

La contamination d'origine fécale des eaux du bassin de la Seine

Pierre Servais ¹, Tamara Garcia Armisen ¹, Nadjeda Espinel ¹, Manuella Fouqueray ² et Jean Marie Mouchel ²

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

*2 Cereve,
Ecole Nationale des Ponts en Chaussées
6 – 8 Rue Blaise Pascal, Cité Descartes,
77455 Marne-La Vallée*

La contamination d'origine fécale des eaux du bassin de la Seine	1
1. Introduction	3
2. Développements méthodologiques.....	4
3. Apports de bactéries fécales en zones urbaines.....	6
3.1. Apports de bactéries fécales via les réseaux unitaires.....	6
3.1.1 Importance de la source pluviale pour un réseau unitaire	6
3.1.2 Processus importants en réseau d'assainissement.....	7
3.1.3 Site d'étude, échantillonnages et méthodologies	8
3.1.4 Résultats expérimentaux.....	9
3.2. Impact du traitement aux UV sur la pollution microbienne	11
4. Apports de bactéries fécales en zone rurale	15
5. Etude des processus de devenir des bactéries fécales en rivières : la mortalité bactérienne	16
6. Modélisation de la dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine.....	18
7. Références bibliographiques	20

1. Introduction

La haute densité de population du bassin de la Seine et l'intensité de l'activité agricole 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 de baignade et 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 des eaux de surface. 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 2004 ont porté sur :

- (1) la comparaison de diverses méthodes d'énumération d'*Escherichia coli*, l'indicateur de contamination fécale aujourd'hui le plus recommandé (Fewtrell and Bartram, 2001). Nous avons comparé sur des échantillons naturels provenant du bassin de la Seine, le dénombrement des *E. coli* par méthode de mise en culture en microplaques, la mesure de l'activité glucuronidasique (George et al., 2000) et la technique d'hybridation in situ avec une sonde oligonucléotidique spécifique pour le dénombrement des *E. coli* (Garcia-Armisen and Servais, 2004a);
- (2) la poursuite de la collecte de données sur les apports de bactéries fécales aux rivières en zones urbaines via les réseaux unitaires et les rejets de stations d'épuration. Jusqu'à présent dans le cadre du programme PIREN, nous nous étions attachés essentiellement à l'étude des situations de temps sec. En 2004, des efforts ont été accomplis pour évaluer les apports en bactéries fécales par les rejets urbains de temps de pluie (RUTP) des réseaux unitaires. Par ailleurs, nous avons fait une première évaluation de l'impact d'un traitement de désinfection aux UV ajoutés en fin de filière de dépollution en station d'épuration sur le rejet en rivière de bactéries fécales.
- (3) la poursuite de la collecte de données sur les apports de bactéries fécales aux rivières en zone rurale. L'impact du lessivage des sols agricoles et des rejets liés aux exploitations agricoles a été étudié dans le bassin de la Blaise.
- (4) l'étude d'un processus contrôlant le devenir des bactéries fécales en rivières : la mortalité bactérienne. En 2004, nous avons étudié le taux de mortalité des *E. coli* dans des rivières de taille diverses de l'ordre 1 à l'ordre 8 qui sont susceptibles de contenir des populations très différentes de protozoaires qui constituent la principale cause de mortalité des bactéries en rivière.
- (5) la validation des prédictions des teneurs en coliformes fécaux dans l'axe fluvial de la Seine de l'amont de Paris et l'entrée de l'estuaire à Poses calculées par l'applicatif du modèle SENEQUE.

2. 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). Elle peut aujourd'hui être employée pour le contrôle en temps réel de la qualité microbiologiques des eaux potabilisables ou des eaux de baignade (Lebaron et al., 2005).

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 relevantes, semble l'une des techniques les plus prometteuses. Dans le cadre des travaux du PIREN, nous avons mis au point une méthode d'hybridation in situ (FISH) pour le dénombrement des *E. coli* dans les milieux naturels (Garcia-Armisen et al., 2004a) 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.

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 1 à 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 (Figure 2.1). Les résultats de ce travail méthodologique ont été publiés dans la revue «Journal of Microbiological Methods ». Le texte de cette publication est repris en annexe (Garcia-Armisen et Servais, 2004b ; Annexe 1).

Sur des échantillons naturels provenant du bassin de la Seine, une comparaison de la mesure de l'activité glucuronidasique (George et al., 2000) et de l'énumération des *E. coli* viables par la technique d'hybridation in situ avec une sonde oligonucléotidique spécifique (Garcia-Armisen and Servais, 2004a) a, par ailleurs, été réalisée. Ces mesures ont permis de mettre en évidence un comportement similaire de l'activité glucuronidasique et de la viabilité mesurée par la méthode DVC-FISH lorsque on balaye une large gamme de teneurs en *E. coli*. La figure 2.2 montre que en coordonnées logarithmiques, on observe une pente proche de 1 entre les résultats des deux méthodes ce qui indique une relation linéaire entre les deux méthodes et donc une prise en compte identique des bactéries *E. coli* non cultivables par les deux méthodes. Ceci démontre la capacité de la méthode enzymatique à prendre en compte les bactéries viables mais non cultivables. En plus de l'avantage de sa rapidité, cette méthode prend donc en compte tous les *E. coli* viables ce qui n'est clairement pas le cas des méthodes basées sur la mise en culture comme celle utilisant les microplaques (Garcia-Armisen et al., 2005).

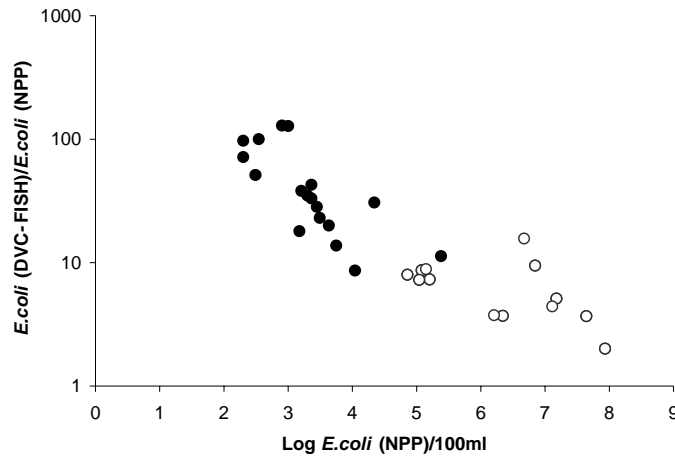


Figure 2.1. Rapport des E.coli viables énumérés par la méthode DVC-FISH et des E.coli cultivables énumérés par la méthode NPP porté en fonction du nombre de E. coli cultivables énumérés par la méthode NPP dans des échantillons d'eaux de rivières (●) et d'eaux usées (○) (Garci-Armisen and Servais, 2004b).

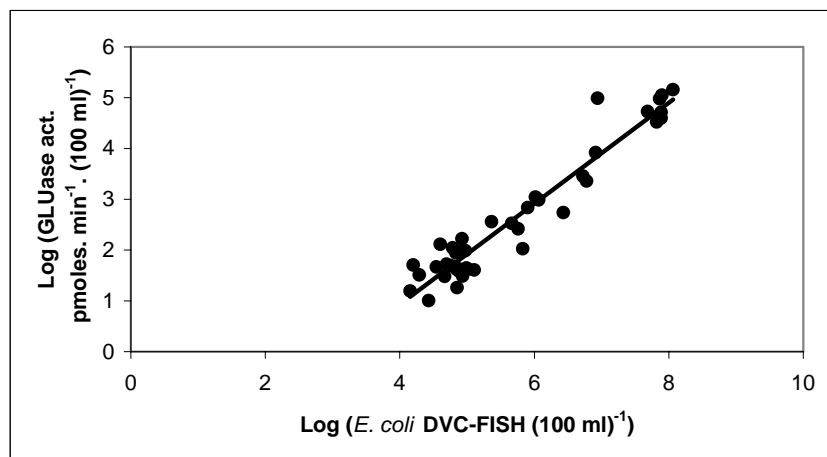


Figure 2.2. Régression linéaire en coordonnées logarithmiques entre l'activité glucuronidasique (GLUase act.) et les E. coli viables énumérés par la méthode DVC-FISH dans des échantillons d'eaux de rivières et d'eaux usées. $\text{Log (GLUase act. pmoles. min}^{-1} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}) = 0.994 \text{ Log (E. coli. (100 ml})^{-1}) - 3.053 (r^2 = 0.93, n=41, p < 0.001)$. (Garci-Armisen et al., 2005)

3. Apports de bactéries fécales en zones urbaines

Dans les bassins versants anthropisés, les rejets d'eaux usées domestiques constituent, à priori, la source principale de contamination fécale du milieu naturel.. En 2004, des efforts ont été accomplis pour évaluer les apports en bactéries fécales par les rejets urbains de temps de pluie (RUTP) des réseaux unitaires et pour évaluer l'impact sur la pollution fécale d'un traitement de désinfection aux UV ajoutés en fin de filière de dépollution en station d'épuration.

3.1. Apports de bactéries fécales via les réseaux unitaires

3.1.1 Importance de la source pluviale pour un réseau unitaire

L'importance des rejets urbains de temps de pluie sur la contamination du milieu naturel par des germes pathogènes demeure très mal connue aujourd'hui car les données sur le niveau de contamination de ces rejets sont très rares. Comme celles des eaux usées, les teneurs en bactéries fécales sont élevées dans les eaux usées des réseaux unitaires, mais les fourchettes de valeurs citées sont très fluctuantes, plus encore par temps de pluie que par temps sec. (Chebbo et al., 1995 ; Hogland et al., 1984). Jefferies et al. (1990) et Ashley et Dabrowski (1995) indiquent des valeurs variant entre $2 \cdot 10^4$ et 10^8 dans le réseau unitaire de Dundee (Ecosse). Le niveau de contamination des réseaux pluviaux stricts (ou réputés tels) est encore plus variable, les niveaux peuvent être relativement faibles dans un réseau bien séparé (Aalderink et al., 1990), mais des mauvais branchements ou des déversements imparfaitement maîtrisés provenant de la partie "eaux usées" du réseau peuvent considérablement augmenter ces teneurs.

Des bilans simplifiés permettent de donner des ordres de grandeur des contributions respectives des RUTP d'un réseau unitaire (ou pluvial) (Chebbo et al., 1995). Ils sont basés sur des rapports de volumes déversés par les stations d'épuration après traitement ou déversés par les rejets urbains de temps de pluie. Il sont évidemment extrêmement variables d'une ville à l'autre en fonction de la technologie de traitement utilisée, et de la structure et du mode de gestion du réseau (existence de facilités de stockage par temps de pluie en particulier).

Suivant cette méthode, on peut estimer, à partir d'ordres de grandeurs sur les concentrations dans chacun des types d'effluents (eau des RUTP de réseaux unitaires, eaux de ruissellement pluvial), la contribution des différentes sources de contamination au milieu récepteur en fonction de l'efficacité de la station d'épuration et des capacités installées sur le réseau pour limiter les déversements (capacités de stockage, système de gestion temps réel etc...). La Figure 3.1 montre que selon le rapport de concentration en coliformes entre eaux usées de temps sec et eaux unitaires de temps de pluie, la stratégie la plus efficace en moyenne annuelle peut être très différente. Il est donc important de bien caractériser les eaux de temps de pluie dans le réseau unitaire parisien pour orienter les stratégies. Si on s'intéresse en priorité aux pics en période pluvieuse, c'est évidemment la limitation de rejets de temps de pluie qui est la seule stratégie efficace.

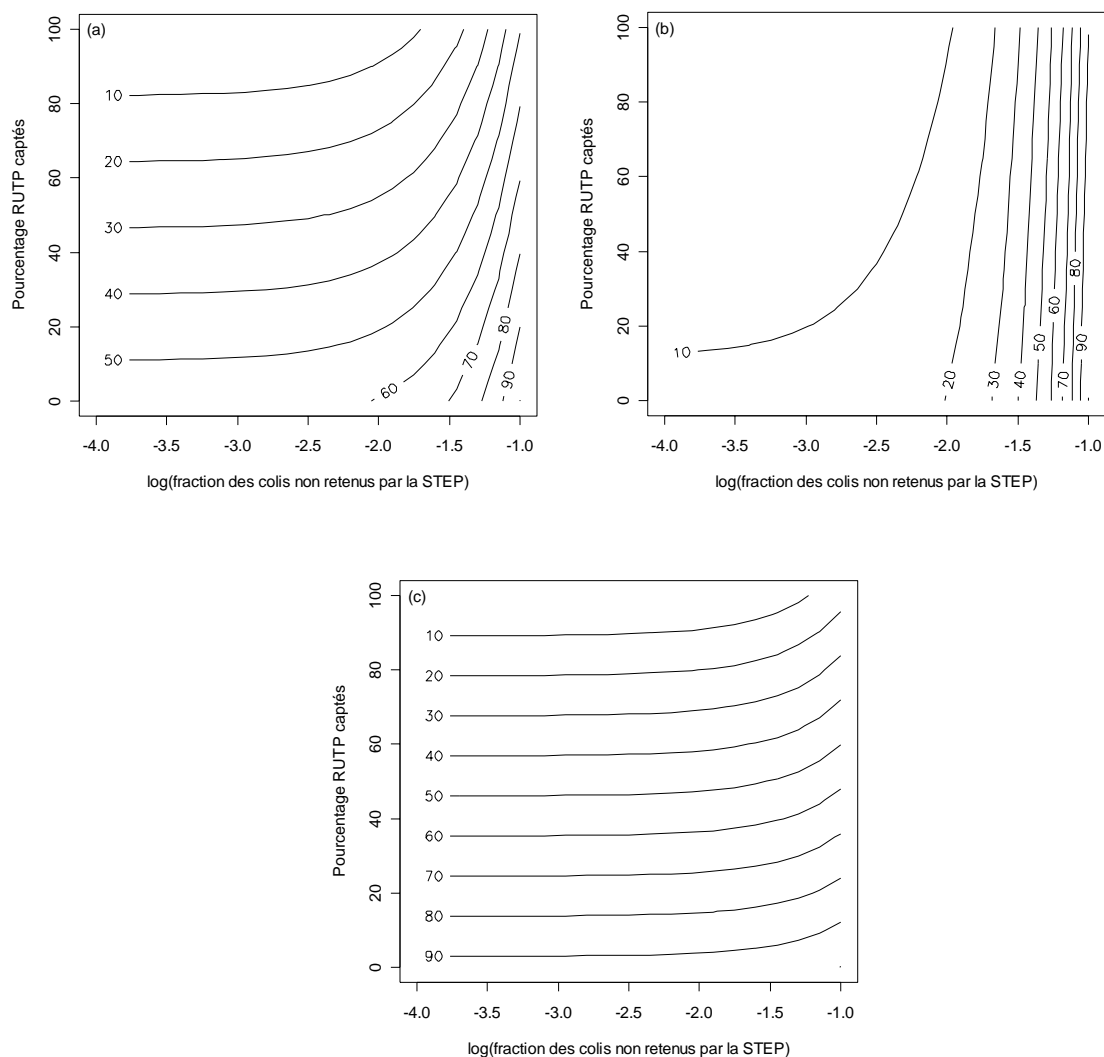


Figure 3.1: Efficacité de différentes stratégies de gestion, exprimé en pourcentage de coliformes émis par la ville en référence à une situation où le rendement de la station est de 90% et où aucune capacité de traitement du temps de pluie n'existe. En abscisse, l'efficacité de la STEP pour éliminer les coliformes fécaux (de 10^4 à 10^1), en ordonnée, fraction des rejets urbains de temps de pluie retenue puis traitée par la STEP. La teneur en coliformes fécaux des eaux usées est supposée égale à $10^7/100$ ml, trois hypothèses sont faites sur les teneurs en coliformes totaux dans les eaux déversées, $10^7/100$ ml (a), $10^6/100$ ml (b) et $10^8/100$ ml (c). Les hypothèses de calcul sont celles d'une ville imperméabilisé à 40%, avec 300 habitants par ha, une production d'eaux usées de $0.2 \text{ m}^3/\text{hab}/\text{j}$ et une pluviométrie annuelle de 700 mm.

3.1.2 Processus importants en réseau d'assainissement

Plusieurs processus sont susceptibles d'influencer les teneurs en bactéries indicatrices dans un réseau d'assainissement en plus de la variabilité des sources. Les principaux sont : la sédimentation, et son corollaire la resuspension en cas d'accroissement de débit, la croissance des micro-organismes et différents facteurs de perte tel que la broutage par les protozoaires ou différents types de compétitions/inhibitions en présence d'autres micro-organismes.

L'effet de la sédimentation a été largement rapporté dans les milieux aquatiques où on peut montrer à la fois des accroissements significatifs des teneurs dans l'eau en cas de montée de débit et d'érosion, et des teneurs élevées en bactéries indicatrices dans les sédiments (Pommeppy et al., 1992), qui

témoignent d'un certain niveau de survie de ces bactéries. L'association des bactéries indicatrices aux particules est avérée également dans le cas de la Seine et des stations d'épuration qui ont été étudiées dans son bassin (Georges et Servais, 2002). Par ailleurs, de nombreux travaux ont montré l'importance de la fraction fixée sur les particules pour de nombreux contaminants dans les réseaux unitaires (Gromaire et al., 2001 ; Chebbo et al., 2003). L'effet du broutage a été démontré dans le bassin de la Seine comme ailleurs, il pourrait être très important dans le réseau également, malgré un plus faible niveau d'oxygénation des eaux.

Une question qui reste plus ouverte est celle de la croissance de ces organismes (Ellis et Wang, 1995). Elle est réputée impossible dans nos milieux tempérés. Cependant, outre la température, la teneur en éléments nutritifs est un des facteurs qui favorise la croissance des micro-organismes. Dans le cas de ces bactéries adaptées à des milieux très riches, les constantes de Michéalis qui déterminent l'apparition d'un effet de saturation sont probablement très élevées également, et on peut penser que les teneurs élevées en DBO₅ dans les réseaux d'assainissement pourraient être favorables à une croissance malgré les températures relativement basses des réseaux d'égout. Georges et al. (2002) ont montré que la quantité de coliformes fécaux exportés par habitant et par jour augmentait avec la taille du réseau d'assainissement, ce qui laisse à penser que le réseau d'assainissement n'est pas un simple transporteur neutre des germes fécaux, mais que des processus d'intensité différente en fonction de la morphologie du réseau peuvent les affecter. Au sein du réseau de Dundee, Ashley et Dabrowsky (1995) montrent aussi des concentrations croissantes en moyenne par temps sec à l'exutoire de bassins versants superficie croissante.

Les trois facteurs (effets des particules, broutage et compétition, croissance) et doivent donc être évalués dans les réseaux d'assainissement, ainsi que leur effet global sur l'évolution temporelle (temps sec versus temps de pluie) et spatiale des teneurs en coliformes dans les réseaux.

Ce type d'étude a été lancé au cours de l'année 2003 en complément des travaux déjà réalisés dans le cadre du programme PIREN-Seine pour mieux identifier la source urbaine de contamination. On tire parti de l'observatoire OPUR mis en place dans l'agglomération parisienne et dont les structures (facilités d'échantillonnage, données annexes validées...) doivent nous permettre de mieux identifier les flux de contamination et les processus au sein du réseau unitaire parisien.

3.1.3 Site d'étude, échantillonnages et méthodologies

Dans le cadre de l'observatoire OPUR, l'exutoire de 6 sous-bassins versants a été équipé de systèmes d'échantillonnage et de mesures de débit (Figure 3.2). Par ailleurs, les collaborations établies avec les services techniques de la ville de Paris permettent d'accéder aux autres informations pertinentes (pluie, fonctionnement du réseau, etc....).

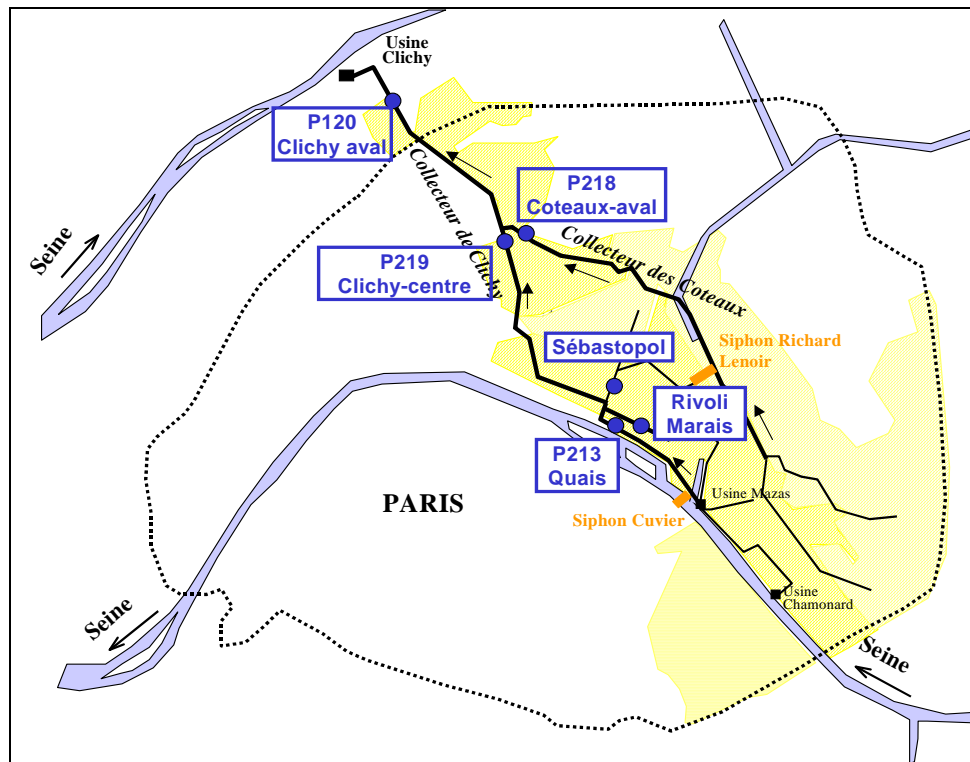


Figure 3.1 : Les stations de mesure mises en place dans le cadre du programme OPUR

Trois campagnes de temps sec ont permis de collecter des échantillons pour caractériser les variations journalières de concentration en différents points du réseau, et pour évaluer les vitesses de chutes des coliformes, et par là évaluer leur degré d'association avec des particules. Dans le cas d'échantillonnage non réfrigéré, les échantillons ont toujours été collectés moins de trois heures après le prélèvement. Des études de laboratoire ont montré qu'il s'agissait de la plus grande durée de stockage possible à température ordinaire avant des variations parfois très importantes (dans un sens comme dans l'autre, ce qui est indicatif du potentiel de croissance de ces bactéries). Toutes les stations n'ont pas pu être échantillonnées au cours de chaque campagne de temps sec. Le protocole VICPOL a été utilisé pour l'évaluation des vitesses de chute. Il est basé sur l'utilisation de plusieurs colonnes de sédimentation en parallèle, leur dimensionnement ayant été optimisé (Bhourri, 2003).

La même stratégie d'échantillonnage a été suivie par temps de pluie avec un échantillonnage pour évaluation des vitesses de sédimentation, et deux échantillonnages spatialisés.

Les coliformes fécaux cultivables ont été évalués par des dénombrements sur boîte de Pétri après incubation à 44 °C sur un milieu de culture sélectif (milieu TTC-Tegitol selon la norme AFNOR NF T90-414).

Les échantillons d'eaux usées sont conservés à 4°C avant analyse. L'échantillon est soniqué (15 secondes, appareil Transsonic 275, 35kHz, Prolabo) pour homogénéisation et séparation des bactéries fixées sur les particules, puis dilué (1/2, 1/20, 1/200 et 1/2000) à l'aide d'une solution de Ringer (Fischer). Cent µL sont ensuite étalés sur le milieu sélectif, gélose lactosée au Tergitol 7-TTC (OXOID)(procédure selon la norme AFNOR NF T90-414). Pour chaque échantillon, entre 3 et 5 réplicats sont effectués, l'incubation dure 24h à 44°C±1°C, avant la lecture.

3.1.4 Résultats expérimentaux

La Figure 3.3 montre des évolutions journalières marquées en temps sec à l'exutoire du bassin versant du Marais avec de teneurs en coliformes fécaux qui varient de $2 \cdot 10^6$ à $1.2 \cdot 10^7$ / 100 ml. Ces variations sont bien en phase avec les variations des débits, de la DCO totale et des MES. Elles sont probablement dues à la fois à la variation journalière des apports par les habitants et à la variation des débits qui peuvent favoriser un phénomène de dépôt/resuspension au cours de la journée.

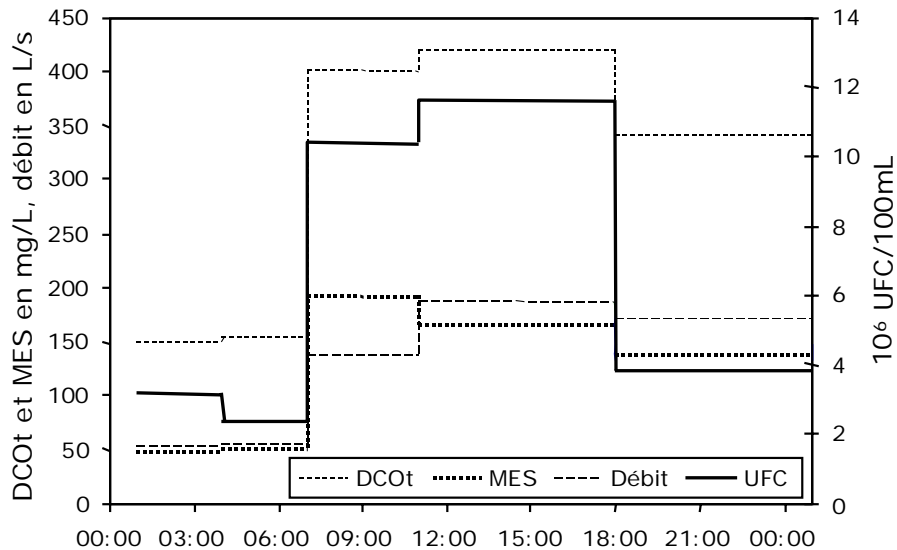


Figure 3.3: Evolution temporelle des teneurs en coliformes fécaux pour 5 échantillons reconstitués au cours de la journée du 1^{er} avril à l'exutoire du bassin versant du Marais. La DCO totale, les MES et les débits moyens correspondant aux périodes d'intégration des échantillons sont reportés également.

Les autres séries journalières de mesures de coliformes fécaux n'ont pas donné de résultats facilement corrélables au fonctionnement du réseau. Dans tous les cas, les teneurs ont varié entre $1.2 \cdot 10^7$ et $4.5 \cdot 10^7$ / 100 ml, soit une plage de valeurs relativement consistante mais qui se situe au delà de la plage obtenue au Marais le 1^{er} avril. Il est encore trop tôt pour établir qu'un mécanisme d'apport de coliformes (croissance, resuspension ?) est à l'œuvre et lisse les variations attendues au cours des cycles jour/nuit. Mais l'hypothèse est faite, et elle devra être validée ou invalidée au cours des campagnes à suivre.

En temps de pluie, les premiers résultats (Figure 3.4) montrent un effet de dilution pour la pluie la plus forte (17.5 mm), mais peu d'effets notables pour la pluie plus faible (4.5 mm). Au moment de la plus forte dilution, les teneurs descendent à $2 \cdot 10^6$ UFC/100 ml, soit près d'un facteur 10 en dessous de ce qu'on observe au mêmes points après la pluie.

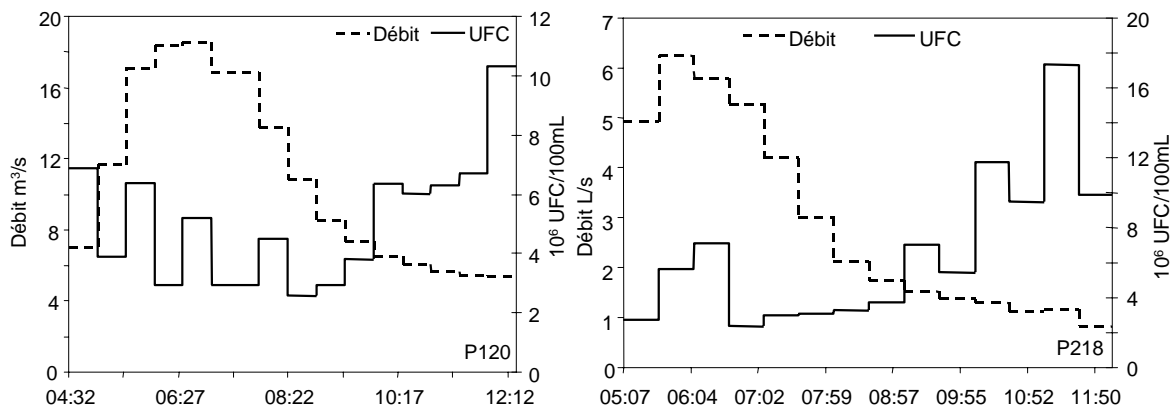


Figure 3.4 : Evolution des concentrations en coliformes fécaux par temps de pluie en deux stations dans le réseau.

Ces premières campagnes ont permis d'esquisser de possibles évolutions systématiques de teneurs en coliformes fécaux dans le réseau unitaire parisien. Il est nécessaire de confronter nos hypothèses à de nouvelles données.

3.2. Impact du traitement aux UV sur la pollution microbienne

Par temps sec, la plupart des rejets domestiques urbains sont aujourd'hui traités en station d'épuration (STEP). 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 STEP, 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 STEP 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). La Figure 3.5 présente, par exemple, les abattements en coliformes fécaux mesurés sur les usines du SIAAP en région parisienne.

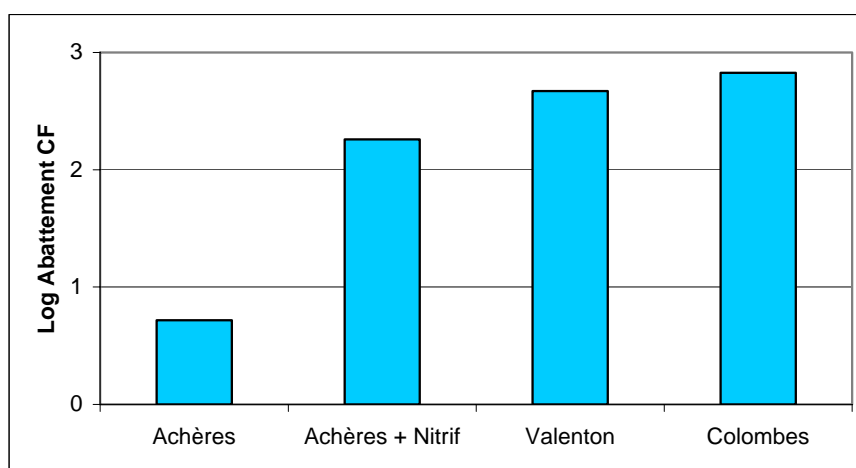


Figure 3.5. Abattement en unité logarithmique des coliformes fécaux dans les STEP du SIAAP.

Malgré les abattements observés dans les STEP, les eaux usées issues des stations d'épuration 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., 2004c). Une amélioration de la qualité microbiologique passe donc par une augmentation de l'efficacité d'abattement de la pollution fécale des STEP 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 testé par le SIAAP à la STEP de Noisy. Une évaluation de l'efficacité d'abattement de la pollution fécale par les STEP incluant une étape de désinfection aux UV a été entreprise. Les STEP suivantes ont été échantillonnées en entrée et en sortie de filière de traitement : Sainte Marie, une STEP du Roussillon qui, en été, pratique la désinfection aux UV en aval d'une filtration sur sable; Dieppe et Veules les Roses, deux STEP de Normandie pratiquant la désinfection UV car situées en zone sensible ; une unité pilote de désinfection aux UV installée à l'Usine de Noisy en banlieue parisienne. Les résultats d'abattement global en coliformes fécaux de l'ensemble de la filière de ces STEP sont présentés à la Figure 3.6.

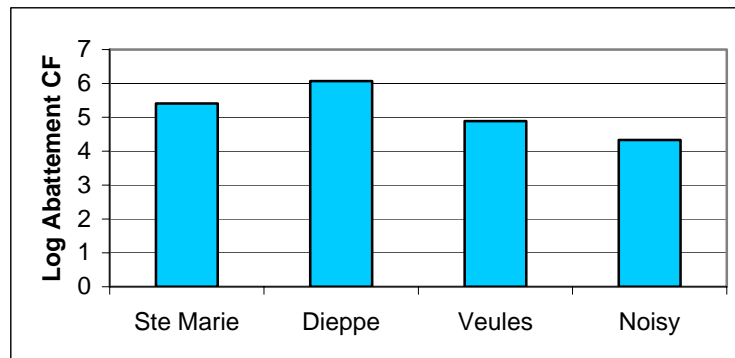


Figure 3.6. Abatement en unité logarithmique des coliformes fécaux dans les STEP_s échantillonnées qui pratiquent la désinfection aux UV.

Alors que dans les STEP_s n'incluant pas d'étape de désinfection, l'abattement maximum en coliformes fécaux est de trois unités Log, dans les STEP_s incluant une désinfection aux UV l'abattement moyen est d'environ 5 unités Log. Cela signifie que, le gain d'abattement en coliformes fécaux est compris entre 2 et 4 unités Log, ce qui est très considérable. Ces résultats ainsi que la quasi totalité des résultats présentés dans la littérature sur l'abattement des bactéries fécales par un traitement de désinfection aux UV sont basés 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 estimé par différentes méthodes l'efficacité de la désinfection aux UV (mesure en entrée et en sortie du traitement UV) sur les STEP_s de Dieppe, Veules les Roses et sur le pilote UV de Noisy. Les méthodes suivantes ont été utilisées: coliformes dénombrés sur milieu gélosé spécifique, *E. coli* cultivables dénombrés par la méthode des microplaques, *E. coli* viables déterminés par la méthode DVC-FISH et estimation de l'activité glucuronidase des *E. coli*. Les résultats de cette comparaison sont présentés à la Figure 3.7. Les abattements des coliformes fécaux et des *E. coli* estimés par des méthodes basées sur la mise en culture ne sont significativement différents, mais sont significativement supérieurs à ceux mesurés pour les *E. coli* viables mesurés par la méthode d'hybridation in situ couplée à une mesure de viabilité. Les abattements mesurés par l'activité enzymatique des *E. coli* sont, pour leur part, très faibles. A ce stade, on peut avancer les hypothèses suivantes pour expliquer ces différences. Le traitement aux UV affecte prioritairement l'ADN en favorisant la formation de dimère entre les bases de l'ADN ce qui a pour conséquence d'empêcher 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 photorepair). 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. La méthode enzymatique, pour sa part, nécessite uniquement que l'enzyme glucuronidase soit présente et associée à une structure cellulaire retenue sur un filtre de porosité 0.2 µm (le protocole de mesure de l'activité enzymatique retenue sur un filtre de porosité 0.2 µm). La question qui 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. Il semble, à ce stade, difficile de trancher, même si certains auteurs (Villarino et al., 2000) ont avancés que la méthode DVC-FISH semblait la méthode la plus judicieuse à utiliser pour évaluer l'effet réellement létal des UV sur les bactéries. Des expériences de laboratoire visant à confirmer et à expliquer les différences d'efficacité

observée dans les STEPs seront entreprises en 2005 dans le cadre du PIREN ; leur objectif final sera de proposer une méthode pertinente pour évaluer correctement l'effet des UV. Ceci apparaît très important à un moment où des investissements importants dans ce type de traitement sont envisagés pour améliorer la qualité microbiologique des eaux de surface.

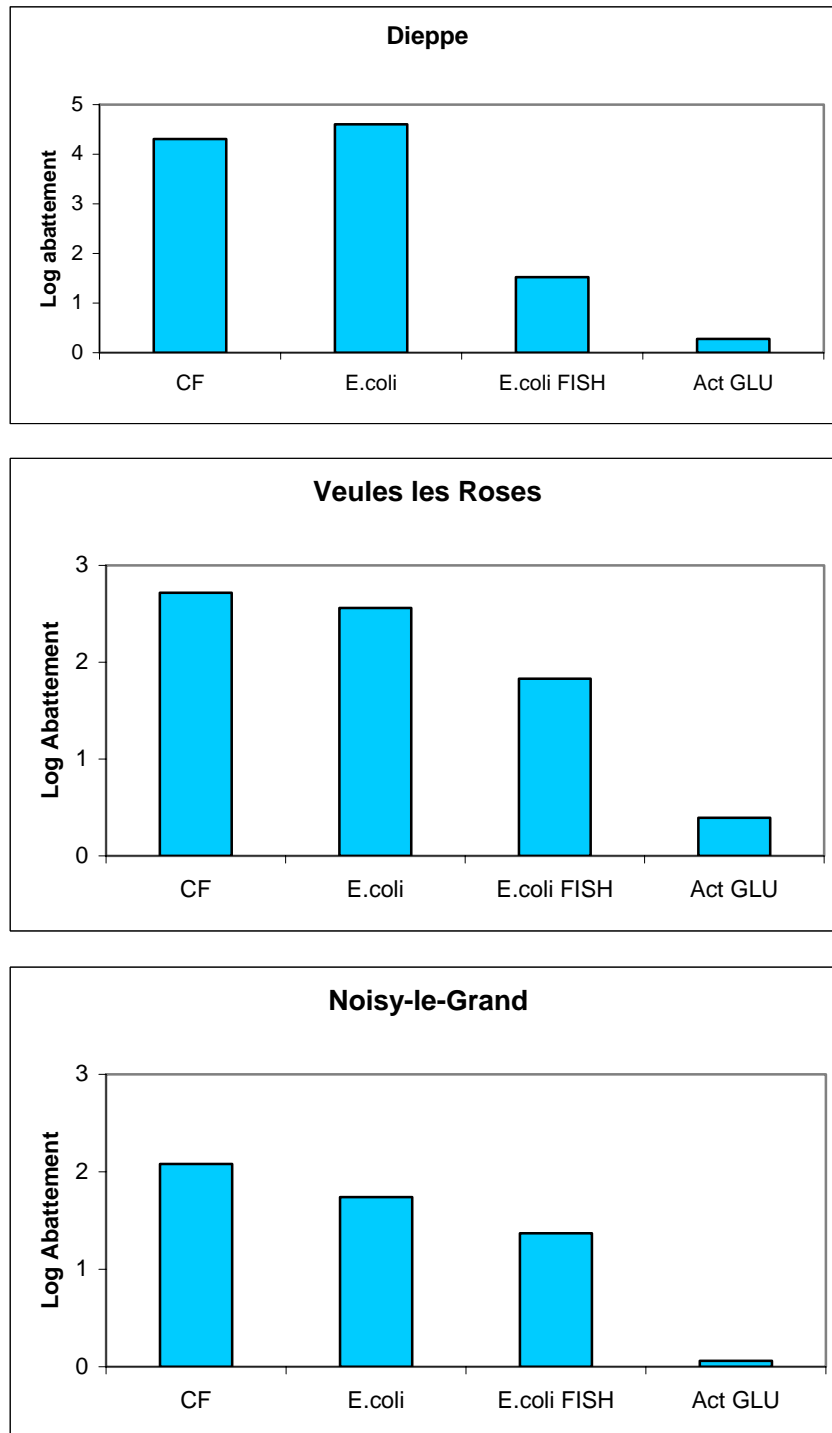


Figure 3.7. Abattement en unité logarithmique lors du traitement aux UV des coliformes fécaux dénombrés sur milieu gélosé spécifique, des *E. coli* cultivables dénombrés par la méthode des microplaques, des *E. coli* viables déterminés par la méthode DVC-FISH et de l'activité

*glucuronidasiqne des E. coli dans les STEPs de Dieppe , Veules les Roses et Noisy (unité
piloite UV).*

4. 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, (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. L'étude des apports diffus a, par la suite, été étendue 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) (Garcia-Armisen and Servais, 2004c). En 2004, des mesures complémentaires ont été réalisées sur les apports par lessivage des sols dans le bassin de la Blaise. Pour évaluer les apports diffus de coliformes fécaux dans ce bassin hydrographique, 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 zone forestière et des ruisseaux s'écoulant en zone agricole ont été échantillonnés. Cette stratégie d'échantillonnage avait déjà été utilisée avec succès par George et al. (2004) dans le bassin amont de l'Oise. Des campagnes de mesures ont été réalisées lors de situations de temps sec et lors de situations de temps de pluie afin d'évaluer l'impact des conditions climatiques. Les résultats sont présentés à la figure 4.1.

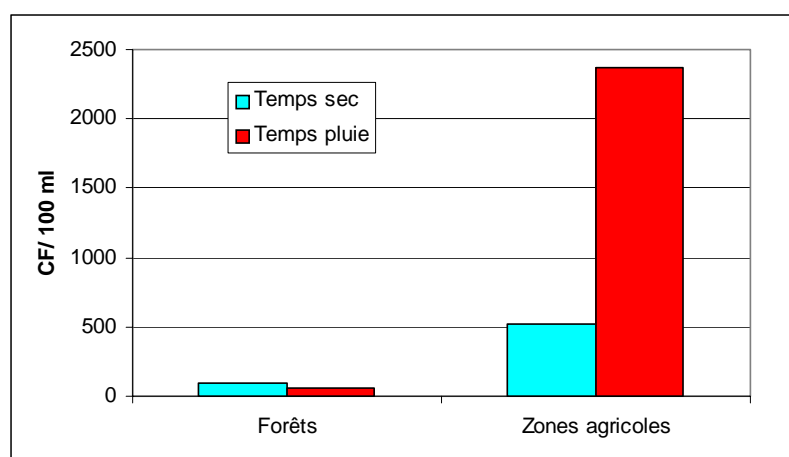


Figure 4.1. Concentration en coliformes fécaux résultant du lessivage des sols forestiers et agricoles dans le bassin de la Blaise par temps sec et par temps de pluie.

En zone forestière, on n'observe pas d'effet des conditions climatiques et les valeurs d'abondance en coliformes fécaux résultant du lessivage des sols sont de l'ordre de 100 CF/100 ml. Cette valeur est très proche des valeurs trouvées pour des ruisseaux forestiers dans le bassin de l'Oise et dans ceux de l'Andelle et de la Risle (George et al., 2004). En zones agricoles, les valeurs sont très significativement plus élevées, de l'ordre de 500 CF/ 100 ml par temps sec et plus de 2000 CF/ 100 ml par temps de pluie. Ici, l'effet du ruissellement de temps de pluie est bien marqué comme déjà mis en évidence sur d'autres secteurs du bassin (George et al., 2004). Les valeurs observées en zones agricoles sont du même ordre de grandeur que celles observées pour des zones de pâtures dans le bassin de l'Oise par George et al. (2004).

Des mesures ont par ailleurs été entreprises pour quantifier les apports de bactéries provenant directement des exploitations agricoles. Cette dernière action a également été menée sur le bassin de la Blaise et ses résultats sont repris dans le rapport « Caractérisation des écoulements de temps sec et de temps de pluie dans le bassin de la Blaise: résultats des campagnes de mesure ».

5. Etude des processus de devenir des bactéries fécales en rivières : la mortalité bactérienne

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 quantifié 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 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.

Jusqu'à présent, les mesures de mortalité bactérienne entreprises dans le bassin de la Seine s'étaient limitées à la Seine en aval de l'agglomération parisienne (George et al., 2001c; Menon et al., 2003). En 2004, nous nous sommes attachés à l'étude de la mortalité bactérienne sur des échantillons provenant de divers types de rivières du bassin pour voir quel était l'impact de la taille de la rivière sur la vitesse de mortalité des bactéries fécales. En fait, des rivières de différents ordres(de l'ordre 1 à l'ordre 8) ont été échantillonnées au début de l'été 2004 et la mortalité bactérienne a été mesurée par la méthode basée sur la décroissance du marquage radioactif de *E. coli* (Garcia Lara et al., 1991 ; Menon and Servais, 1991 ; Menon et al., 2003). Deux à trois rivières de chaque ordre ont été échantillonnées en juin 2004 dans la bassin de la Seine (à l'exception de l'ordre 8 où seule la Seine à l'aval de paris a été échantillonnée).

La figure 5.1. présente les valeurs moyennes par ordre des taux de mortalité obtenus lors de la campagne réalisée dans le bassin de la Seine en Juin 2004. Les valeurs de taux de mortalité totale obtenues sont comprises entre 24×10^{-3} et $35 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$.

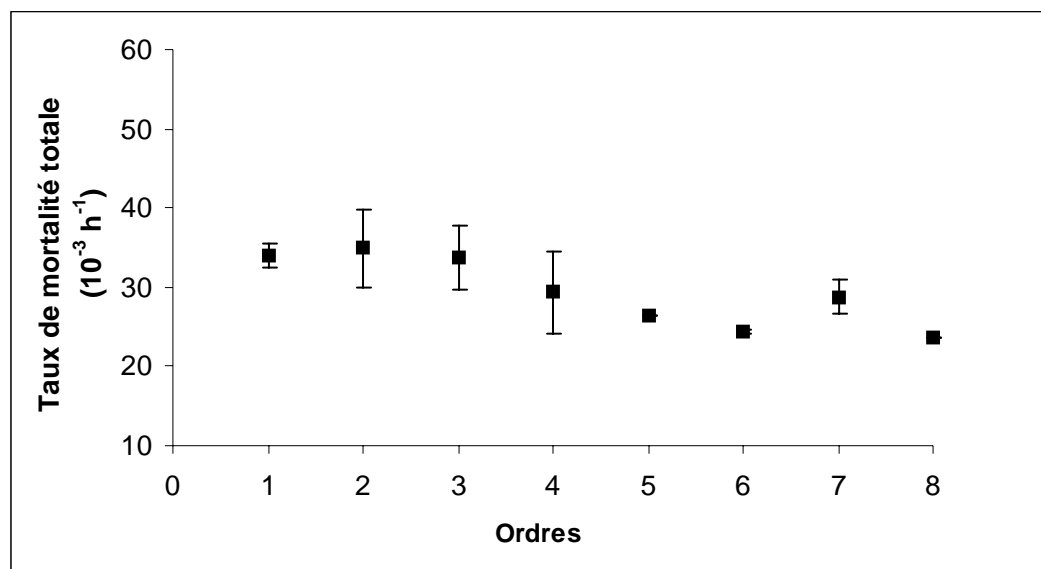


Figure 5.1: Moyennes des taux de mortalité totale (h^{-1}) des *E. coli* en fonction de l'ordre des rivières (campagne de Juin 2004).

Sur base de mesures de taux de disparition *in situ* estimés dans des rivières normandes d'ordre 2 à 5, Beaudéau et al. (1998) avaient observé une décroissance du taux de disparition des coliformes fécaux avec l'accroissement de l'ordre des rivières. Dans nos résultats, on n'observe pas de tendance claire de variation du taux de mortalité avec l'ordre des rivières. Les taux de mortalité sont assez constants quelque soit l'ordre de la rivière. Il existe une différence majeure entre nos mesures de taux de mortalité et les estimations de taux de disparition *in situ* de Beaudéau et al. (1998). Nos mesures ne prennent pas en compte la sédimentation alors que les mesures *in situ* la prennent. Il est possible que les variations de taux de disparition en fonction de l'ordre soit liée à une sédimentation plus rapide dans les rivières de petits ordre qui sont moins profondes. Dans le modèle SENEQUE (voir section 6), la sédimentation étant prise en compte indépendamment de la mortalité, nous prendrons donc, en fonction des résultats expérimentaux, un temps de mortalité identique quelque soit l'ordre de la rivière considérée.

En comparant, ces résultats avec ceux obtenus précédemment avec la même méthode, on observe que les valeurs obtenues dans ce travail pour les rivières les plus grandes, d'ordres 6, 7 et 8 (valeurs comprises entre 23.7 et $28.75 * 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) sont du même ordre de grandeur que les valeurs obtenues pour la Seine d'ordre 8 par Menon et al. (2003) et par Servais et al. (1985) dans la Haute Meuse belge (ordre 7) en période estivale.

Diverses études ont montré l'importance prépondérantes 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 naturelles (Servais *et al.*, 1989, 1992 ; Menon et al., 2003). Dans ce travail, le taux de mortalité due à la lyse et le taux de mortalité due au broutage par les protozoaires (flagellés et ciliés) ont été estimé sur chacun des échantillons provenant des rivières de différents ordres. Les résultats montrent que le broutage par les protozoaires est responsable, en moyenne, de 75 % de la mortalité totale des *E. coli* dans les échantillons prélevés dans les rivières de divers ordres en juin 2004. En pourcentage, la mortalité due au broutage représente, en moyenne, la même part de la mortalité totale quelque soit l'ordre de la rivière dont provient l'échantillon. Le broutage par les protozoaires est clairement le facteur prédominant responsable de la mortalité des *E. coli* dans les rivières des différents ordres.

6. 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'appliquatif 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'appliquatif 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 2004 a consisté à valider l'appliquatif SENEQUE par comparaison des calculs du modèle avec des résultats expérimentaux.

Des simulations avaient été réalisées en 2003 à l'aide de l'appliquatif SENEQUE sur l'axe principal de la Vesle et de la Marne (Garcia-Armisen et al., 2004d). En 2004, l'appliquatif 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 est présenté à la figure 6.1. 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 (George et al., 2001c). 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.

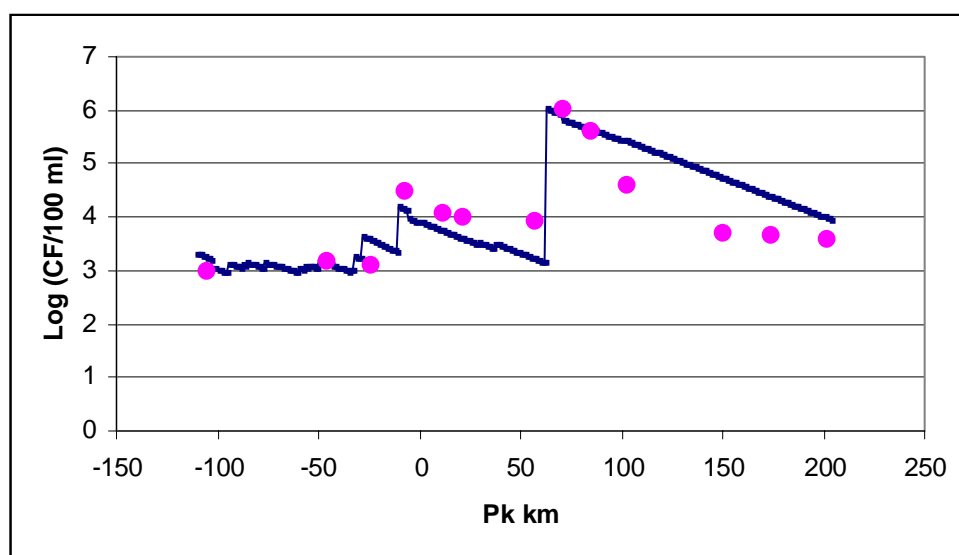


Figure 7.1: Abondance en CF cultivables dans la Seine. Résultats de modélisation obtenus avec l'appliquatif SENEQUE et résultats expérimentaux de Septembre 1998 (George et al., 2001c). Pk : échelle kilométrique avec le zéro au Pont Marie (Paris)

Cet exemple de comparaison de simulations et de données expérimentales sur l'axe fluvial de la Seine ainsi que celles précédemment présentées (Garcia-Armisen et al., 2004d) sur les axes de la Marne et de la Vesle montrent que le modèle est tout à fait à même de décrire correctement les fluctuations des bactéries indicatrices de contamination fécale que sont les coliformes fécaux.

7. Références bibliographiques

- Alderink R.H., Van Duin E.H.S., Peels C.E., Scholten M.J.M. 1990. Some characteristics of run-off quality from separated sewer system in Lelystad, The Netherlands, *Proceedings of the 5th international conference on Urban Storm Drainage*, Osaka, pp 427-432.
- Ashley R.M. and Dabrowski W. 1995. Dry and storm weather transport of coliforms and fecal streptococci in combined sewage, *Water Science and Technology*, **31**(7):311-320.
- Beaudeau P., Tousset N., Bruchon, F., Lefèbvre A. and Taylor, H.D. 2001. In situ measurement and statistical modelling of *Escherichia coli* decay in small rivers. *Water Research*. **35** : 3168-3178.
- Bhourri R. 2003. Distribution des polluants contenus dans les eaux pluviales urbaines par classes de vitesse de chute des particules. *Mémoire de DEA. Ecole Nationale des Ponts et Chaussées*, 46p.+ annexes.
- 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.
- Chebbo G., Ashley R. et Gromaire M.C. 2003. The nature and pollutant role of solids at the water-sediment interface in combined sewer networks, *Water Science and Technology*, **47**(4):1-10.
- Chebbo G., Mouchel J.M., Saget E., Gousailles M. 1995. La pollution des rejets urbains par temps de pluie, flux nature et impact. *Techniques, Sciences et Méthodes*, **11**:796-806.
- 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.
- Ellis B.J. et Wang Y. 1995. Bacteriology of urban runoff : the combined sewer as a bacterial reactor and generator, *Water Science and Technology* , **31**(7):303-310.
- Fewtrell, L and Bartram, J. 2001. Water quality: guidelines, standards and health. World Health Organization Water Series. IWA Publishing, London (U.K.)
- 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, Servais, P. 2004c. Quantification of Point and Non Point Sources of *E. coli* and Enterococci in a Large Urbanised Watershed (The River Seine, France). *Proceedings International Water Association World Congress*.
- Garcia-Armisen, T., Mercier, P. & Servais, P. 2004d. Les bactéries indicatrices de contamination fécale dans les eaux du bassin de la Seine. *Rapport PIREN Seine Février 2004*
- Garcia-Armisen, T., Lebaron, P. & Sevais, P. 2005. β -D-glucuronidase activity assay to assess viable *Escherichia coli* abundance in freshwaters. *Letters in Applied Microbiology*. In press.
- Garcia-Lara, J., Menon, P., Servais, P. & Billen, G., 1991. Mortality of fecal bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57** : 885-888.
- 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.
- 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*, **35**(2):521-533
- Jefferies C., Young H.K. and Mc Gregor I. 1990. Microbial aspects of sewage and sewage sludge in Dundee, Scotland. *Water Science and Technology*, **22**(10/11):47-52.
- Lebaron, P., Henry, A., Lepeuple, A.-S., Pena, G. & Servais, P. 2005. An operational method for real-time monitoring of *E. coli* in bathing waters. *Marine Pollution Bulletin*. In press.
- 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
- Pommepuy M., Guillaud J.F., Dupray E., Derrien A., Le Guyader F. and Cormier M. 1992. Enteric bacteria survival factors. *Water Science and Technology*, **25**(12):93-103.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., De Roubin, M.R. & Laurent, P. 2002. Methods of detection and enumeration of coliforms in drinking water : a review. *J. Microbiol. Methods*. 49(1) : 31-54
- Servais, P., Billen, G., & J. Vives-Rego, 1985. Rate of bacterial mortality in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 : 1448-1454.
- Servais, P., Billen, G., Martinez & Vives-Rego, J. 1989. Estimating bacterial mortality by the disappearance of ³H-labelled intracellular DNA. Technical validation and field measurements. *FEMS Microbiol. Ecology*, 62 : 119-126.
- Servais, P. & Menon, P., 1991. Fate of autochthonous and fecal bacteria in marine ecosystems., *Kieler Meeresforsch*, 8 : 290-296.
- Servais, P., Vives-Rego, J. & G. Billen, 1992. Survival and mortality of bacteria in natural environments. In : *Release of genetically engineered and other microorganisms*. J.C. Fry & M.J. Day, eds., Cambridge University Press, p. 100-119.
- 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.*
- 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.



Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization

Tamara Garcia-Armisen*, Pierre Servais

Ecologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 221, Bd du Triomphe, B1050 Brussels, Belgium

Received 13 January 2004; received in revised form 6 April 2004; accepted 8 April 2004
Available online 7 June 2004

Abstract

A combination of direct viable count (DVC) and fluorescent in situ hybridization (FISH) procedures was used to enumerate viable *Escherichia coli* in river waters and wastewaters. A probe specific for the 16S rRNA of *E. coli* labeled with the CY3 dye was used; enumeration of hybridized cells was performed by epifluorescence microscopy. Data showed that the method was able to accurately enumerate a minimum of 3000 viable *E. coli* among a large number of non-fecal bacteria. When applied to river water and wastewater samples, the DVC-FISH method gave systematically higher *E. coli* counts than a reference culture-based method (miniaturized MPN method). The ratio between both counts (DVC-FISH/MPN) increased with decreasing abundance of culturable *E. coli* indicating that the proportion of viable but non-culturable (VBNC) *E. coli* (detectable by the DVC-FISH procedure and not by a culture-based method) was higher in low contaminated environments. We hypothesized that the more stressing conditions, i.e. nutritional stress and sunlight effect, met in low contaminated environments were responsible for the larger fraction of VBNC *E. coli*. A survival experiment, in which sterile mineral water was inoculated with a pure *E. coli* strain and incubated, confirmed that stressing conditions induced the apparition of non-culturable *E. coli* detectable by the DVC-FISH procedure. The analysis of the *E. coli* concentration along a Seine river longitudinal profile downstream a large input of fecal bacteria by a WWTP outfall showed an increasing fraction of VBNC *E. coli* with increasing residence time of the *E. coli* in the river after release. These data suggest that the DVC-FISH method is useful tool to analyze the dynamics of fecal bacteria in river water.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *E. coli*; Fluorescent in situ hybridization (FISH); Direct viable count; Viable non-culturable bacteria (VBNC)

1. Introduction

Freshwaters contaminated by fecal material from men and animals may contain a large variety of human pathogenic microorganisms. Health protection

programs require to estimate the level of contamination of aquatic systems by these microorganisms. Since the systematic search of all potential strains of entero-pathogens is not feasible, the enumeration of various indicator bacteria is usually used to evaluate the fecal contamination of waters and, the sanitary risk associated with various utilization's of the water (bathing, production of drinking water, etc.). For years, total coliforms and fecal coliform were the

* Corresponding author. Tel.: +322-650-5715; fax: +322-650-5993.

E-mail address: tgarciaa@ulb.ac.be (T. Garcia-Armisen).

most widely used indicators but, more recently, the abundance of *Escherichia coli* has been shown to be more related to the sanitary risk than that of coliforms (Fewtrell and Bartram, 2001).

Accurate enumeration of *E. coli* is thus important to assess microbiological water quality. Classical methods for enumerating *E. coli* are based on culture in liquid (most probable number, MPN) 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 target 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; Barcina et al., 1989; Pommepuy et al., 1996). 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 (Colwell et al., 1985; Grimes and Colwell, 1986; Pommepuy et al., 1996) suggested that pathogenic VBNC bacteria could maintain their virulence being thus a potential reservoir of disease.

As a consequence, alternative methods were developed during the last 10 years to detect and enumerate *E. coli* in waters (Rompré et al., 2002). Those are direct enzymatic methods (George et al., 2000; Van Poucke and Nelis, 2000), immunological methods (Pyle et al., 1999), quantitative polymerase chain reaction (PCR) (Juck et al., 1996) and fluorescent in situ hybridization (FISH) (Regnault et al., 2000a; Lepeuple et al., 2003). This latter technique appears particularly interesting as it provides quantitative data in only 6–8 h (Rompré et al., 2002). Several fluorescently labeled DNA probes targeting *E. coli* were proposed in the literature (Prescott and Fricker, 1999; Stender et al., 2001; Regnault et al., 2000a). Two major problems were encountered by the authors who used FISH for detecting fecal bacteria in natural waters: (i) the low level of targeted rRNA per cell due to the stress conditions met by these bacteria in such waters resulting in a low level of fluorescence and, thus, a difficult enumeration of the target events by epifluorescence microscopy or solid phase cytometry (Lepeuple et al., 2003); (ii) the inability to distinguish viable from non-viable cells.

To analyze simultaneously the phylogenetic affiliation and the metabolic state of single cells in waters, it

is possible to couple FISH with methods characterizing the physiological state of bacteria at the single cell level as the direct viable count method (DVC) (Kogure et al., 1979), the CTC method (Rodriguez et al., 1992) or the esterase activity measurement (Catala et al., 1999). Regnault et al. (2000a,b) proposed to couple the DVC procedure with the use of a FISH probe targeting the 16S rRNA of *E. coli*. The DVC procedure involves exposing bacterial cells to a revivification medium containing antibiotics preventing cellular division; elongated cells are then enumerated as viable cells. In the proposed protocol, the cells were hybridized after the revivification stage with a 16S rRNA probe, called “Colinsitu”, specific from *E. coli*. The specificity of this probe for *E. coli* was fully demonstrated by Regnault et al. (2000a,b). The introduction of the revivification stage allows, on one hand, to have in the viable elongated cells a sufficient rRNA content to be detectable by microscopy after the FISH procedure and, on the other hand, to distinguish viable *E. coli* from non-viable *E. coli*. Villarino et al. (2000) showed that the DVC-FISH procedure was adequate to monitor bacterial viability. A procedure combining DVC and FISH was also recently used to enumerate *Enterobacteriaceae* in natural and drinking waters (Baudart et al., 2002).

The aim of the present study was (i) to investigate the application of a protocol coupling DVC and FISH using the “Colinsitu” probe for enumerating by epifluorescence microscopy *E. coli* in river water and wastewater samples; (ii) to define the detection limit and the accuracy of this method; (iii) to compare the number of *E. coli* in rivers and wastewaters enumerated by the DVC-FISH procedure and by a culture-based method.

2. Materials and methods

2.1. River and wastewater sampling

River water samples were collected from March to September 2003 in the Seine river hydrographical network (France). Samples were harvested from small rivers upstream to any domestic wastewater discharge up to the highly contaminated Seine river downstream to the Parisian area. Moreover, mean daily wastewater samples were collected at the entrance and at the

outlet of nine wastewater treatment plants (WWTPs) located in France. The treatment in these plants included primary settling followed by activated sludge process (with nitrification in some of the investigated WWTPs).

In addition, in April 2003, samples were collected along a longitudinal profile in the Seine river downstream from Paris. In this area, the Seine river receives the wastewater effluents treated by the large WWTP of Achères (7.5×10^6 inhabitant-equivalents).

All samples were collected in sterile 2-l bottles, kept at 4 °C and analyzed within 12 h.

2.1.1. *E. coli* enumeration by miniaturized most probable number

Standardized miniaturized MPN method (ISO 9308-3) using microplates (BIO-RAD) is based on the defined substrate approach (Edberg et al., 1988). Briefly, 200 µl of several decimal dilutions of the sample were added in each of the 96 wells of the microplate containing the substrate (4-methyl umbelliferyl-β-D-glucuronide) (MUGlu) in dehydrated form. The microplates were incubated for 36–48 h at 44 °C. The hydrolysis of MUGlu by the β-D-glucuronidase (an enzyme specific of *E. coli*) releases a fluorescent compound (MUF), which can be detected under UV light. The number of positive wells (fluorescent under UV light) after incubation allows to calculate the *E. coli* abundance using a statistical analysis based on Poisson's law.

2.1.2. *E. coli* enumeration by DVC-FISH procedure

The procedure used for enumeration of *E. coli* by the DVC-FISH was based on the protocol proposed by Regnault et al. (2000a). Water samples were filtered through 25 mm 0.4 µm pore-size polycarbonate filters (Nucleopore, Whatman). One to 100 ml were filtered depending on the origin of the sample and on its suspended matter (SM) content. For the DVC procedure, filters were incubated for 4 h at 30 °C on absorbent pad (Millipore) previously soaked into culture plates (GREINER BIO-ONE) with 0.6 ml revivification medium consisting of TCS broth (BIO-RAD) supplemented with yeast extract (0.6% w/v), nalidixic acid (10 µg/ml) (SIGMA) and ciprofloxacin (1 µg/ml) (ICN). In this study, a mixture of two antibiotics (nalidixic acid and ciprofloxacin) was used, instead of nalidixic

acid alone as firstly described by Kogure et al. (1979), to decrease the risk of errors due to possible *E. coli* resistance to antibiotic (Reinthaler et al., 2003; Joux and Lebaron, 1997). After the 4-h incubation, bacteria were fixed for 15 min with 3% (w/v) paraformaldehyde (PFA).

The “Colinsitu” probe used for the in *E. coli* hybridization has the following sequence: 5′-GAG ACT CAA GAT TGC CAG TAT CAG-3′ (Regnault et al., 2000a). This probe target position 637–660 in the *E. coli* 16S rRNA. The probe was labeled at the 5′-end with the CY3 dye. Eubacterial probe EUB338 targeting position 338–355 in the *E. coli* 16S rRNA 5′ labeled with FITC was used as a control in all in situ hybridization experiments.

For hybridization, filters issued from the DVC stage were transferred onto a new pad soaked with 300 µl of hybridization buffer consisting of 0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.2% (w/v) bovine serum albumin (BSA, fraction V Sigma), 0.1 mg/ml polyadenylic acid (ICN) and 22% deionized formamide (ACROS). The filters carrying the fixed bacteria were covered with 300 µl of hybridization buffer containing 10 pmol of CY3-labeled “Colinsitu” probe and 20 pmol of FITC-labeled eubacterial probe EUB338. The hybridization was performed for 2 h at 42 °C were then washed in new multiwell tissue culture plates with 2 ml of pre-warmed washing buffer (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.01% SDS, 5 mM EDTA) and incubated at 51 °C for 20 min. The filters were then deposited on microscopic slides for mounting.

Filters with hybridized cells were observed by epifluorescence microscopy (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with a HBO-100 W mercury lamp at a magnification of 1000×. Enumeration of elongated (DVC+) *E. coli* bacterial cells was performed using the filter block Y3 for the CY3 green excitation range with an excitation filter of band pass (BP) 535/50 nm, a dichromatic mirror (reflection short-pass filter (RKP) at 565 nm and suppression filter of BP 610/75). For river water samples and wastewater samples, 100 and 50 microscopic fields were respectively analyzed. The ratio between the surface actually used for water sample filtration and the surface of a microscopic field was 7056. Taking into account this ratio, the volume of sample filtered, the average

number of positive events per microscopic field, the number of *E. coli* per volume unit was calculated. All the values of *E. coli* abundance in this paper are expressed in *E. coli* per 100 ml.

A positive control was performed by verifying a fluorescent event as being a bacteria; bacterial cells were visualized using the EUB 338 probe labeled with FITC, with the I2 filter for blue excitation range with an excitation filter (BP 450–490 nm) and a dichromatic mirror (RKP at 510 nm and a suppression filter of long-pass (LP) 515 nm). A negative control was also performed by detecting autofluorescent microorganisms with the filter A for ultra violet excitation range with an excitation filter (BP 340–380 nm) and a dichromatic mirror (RKP at 400 nm and a suppression filter of LP 430 nm).

2.2. *E. coli* pure strain spiked in natural water

Mineral water (Evian, France) was supplemented with 2 mg/l of yeast extract and incubated for 24 h at 20 °C under agitation to increase the bacterial abundance. After incubation, the abundance of bacteria was estimated to 1.5×10^8 cells/100 ml by epifluorescence microscopy (Leica Wetzlar, Germany; magnification factor 1000 \times) after DAPI staining (Porter and Feig, 1980). The absence of *E. coli* was confirmed at this stage. The supplemented Evian water was then distributed in four 500-ml bottles; each bottle was inoculated with various volumes of an *E. coli* suspension to get final concentrations of respectively 3×10^2 , 3×10^3 , 3×10^4 and 3×10^5 *E. coli*/100 ml. The *E. coli* strain used for these experiments was isolated from the environment; cells used for inoculation were cultured in TSB medium without dextrose (DIFCO) supplemented with 0.2 g/l of methyl- β -D-glucuronide (Sigma). Cells were collected during the exponential growth phase, then three times centrifuged (10 min, 5000 rpm) and resuspended in physiological sterile solution (Ringer, MERCK). *E. coli* abundance in this suspension was determined by epifluorescence microscopy after DAPI staining.

The analysis (DVC-FISH and MPN enumeration's) were performed in triplicates for each bottle immediately after homogenization. Hundred milliliters were filtered for the DVC-FISH procedure while the MPN determinations were performed as

recommended by the manufacturer for these *E. coli* concentrations.

2.3. Batch survival experiments

A survival experiment has been conducted in a microcosm to which *E. coli* cells were added at day 0. The microcosm consisted of a two liters autoclaved bottle (Duran) containing one liter of mineral water (Evian) filtered on 0.2 μ m pore-size polycarbonate filters (Nucleopore, Whatman) and autoclaved. The *E. coli* strain ATCC 1775 was cultured in TSB medium without dextrose (DIFCO) supplemented with 0.2 g/l of methyl- β -D glucuronide (Sigma). The culture was harvested by centrifugation and washed three times with sterile physiological solution (Ringer, Merck). The microcosm was then inoculated with the cultured *E. coli* to reach an initial density of about 10^7 bacteria/100 ml. The microcosm was incubated with gentle stirring for 12 days at 20 °C under a suspended illumination system consisting of two daylight lamps (OSRAM 15 W), and a cycle of 12–12 h daylight–dark. *E. coli* abundance was measured during the microcosm incubation by three different methods: direct microscopic observation following DAPI staining, a culture-based method (miniaturized MPN method) and the DVC-FISH procedure.

3. Results

3.1. Accuracy and detection limits of the DVC-FISH procedure

To test the ability of the DVC-FISH procedure to enumerate low numbers of viable *E. coli* among a large abundance of non-target cells, variable amounts of *E. coli* were spiked in mineral water containing a constant 1.5×10^8 non-*E. coli* bacteria/100 ml.

The abundance measured by the DVC-FISH method was compared to the abundance estimated by the MPN method (Fig. 1); no significant difference (Mann–Whitney *U*-test) was found between counts performed by both methods. The relative error (in %) was calculated for the enumeration performed by both methods. For the MPN procedure, the relative error ranged between 12% and 35% (average 20%) and did not depend on the abundance of *E. coli*. A relative

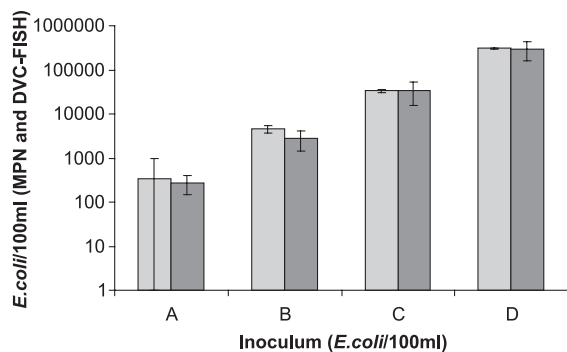


Fig. 1. *E. coli* enumerated by the DVC-FISH procedure (grey bars) and by the MPN method (dark bars). Four independent bottles containing natural water enriched in autochthonous bacteria (1.5×10^8 bacteria/100 ml) were spiked with various concentrations of *E. coli*. (A: 300 *E. coli*/100 ml, B: 3000 *E. coli*/100 ml, C: 30,000 *E. coli*/100 ml, D: 300,000 *E. coli*/100 ml.) Error bars correspond to the standard deviation calculated on the basis of triplicate analysis.

error of 20% is quite usual for the culture-based methods (Regnault et al., 2000a; George et al., 2001a). For the DVC-FISH procedure, the relative error decreased when the abundance of viable *E. coli* increased, i.e. 170%, 20%, 7% and 5% for, respectively, 300, 3000, 30,000 and 300,000 *E. coli*/100 ml. The high relative error for *E. coli* concentration of 300/100 ml is due to the very low number of positive events enumerated. For example, when 100 ml of a water containing 300 *E. coli*/100 ml is filtered, only 4 positive events are theoretically expected on the 100 microscopic fields examined. When the abundance of viable *E. coli* reached 3000/100 ml, the relative error of the DVC-FISH method was similar to the average relative error of the MPN method. For higher abundance of viable *E. coli*, the DVC-FISH method was more accurate than the culture-based method. From these data, the DVC-FISH can be considered as accurate and sensitive for samples containing a minimum of 3000 viable *E. coli*/100 ml enumerated among a large number of non-target bacteria.

3.2. Enumeration of *E. coli* in river and wastewater samples

For the analysis of river and wastewater samples, variable volumes were filtered depending on the *E. coli* content and on the amount of suspended matter (SM) which caused the fouling of the membrane.

Indeed, for samples with high *E. coli* abundance (raw wastewaters), filtration of one to some ml allowed accurate *E. coli* enumerations despite the aggregation of the bacteria around particles inducing some heterogeneity in their distribution on the microscopic slide. For treated wastewaters, volumes around 10 ml were usually filtered; Fig. 2.1(I) shows that doing so the fluorescent background was not too important.

For river samples, the lower abundance of *E. coli* requires the filtration of a more important volume (50–100 ml) resulting in the accumulation of SM on the filtration membrane which induces some fluorescent background. Fig. 2.1(II) nevertheless shows that the increase of the bacterial cell size and of their rRNA content by the DVC procedure allow to differentiate the *E. coli* from the fluorescent background. Fig. 2.2(I) shows typical DVC-FISH positive *E. coli* from a river water sample stained with CY3. Fig. 2.2(II) presents the staining of the bacteria present on the same microscopic field with EUB 338 (confirmation step); elongated non-*E. coli* cells (not hybridized with the “Colinsitu probe”) are visible as well as the elongated *E. coli*.

Usually, the DVC step results in a nearly two fold enlargement of the cells (Fig. 2.3(I) and (II)) and also increases the intensity of fluorescence. When the DVC-FISH procedure was applied to wastewater or to *E. coli* strains cultured in rich medium, all the intensely fluorescent bacteria were enlarged (length of at least 5 μm). In some river samples, we observed that some strongly fluorescent bacteria were not enlarged. Controls performed using the FISH procedure without DVC in these rivers samples showed a very low level of fluorescence and no intensely fluorescent bacteria was observed. Thus, it seems that these cells responded to DVC procedure by increasing their intracellular rRNA contents but without cell size increase. These cells were thus counted as viable *E. coli* as suggested by Regnault et al. (2000b).

For the river samples, it seems important to use a fluorochrome bound to the probe with high quantum yield and extinction coefficients. In this study, we used CY3 which was shown to provide significantly brighter staining than other dyes and to be very stable to photobleaching (Moter and Göbel, 2000; Wessendorf and Brelje, 1992). Bouvier and del Giorgio (2003) who recently discussed the factors influencing

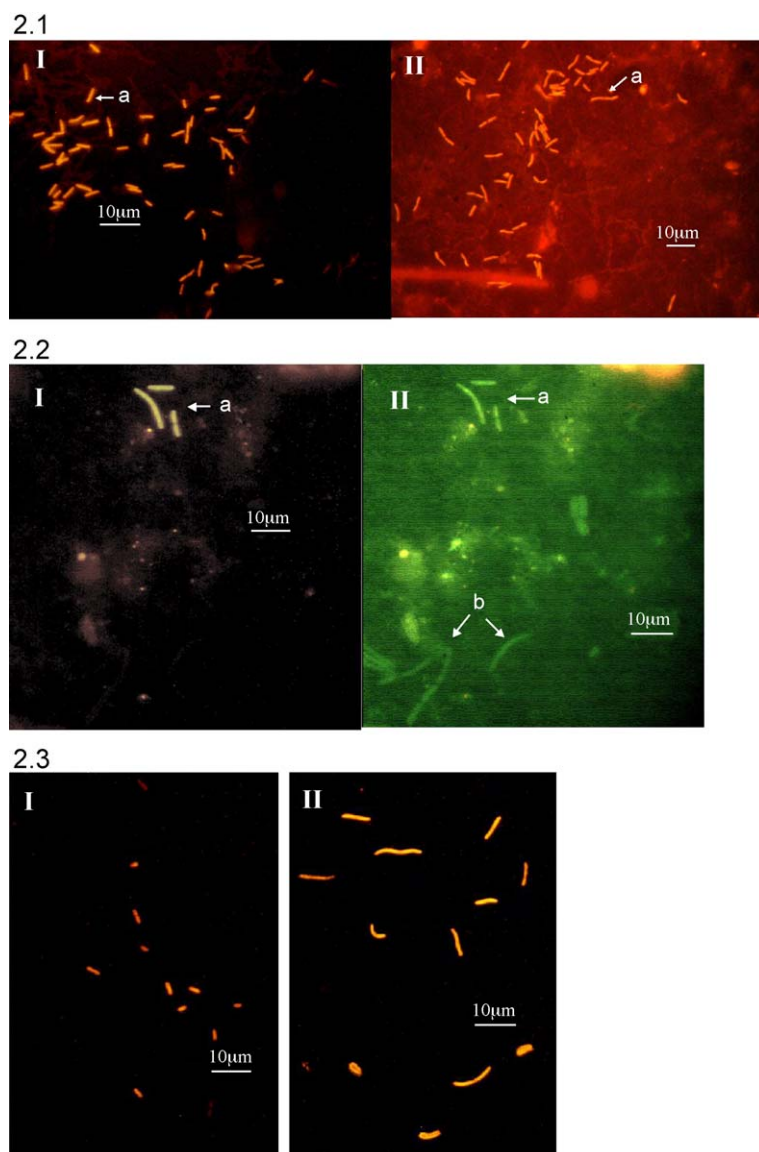


Fig. 2. Images of *E. coli* detected by DVC-FISH procedure using the “Colinsitu” probe labeled with the CY3 dye. (“a” arrows indicates typical elongated *E. coli*.) 2.1 Comparison of the fluorescent background between: (I) treated wastewater (10 ml filtered) and (II) Seine river sample (100 ml filtered). 2.2 (I) Typical DVC-FISH positive *E. coli* from a river water sample stained with CY3 and (II) staining of the bacteria present on the same microscopic field with EUB 338 (confirmation step). “b” arrows indicates elongated non-*E. coli* cells (not hybridized with the “Colinsitu” probe” and thus not-visible on 2.2 (I)). 2.3 Comparison of bacterial size (I) with and (II) without DVC step (sample of pure *E. coli* strain).

bacterial cells detection using FISH pointed out the importance of the fluorochrome and advised the use of the CY3.

Enumeration of *E. coli* in river and wastewater samples using with DVC-FISH were compared with

those obtained with MPN method. Fig. 3 shows that a significant correlation ($r^2 = 0.85$, $p < 0.01$) was found in log–log plot between the abundance of *E. coli* enumerated by both methods. However, the DVC-FISH procedure resulted systematically in

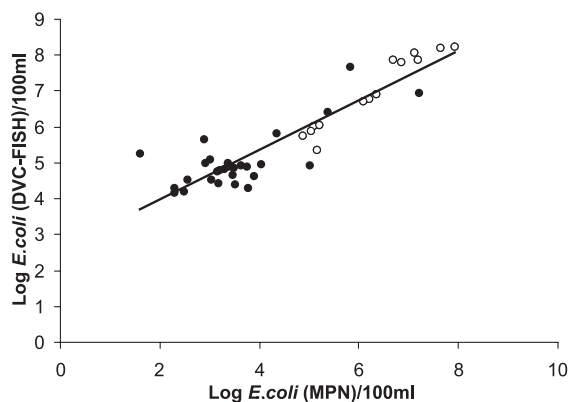


Fig. 3. *E. coli* enumerated by the DVC-FISH procedure plotted against *E. coli* enumerated by the MPN method in river water (●) and wastewater (○) samples. Correlation straight line: $y = 0.686x + 2.621$ ($n = 45$, $r^2 = 0.84$).

higher numbers than the MPN method at the opposite to what was observed with a natural *E. coli* strain harvested in exponential phase of growth and spiked in natural water (Fig. 1). The slope of the linear log–log correlation of the data presented in Fig. 3 was nevertheless lower than 1 suggesting that the ratio between *E. coli* abundances estimated by both methods was not constant when the number of culturable *E. coli* changes. Fig. 4 shows the ratio of both enumerations (DVC-FISH/MPN) plotted as a function of the abundance of culturable *E. coli*. This ratio ranged between 2 and more than 100 and increased with decreasing abundance of culturable *E. coli*. If we assume that the difference between

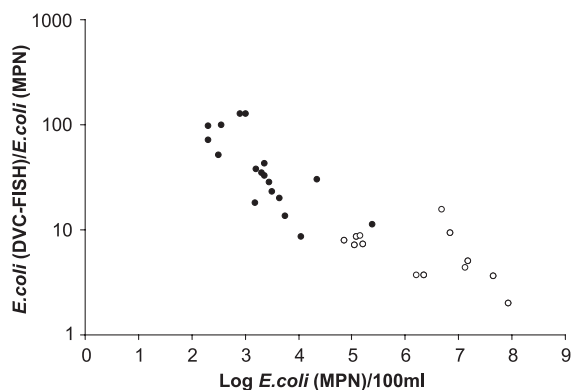


Fig. 4. Ratio of the *E. coli* enumerated by the DVC-FISH method and by the MPN method plotted against culturable *E. coli* (MPN enumeration) in river water (●) and wastewater (○) samples.

both methods is due to the VBNC *E. coli* detected by the DVC-FISH procedure and not by the MPN method, the ratio DVC-FISH/MPN corresponds to the ratio between viable *E. coli* and culturable *E. coli*. Our data thus suggest that the proportion of viable but non-culturable *E. coli* increases in weakly contaminated waters. This can be probably explained by environmental conditions more stressing in low contaminated waters.

3.3. Detection of VBNC *E. coli* in microcosm experiment

In order to test if stress conditions could lead to the appearance of viable *E. coli* (responding positively to the DVC-FISH procedure) but non-culturable (not detectable in the MPN test), a microcosm experiment was performed in this study. The fate of *E. coli* spiked in sterile water incubated under light was followed by three methods: direct microscopic counts, culture-based method and DVC-FISH.

Fig. 5 shows that, during the 200-h incubation, the total count (morphologically intact cells) remained stable while culturable bacteria detected by the MPN method decreased almost two log. This figure also shows that *E. coli* detected by the DVC-FISH remained quite constant during the first hundred hours of incubation and then slightly decreases. At the end of the incubation, only 1 % of the *E. coli* spiked in the microcosm remained culturable, 21 % was still viable and 100 % was morphologically intact. That means

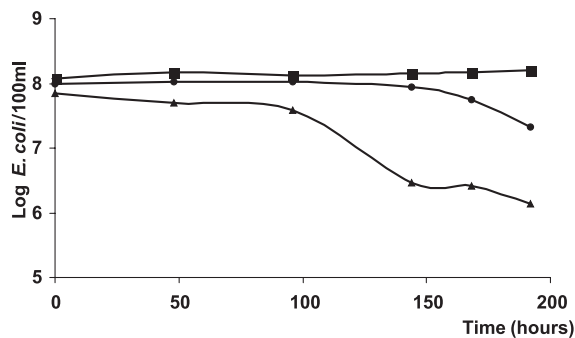


Fig. 5. Temporal fluctuation of *E. coli* abundance measured by microscopic enumeration after DAPI staining (■), the MPN method (▲) and the DVC-FISH procedure (●) in a microcosm containing sterile mineral water spiked with *E. coli* cells and incubated at 20 °C in the light.

that during the course of the experiment a large fraction of *E. coli* lost its viability (defined here as a positive response to the DVC procedure) and a fraction of *E. coli* entered the VBNC state (non-culturable DVC+ cells).

3.4. Seine river longitudinal profile

In this study, we have tried to present a natural situation where fecal bacteria enter a VBNC state. For this, samples were collected along a 120 km stretch of the Seine river downstream to Paris. In this area, the river receives the discharge of the treated waters of the very large Achères WWTP (7.5 millions inhabitant-equivalents). George et al. (2001b) have shown that the discharge of these effluents increased significantly the level of fecal contamination and that the abundance of fecal bacteria decreased quite rapidly downstream from the WWTP outfalls in a stretch where the river did not receive other important wastewater discharge. The abundance of *E. coli* along the river was followed by DVC-FISH and MPN methods. Fig. 6 shows, at all sampling stations, higher numbers of *E. coli* as enumerated by the DVC-FISH method than by the MPN method confirming the data of Fig. 4. An important increase of *E. coli* was observed by both methods at the location of the Achères wastewater effluents outfalls as already observed by George et al. (2001b) for total and fecal coliforms. Downstream Achères, the number of *E. coli* decreased. The decrease was however significantly more rapid when

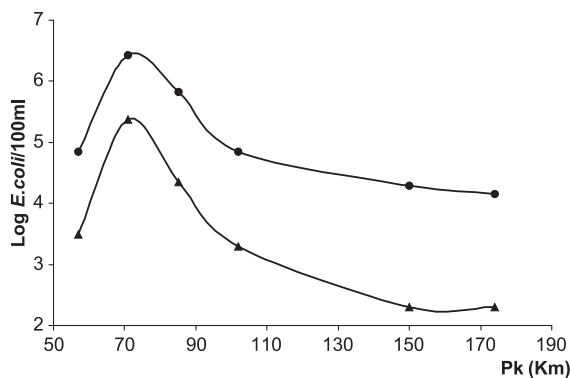


Fig. 6. *E. coli* enumerated by the DVC-FISH (●) and the MPN (▲) methods along a longitudinal profile in the Seine river downstream Paris. X-axis is a kilometric scale (km=0 at Paris). The Achères WWTP is located at km 63.

measured with the culture-based method than when measured by the DVC-FISH procedure. This means that during the transit of the water in the river stretch downstream Achères, a fraction of the *E. coli* entered a viable (defined as cells responsive to the DVC procedure) but non-culturable state. These results strengthen the hypothesis that *E. coli* cells released by the WWTP exposed in the river to sunlight, nutritional stress and low temperature progressively enter in VBNC state.

4. Discussion

The search for more rapid, sensitive and specific methods for the enumeration of bacterial indicators of fecal contamination resulted in the development of numerous alternatives to the classical culture methods during the recent years (Rompré et al., 2002). Apart from the fact that they require 24–48 h to obtain a result, the major limitation of traditional culture-based methods lies in their inability to detect VBNC bacteria. In this work, a combination of the DVC and the FISH procedures was successfully tested to enumerate *E. coli* in river and wastewater samples. This method was chosen because the DVC step allows to identify the substrate responsive cells, called viable cells in this paper, and hybridization with the “Colinsitu” probe allows the identification of low number of *E. coli* among a large number of non-target bacteria.

In this paper, the term “viable but non-culturable bacteria” (VBNC) was used instead of “active but non-culturable bacteria” (ABNC) as proposed by some authors (Joux and Lebaron, 2000) because our criterion to consider a bacterial cell as “viable” measures only a potential capacity to grow and not a real activity in the environmental conditions. A positive response to the DVC procedure indicates that a cell is substrate responsive in the incubation conditions used for DVC (at 30 °C in the presence of a substrate carbon rich medium); this does not imply that a DVC+ cell is really active in the natural environment.

Our results showed that the DVC-FISH combination allows the detection of a small number of target cells between numerous other bacteria: about 3000 *E. coli*/100 ml in more than 10^8 non-*E. coli*/100 ml have been accurately detected in the experiment presented

in Fig. 1. To get a better detection limit, some authors have proposed to enumerate hybridized cells by solid phase cytometry which allows the detection of a single fluorescent event on the whole membrane (Lemarchand et al., 2001). In this system, the laser beam scans the entire surface of the filtration membrane to detect fluorescent signals. Baudart et al. (2002) combined DVC with FISH to enumerate *Enterobacteriaceae* in waters using a laser scanning cytometer. These authors showed that it was possible to detect as few as one target cell in approximately 10^8 non-target cells spread over the membrane. However, these authors mentioned that, for some samples, due to the presence of autofluorescent particles on the membrane, a tedious microscopic confirmation after detection by the scanner was necessary. Lepeuple et al. (2003) tested the DVC-FISH procedure using the “Colinsitu” probe; in order to allow detection by the scanner, they combined the fluorescent-tyramide with an oligonucleotidic probe directly labeled with horseradish peroxidase to increase the fluorescence (Lebaron et al., 1997). However, the microscopic counts of *E. coli* were significantly higher than the scanner counts; this was attributed to the heterogeneity of the cell labeling inducing a difficulty for the scanner to distinguish labeled cells from the fluorescent background. These examples showed that automatic enumeration of hybridized cells using laser scanning cytometer remains difficult even if this technology is very promising. So, even if the microscopic enumeration of hybridized *E. coli* cells is time consuming, it can be recommended today. As the microscopic counts of hybridized *E. coli* do not allow very low detection limit, the use of the DVC-FISH procedure as used in this paper is limited to contaminated environments and can not, for example, be used for microbiological control of drinking water quality.

The application of DVC-FISH with “Colinsitu” probe to a large number of wastewater and river water samples showed systematically higher figures for enumeration with DVC-FISH than with culture-based methods. This is in concordance with the data by Delabre et al. (2001) and Lepeuple et al. (2003) for studies performed in drinking waters. In our study, the DVC-FISH procedure allows to enumerate 2–100 times more *E. coli* than the MPN method. The difference between both enumerations was attributed to the presence in environmental samples of viable *E.*

coli (substrate responsive cells in the DVC procedure) but non-culturable (not detectable by the MPN method). Our laboratory experiment with sterile microcosm inoculated with *E. coli* showed that in conditions of stress (very low nutrient concentration, light) VBNC appeared. In microcosms, the progressive loss of culturability of morphologically intact fecal bacteria has been already observed by others (Roszak and Colwell, 1987; Barcina et al., 1989; Pommepuy et al., 1996; Joux et al., 1997; Petit et al., 2000). In this experiment, the ratio DVC-FISH/MPN increased from 1.4 just after inoculation to 15 after 200 h of incubation.

In the same way, analyzing the *E. coli* concentration along a Seine river longitudinal profile downstream a large input of fecal bacteria by a WWTP outfall showed an increasing fraction of VBNC *E. coli* with increasing residence time of the *E. coli* in the river after release. The ratio DVC-FISH/MPN increased from 11 just downstream the WWTP outfall to 71, 120 km further. Various environmental factors can be responsible for the observed loss of culturability in the Seine river: nutritional stress, sunlight, temperature, etc. These data confirmed the laboratory results demonstrating that the stress conditions increased the difference between both estimations of the *E. coli* abundance.

Our results also demonstrated that the ratio between VBNC and culturable *E. coli* was higher in low contaminated water than in highly contaminated waters suggesting more stressing conditions for bacteria in low contaminated waters. Two factors are likely to have stronger effects in natural waters weakly contaminated by fecal bacteria: nutrient availability and water turbidity, which can reduce sunlight effect, are generally lower than in strongly contaminated waters.

5. Conclusions

Our results demonstrated that an epifluorescence microscopic DVC-FISH procedure can be used to enumerate viable *E. coli* in rivers and wastewaters. This method, on the contrary to the culture-based methods, allows to obtain results within a working day but is presently too time consuming to be considered for routine microbiological water analysis. It

can nevertheless be recommended as a very useful research tool to understand the processes involved in the dynamics of *E. coli* in the environment.

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 proportion of VBNC *E. coli* was not constant for all environments and weakly contaminated water presented a higher proportion of this type of cells, suggesting a large underestimation of the abundance of *E. coli* in this kind of environment.

From a sanitary point of view, this means that the number of viable fecal bacteria is systematically underestimated by traditional culture-based methods and particularly in weakly contaminated water. This 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 from 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 Centre National de la Recherche Scientifique (France). The authors thank Adriana Anzil and Philippe Mercier for their help during the field work, and Karine Delabre, Philippe Lebaron and Julia Baudart for helpful discussions during the course of the study.

References

- Barcina, I., Gonzales, J.M., Iriberry, J., Egea, L., 1989. Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 246–251.
- Baudart, J., Coallier, J., Laurent, P., Prévost, M., 2002. Rapid and sensitive enumeration of viable diluted cells of members of the family *Enterobacteriaceae* in freshwater and drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5007–5063.
- Bouvier, T., del Giorgio, P.A., 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 3–15.
- Catala, P., Parthuisot, N., Bernard, L., Baudart, J., Lemarchand, K., Lebaron, P., 1999. Effectiveness of CSE to counterstain particles and dead bacterial cells with permeabilised membranes: application to viability assessment in waters. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 219–226.
- Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A., 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., Roubin, M.R., Gatel, D., Poty, F., Cavard, J., 2001. New analytical tools for distribution system surveillance. American Water Works Association, WQTC Proceedings, CD Rom.
- Edberg, S.C., Allen, M.J., Smith, D.B., Then National Collaborative Study, 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.
- Fewtrell, L., Bartram, J., 2001. *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. World Health Organization Water Series IWA Publishing, London, UK.
- George, I., Petit, M., Servais, P., 2000. Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *J. Appl. Microbiol.* 88, 404–413.
- George, I., Crop, P., Servais, P., 2001a. Use of β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase activities to estimate the microbiological contamination of wastewater. *Can. J. Microbiol.* 47, 670–675.
- George, I., Petit, M., Theate, C., Servais, P., 2001b. Distribution of coliforms in the Seine river and estuary (France). *Estuaries* 24, 984–1002.
- Grimes, D.J.R., Colwell, R., 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiol. Lett.* 34, 161–165.
- Joux, F., Lebaron, P., 1997. Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3643–3647.
- Joux, F., Lebaron, P., 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect.* 2, 1523–1535.
- Joux, F., Lebaron, P., Troussellier, M., 1997. Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 65–76.
- Juck, D., Ingram, J., Prévost, M., Coallier, J., Greer, C., 1996. Nested PCR protocol for the rapid detection of *Escherichia coli* in potable water. *Can. J. Microbiol.* 42, 862–866.
- Kogure, K., Simidu, U., Taga, N., 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25, 415–420.
- Lebaron, P., Catala, P., Fajon, C., Joux, F., Baudart, J., Bernard, L., 1997. A new sensitive, whole-cell hybridization technique for detection of bacteria involving a biotinylated oligonucleotide

- probe targeting rRNA and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3274–3278.
- Lemarchand, K., Parthuisot, N., Catala, P., Lebaron, P., 2001. Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. *Aquat. Microb. Ecol.* 25, 301–309.
- Lepeuple, A.S., Delabre, K., Giloupe, S., Intertaglia, L., de Roubin, M.-R., 2003. Laser scanning detection of FISH-labelled *Escherichia coli* from water samples. *Water Sci. Technol.* 47, 123–129.
- Moter, A., Göbel, U.B., 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 41, 85–112.
- Petit, M., George, I., Servais, P., 2000. Survival of *Escherichia coli* in freshwater: b-D-glucuronidase activity measurements and characterization of cellular states. *Can. J. Microbiol.* 46, 679–684.
- Pommepeuy, M., Butin, M., Gourmelon, M., Colwell, R.R., Cormier, M., 1996. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4621–4626.
- Porter, K.G., Feig, Y.S., 1980. Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943–948.
- Prescott, A.M., Fricker, C.R., 1999. Use of PNA oligonucleotides for the in situ detection of *Escherichia coli* in water. *Mol. Cell. Probes* 13, 261–268.
- Pyle, B.H., Broadaway, S.C., McFeters, G.A., 1999. Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food and water by immunomagnetic separation and solid-phase laser cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1966–1972.
- Regnault, B., Martin-Delautre, S., Lejay-Collin, M., Lefèvre, M., Grimont, P.A.D., 2000a. Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli*/*Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization: specificity and potential application. *Res. Microbiol.* 151, 521–533.
- Regnault, B., Martin-Delautre, S., Grimont, P.A.D., 2000b. Problems associated with the direct viable count procedure applied to gram-positive bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 281–284.
- Reinthal, F.F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F., Marth, E., 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.* 37, 1685–1690.
- Rodriguez, G.G., Philips, D., Ishiguro, K., Rigway, L., 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1801–1808.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., De Roubin, M.R., Laurent, P., 2002. Methods of detection and enumeration of coliforms in drinking water a review. *J. Microbiol. Methods* 49, 31–54.
- Roszak, D.B., Colwell, R.R., 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2889–2983.
- Stender, H., Oliveira, K., Rigby, S., Bargoot, F., Coull, J., 2001. Rapid detection, identification and enumeration of *Escherichia coli* by fluorescence in situ hybridization using an array scanner. *J. Microbiol. Methods* 45, 31–39.
- Van Poucke, S.O., Nelis, H.J., 2000. A 210-min solid phase cytometry test for the enumeration of *Escherichia coli* in drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 89, 390–396.
- 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 live and heat- or UV-killed cells. *Res. Microbiol.* 151, 755–768.
- Wessendorf, M.W., Brelje, T.C., 1992. Which fluorophore is the brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red, and cyanine 3.18. *Histochemistry* 98, 81–85.