E. coli* testées, 11 (soit près de 4 % des souches) ont présentés des résistances à au moins 8 antibiotiques.

## 4. Conclusions

L'étude de la résistance de souches d'*Escherichia coli* aux antibiotiques dans les rivières a confirmé le fait que l'utilisation d'antibiotiques tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire provoque l'émergence puis la dissémination de telles bactéries. L'existence de souches antibiorésistantes d'*E. coli* dans les rivières indique que d'autres bactéries d'origine fécale antibiorésistantes potentiellement pathogènes y sont présentes. Un risque sanitaire est donc présent étant donné que les possibilités de traitement des infections causées par ces microorganismes s'en trouvent amoindries.



L'étude de l'antibiorésistance a montré que les quatre types de milieux caractérisés par des origines différentes des bactéries fécales peuvent être classés par taux de résistance décroissant : eaux usées hospitalières, eaux usées domestiques, rejets agricoles et enfin ruisseaux forestiers. A ce sujet, les échantillons de rivière se rapprochent plutôt des échantillons de type « domestique » malgré de grandes variations entre les échantillons. Les antibiotiques auxquelles les souches issues de ces milieux résistent sont aussi très variables selon les milieux. L'analyse des souches, tous échantillons confondus, a permis de faire le lien entre consommation d'antibiotiques et taux de résistances. Bon nombre de souches multirésistantes ont également été recensées dans les divers milieux étudiés.

Cette étude préliminaire a mis en évidence la présence dans les rivières du bassin de la Seine de bactéries fécales résistantes aux antibiotiques ce qui peut poser un problème sanitaire sérieux quand il s'agit de bactéries pathogènes. Il s'agit donc clairement d'une problématique émergente à prendre en compte dans l'avenir dans les travaux du PIREN

## **5. Références**

Garcia-Armisen, T., Touron, A., Petit, F. & Sevais, P. 2005. Sources of microbiological contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries*. 28: 627-633