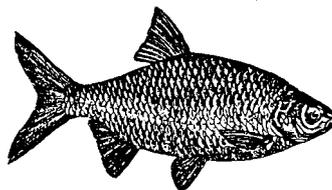
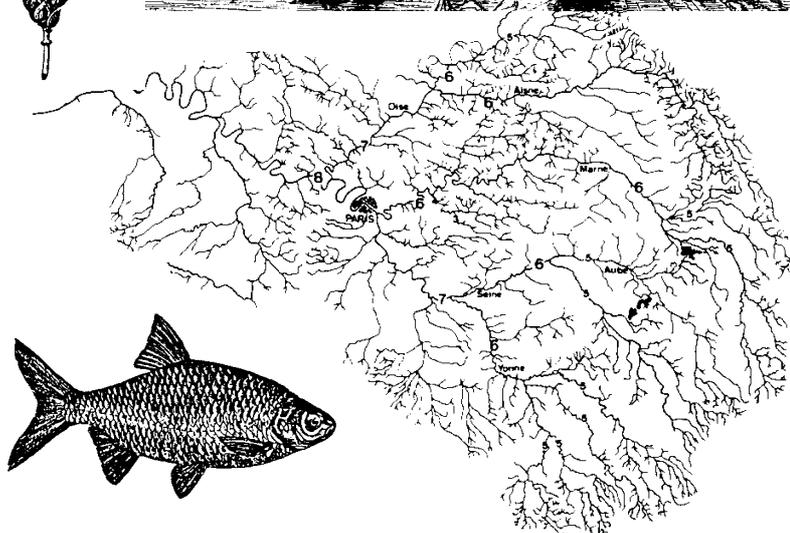
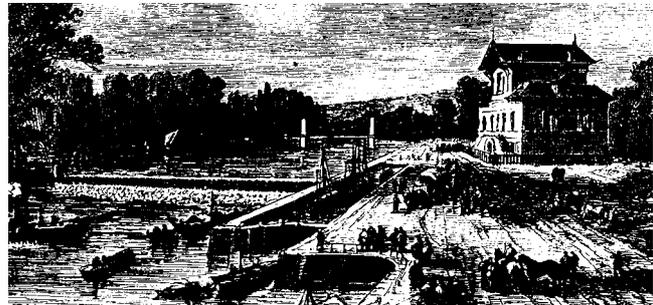
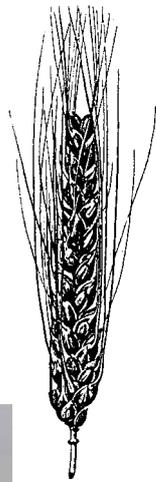


Programme PIREN-Seine 1998-2001

Sources et dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine

Direction et secrétariat:
UMR CNRS 7619 Sisyphe
Université P&M Curie
Tour 26, 5e étage, boîte 123
4, place Jussieu
75005 Paris



Rapport de Synthèse, Février 2002

Sources et dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine

Isabelle George et Pierre Servais

Ecologie des Systèmes Aquatiques,
Université Libre de Bruxelles,
Campus Plaine, CP 221,
1050 Bruxelles, Belgique

1.	Introduction	4
2.	Développements méthodologiques.....	7
2.1.	Méthodes de détection des bactéries coliformes.....	7
2.1.1	Méthodes classiques de détection des bactéries coliformes	7
2.1.2	Méthodes enzymatiques	8
2.2.	Développement de méthodes enzymatiques rapides sans passage par une mise en culture des échantillons.....	9
2.2.1	Mise au point des protocoles	9
2.2.2	Comparaison des mesures d'activité enzymatique et des comptages sur milieu gélosé spécifique	11
2.2.3	Activité enzymatique par coliforme	12
2.2.4	Spécificité des méthodes enzymatiques.....	13
2.2.5	Contribution des bactéries actives mais non cultivables aux mesures d'activité enzymatique	13
3.	Sources de contamination fécale dans le bassin de la Seine.....	14
3.1.	Sources ponctuelles et sources diffuses de contamination fécale	14
3.2.	Apports de coliformes par les eaux usées	15
3.2.1	Abondance en coliformes dans les eaux usées brutes.....	16
3.2.2	Élimination des coliformes par les traitements d'épuration.....	18
3.2.3	Abondance en coliformes dans les eaux usées traitées.....	20
3.3.	Apports de coliformes par le lessivage des sols.....	20
4.	Dynamique des coliformes dans les rivières du bassin de la Seine.....	24
4.1.	Distribution des coliformes dans le bassin de la Seine	25
4.1.1	Distribution des coliformes dans la Seine et son estuaire.....	25
4.1.2	Distribution des coliformes dans la Marne et l'Oise.....	28
4.2.	Facteurs contrôlant la dynamique des coliformes en rivière.....	29
4.2.1	Mortalité réelle et "apparente" des coliformes dans le bassin de la Seine.....	29
4.2.2	Attachement des coliformes aux matières en suspension (MES)	32
5.	Modélisation de la dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine.....	34
5.1.	Description du compartiment « coliformes fécaux » inclus dans les modèles SENESTRE et MODESTE	34
5.1.1	Prise en compte des apports diffus	35
5.1.2	Prise en compte des apports ponctuels	35
5.1.3	Prise en compte des processus en rivière.....	36
5.2.	Simulations et validation du modèle aux résultats expérimentaux	38
5.2.1	Simulations à l'exutoire des quatre grands sous-bassins.....	38
5.2.2	Simulations dans l'axe fluvial de la Seine.....	39
6.	Conclusion et perspectives	41
7.	Références bibliographiques	42

1. Introduction

La contamination bactérienne des eaux de surface est un problème de pollution qui remonte très loin dans le temps. En effet, la pollution par contamination de l'eau par des micro-organismes d'origine fécale est apparue très tôt, en fait dès que l'eau a été utilisée comme vecteur d'élimination des déchets. Avec le développement de l'urbanisation, les problèmes d'hygiène et de santé publique liés à la contamination bactérienne de l'eau sont devenus de plus en plus critiques. Ainsi au cours du 19^{ème} siècle, les maladies d'origine hydrique ont été responsables dans nos pays de vastes épidémies de dysenterie, fièvre typhoïde, choléra,... Ces maladies sont le plus souvent transmises par voie féco-orale et la contamination de l'homme se réalise alors soit par consommation d'eau de boisson, soit par consommation d'aliments contaminés par l'eau, soit encore lors d'un bain ou d'un contact avec des eaux à usage récréatif.

Les progrès scientifiques mettant en évidence de manière claire l'origine hydrique de ces maladies, associés aux progrès de l'hygiène collective et individuelle, au développement de techniques de production d'eau potable et à des contrôles bactériologiques stricts des eaux de surface et des eaux destinées à la consommation humaine ont permis l'éradication presque complète dans le monde occidental des plus graves de ces maladies qui continuent à constituer un fléau dans certains pays en voie de développement. Dans les pays occidentaux, les pathogènes transmis par l'eau sont aujourd'hui responsables d'affections qui, bien que relativement bénignes par rapport à celles précédemment citées, sont encore fréquentes. Ces affections sont principalement gastro-intestinales et leurs symptômes incluent des nausées, vomissements, diarrhées, fièvres et maux d'estomac. Les agents pathogènes responsables sont d'origine fécale et incluent des bactéries (principalement des genres *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, et *Escherichia*), des virus (virus de l'hépatite A, enterovirus, rotavirus, virus de Norwalk) et des protozoaires (*Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum*), qui contaminent les eaux de surface et même de nappe par les rejets d'eaux usées et le lessivage des bassins versants.

Dans les milieux aquatiques pollués, la détection de tous les micro-organismes pathogènes est difficile et imprécise en raison de leur présence aléatoire, de leur faible nombre, s'ils sont présents, et de l'absence de techniques qui permettent de rechercher simultanément l'ensemble des pathogènes potentiellement présents. Pour pallier les difficultés de fonder une surveillance de la qualité des eaux sur les germes pathogènes est né le concept de "**microorganismes indicateurs de contamination fécale**". Ces indicateurs sont spécifiques de la flore intestinale, ils ne sont pas nécessairement pathogènes, mais leur présence en grand nombre dans un milieu aquatique indique l'existence d'une contamination fécale, et donc un risque épidémiologique potentiel.

Idéalement, un bon indicateur de contamination fécale doit être systématiquement rencontré dans les fèces des humains et des animaux à sang chaud et toujours absent de l'environnement non pollué. Il doit être présent dans les eaux en même temps que les germes pathogènes et en plus grand nombre qu'eux. Il doit être plus résistant aux agents désinfectants que les germes pathogènes. Un lien doit pouvoir être établi entre l'indicateur, sa nature, son abondance et la probabilité d'apparition d'infections. Enfin, un bon indicateur doit être facilement détectable par une méthode spécifique et identifiable sans ambiguïté à l'aide de tests simples, rapides et peu coûteux.

Plusieurs groupes de bactéries répondent de manière relativement satisfaisante à ces critères. Il s'agit des **coliformes totaux**, **coliformes fécaux**, et **streptocoques fécaux**, sur lesquels sont basées les normes européennes de qualité des eaux de baignade (Tableau 1) et des eaux destinées à la consommation humaine (Tableau 2) ou à la conchyliculture. La Directive européenne de qualité des eaux de baignade fixe à la fois une norme impérative à ne jamais dépasser et une norme guide qu'il est souhaitable de respecter.

Tableau 1 : *Qualité bactériologique requise pour les eaux de baignade (Directive du Conseil des Communautés Européennes du 8/12/1975 (n° 76/160/EEC))*

	Norme guide	Norme impérative	Fréquence d'échantillonnage
coliformes totaux	500 / 100 ml	10 000 / 100ml	bimensuelle pendant la période baignable
coliformes fécaux	100 / 100 ml	2000 / 100 ml	bimensuelle pendant la période baignable
streptocoques fécaux	100 / 100 ml		(1)
salmonelles		0 / 100 ml	(1)
entérovirus		0 / 10 l	(1)

(1) Teneur à vérifier par les autorités compétentes lorsqu'une enquête effectuée dans la zone de baignade en révèle la présence possible ou une détérioration de la qualité des eaux est détectée.

Tableau 2 : *Qualité bactériologique requise pour les eaux douces superficielles utilisées pour la production d'eau livrée à la consommation humaine (Directive du Conseil des Communautés Européennes du 16/06/1975 (n° 75/440/EEC))*

	Valeur guide A1	Valeur guide A2	Valeur guide A3
coliformes totaux	50 / 100 ml	5000 / 100 ml	50000 / 100ml
coliformes fécaux	20 / 100 ml	2000 / 100 ml	20000 / 100 ml
streptocoques fécaux	20 / 100 ml	1000 / 100 ml	10000 / 100 ml
salmonelles	Absence dans 5 l	Absence 1 l	

A1, A2, A3. procédés de traitements types permettant la production d'eau potable à partir d'eaux superficielles.

A1. traitement physique simple et désinfection, par exemple filtration rapide et désinfection.

A2. traitement normal physique, chimique et désinfection, par exemple préchloration, coagulation-floculation-décantation, filtration, désinfection (chloration finale)

A3. traitements physique et chimique poussés, affinage et désinfection, par exemple chloration au break point, coagulation-floculation-décantation, filtration, affinage (filtration sur charbon actif), désinfection (ozonation, chloration finale)

Le groupe des **coliformes totaux** inclut l'ensemble des bactéries aérobies et anaérobies facultatives gram négatif, non sporulantes, en forme de bâtonnet, oxydase négative, capables de se multiplier en présence de sels biliaires ou d'autres agents de surface ayant des propriétés équivalentes et de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 h à 35-37°C. Les coliformes totaux constituent un groupe de bactéries très hétérogène, le plus souvent présentes en grand nombre dans les excréments animaux et humains mais dont certaines espèces ne sont pas nécessairement liées à la flore intestinale humaine ou animale et peuvent proliférer dans les sols ou dans les milieux aquatiques. Ces germes ne peuvent donc être considérés comme des indicateurs très fiables de pollution fécale.

Le groupe de **coliformes fécaux** (ou plus exactement coliformes thermotolérants) est constitué de bactéries ayant les mêmes caractéristiques et propriétés fermentatives que les coliformes totaux, mais à une température d'incubation de 44-44.5°C. Dans ce groupe, l'espèce *Escherichia coli* (*E.coli*) est de loin la plus fréquente, mais le groupe comprend également des espèces des genres *Citrobacter*, *Yersinia*, *Klebsiella* et *Enterobacter* (Haslay & Leclerc 1993). La présence de coliformes fécaux dans un milieu aquatique, et plus particulièrement celle d' *E.coli*, est considérée comme un bon indicateur d'une contamination récente du milieu par du matériel fécal humain ou d'animaux à sang chaud (Helmer *et al.* 1991, Baudisová 1997).

Quant au groupe des **streptocoques fécaux**, il est constitué d'espèces du genre *Enterococcus*, d'origine humaine prépondérante, et d'espèces du genre *Streptococcus* d'origine animale. Bien que ce groupe semble assez ubiquiste (Geldreich *et al.* 1964, Leclerc *et al.* 1996), il est généralement considéré comme un indicateur fiable de pollution fécale.

La recherche des Salmonelles, que la directive européenne ne préconise que dans les cas où une contamination fécale est déjà révélée par la présence de teneurs élevées en bactéries indicatrices, obéit à une autre logique que celle des germes indicateurs: ces bactéries constituent, en effet, par elles-mêmes des agents pathogènes, responsables d'une large variété d'infections intestinales. Il est cependant important de noter que la relation entre la présence des indicateurs comme les coliformes et les bactéries pathogènes telles que les Salmonelles n'est pas clairement établie, et que des salmonelles

ont déjà été détectées dans des eaux considérées comme conformes à la norme sur base des bactéries indicatrices (Moriñigo *et al.* 1986, Polo *et al.* 1998).

D'autres critiques peuvent être formulées à l'égard de ces normes bactériologiques. Ainsi, les données épidémiologiques semblent à l'heure actuelle trop peu nombreuses pour permettre de fixer de manière indiscutable le niveau des normes, même si certaines données montrent par exemple une relation entre la fréquence d'apparition de gastro-entérites et la baignade dans des eaux de mauvaise qualité bactériologique (Cabelli *et al.* 1979 & 1983, Seyfried *et al.* 1985a, Ferley *et al.* 1989, Kueh *et al.* 1995). On peut également reprocher aux normes de ne prendre en compte que le risque lié à la voie de contamination d'origine fécale, alors que plusieurs études ont montré que parmi les affections dont l'apparition a pu être associée à la baignade figurent des affections cutanées et oto-rhino-laryngologiques (Stevenson 1953, Cabelli. 1978 et 1989, Seyfried *et al.* 1985a et 1985b, Leenen & Havelaar 2000). Ces affections ne dépendent probablement pas d'une voie de contamination féco-orale mais plutôt d'une contamination de l'eau par la peau ou les voies respiratoires supérieures des nageurs.

Cependant, on ne peut nier l'utilité du caractère préventif de ces normes de qualité bactériologique des eaux, et le concept de "germes indicateurs de contamination fécale" a largement prouvé son utilité depuis des décennies. La recherche de l'ensemble des pathogènes potentiels reste difficilement envisageable en routine aujourd'hui, c'est pourquoi il est primordial de mieux appréhender par de nouvelles études le lien entre la présence d'indicateurs de contamination fécale, la présence de pathogènes et les risques pour la santé humaine. Cet objectif nécessite également de mieux comprendre l'écologie des indicateurs de contamination fécale et des pathogènes dans les milieux aquatiques naturels. L'étude réalisée dans le cadre du PIREN Seine de 1998 à 2001 sur les sources et la dynamique des coliformes totaux et fécaux dans le bassin de la Seine s'inscrit dans ce contexte.

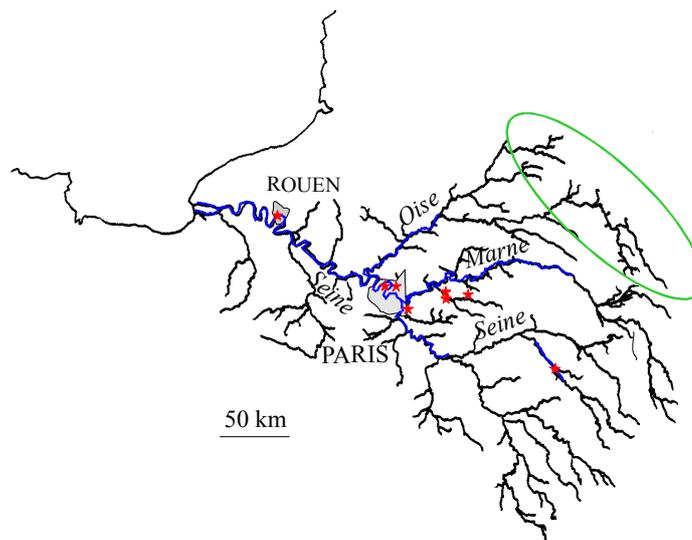


Figure 1 : Carte schématique du bassin de la Seine. Les tronçons échantillonnés sur la Marne, la Seine et l'Oise sont présentés en bleu, la zone d'étude des apports diffus de coliformes est présentée en vert et les étoiles signalent les stations d'épuration échantillonnées dans le cadre de l'étude sur les apports de coliformes par les rejets d'eaux usées.

Le but de cette étude était d'identifier et de quantifier les différentes sources de contamination fécale dans le bassin de la Seine, ainsi que les processus qui contrôlent le devenir des coliformes en rivière. Elle a été articulée autour de quatre thèmes, qui seront développés dans les chapitres suivants: (1) la mise au point d'une méthode de détection des coliformes alternative aux traditionnels comptages sur milieu gélosé spécifique, qui présentent divers inconvénients discutés dans le chapitre 2, (2) l'étude des apports de coliformes dans le bassin de la Seine par les sources ponctuelles (rejets d'eaux usées) et diffuses (lessivage des sols) (3) l'étude des facteurs qui contrôlent la dynamique des coliformes dans

les principales rivières du bassin de la Seine, et (4) le développement d'un modèle décrivant la dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine et basé sur les connaissances acquises tout au long de ce travail. Sur la Figure 1 sont localisées les stations d'épuration échantillonnées dans le cadre de l'étude sur les sources ponctuelles de coliformes, la zone dans le bassin de l'Oise amont où a été menée l'étude sur les sources diffuses de coliformes, et enfin les secteurs de la Marne, l'Oise et la Seine où ont été réalisés des profils longitudinaux d'abondance en coliformes et où ont également été étudiés les principaux facteurs contrôlant la dynamique des coliformes en milieu naturel.

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. En raison de certaines limitations des méthodes traditionnelles, de nombreuses autres techniques de détection des coliformes ont été développées ces dernières décennies, 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 ce travail, qui sont présentés dans le présent chapitre. L'objectif était d'optimiser cette méthode pour la détection quantitative des coliformes dans les eaux douces naturelles et les eaux usées, afin de l'utiliser comme alternative aux traditionnels dénombrements sur milieu gélosé sélectif.

2.1. Méthodes de détection des bactéries coliformes

2.1.1 Méthodes classiques de détection des bactéries coliformes

Dans les eaux naturelles, les deux méthodes traditionnelles d'énumération des coliformes sont la détermination du Nombre le Plus Probable (NPP) en milieu liquide, et le dénombrement des Unités Formant Colonie (UFC) après incubation sur milieu gélosé spécifique (AFNOR 1990, APHA 1995). Ces techniques sont préconisées dans la plupart des normes de qualité des eaux.

La méthode de détermination du NPP consiste à inoculer, à l'aide de dilutions décimales appropriées de l'échantillon à analyser, une série de tubes contenant un milieu nutritif qui n'est pas véritablement sélectif mais qui permet de mettre en évidence la fermentation de lactose. Après une incubation de 24 h à 37°C (test présomptif), les tubes "positifs" (trouble, production de gaz, virage d'un indicateur) sont repiqués pour un test confirmatif dans un milieu sélectif contenant des sels biliaires ou des agents de surface et incubés pendant 24 à 48 h à 37°C (coliformes totaux (CT)) ou 44°C (coliformes fécaux (CF)). La loi de Poisson permet de calculer le NPP par unité de volume sur base du nombre de tubes positifs comptés pour les diverses dilutions. Pour cette technique, les directives européennes de qualité des eaux ne spécifient ni le milieu non sélectif, ni le milieu sélectif.

La méthode de détermination du nombre d'UFC est la plus couramment utilisée en raison de sa simplicité et de son faible coût. Elle consiste à filtrer sur une membrane stérile de porosité 0,45 µm l'échantillon d'eau ou des dilutions décimales de celui-ci, de manière à avoir après incubation 10 à 100 UFC sur le filtre. La membrane est mise à incuber sur milieu gélosé sélectif à 37°C pendant 48 h (CT) ou à 44°C pendant 24 h (CF). Les colonies typiques sont dénombrées sur le milieu gélosé et le résultat est souvent exprimé par 100 ml d'échantillon brut. Pour cette technique, les directives européennes de qualité des eaux définissent les milieux appropriés, tels que la gélose lactosée au Tergitol et TTC qui a été utilisée dans cette étude.

Les deux méthodes précitées présentent divers inconvénients, dont le principal est un long temps de réponse (jusqu'à 96 h pour la détermination du NPP). Elles ne permettent donc pas de détecter immédiatement les pollutions fécales en milieu naturel, ce qui constitue un gros inconvénient quand une réponse rapide sur l'état de contamination d'une eau naturelle est souhaitée, par exemple aux prises d'eau des usines de production d'eau potable en rivière ou dans les zones de baignade fréquentées. De plus, ces méthodes (particulièrement la filtration sur membrane) sont probablement mal adaptées au dénombrement des coliformes dans les eaux naturelles, car elles ne permettent pas d'y

détecter les bactéries ‘actives mais non cultivables’, c’est-à-dire des bactéries en état de stress incapables de se multiplier sur/dans les milieux nutritifs mais morphologiquement intactes et conservant certaines activités métaboliques. L’état actif mais non cultivable (ANC) a été démontré chez des bactéries marines autochtones, mais également chez les bactéries fécales (dont des pathogènes) rejetées dans des eaux naturelles stérilisées (Colwell *et al.* 1985, Grimes & Colwell 1986, Joux *et al.* 1997). Les diverses limitations des méthodes classiques de dénombrement des coliformes expliquent qu’il existe à l’heure actuelle un vif intérêt pour le développement de nouvelles méthodes de détection des coliformes (Rompré *et al.* 2002).

2.1.2 Méthodes enzymatiques

L’exploitation de propriétés enzymatiques spécifiques des coliformes totaux et d’*E.coli* constitue une alternative intéressante aux méthodes classiques de dénombrement des coliformes, et fait l’objet de nombreuses recherches depuis une quinzaine d’années.

Les coliformes totaux (CT) sont traditionnellement définis sur base de leur capacité à fermenter le lactose (voir chapitre 1). Le catabolisme du lactose chez les CT nécessite la présence de deux enzymes dont l’expression est inductible: une perméase qui facilite l’entrée du lactose dans les cellules, et l’enzyme **β -D-galactosidase** (GAL) qui hydrolyse le lactose en galactose et glucose dans l’intestin humain et animal (Figure 2). La β -D-galactosidase peut également hydrolyser des composés artificiels tels que l’O-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG) en libérant ainsi l’O-nitrophényl de couleur jaune, ou le 4-méthylumbelliferyl- β -D-galactoside (MUGal) en libérant un produit 4-méthylumbellifère (MUF) fluorescent (Figure 2).

L’enzyme **β -D-glucuronidase** (GLU) permet aux *Escherichia coli* de cliver les diglucuronides de bilirubine dans l’intestin humain ou animal, en libérant des acides glucuroniques d’une part, et des molécules de bilirubine d’autre part (Figure 3). Cet enzyme inductible peut également hydrolyser le substrat artificiel 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUGlu) en libérant du 4-méthylumbellifère (MUF) fluorescent (Figure 3).

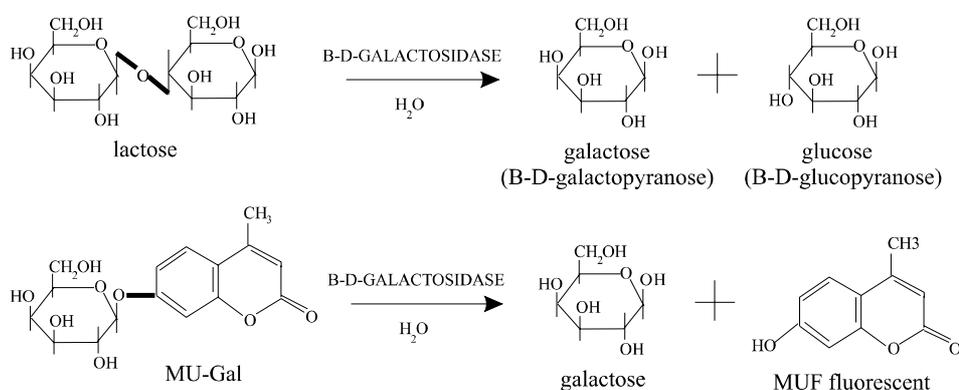


Figure 2 : Hydrolyse du lactose et du MUGal par la β -D-galactosidase. Les liaisons hydrolysées par l’enzyme sont représentées en gras dans la figure.

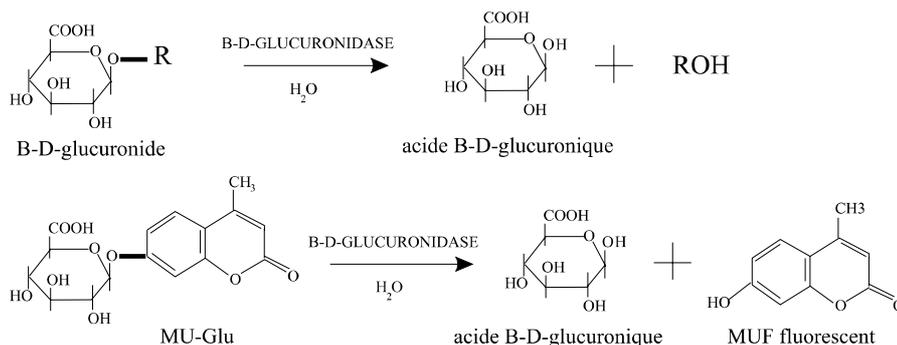


Figure 3 : Hydrolyse des β -D-glucuronides et du MUGlu par la β -D-glucuronidase. Les liaisons hydrolysées par l'enzyme sont représentées en gras dans la figure.

Les propriétés enzymatiques des CT et d' *E.coli* ont été utilisées pour mettre au point de nouvelles méthodes d'énumération des coliformes plus rapides et plus spécifiques. Dans un premier temps, celles-ci étaient basées sur la présence dans les milieux de croissance de substrats spécifiques comme seule source de carbone, qui ne peuvent être utilisés que par les bactéries possédant les enzymes β -D-galactosidase et β -D-glucuronidase. Divers substrats chromogènes et fluorogènes ont ainsi été proposés, parmi lesquels les plus utilisés sont l' ONPG, le MUGal et le MUGlu. L'hydrolyse de ces substrats par les bactéries libère des molécules colorées, ou des molécules fluorescentes détectées par exposition aux rayonnements ultra-violet. Ces divers substrats peuvent être combinés pour permettre la recherche simultanée des CT et *E.coli* dans les échantillons (Rompré *et al.* 2002). Le temps nécessaire à la détermination du NPP a été sensiblement amélioré grâce aux nouveaux milieux de culture basés sur les propriétés enzymatiques des coliformes, car aucun test confirmatif n'est nécessaire. Cependant, ces nouvelles méthodes nécessitent encore minimum 18 h d'incubation, et ne permettent pas de détecter des coliformes non cultivables en milieu naturel.

Plus récemment, les propriétés enzymatiques des CT et d' *E.coli* ont été exploitées dans des tests sans passage par une étape de mise en culture des échantillons (Berg & Fiksdal 1988, Fiksdal *et al.* 1994, Apte *et al.* 1995). La suppression de cette étape a permis d'abaisser considérablement le temps de réponse des méthodes: celui-ci est généralement ≤ 1 h. Par exemple, Fiksdal *et al.* (1994) ont proposé un protocole basé sur les substrats MUGal et MUGlu pour la détection des coliformes fécaux en 30 minutes dans les eaux côtières. Dans notre travail, ces méthodes enzymatiques directes ont d'abord été optimisées pour une utilisation sur des échantillons d'eau douce (George *et al.* 2000) et ensuite utilisées pour étudier les sources et la dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine. Ces méthodes présentent l'avantage d'être rapides, peu coûteuses et simples à utiliser.

2.2. Développement de méthodes enzymatiques rapides sans passage par une mise en culture des échantillons

2.2.1 Mise au point des protocoles

Les méthodes enzymatiques de détection des CT et d' *E.coli* consistent à filtrer un échantillon d'eau, à incuber le filtre dans un tampon à pH optimal et température optimale en présence d'un substrat fluorogène à concentration saturante (MUGal ou MUGlu), et à mesurer l'apparition de fluorescence résultant de l'hydrolyse du substrat par les bactéries au cours du temps. Celle-ci est exprimée en picomoles de produit MUF libéré par minute. L'apparition de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent dans l'échantillon, qui est elle-même proportionnelle au nombre de CT ou d' *E.coli* dans l'échantillon si la quantité d'enzyme par bactérie est constante.

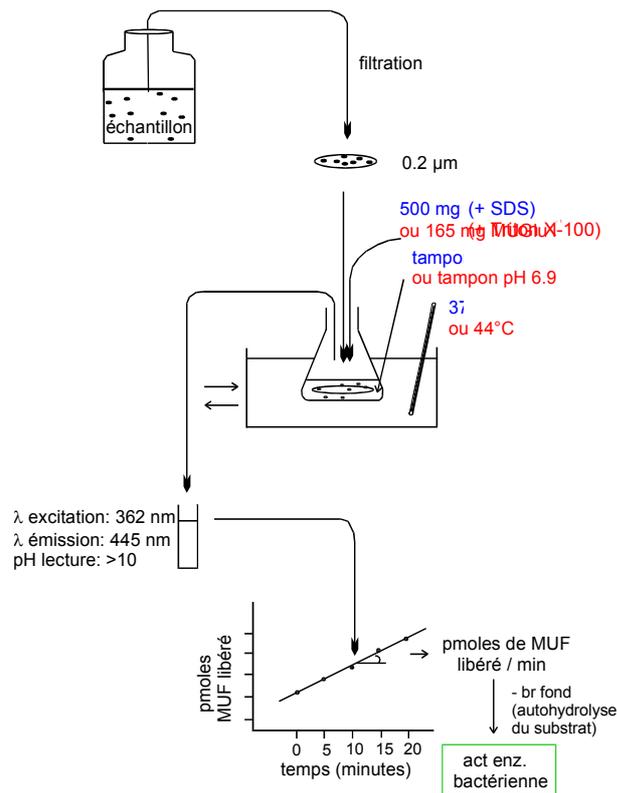


Figure 4 : Protocole de mesure des activités β -D-galactosidasique (en bleu) et β -D-glucuronidasique (en rouge), basé sur l'utilisation des substrats fluorogènes MUGal (Sigma) et MUGlu (Biosynth AS).

Cette méthode a été utilisée dans le bassin de la Seine pour la détection des CT et d' *E.coli*. Son protocole a été préalablement optimisé pour les eaux douces, en testant différents pH d'incubation, températures d'incubation et concentrations en substrats fluorogènes sur des échantillons d'eaux douces naturelles diversement contaminées en coliformes (George et al. 2000). Ces expériences ont permis de finaliser un protocole de mesure de l'activité GAL des CT d'une part, et de l'activité GLU d' *E.coli* d'autre part. Les deux protocoles sont présentés à la Figure 4. Dans les eaux usées, différentes concentrations en substrats MUGal ou MUGlu ont également été testées, afin de déterminer si la concentration utilisée en routine pour les eaux douces naturelles était suffisante pour obtenir une réponse enzymatique optimale dans les eaux usées. Comme les relations de Michaëlis-Menten obtenues entre l'activité GAL ou GLU et la concentration en MUGal ou MUGlu étaient similaires à celles obtenues dans des eaux douces naturelles (George et al. 2001b), les protocoles optimisés pour les eaux douces ont été appliqués tels quels aux eaux usées. A l'aide d'inducteurs de la β -D-galactosidase (l' IPTG) et de la β -D-glucuronidase (le MetGlu), nous avons également vérifié que les deux activités enzymatiques étaient déjà induites chez les coliformes des milieux aquatiques naturels. Pour cela, des échantillons d'eaux douces ont été incubés pendant 6 h en présence et en l'absence d'IPTG et de MetGlu (inducteurs), et les activités GAL et GLU ont été mesurées au cours du temps (Figure 5). Aucune augmentation notable des activités enzymatiques n'a été observée sous l'action des inducteurs aux concentrations testées. Nous avons par conséquent considéré que ces enzymes étaient déjà induites chez les coliformes du milieu naturel, et qu'il était inutile d'ajouter un inducteur dans les protocoles, quelque soit l'abondance en coliformes de l'eau analysée.

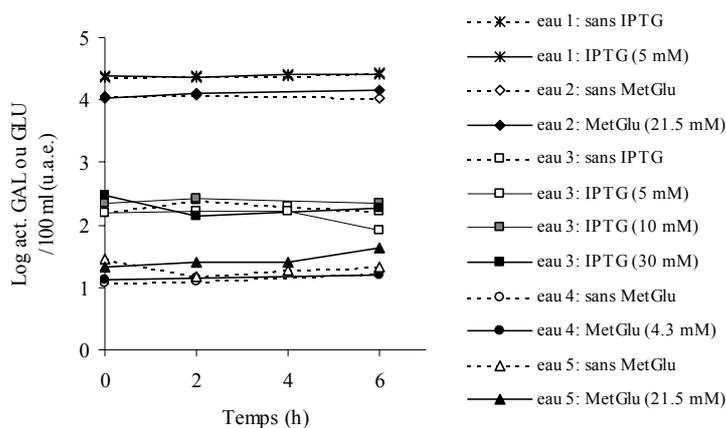


Figure 5 : Effet au cours du temps de l'ajout d'inducteurs IPTG et MetGlu sur les activités GAL et GLU présentes dans cinq échantillons naturels d'abondance en coliformes variable.

2.2.2 Comparaison des mesures d'activité enzymatique et des comptages sur milieu gélosé spécifique

La précision des méthodes enzymatiques et des dénombrements sur gélose a été comparée sur plusieurs échantillons d'eaux douces et d'eaux usées. La reproductibilité des mesures enzymatiques était très bonne (coefficient de variation de 10-15%) et systématiquement meilleure que celle des dénombrements sur milieu gélosé, bien que non significativement différente.

Une large gamme d'eaux douces allant de petits ruisseaux forestiers à des rivières en aval de rejets domestiques a été échantillonnée et analysée par les méthodes enzymatiques, en parallèle avec des dénombrements de coliformes sur gélose lactosée au Tergitol et TTC. La même comparaison a été établie sur des eaux usées brutes, de première décantation et traitées. L'ensemble des points obtenus sur les eaux naturelles et les eaux usées est présenté à la Figure 6.

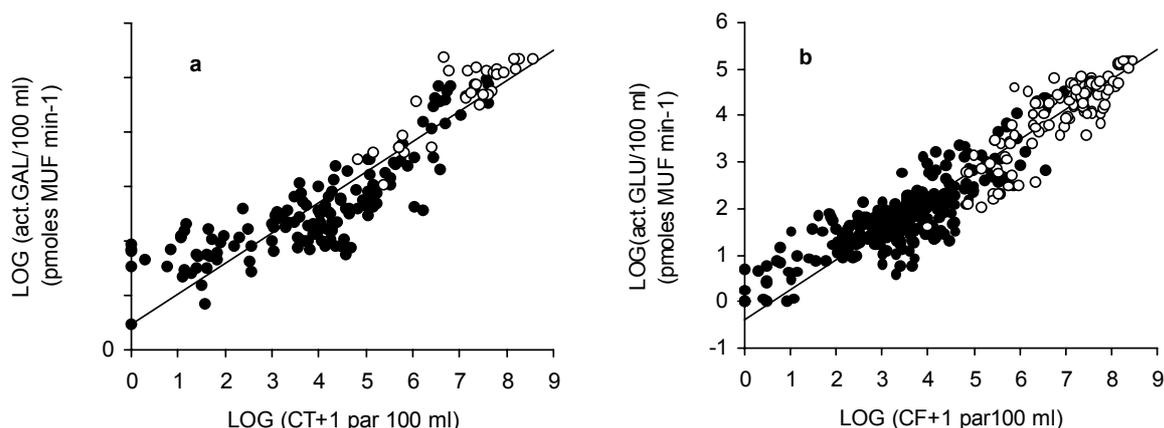


Figure 6 : Régression linéaire de type II en coordonnées log-log entre l'activité GAL et le nombre de CT cultivables (a) et l'activité GLU et le nombre de CF cultivables (b) dans les eaux douces naturelles (●) et les eaux usées (○). $\text{Log act GAL} = 0.56 * \text{log CT} + 0.45$ ($r^2 = 0.80$, $n = 181$, $p < 0.001$); $\text{Log act GLU} = 0.65 * \text{log CF} - 0.39$ ($r^2 = 0.88$, $n = 407$, $p < 0.001$).

Les régressions linéaires ajustées entre l'activité GAL et les CT cultivables (en coordonnées log-log) et entre l'activité GLU et les CF cultivables (en coordonnées log-log) sont toutes deux

significatives ($r^2=0.80$ et $r^2= 0.88$). Ces régressions linéaires ont servi à estimer la sensibilité des méthodes enzymatiques en "nombre de coliformes cultivables correspondants". Le bruit de fond des méthodes enzymatiques, c'est-à-dire le taux d'autohydrolyse du substrat, est de 45 ± 16 (activité GAL, $n=5$) et 2.2 ± 0.5 (activité GLU, $n=20$) picomoles par minute. Si on considère un seuil de détection égal à 3 fois la valeur du bruit de fond, la sensibilité des méthodes enzymatique correspond à environ 450-1700 CT et 50-100 CF cultivables.

2.2.3 Activité enzymatique par coliforme

La pente des régressions linéaires calculées à la Figure 6 entre les méthodes enzymatiques et les dénombrements sur milieu gélosé (en coordonnées log-log) est dans les deux cas < 1 , ce qui signifie que l'activité enzymatique par coliforme cultivable est plus élevée dans les eaux douces contenant peu de coliformes que dans les rivières très polluées ou les eaux usées (Figure 7).

Quatre hypothèses peuvent expliquer ces résultats:

- l'activité enzymatique par coliforme est réellement plus élevée dans les eaux peu polluées. Cette hypothèse est difficile à vérifier en conditions de laboratoire et n'a pas été testée dans cette étude.
- l'activité enzymatique des coliformes est surestimée dans les eaux peu polluées ou sous-estimée dans les eaux très polluées, ce qui signifie que l'activité par coliforme dépend du nombre de coliformes présents pendant la mesure enzymatique. Cette hypothèse a été testée plusieurs fois, en mesurant dans des dilutions décimales successives d'une eau usée, l'activité GLU et le nombre de CF cultivables. Dans tous les cas, l'activité GLU était directement proportionnelle au nombre de CF cultivables dans les différentes dilutions (pente proche de 1)(George *et al.* 2000). Par conséquent, l'activité enzymatique par coliforme ne dépend pas du nombre de coliformes présents au moment de la mesure d'activité enzymatique.
- des bactéries "non cibles" (bactéries n'appartenant pas au groupe des CT ou à l'espèce *E.coli* mais qui possèdent l'enzyme GAL ou GLU) interfèrent largement dans les mesures d'activité enzymatique dans des eaux contenant peu de coliformes, ce qui reflèterait un manque de spécificité des méthodes enzymatiques. La spécificité des méthodes enzymatiques est discutée au paragraphe 2.2.4.
- l'abondance en coliformes est sous-estimée dans les eaux peu polluées par les méthodes culturales en raison de l'existence de nombreuses bactéries actives (c'est-à-dire présentant une activité enzymatique détectable) mais non cultivables. Cette hypothèse est développée au paragraphe 2.2.5.

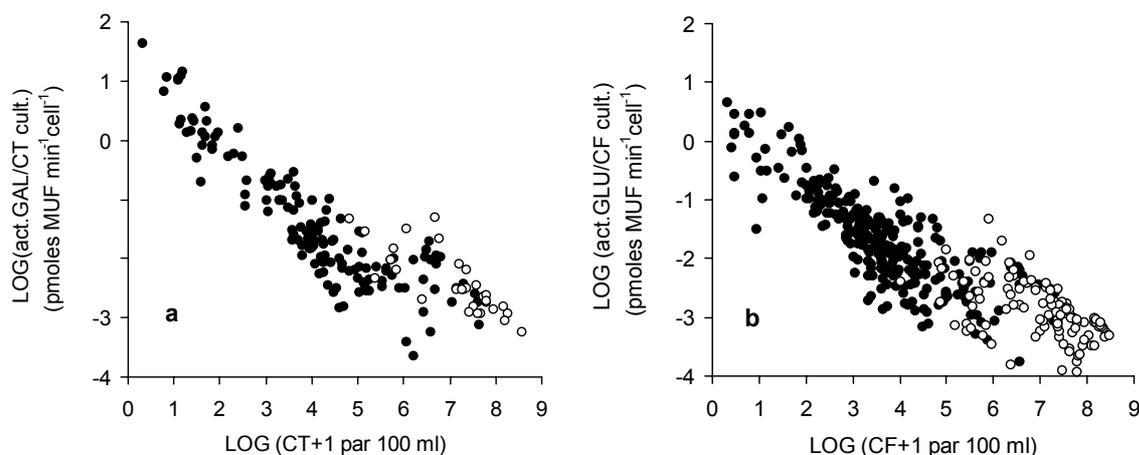


Figure 7 : Activité GAL par CT cultivable en fonction du nombre de CT cultivables (a) et activité GLU par CF cultivable en fonction du nombre de CF cultivables (b) dans les eaux douces naturelles (●) et les eaux usées (○).

2.2.4 Spécificité des méthodes enzymatiques

La troisième hypothèse fait référence à certaines études mentionnant l'existence de bactéries non-cibles possédant l'enzyme β -D-galactosidase ou β -D-glucuronidase, et qui pourraient interférer dans les méthodes enzymatiques rapides car celles-ci n'incluent pas d'étape sélective de croissance. L'interférence de bactéries non cibles serait alors fonction de leur niveau d'activité par rapport à celui des bactéries cibles, et de la proportion des bactéries cibles et non-cibles (Tryland & Fiksdal 1998). De plus, pour expliquer le fait que l'activité par coliforme cultivable est beaucoup plus élevée dans les eaux pauvres en coliformes (Figure 7) par un manque de spécificité des méthodes enzymatiques, il faudrait que le rapport de bactéries non-cibles/bactéries cibles soit supérieur dans ces eaux peu contaminées.

Concernant les niveaux d'activité respectifs, un argument souvent avancé en défaveur de la spécificité des méthodes enzymatiques est le faible niveau d'activité mesuré par cellule d' *E.coli* dans des cultures pures par rapport au niveau d'activité par coliforme cultivable en milieu naturel, qui refléterait une contribution de bactéries non-cibles à l'activité enzymatique mesurée dans les eaux naturelles. Quand un inducteur de l'activité GLU est ajouté aux milieux de culture, on constate cependant que l'activité GLU par *E.coli* est sensiblement augmentée et se rapproche de celle mesurée en milieu naturel, où nous savons que l'activité enzymatique est induite (George *et al.* 2000). De plus, l'activité GLU de cultures pures d' *E.coli* n'est pas maximale quand elle est mesurée par le protocole optimisé sur des eaux douces naturelles (et détaillé à la Figure 4), car la concentration en substrat utilisée dans ce protocole s'avère non saturante pour des cultures pures d' *E.coli*. Quant à l'activité des bactéries non-cibles, diverses expériences réalisées dans le cadre de la présente étude (George *et al.* 2000, George 2001b) ont mis en évidence que, en accord avec les résultats antérieurs de Tryland & Fiksdal (1998), l'activité enzymatique des bactéries glu+ non-cibles (bactéries non CF mais possédant la glucuronidase) est nettement inférieure à celle des *E.coli*. La présence de bactéries glu+ même en grand nombre dans des échantillons naturels interférerait alors peu dans les méthodes enzymatiques.

Concernant les abondances respectives de bactéries cibles et non-cibles dans les milieux naturels, la littérature manque de données. Fiksdal *et al.* (1997) ont proposé d'estimer le nombre de bactéries non-cibles en dénombrant les colonies bactériennes fluorescentes (bactéries "gal+" ou "glu+") formées sur des milieux gélosés non sélectifs incubés à 20°C et auxquels ont été ajoutés des substrats chromogènes ou fluorogènes spécifiques des deux enzymes étudiées. Van Poucke & Nelis (1997) ont ainsi montré que le nombre de gal+ et glu+ dans des eaux naturelles et usées pouvait largement excéder le nombre de CT ou CF dénombrés sur milieu gélosé sélectif à température sélective. Cependant, nous avons montré (George 2001), en accord avec les observations de Fiksdal *et al.* (1997), que cette différence était principalement due aux températures d'incubation élevées des milieux gélosés sélectifs, qui empêchent certains coliformes fragilisés de s'y multiplier.

En conclusion, les résultats actuellement disponibles, s'ils ne démontrent pas totalement la spécificité des méthodes enzymatiques rapides, semblent montrer que l'interférence des bactéries non-cibles dans les mesures d'activité GLU et GAL est faible, et qu'elle ne peut expliquer la pente < 1 des Figures 6a et 6b.

2.2.5 Contribution des bactéries actives mais non cultivables aux mesures d'activité enzymatique

La quatrième hypothèse pour expliquer que l'activité enzymatique par coliforme cultivable ne soit pas constante serait la prise en compte par les méthodes enzymatiques de bactéries actives mais non cultivables (BANC) dans les milieux peu contaminés par des matière fécales. Cette hypothèse est soutenue par des expériences de laboratoire qui consistent à suivre au cours du temps l'activité GLU, le nombre total de cellules et le nombre de cellules cultivables d' *E.coli* rejetés dans des microcosmes d'eau de rivière stérilisée (Figure 8) (George *et al.* 2000, Petit *et al.* 2000). Une chute du nombre d' *E.coli* cultivables beaucoup plus marquée que celle de l'activité GLU a été systématiquement observée dans ce type d'expérience. L'apparition de bactéries actives (présentant une activité GLU détectable) mais non cultivables était sans doute le résultat d'un stress nutritionnel, et nous avons pu montrer que ce phénomène était accentué par un stress lumineux. D'autres auteurs ont également constaté

l'apparition de cellules d' *E.coli* non cultivables conservant leur activité GAL après rejet en eau de mer (Davies *et al.* 1995, Pommepuy *et al.* 1996a). Il est donc possible qu'en milieu naturel, les méthodes enzymatiques soient capables de prendre en compte des BANC qui échappent aux méthodes classiques de mise en culture. La proportion de BANC est sans doute plus élevée dans les eaux pauvres en coliformes, qui sont souvent celles où la disponibilité en nutriments et la turbidité sont les plus faibles et donc où les stress nutritionnels et lumineux sont les plus marqués. Cette proportion variable de BANC en fonction du degré de contamination fécale de l'eau pourrait partiellement expliquer le fait que l'activité par coliforme cultivable n'est pas constante dans l'ensemble des eaux douces échantillonnées.

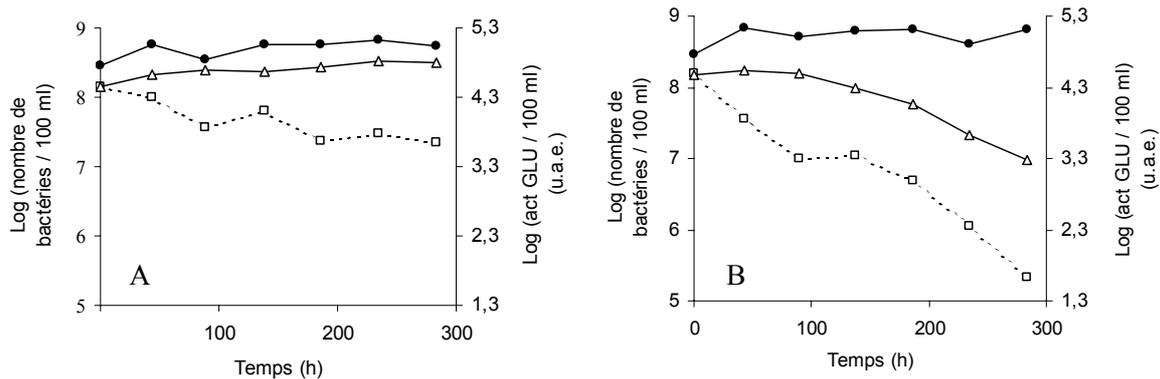


Figure 8 : Devenir en microcosme d'*E.coli* rejetés dans de l'eau de Marne stérilisée et incubée à 20 °C à l'obscurité (A) ou à la lumière suivant un cycle nyctéméral avec 8 h de lumière (B).

● = nombre de cellules/100 ml dénombrées en microscopie à épifluorescence après coloration au DAPI ; □ = nbre d'UFC (CF cultivables) /100 ml dénombrés sur gélose lactosée au Tergitol et TTC après incubation 24h à 44°C ; Δ = activité GLU /100 ml. u.a.e. = unités d'activité enzymatique (pmoles de MUF min⁻¹).

3. Sources de contamination fécale dans le bassin de la Seine

3.1. Sources ponctuelles et sources diffuses de contamination fécale

Dans les bassins versants anthropisés, les rejets d'eaux usées domestiques constituent, à priori, la source principale de contamination fécale du milieu naturel. La plupart des rejets domestiques urbains sont aujourd'hui traités en station d'épuration (STEP), dont l'objectif est d'éliminer les matières en suspension et la matière organique des effluents et, pour les plus performantes d'entre elles, la pollution azotée et éventuellement phosphorée. Bien que les eaux usées transportent aussi de nombreux germes fécaux (parmi lesquels certains sont pathogènes), très peu de STEPs sont à l'heure actuelle équipées de traitements spécifiquement conçus pour éliminer ces micro-organismes. Par conséquent, un des objectifs de cette étude sur les sources de contamination fécale dans les bassins versants a été d'évaluer l'efficacité avec laquelle les différents traitements en vigueur aujourd'hui dans les STEPs éliminent la pollution microbiologique d'origine fécale.

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, difficilement localisables dans l'espace et parfois très variables dans le temps. Ces sources peuvent être d'origine humaine (eaux d'infiltration de fosses septiques, fuites dans des réseaux d'assainissement défectueux...) ou animale (lessivage de sols contaminés par des fèces d'animaux sauvages ou du bétail). Dans un souci de simplification, seules les sources diffuses d'origine animale ont été étudiées dans le bassin de la Seine, en échantillonnant des petits bassins versants forestiers, agricoles et pâturés en amont de tout rejet domestique. Cette étude sur les apports diffus a été réalisée après avoir constaté, lors de campagnes d'échantillonnage sur la Marne, l'Oise et le Grand Morin, que

les abondances en coliformes aux stations choisies les plus en amont des secteurs étudiés (respectivement en amont de Châlons-en-Champagne, de Compiègne et de Coulommiers) étaient déjà supérieures aux normes guide et impérative de qualité des eaux de baignade.

3.2. Apports de coliformes par les eaux usées

L'étude sur les sources ponctuelles de contamination fécale a été réalisée sur douze STEPs se différenciant par leur capacité nominale (de 90 à 7000000 d'équivalents-habitants) et par leur type de traitement (boues activées, boues activées à temps de séjour prolongé, biofiltration, lagunage etc.) (Tableau 3). La plupart de ces STEPs étaient localisées dans le bassin de la Seine, mais quelques STEPs localisées ailleurs, en France ou en Belgique, ont également été échantillonnées afin de compléter l'étude.

Tableau 3 : Localisation, date d'échantillonnage et caractéristiques des STEPs échantillonnées. Les STEPs ont été regroupées par type de traitement (catégories A à G)(George et al. 2002).

STEP	Localisation	Date d'échantillonnage	Capacité en équivalents-habitants	Débit nominal (m ³ j ⁻¹)	Type de traitement ^a	Catégorie
Wavre	Belgique, Brabant Wallon	02-1999 (3 fois), 04-1999	165000	40000	PT, D, BA	A
Achères	France, Ile-de-France	05-1999, 12-1999, 04-2000, 05-2000, 06-2000	7000000	2100000	PT, D, BA	A
Guérard	France, Ile-de-France	06-2000	2000	216	BAnit	B
Couilly	France, Ile-de-France	06-2000	15000	3000	PT, D, BAnit	B
Rixensart	Belgique, Brabant Wallon	03-1999	125000	35000	PT, D, BAnit	B
Troyes	France, Champagne-Ardenne	05-1999	300000	46000	PT, D, BAnit	B
Achères, pilote Biofor®	France, Ile-de-France	05-1999, 12-1999, 04-2000, 05-2000, 06-2000		18000	PT, D, BA, Bnit	C
Waterloo	Belgique, Brabant Wallon	05-1999	20000	3600	PT, D, BAnit+denit	D
Rouen	France, Haute-Normandie	04-1999	450000	70000	PT, D, BAnit+denit	D
Valenton	France, Ile-de-France	04-1999	1200000	300000	PT, D, BAnit+denit	D
Colombes	France, Ile-de-France	04-2000, 05-2000, 06-2000	800000	240000	PT, D (Densadeg®), Bc, Bnit, Bdenit	E
Aulnoy	France, Ile-de-France	06-2000	90	14	L	F
Sainte Marie La Mer	France, Languedoc-Rousillon	07-2000	20000	3000	PT, D, BA, FS ^b , UV ^b	G

^a PT= prétraitement (dégrillage, déshuilage), D= décantation primaire, BA= boues activées + clarification, BAnit= boues activées à temps de séjour prolongé (nitrification) + clarification, BAnit+denit= boues activées à temps de séjour prolongé et zone anaérobie (nitrification + dénitrification) + clarification, Bc= biofiltre pour la dépollution carbonée (Biofor®), Bnit= biofiltre pour la nitrification (Biofor®/Biosytr®), Bdenit= biofiltre pour la dénitrification (Biofor®), L=lagunage (2 bassins), FS= filtration sur sable, UV=désinfection aux rayons UV.

^b étapes fonctionnant uniquement en été.

L'efficacité d'abattement des coliformes fécaux (CF) par différentes filières de traitement a été comparée à l'aide de traditionnels dénombrements des CF sur milieu gélosé spécifique et de la méthode enzymatique basée sur la mesure de l'activité β -D-glucuronidase (activité GLU) d'*E.coli* détaillée au chapitre 2. Une seule de ces STEPs était spécifiquement conçue pour éliminer les bactéries des effluents, par une filtration sur sable suivie d'un traitement aux ultra-violets. Dans toutes les STEPs, des échantillons d'eaux usées ont été prélevés à l'aide d'échantillonneurs automatiques réfrigérés et moyennés sur 24 h, afin d'intégrer les variations journalières d'abondance en coliformes dues aux activités humaines. Dans chaque STEP, des échantillons ont été prélevés en entrée, en sortie de la décantation primaire (quand elle existait), et en sortie de la filière de traitement. En sortie des filières, seules des eaux usées complètement traitées ont été échantillonnées, même dans les rares cas où des by-pass¹ avaient lieu dans les STEPs. Par conséquent, ce travail donne uniquement des informations sur les quantités de coliformes rejetées en milieu naturel par *temps sec*. Les apports de coliformes lors de fortes pluies, quand les débits dans les réseaux unitaires augmentent brusquement et qu'une partie des eaux usées brutes est rejetée en rivière par surverse ou après un traitement incomplet en STEP, devraient faire l'objet d'études ultérieures dans le cadre du PIREN Seine.

3.2.1 Abondance en coliformes dans les eaux usées brutes

Les abondances en CF cultivables qui ont été mesurées en entrée des douze STEPs étaient très élevées et avoisinaient 10^7 à 10^8 CF cultivables/ 100 ml (Figure 9). Les abondances en CF cultivables et les activités enzymatiques étaient assez variables d'une STEP à l'autre, et pour une même STEP, d'une campagne d'échantillonnage à l'autre.

Afin de comparer les différentes STEPs, les abondances de CF cultivables et les activités GLU ont été exprimées en "équivalents-habitants coliformes" (EH-colis), c'est-à-dire en quantités de CF cultivables et d'activité GLU rejetées par habitant et par jour dans les eaux usées brutes ou traitées. Ces EH-colis ont été calculés d'après Servais *et al.* (1999) en considérant une demande biologique en oxygène (DBO) de 54 g par habitant et par jour dans les eaux usées brutes (WHO 1982). Pour chaque STEP, le volume journalier d'eaux usées par habitant ($m^3 \text{ hab}^{-1} \text{ j}^{-1}$) a été calculé en divisant la valeur de $54 \text{ g hab}^{-1} \text{ j}^{-1}$ par la DBO moyenne mesurée dans les eaux usées brutes (mg l^{-1}). L'abondance en CF ou l'activité GLU mesurée par 100 ml d'eau usée brute ou traitée a ensuite été multipliée par 10000 et par le volume journalier d'eaux usées par habitant pour obtenir l'EH-colis correspondant (exprimé en CF cultivables ou en act GLU $\text{hab}^{-1} \text{ j}^{-1}$) dans les eaux usées brutes ou traitées. Quand les valeurs de DBO n'étaient pas disponibles (cas de la STEP de Sainte Marie la Mer), les EH-colis ont été calculés sur base d'un volume d'eaux usées de $180 \text{ l}^{-1} \text{ hab}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Dans des eaux usées brutes, les EH-colis avoisinaient les 100 milliards de CF cultivables et 10 millions d'unités d'activité GLU par habitant et par jour (Tableau 4). Par ailleurs, des expériences en laboratoire consistant à suivre l'évolution de la population de coliformes dans des eaux usées brutes et traitées incubées à différentes températures ont montré que les coliformes pouvaient se multiplier dans les rejets domestiques bruts. Cette hypothèse est soutenue par une étude de la littérature sur le réseau d'assainissement de Dundee en Ecosse (Ashley & Dabrowski 1995), où des concentrations en coliformes croissantes ont été observées des émissaires de tête aux émissaires principaux par temps sec. Il est probable que la multiplication des coliformes soit proportionnelle au temps de résidence des masses d'eaux usées dans chaque réseau d'assainissement, temps qui est d'autant plus long que le réseau -et la STEP auquel il aboutit- est grand(e). Par ce raisonnement simplifié, on peut expliquer que les valeurs d'EH-colis en entrée des STEPs échantillonnées dans cette étude augmentent globalement avec la taille de celles-ci (Figure 10).

¹ Les by-pass consistent à court-circuiter l'entièreté du traitement ou certaines de ses étapes dans les STEPs connectées à un réseau d'assainissement unitaire (càd collectant à la fois les eaux usées et les eaux de pluie). Les by-pass ont lieu lors des fortes pluies, quand le débit d'eaux collectées dépasse le débit maximum qui peut être traité dans la STEP ou dans certains ouvrages de celle-ci. L'eau est alors rejetée dans le milieu naturel non traitée ou partiellement traitée.

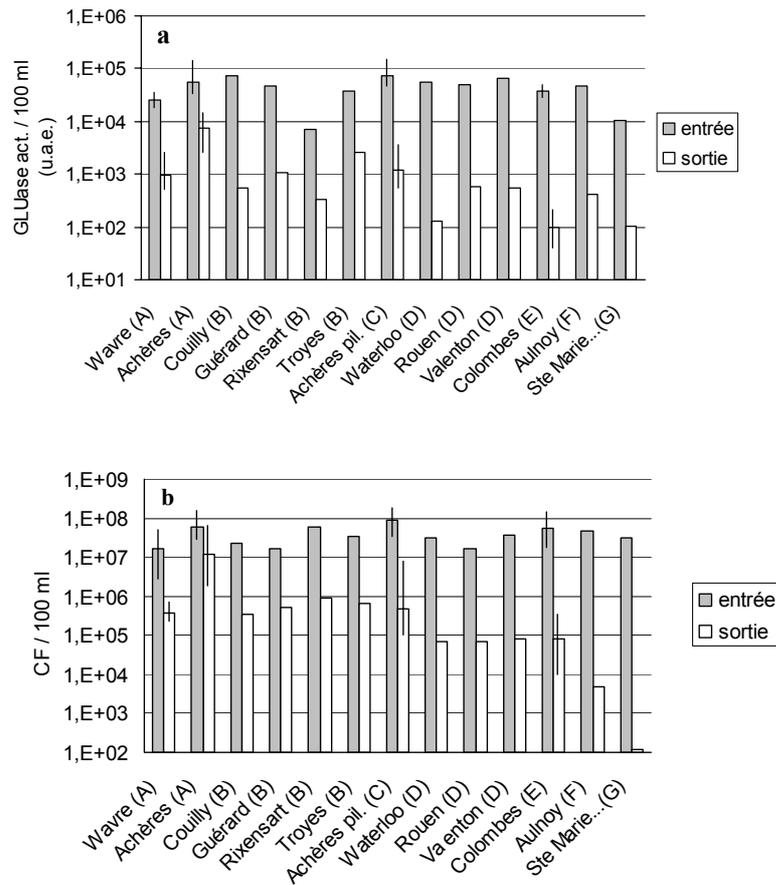


Figure 9: Activité GLU (a) and CF cultivables (b) par 100 ml dans les eaux usées en entrée et sortie des différentes STEPs. Quand les STEPs ont été échantillonnées plusieurs fois, la moyenne géométrique et l'intervalle entre les valeurs minimale et maximale (barre verticale) sont présentés sur la figure. u.a.e = unités d'activité enzymatique (pmoles de MUF min⁻¹)

Tableau 4 : Equivalents- habitants coliformes (CF cultivables ou act GLU hab⁻¹ j⁻¹) dans les eaux usées brutes et traitées des différentes STEPs. Pour les catégories de traitement incluant différentes STEPs, la moyenne géométrique a été calculée et l'intervalle entre les valeurs minimale et maximale détaillé dans le tableau (George et al. 2002).

Type de traitement	Unités d'act GLU hab ⁻¹ j ⁻¹		CF cultivables hab ⁻¹ j ⁻¹	
	Moyenne géométrique	Intervalle min-max	Moyenne géométrique	Intervalle min-max
Eau brute	8.94 x 10 ⁷	(1.66-22.2) x 10 ⁷	8.13 x 10 ¹⁰	(2.49-25.0) x 10 ¹⁰
Décantation	3.87 x 10 ⁷	(0.66-12.1) x 10 ⁷	5.04 x 10 ¹⁰	(1.34-28.0) x 10 ¹⁰
A	6.64 x 10 ⁶	(2.15-20.5) x 10 ⁶	5.13 x 10 ⁹	(0.84-31.2) x 10 ⁹
B	1.89 x 10 ⁶	(0.78-5.60) x 10 ⁶	1.28 x 10 ⁹	(0.83-2.23) x 10 ⁹
C	3.29 x 10 ⁶		1.31 x 10 ⁹	
D	8.07 x 10 ⁵	(2.08-13.0) x 10 ⁵	1.31 x 10 ⁸	(1.05-1.89) x 10 ⁸
E	4.11 x 10 ⁵		3.27 x 10 ⁸	
F	1.77 x 10 ⁶		1.93 x 10 ⁷	
G	1.88 x 10 ⁵		2.19 x 10 ⁵	

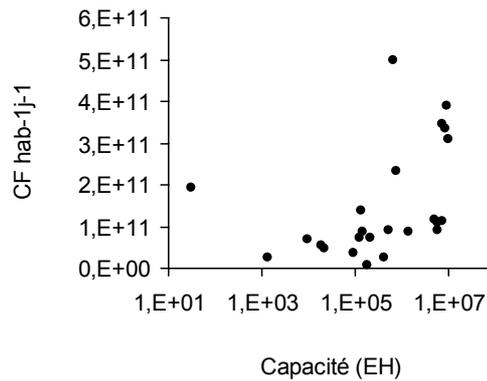


Figure 10 : Relation en coordonnées semi-logarithmiques entre l'EH-colis (en CF cultivables $\text{hab}^{-1} \text{j}^{-1}$) dans les eaux usées brutes en entrée des différentes STEPs échantillonnées, et la capacité nominale de ces STEPs (en équivalents-habitants EH). La capacité nominale de chaque STEP a été calculée pour chaque campagne comme le produit de la DBO mesurée dans les eaux usées brutes (mg l^{-1}) et du volume journalier d'eau entrant dans la STEP ($\text{m}^3 \text{j}^{-1}$), divisé par 54 ($\text{g DBO hab}^{-1} \text{j}^{-1}$).

3.2.2 Élimination des coliformes par les traitements d'épuration

Dans les filières de traitement, la décantation primaire élimine mieux les matières en suspension (MES) que les CF (Figure 11). Cette étape élimine probablement les CF liés aux MES. Elle est moins efficace pour abattre la pollution microbologique que les traitements secondaire et tertiaire. En effet, dans les filières de traitement complètes, les CF sont généralement mieux éliminés que les MES ou la DBO, deux paramètres standards qui permettent d'estimer l'efficacité des traitements (Figure 12). L'efficacité d'élimination des microorganismes fécaux est très dépendante du type de traitement pratiqué dans les STEPs échantillonnées: l'abattement des CF varie de $1 \log_{10}$ (90%) à plus de $5 \log_{10}$ (99.999%) suivant le traitement (Figure 13). Ainsi, les CF cultivables sont mieux éliminés dans les traitements où le temps de rétention des masses d'eaux usées est plus long (boues activées à temps de séjour prolongé, lagunage...), dans le traitement le plus efficace pour réduire les variables physico-chimiques (biofiltration), ou dans la filière comprenant une étape de désinfection.

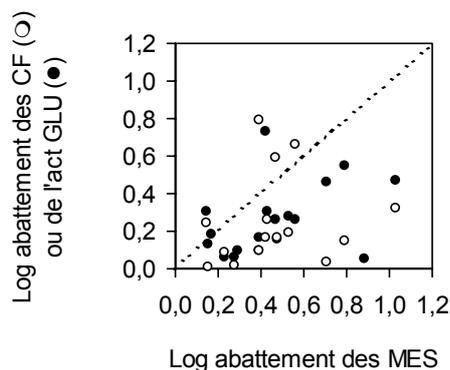


Figure 11 : Relation en coordonnées logarithmiques entre l'abattement par la décantation primaire de l'act GLU ou des CF cultivables et l'abattement des MES. La ligne en pointillé représente la ligne d'équivalence.

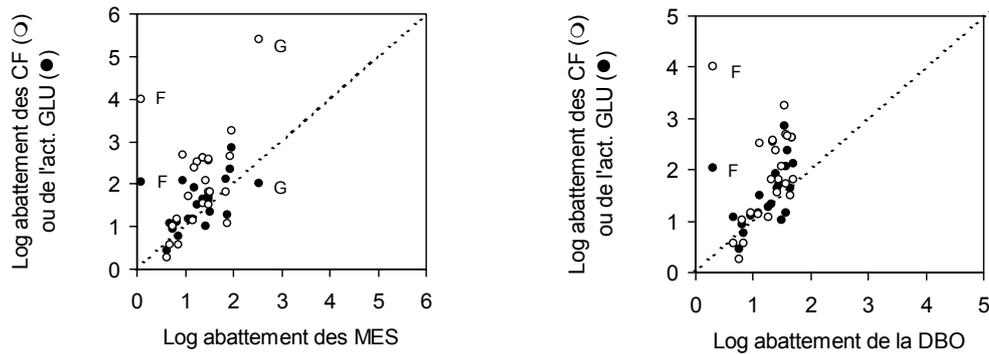


Figure 12: Relation en unités logarithmiques entre l'abattement de l'act GLU et des CF cultivables et celui des MES et de la DBO. La ligne pointillée représente la droite d'équivalence. Aucune donnée de DBO n'était disponible pour le traitement G.

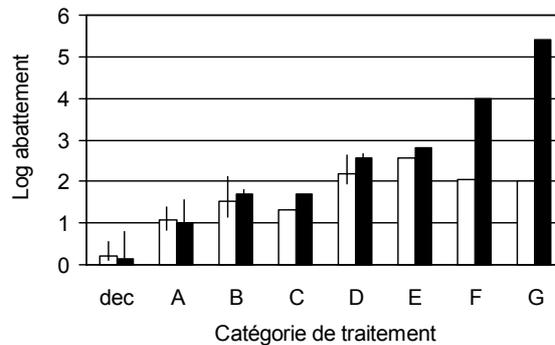


Figure 13: Efficacité d'abattement (en log) de l'activité GLU et des CF cultivables en fonction du type de traitement. Les résultats sont exprimés en \log_{10} d'abattement par rapport aux valeurs dans l'eau usée brute. Quand différentes STEPs ont été échantillonnées dans une même catégorie, la moyenne géométrique a été calculée et l'intervalle entre les valeurs minimale et maximale (barre verticale) présenté sur la figure. Dec= décantation primaire, A à G = type de traitement détaillé au Tableau 3.

Les abondances en CF cultivables sont fortement réduites par le lagunage (Figure 13). Il est cependant peu probable que l'abattement de $4 \log_{10}$ observé en juin 2000 soit représentatif d'un abattement moyen annuel, car l'efficacité des lagunages est variable sur l'année et présente un maximum au printemps et en été (Bahlaoui *et al.* 1997). Par ailleurs, l'activité GLU n'est réduite que de $2 \log_{10}$ dans le même lagunage. Cette différence peut être due à la présence, dans les bassins de lagunage peu profonds et ensoleillés, de coliformes qui ont conservé leur activité enzymatique mais sont devenus non cultivables sous l'action de la lumière solaire (Barcina *et al.* 1989, Dupray *et al.* 1993, Pompepuy *et al.* 1996b, George *et al.* 2000), ou à une interférence dans la mesure enzymatique de certaines algues d'eau douce qui produisent la β -D-glucuronidase (Davies *et al.* 1994).

La filière comprenant une étape de désinfection aux UV réduit de manière spectaculaire les abondances en CF cultivables ($5.4 \log_{10}$) (Figure 13), et en sortie des UV, les effluents ne contiennent plus qu'environ 100 CF cultivables/ 100 ml. A l'heure actuelle, les UV sont considérés comme l'un des meilleurs traitements de désinfection des effluents. Cependant, la seule étape de désinfection aux UV réduit d'environ $3 \log_{10}$ l'abondance en CF cultivables dans les effluents, mais elle ne modifie pas le niveau d'activité GLU. D'autres études ont montré que l'activité β -D-galactosidasique de cellules d'*E.coli* était peu affectée par les UV (Pompepuy *et al.* 1998, Fiksdal & Tryland 1999) et qu'une

recroissance des CF soumis aux UV pouvait être observée après leur rejet en eau douce (Pommepuy *et al.* 1998). Ces résultats mériteraient d'être confirmés mais ils soulèvent des questions sur l'efficacité des ultra-violetts à réellement éliminer les bactéries dans les eaux usées. Dans une étude récente réalisée à l'aide d'outils moléculaires, le même genre de critique a été formulée à l'encontre de la chloration des effluents qui, au lieu de tuer les coliformes, induirait un état actif mais non cultivable chez ceux-ci (Rockabrand *et al.* 1999).

3.2.3 *Abondance en coliformes dans les eaux usées traitées*

Dans les eaux traitées en sortie de STEP, les abondances en CF cultivables varient de 10^2 à 10^7 / 100 ml et les activités GLU de 10^2 à 10^4 unités d'activité enzymatique/ 100 ml (Figure 9). La plupart de ces valeurs sont élevées, c'est pourquoi des pics d'abondances en coliformes sont souvent observés en aval des rejets de STEP, comme par exemple dans la Seine en aval des rejets des STEPs de Valenton et Achères (George *et al.* 2001a, 2001c). Ces pics dépendent de la qualité microbiologique des effluents et du milieu récepteur, mais aussi du facteur de dilution des rejets dans le milieu récepteur. Les abondances en coliformes dans les effluents traités dépendent de la qualité microbiologique des eaux brutes d'une part, et de l'efficacité de la filière de traitement à éliminer les coliformes d'autre part. Des douze STEPs échantillonnées dans ce travail, les effluents traités de Seine Aval étaient les plus contaminés (Figure 9). Les EH-colis sont également très variables d'un effluent traité à l'autre en raison des différences d'efficacité entre les traitements (Tableau 4). Ces EH-colis permettent d'estimer, pour toute STEP dont on connaît le traitement et la capacité nominale, la quantité de coliformes rejetés par jour dans l'environnement. A titre d'exemple, d'après les valeurs du Tableau 4, un village de 10000 habitants équipé d'une décantation primaire pour traiter ses effluents rejeterait, par jour, autant de CF qu'une ville de 100000 habitants équipée d'un traitement par boues activées, ou qu'une ville de 1000000 d'habitants équipée d'un système de biofiltration! Les quantités de coliformes apportées aux milieux naturels par jour par les STEPs peuvent alors servir de données d'entrée dans des modèles décrivant le devenir des coliformes dans les milieux aquatiques, comme décrit au chapitre 5.

3.3. **Apports de coliformes par le lessivage des sols**

Les apports diffus de coliformes dans le bassin hydrographique de la Seine dus au lessivage des sols ont été étudiés dans des petites rivières du bassin de l'Oise amont, dans la Thiérarchie belge (où l'Oise prend sa source) et dans les départements français de l'Aisne et des Ardennes. Cette région a été choisie pour des raisons logistiques et de diversité de couverture végétale. Une campagne d'échantillonnage a été réalisée en juillet 2000 sur une soixantaine de ruisseaux choisis sur des cartes au 1/100000^{ème} et sur le terrain, en fonction de la couverture végétale de leur bassin versant (forêts, cultures (blé, maïs, avoine, colza) et/ou prairies pâturées). Les prélèvements ont eu lieu en amont de tout rejet domestique, de manière à s'affranchir des apports d'origine humaine. Cette stratégie d'échantillonnage avait déjà été utilisée avec succès par des chercheurs du PIREN Seine pour étudier les apports d'ions et de pesticides par le lessivage des sols forestiers et agricoles (Thibert 1994, Guivarc'h & Chevreuil 1998). Douze ruisseaux représentatifs ont été sélectionnés parmi les 60 (4 de zones forestières, 4 de zones cultivées et 4 de zones d'élevage) et ré-échantillonnés en septembre 2000, novembre 2000, février 2001, avril 2001 et juillet 2001 afin d'évaluer les variations temporelles de la contamination fécale des petites rivières. Les conditions climatiques caractérisant ces six campagnes, ainsi que la température de l'eau au moment des prélèvements, sont reprises pour information au Tableau 5. La concentration en MES, l'abondance en CF cultivables et l'activité GLU ont été mesurées dans chaque échantillon par les méthodes décrites au chapitre 2. Les résultats de la campagne de juillet 2000 sur les 60 ruisseaux sont présentés à la Figure 14 et ceux du suivi temporel sur les 12 ruisseaux à la Figure 15.

Tableau 5 : Caractéristiques climatiques enregistrées à la station météorologique de Dourbes (Belgique) et température des échantillons lors des quatre campagnes d'échantillonnage.

Date de l'échantillonnage	Temps ^a	Précipitations journalières (mm/jour)			Température de l'eau ^e (°C)	
		Moyenne ^b	Intervalle min-max ^c	Moyenne habituelle ^d	Moyenne	Intervalle min-max
10 au 19/07/2000	Pluie, orages	6.9	0.3 - 15.4	2.4	12	11-13
06/09/2000	Pluie	6.5	0.6 - 9.8	2.4	12	11-13
22/11/2000	Pluie	2.2	0.2 - 5.3	2.2	9	7-11
15/02/2001	Temps sec	2.0	0.1 - 8.3	1.8	6	2.5-9
26/04/2001	Temps sec	1.3	0.2-2.7	1.9	7	5-8
05/07/2001	Temps sec	1.9	1-2.9	2.5	15	13-18

^a Observé au moment des échantillonnages ; ^b Moyenne, sur la journée d'échantillonnage + les 5 jours précédant celle-ci, des valeurs journalières de précipitations enregistrées à la station météorologique de Dourbes (Station météorologique la plus proche de la zone de prélèvement). Pour la campagne de juillet 2000, la moyenne a été calculée sur les 10 jours d'échantillonnage + les 5 jours précédant la campagne. Pour la campagne de février 2001, la moyenne a été calculée sur le mois entier (trop peu de données sur 6 j.) ; ^c Intervalle entre les valeurs minimales et maximales enregistrées à la station météorologique de Dourbes sur une période couvrant la journée d'échantillonnage (ou les 10 jours d'échantillonnage en juillet 2000) + les 5 jours précédant celle-ci ; ^d données météorologiques sur les 30 dernières années ; ^e valeur moyenne pour les 12 ruisseaux du suivi temporel.

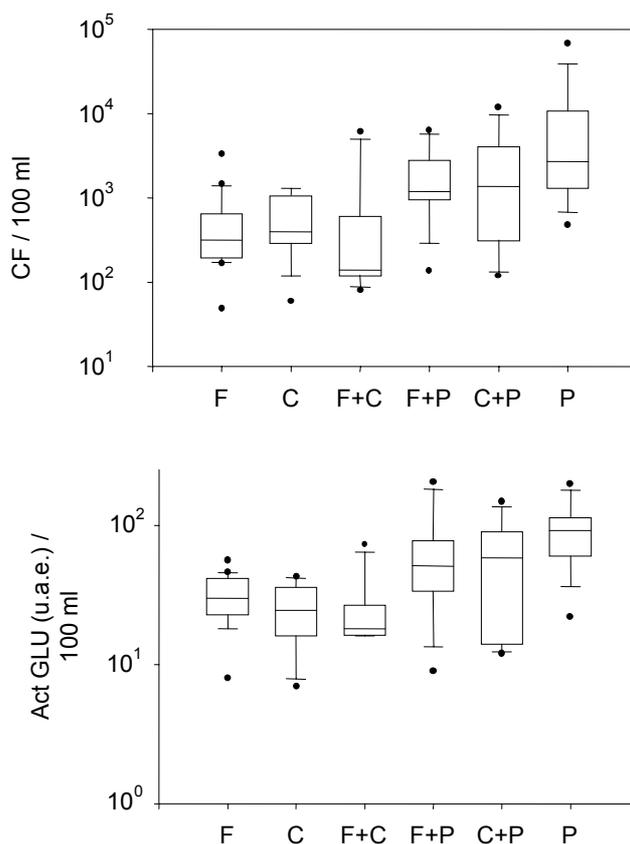


Figure 14: Concentration en CF cultivables et en activité GLU (en échelle log) dans des ruisseaux alimentés par des bassins versants forestiers (F, n=17), cultivés (C, n=8), pâturés (P, n=14) ou mixtes (F+C, n=7; F+P, n=7; C+P, n=8) (Juillet 2000). La barre horizontale au centre des "boîtes à moustache" représente la valeur médiane (quartile 50%), les limites inférieure et supérieure des "boîtes à moustache" les quartiles 25% et 75%, les barres verticales les quantiles 10% et 90%, et les points les valeurs extrêmes (non comprises dans la fourchette 10%-90%). u.a.e. = unités d'activité enzymatique (pmoles MUF min⁻¹).

L'impact du type de couverture végétale et d'occupation du sol sur la qualité microbiologique des rivières est très visible sur la Figure 14. Les ruisseaux traversant des pâtures, qui sont essentiellement consacrées dans cette zone du bassin à l'élevage des bovins, contiennent beaucoup plus de CF que les ruisseaux de zones forestières ou cultivées. Des abondances de 480 à 69000 CF cultivables/ 100ml (médiane: 2700) ont été mesurées en juillet 2000 dans les ruisseaux de zones d'élevage, alors que dans la Seine 100 km en amont de Paris, elles valaient 900 CF/ 100ml en mars 1998 et 2100 CF/ 100ml en septembre 1998. D'autres études de la littérature confirment l'impact des élevages extensifs sur la pollution fécale des petites rivières (Khaleel *et al.* 1980, Hagedorn *et al.* 1999). De plus, l'accès direct du bétail aux ruisseaux pour s'abreuver, comme c'est le cas dans les zones amont du bassin de l'Oise, favorise la contamination fécale de ceux-ci (Hagedorn *et al.* 1999).

Par ailleurs, les abondances en CF dans les petites rivières échantillonnées en juillet 2000 (Figure 14) étaient nettement supérieures à celles que nous avons mesurées dans des ruisseaux forestiers de la Thiérarchie belge en décembre 1996 (20-340 CF cultivables/ 100 ml). La campagne de juillet 2000 a été réalisée par mauvais temps, et les concentrations en MES dans les rivières étaient très élevées (jusque 250 mg l⁻¹). Les concentrations élevées en coliformes résultaient probablement d'un important ruissellement en surface des sols (plus contaminé en MES et en coliformes que l'écoulement de base) et/ou d'une remise en suspension des sédiments contaminés du lit due à l'augmentation du débit des ruisseaux. Cette explication est d'autant plus plausible que nous avons observé, dans ces mêmes rivières, qu'une fraction importante des coliformes était attachée aux MES (voir chapitre 4).

Le suivi temporel réalisé sur 12 ruisseaux du bassin de l'Oise amont a révélé l'existence de fluctuations temporelles de la contamination fécale des petites rivières, avec des variations maximales de 1.30 log (CF cultivables) et 0.56 log (act. GLU) (Figure 15). Les abondances en CF et les activités enzymatiques étaient maximales par temps pluvieux (juillet 2000, septembre 2000), alors que les valeurs minimales pour les deux paramètres ont été enregistrées par temps sec en hiver (février 2001), quand les concentrations en MES étaient parmi les plus basses du suivi. Par ailleurs, les ruisseaux traversant des pâtures étaient plus contaminés sur l'ensemble du suivi que ceux traversant des cultures ou des forêts, ce qui confirme l'impact du bétail sur la pollution fécale des petites rivières.

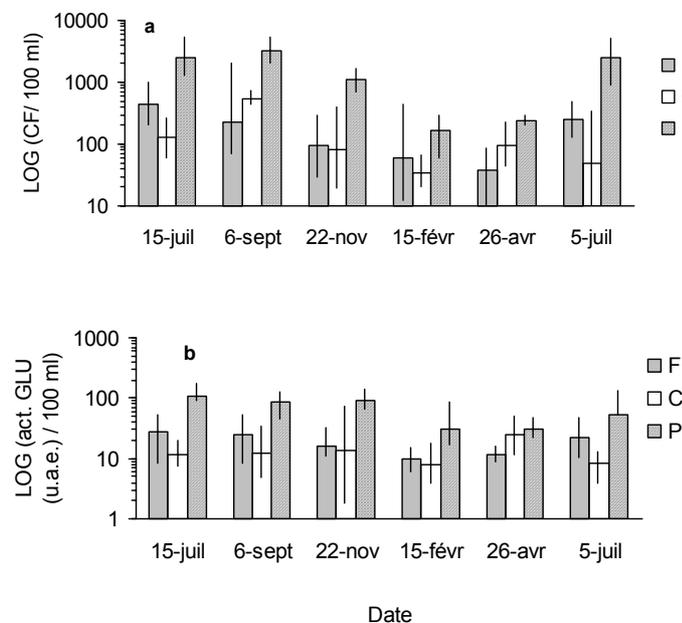


Figure 15: Variations saisonnières (en échelle log) de la concentration en CF cultivables (a) et de l'activité GLU (b) dans 12 ruisseaux du bassin de l'Oise, alimentés par un bassin versant forestier (F), cultivé (C) ou pâturé (P). Les résultats présentés pour chaque type de bassin versant sont des moyennes géométriques des valeurs mesurées dans 4 ruisseaux.

Ces campagnes montrent bien le rôle des précipitations dans la contamination fécale des rivières par le ruissellement de surface (riche en coliformes et MES) et/ou la remise en suspension de sédiments contaminés. Une bonne corrélation a d'ailleurs été observée entre le niveau d'act GLU et la concentration en MES dans les ruisseaux pour l'ensemble des campagnes du suivi (Figure 16). Il a été largement démontré dans la littérature que les fortes pluies et les orages provoquaient des pics de contamination fécale en rivière, systématiquement associés à des pics de concentrations en MES (Wyer *et al.* 1996 et 1997, Baudart *et al.* 2000). Cependant, la littérature manque d'informations sur la nature du lien entre coliformes et MES et on peut s'interroger pour savoir si les coliformes sont apportés aux petites rivières par temps de pluie conjointement aux MES ou adsorbés sur celles-ci. Afin de répondre à cette question, la fraction de coliformes adsorbés sur les MES a été évaluée dans les 12 ruisseaux échantillonnés en novembre 2000 (temps pluvieux) (voir chapitre 4). Il s'est avéré qu'une partie de la population de coliformes était en effet liée aux MES, et que cette fraction dépendait de la concentration en MES de l'eau (chapitre 4).

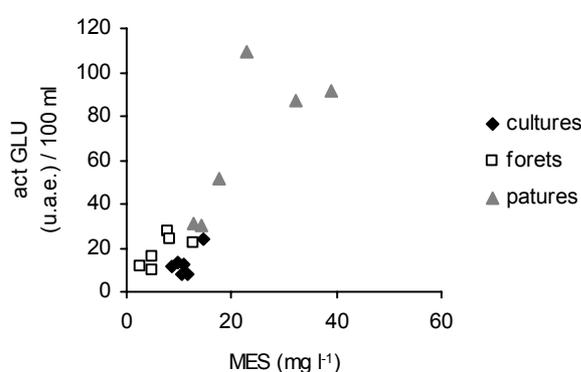


Figure 16: Relation entre l'activité GLU et la concentration en MES dans les 12 ruisseaux échantillonnés pendant le suivi temporel. Chaque point représente une moyenne géométrique des valeurs mesurées lors de chaque campagne dans les 4 ruisseaux correspondant au même type de couverture végétale.

En conclusion, cette étude sur les apports de coliformes aux rivières par le lessivage des sols a montré que les abondances en CF dans les petites rivières dépendaient du type de couverture végétale et d'occupation du sol, puisque les ruisseaux traversant des pâtures sont systématiquement plus contaminés que ceux de zones forestières ou de zones cultivées. Ces campagnes ont également montré que les conditions climatiques pouvaient jouer un rôle significatif dans les apports diffus par le lessivage des bassins versants. Il est probable qu'elles conditionnent l'importance relative du ruissellement de surface par rapport à celui de l'écoulement de base, et les phénomènes de remise en suspension des sédiments dans les rivières. Cependant, certains facteurs influençant les apports diffus de coliformes (saison, activités agricoles liées au sol (épandages de fumier, stabulation ou mise en pâture du bétail ...)) restent à étudier plus en détails.

Enfin, même si les abondances en coliformes dans les petites rivières alimentées par des apports diffus sont élevées, un rapide calcul sur le bassin de l'Oise amont nous montre que même dans les bassins ruraux peu peuplés, la contribution du lessivage des sols à la contamination fécale des rivières est faible par rapport à celle des rejets ponctuels. Si on considère dans le bassin de l'Oise qu'environ 22% des terres sont recouvertes de forêts, 68% de cultures et 10% de pâtures (Billen, comm. pers.) (ces chiffres ne sont pas très différents pour les bassins de la Marne et de la Seine Amont), on peut calculer une abondance moyenne en CF dans les rivières du bassin de l'Oise due aux apports diffus, en pondérant les abondances en coliformes mesurées dans les ruisseaux de zones forestières, cultivées ou pâturées par ces pourcentages. Cette abondance moyenne (3180 CF l⁻¹) est multipliée par le débit spécifique (environ 11 l km⁻² sec⁻¹ dans la zone échantillonnée (Guerrini *et al.*

1998)), ce qui permet de calculer le nombre de CF apportés par sec et par km² par le lessivage des sols dans le bassin de l'Oise amont (34980 CF km⁻² sec⁻¹). Si on considère que les eaux usées des habitants des zones rurales sont traitées par boues activées (qui est le traitement d'épuration le plus répandu), on peut calculer à partir des EH-colis du Tableau 4 que les apports de CF au milieu naturel par ces effluents traités valent environ 59400 CF hab⁻¹sec⁻¹. Les rejets d'un seul habitant par km² sont donc déjà supérieurs aux apports diffus. Dans les régions rurales en tête des sous-bassins de l'Oise, de la Marne et de la Seine, la densité de population avoisine 1-50 hab km⁻² (Guerrini *et al.* 1998); les apports de CF km⁻² sec⁻¹ par les rejets d'eaux usées y supplantent donc largement les apports par le lessivage des sols.

4. Dynamique des coliformes dans les rivières du bassin de la Seine

La distribution et la dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine ont été étudiées dans les principales rivières de celui-ci (Marne, Oise et Seine) (Figure 17). Des profils longitudinaux d'abondance en coliformes ont été réalisés entre 1997 et 2001 sur ces rivières dans diverses conditions de débits, et complétés par diverses expériences visant à évaluer les principaux facteurs de contrôle du devenir des coliformes en milieu naturel afin d'expliquer l'allure des profils obtenus. Rappelons que le bassin de la Seine est particulièrement sensible aux problèmes de contamination fécale, vu sa grande densité de population (en moyenne 195 habitants km⁻²) (Guerrini *et al.* 1998) et l'utilisation de ses eaux de surface pour la production d'eau potable.

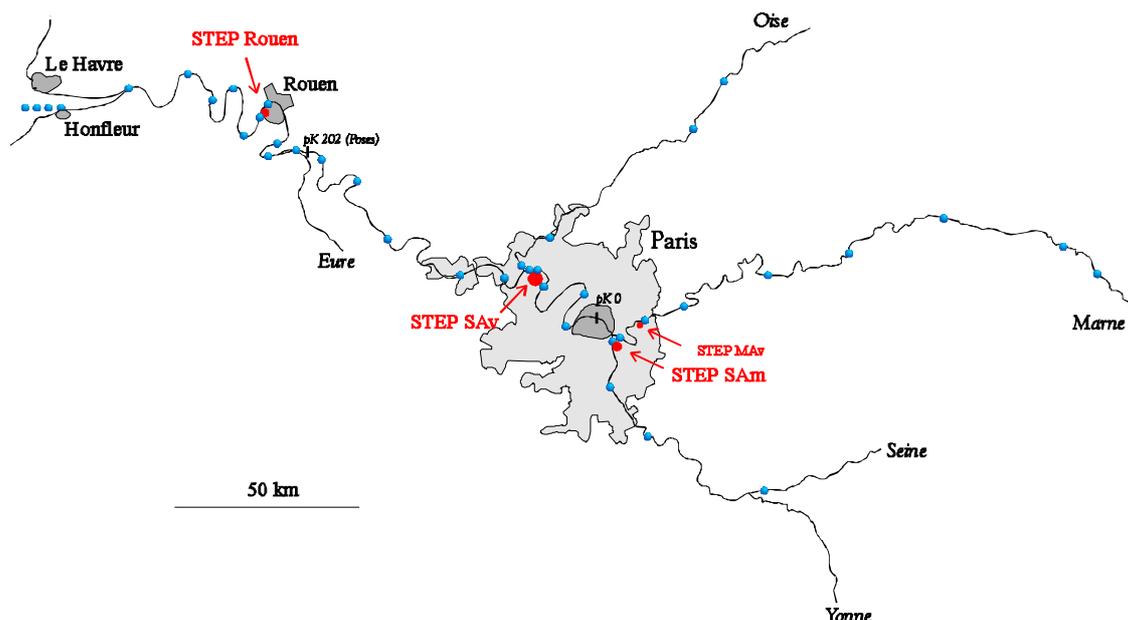


Figure 17: Carte schématique des tronçons de la Seine, l'Oise et la Marne échantillonnés en 1997 et 1998. Les grandes stations d'épuration (STEPS) de l'agglomération parisienne sont représentées en rouge sur la figure (SAv= Seine Aval (Achères), SAm= Seine Amont (Valenton), MAv= Marne aval (Noisy-le-Grand)), ainsi que la STEP de Rouen. Les stations d'échantillonnage en rivière sont représentées par des ronds bleus. PK est une échelle kilométrique dont le zéro se situe au Pont d'Austerlitz à Paris.

Trois campagnes d'échantillonnage ont été réalisées sur la Seine en mai 1997, juillet 1997 et mai 2001, sur un tronçon de 300 km de long, de l'agglomération parisienne jusqu'à l'embouchure de l'estuaire. En mars 1998 et septembre 1998, les échantillonnages ont été réalisés de 100 km en amont de Paris jusqu'à l'embouchure de l'estuaire (Figure 17). Quatre profils longitudinaux ont été réalisés en

même temps sur la Marne et l'Oise, sur des tronçons de 300 et 100 km respectivement, jusqu'à leur confluence avec la Seine (Figure 17).

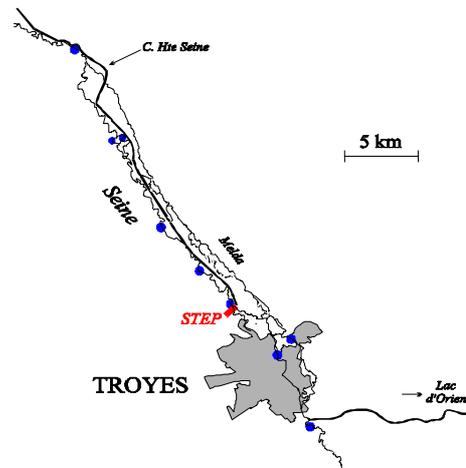


Figure 18: Carte schématique de la Seine dans l'agglomération troyenne. Les stations échantillonnées en Seine sont présentées en bleu et le rejet de la STEP de Troyes (300000 équivalents-habitants) est signalé en rouge. (C. Hte Seine= canal de Haute Seine). En amont de Troyes, la Seine reçoit les eaux de restitution du barrage-réservoir Seine (lac de la Forêt d'Orient).

Enfin, une étude de moindre ampleur a été réalisée en mai 1999 plus en amont sur la Seine, sur un tronçon de 35 km autour de l'agglomération troyenne (Figure 18). La Seine dans la région de Troyes est d'ordre de Strahler 5, et son débit au moment de la campagne était de 20 à 22 m³ sec⁻¹. Cette étude avait principalement pour objectif d'évaluer l'impact d'une agglomération de taille moyenne sur une rivière également de taille moyenne, une situation plus représentative de l'impact des rejets anthropiques sur la qualité des rivières du bassin que celle de l'agglomération parisienne, où sont rassemblés les 2/3 de la population du bassin de la Seine.

4.1. Distribution des coliformes dans le bassin de la Seine

4.1.1 Distribution des coliformes dans la Seine et son estuaire

Lors des différentes campagnes de prélèvements, les activités β -D-galactosidasique (GAL) et β -D-glucuronidasique (GLU) ont été mesurées sur chaque échantillon (collecté en surface de la colonne d'eau) en même temps que des dénombrements de coliformes totaux (CT) et coliformes fécaux (CF) cultivables, afin de comparer les deux méthodes à l'échelle d'un écosystème aquatique (George et al., 2001a ; 2001c).

Les profils d'abondance en coliformes et d'activité enzymatique ont été obtenus lors des 4 premières campagnes pour des débits relativement faibles de la Seine (débits entre 230 et 440 m³ sec⁻¹ à Poses) et lors de la dernière campagne pour une situation de crue (débit de 1650 m³ sec⁻¹ à Poses). Les quatre premières situations étaient globalement similaires ; deux profils typiques de ces situations sont présentés aux Figure 19 et Figure 20. Les résultats de l'échantillonnage en situation de haut débit sont présentés à la Figure 21.

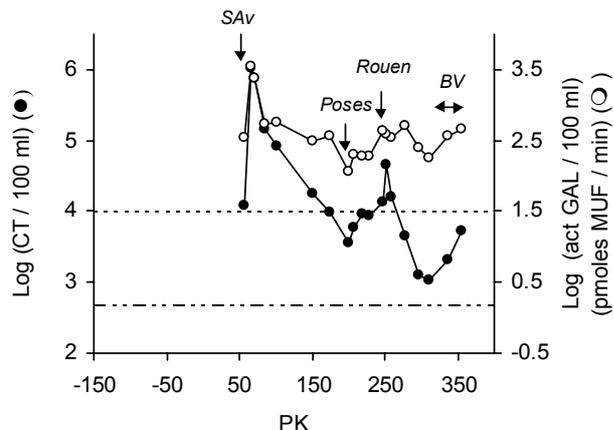


Figure 19: Profil longitudinal en échelle log de l'abondance en CT cultivables et de l'activité GAL dans la Seine en mai 1997 (débit à Poses= $340 \text{ m}^3 \text{ sec}^{-1}$). PK est une échelle kilométrique dont le zéro se trouve au Pont d'Austerlitz à Paris. Les rejets des STEPs Seine Aval (SAv) et Rouen sont indiquées en italique. Les normes guide (500 CT/100 ml) et impérative (10000 CT/100 ml) de la directive européenne de qualité des eaux de baignade sont signalées en pointillé sur la figure. BV= bouchon vaseux.

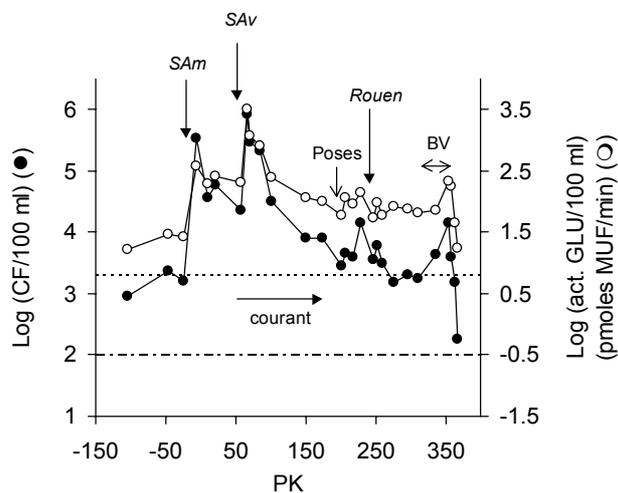


Figure 20: Profil longitudinal en échelle log de l'abondance en CF cultivables et de l'activité GLU dans la Seine en mars 1998 (débit à Poses= $440 \text{ m}^3 \text{ sec}^{-1}$). PK est une échelle kilométrique dont le zéro se trouve au Pont d'Austerlitz à Paris. Les rejets des STEPs principales (Seine Amont (SAm), Seine Aval (SAv) et Rouen) sont indiquées en italique. Les normes guide (100 CF/100 ml) et impérative (2000 CF/100 ml) de la directive européenne de qualité des eaux de baignade sont signalées en pointillé sur la figure. BV= bouchon vaseux.

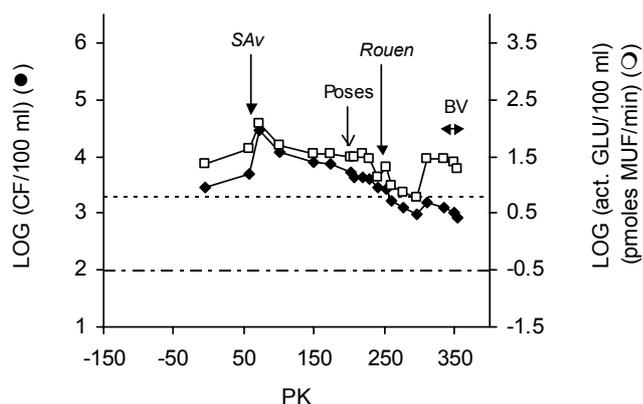


Figure 21: Profil longitudinal en échelle log de l'abondance en CF cultivables et de l'activité GLU dans la Seine en mai 2001 (débit à Poses = $1650 \text{ m}^3 \text{ sec}^{-1}$). PK est une échelle kilométrique dont le zéro se trouve au Pont d'Austerlitz à Paris. Les rejets des STEP principales (Seine Aval (SAV) et Rouen) sont indiqués en italique. Les normes guide (100 CF/100 ml) et impérative (2000 CF/100 ml) de la directive européenne de qualité des eaux de baignade sont signalées en pointillé sur la figure. BV = bouchon vaseux.

Sur ces profils, on observe une forte augmentation des abondances en coliformes et des activités enzymatiques dans la Seine au passage de l'agglomération parisienne, et particulièrement en aval des rejets des deux principales stations d'épuration (STEPs) parisiennes, Seine Amont à Valenton (1.2 millions EH) et Seine Aval à Achères (7 millions EH). Entre ces deux STEP, la Seine reçoit maintenant également les effluents d'une nouvelle STEP très performante de 800000 EH (Seine Centre, à Colombes), qui ne fonctionnait pas encore au moment de nos premières campagnes d'échantillonnage en 1997 et 1998. Notons que l'accroissement de l'abondance en bactéries fécales est moins marqué pour la situation de haut débit (Figure 21) que pour celles de bas débits (Figure 19 et Figure 20) en raison d'une plus grande dilution des eaux usées fortement contaminées dans les eaux de Seine. Même si le traitement des eaux usées en STEP élimine généralement plus de 90% des coliformes (voir chapitre 3), l'abondance en coliformes dans les eaux usées brutes est tellement élevée que même après traitement, les effluents provoquent souvent un pic de contamination fécale dans le milieu récepteur. En aval des rejets de ces deux STEP, les abondances en coliformes et activités enzymatiques diminuent. Cette diminution est particulièrement spectaculaire en situations de bas débits en aval des rejets de Seine Aval, sur un tronçon de 150 km jusqu'au barrage de Poses. Elle peut s'expliquer par différents facteurs: une dilution des eaux de la Seine par les eaux de la Marne et de l'Oise moins contaminées en coliformes et qui confluent avec la Seine en aval des rejets des STEP Seine Amont et Seine Aval respectivement (Tableau 6), une disparition des coliformes due à l'activité bactéricide des protozoaires, une perte de cultivabilité des coliformes soumis à divers stress environnementaux (lumineux, nutritionnel etc.) quand ils sont rejetés en rivière, une mortalité réelle des coliformes par lyse (résultant d'un stress nutritif, d'une compétition avec la flore autochtone, d'une attaque par des bactériophages etc.) ou encore une disparition des coliformes de la colonne d'eau par sédimentation. Ces facteurs sont discutés au point 4.2. A haut débit (Figure 21), les coliformes issus de la STEP Seine Aval sont transportés géographiquement plus loin en raison de transfert plus rapide des masses d'eau. Ainsi, à l'entrée de l'estuaire à Poses, les teneurs en coliformes tentent à croître avec les débits. Dans l'estuaire de la Seine, les abondances en coliformes et les activités enzymatiques augmentent légèrement lors du passage de l'eau dans l'agglomération rouennaise à cause de rejets d'eaux usées (non traitées, ou traitées dans la STEP de Rouen), puis diminuent à nouveau (Figure 19 et Figure 20). Ensuite les abondances en coliformes cultivables et les activités enzymatiques remontent dans la zone de turbidité maximale à l'embouchure de l'estuaire de la Seine. Il est probable que dans cette zone de l'estuaire, une partie des coliformes soit attachée aux matières en suspension. L'éventualité d'un lien entre coliformes et particules est discutée au point 4.2.2. Enfin, dans la baie de

Seine, les abondances et activités chutent lorsque les eaux douces de la Seine sont diluées par les eaux marines. De l'amont de Paris à l'estuaire, les abondances en CT et CF cultivables sont supérieures à la norme guide européenne de qualité des eaux de baignade sur l'ensemble des profils, et supérieures à la norme impérative dans l'agglomération parisienne et dans le bouchon vaseux. Ces comparaisons montrent que la pollution fécale dans la Seine, de Paris à l'embouchure de l'estuaire, est loin d'être négligeable. Notons cependant que ces comparaisons sont faites à titre purement indicatif, car il n'y a pas de zones de baignade reconnues dans le tronçon de la Seine étudié. Cette remarque est également valable pour les secteurs étudiés sur la Marne, l'Oise et la Seine dans la région de Troyes, même si certaines associations prônent la réinstauration de la baignade dans certains de ces secteurs.

Tableau 6 : Activité GLU /100 ml (en pmoles de MUF min⁻¹) mesurée en mars 1998 et septembre 1998 dans la Seine, la Marne et l'Oise en amont de leur confluence.

	Mars 1998	Septembre 1998
Seine en amont de la confluence avec la Marne	372	85
Marne en amont de la confluence avec la Seine	105	23
Seine en amont de la confluence avec l'Oise	1164	883
Oise en amont de la confluence avec la Seine	170	9

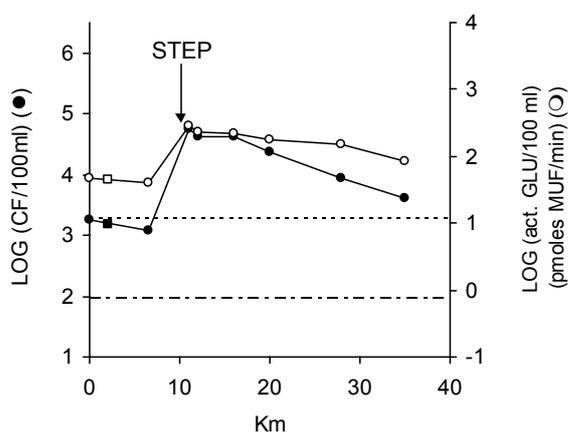


Figure 22: Profil longitudinal d'abondance en CF cultivables et d'activité GLU dans la Seine à Troyes en mai 1999. Les valeurs de ces deux paramètres mesurées dans le canal de restitution du barrage-réservoir sont représentées par des carrés. Les normes guide (100 CF/100 ml) et impérative (2000 CF/100 ml) de la directive européenne de qualité des eaux de baignade sont signalées en pointillé sur la figure.

Les résultats de la campagne d'échantillonnage effectuée les 25 et 26 mai 1999 sur la Seine à Troyes sont présentés à la Figure 22. Les abondances en coliformes cultivables sont inférieures à la norme impérative de qualité des eaux de baignade avant que la Seine ne reçoive les effluents de la STEP de Troyes, puis dépassent la norme et restent supérieures à celle-ci jusqu'à 25 km en aval des rejets.

4.1.2 Distribution des coliformes dans la Marne et l'Oise

La Marne et l'Oise ont été échantillonnées en plusieurs stations le 13 mars 1998 et le 17 septembre 1998. Des exemples de profils obtenus sur des tronçons respectifs de 100 et 300 km sont présentés à la Figure 23. A nouveau, on observe sur ces profils des concentrations en CF cultivables supérieures à la norme impérative de qualité des eaux de baignade, et ce même aux stations d'échantillonnage les plus en amont, c'est-à-dire avant Châlons-en Champagne sur la Marne et avant Compiègne sur l'Oise. Par ailleurs, ces profils montrent que la qualité de la Marne se dégrade sur les 40 derniers km avant sa confluence avec la Seine, lorsqu'elle entre dans l'agglomération parisienne et

reçoit notamment les effluents de la STEP Marne Aval (110000 EH). Il arrive d'ailleurs que les concentrations en coliformes cultivables aux prises d'eau de l'usine de production d'eau potable de Neuilly-sur-Marne (localisée peu avant la confluence) dépassent la norme guide de qualité microbiologique des eaux de surface destinées à la production d'eau potable (valeur guide A3 - voir Tableau 2)(Gatel et al., 1996). Les profils obtenus sur l'Oise ne montrent pas d'évolution longitudinale marquée.

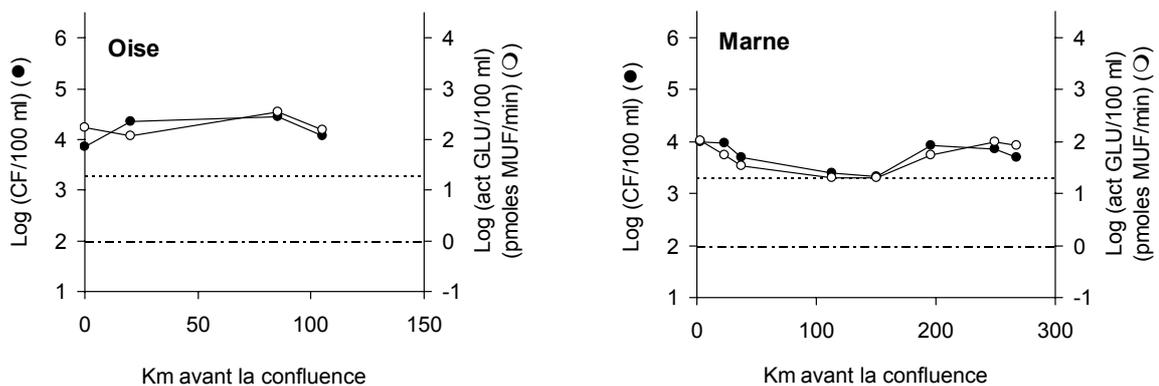


Figure 23: CF cultivables et activité GLU dans l'Oise et la Marne avant leur confluence avec la Seine en mars 1998. Les normes guide (100 CF/100 ml) et impérative (2000 CF/100 ml) de la directive européenne de qualité des eaux de baignade sont signalées en pointillé sur la figure.

4.2. Facteurs contrôlant la dynamique des coliformes en rivière

Le pouvoir auto-épurateur des eaux de surface (et plus particulièrement de l'eau de mer) 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 ou en milieu côtier, 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: activité prédatrice d'autres micro-organismes, carence en nutriments, compétition avec la microflore autochtone, action bactéricide de la lumière solaire et de la salinité, présence de toxiques etc. Dans cette étude sur la contamination fécale des rivières du bassin de la Seine, nous avons évalué le rôle de certains de ces facteurs dans la dynamique des bactéries coliformes. En plus de méthodes classiques d'énumération des coliformes qui présentent certaines limitations discutées au chapitre 2, d'autres méthodes ont été utilisées pour étudier le devenir des coliformes en milieu naturel: une méthode de mesure de l'activité enzymatique spécifique des coliformes (détaillée au chapitre 2), et une méthode basée sur le marquage radioactif de bactéries fécales et le suivi de leur disparition dans des eaux naturelles. Enfin, des facteurs physiques, comme la dilution des eaux usées en milieu naturel ouvert (rivières, milieux côtiers) ou la sédimentation des bactéries fécales liées aux particules, peuvent également participer à la disparition des germes fécaux de la colonne d'eau en aval des rejets d'eaux usées. Le lien éventuel entre les coliformes et les MES dans le bassin de la Seine a fait l'objet d'expériences présentées dans le paragraphe 4.2.2.

4.2.1 Mortalité réelle et "apparente" des coliformes dans le bassin de la Seine

La plupart des expériences classiques visant à estimer les taux de disparition des bactéries fécales dans les milieux aquatiques consistent à suivre, au cours du temps, la disparition de bactéries fécales (préalablement cultivées en milieu nutritif riche) ajoutées à un échantillon naturel par des

énumérations sur milieu gélosé spécifique. Nous savons aujourd'hui qu'après leur introduction en milieu naturel, les bactéries fécales perdent rapidement leur capacité à pousser sur milieu gélosé mais peuvent maintenir une intégrité cellulaire et certaines activités métaboliques pendant plusieurs jours. Les taux de disparition des coliformes calculés sur base de dénombrements sur milieu gélosé surestiment donc très vraisemblablement la mortalité réelle de celle-ci. Par conséquent, les échantillons collectés dans les rivières du bassin de la Seine ont été également analysés dans ce travail par une méthode enzymatique globale. Outre sa rapidité, il est probable que cette méthode prenne en compte des CT ou CF métaboliquement actifs (présentant une activité GAL ou GLU) mais devenus non cultivables en raison de stress environnementaux. En aval des rejets de la STEP Seine Aval dans la Seine, nous avons en effet observé que les concentrations de coliformes cultivables chutaient 5 à 6 fois plus que les activités enzymatiques jusqu'au barrage de Poses (Figure 24). Une explication possible serait la détection par les méthodes enzymatiques de coliformes provenant des eaux usées et qui, une fois rejetés en Seine, subissent un stress nutritionnel provoquant une perte de cultivabilité progressive. Ces coliformes actifs mais non cultivables échapperaient alors aux méthodes classiques de dénombrement sur milieu gélosé spécifique. Pour rappel, nous avons montré à la Figure 8 qu'une carence nutritive et un effet bactéricide de la lumière pouvaient provoquer chez des cellules d' *E.coli* rejetées dans une eau de rivière stérile une perte de cultivabilité beaucoup plus rapide que la perte d'activité GLU.

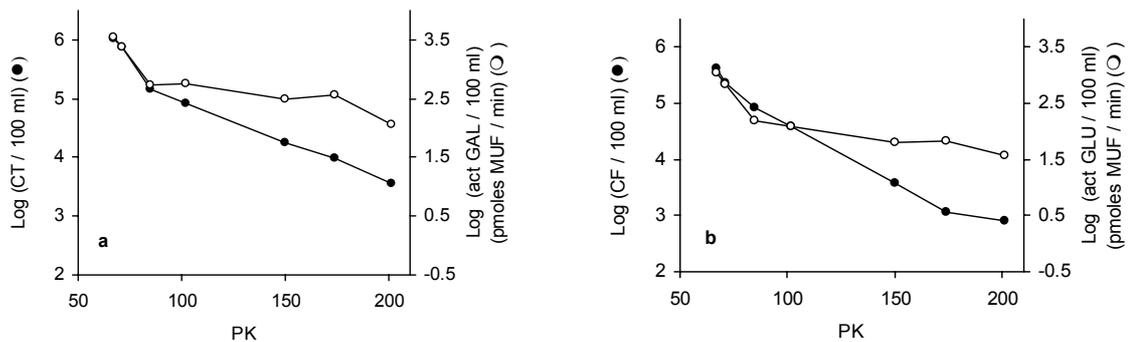


Figure 24: Décroissance des nombres de CT cultivables et de l'activité GAL (a) et décroissance des nombres de CF cultivables et de l'activité GLU (b) dans la Seine en aval des rejets de la STEP Seine Aval en mai 1997.

Menon (1993) a estimé les taux de mortalité des coliformes en Seine par une autre méthode que les dénombrements sur gélose, que nous avons également utilisée dans ce travail. Cette méthode consiste à suivre la disparition de la radioactivité associée à l'ADN de cellules d'*E.coli* pré-marquées à la thymidine tritiée et rejetées dans des microcosmes d'eau naturelle (Garcia-Lara et al. 1991, Servais & Menon 1991). La mortalité est donc considérée ici comme une perte d'intégrité génétique. Par ailleurs, la même méthode a été utilisée pour estimer la part de la mortalité des coliformes attribuable à l'activité des protozoaires, en suivant la disparition d' *E.coli* pré-marqués à la thymidine tritiée dans des échantillons d'eau brute, et d'eau filtrée sur 2 μm et traitée avec des inhibiteurs d'eucaryotes pour supprimer l'activité des protozoaires (exemple Figure 25). La différence entre le taux de mortalité dans l'échantillon brut et dans l'échantillon filtré sur 2 μm représente le taux de mortalité dû à l'activité des protozoaires.

Les taux de mortalité totale mesurés par cette méthode, sur des échantillons d'eau de Seine prélevés en aval de Paris, varient de $8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ à $34 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Tableau 7). Contrairement à l'idée communément admise dans la littérature que les bactéries entériques meurent beaucoup plus rapidement que la microflore autochtone en milieu naturel, ces taux sont du même ordre de grandeur que ceux des bactéries autochtones, bien qu'un peu supérieurs (Servais *et al.* 1989, 1992).

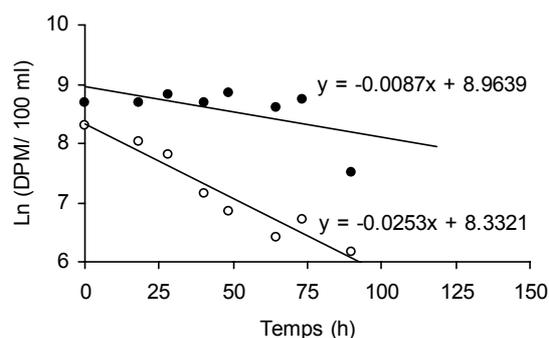


Figure 25: Exemple de décroissance de la radioactivité associée à l'ADN d'*E.coli* marqués à la thymidine tritiée et rejetés dans un échantillon d'eau de Seine (Rouen, Juillet 1997) en présence (eau brute ○) et en l'absence d'activité bactériovore des protozoaires (eau filtrée sur une membrane de porosité 2 μm et additionnée d'inhibiteurs de protozoaires ●). DPM = désintégration par min.

Par ailleurs, nous avons également estimé des taux de disparition des coliformes sur base des activités GLU mesurées dans la Seine en aval de l'agglomération parisienne (entre Triel et Poses). Le temps de transit des masses d'eau d'une station d'échantillonnage à l'autre sur ce tronçon a été calculé à partir du débit de la Seine et de la section mouillée de la rivière aux différentes stations pour les 5 campagnes. Pour chaque campagne, les activités GLU mesurées aux différentes stations ont été portées en échelle logarithmique en fonction du temps de transit des masses d'eau cumulé. La pente de la droite de régression était dans tous les cas significative ($r > 0.91$) et a permis d'estimer un taux de disparition des coliformes du premier ordre (Tableau 8). Les taux de disparition estimés sur base des mesures d'activités GLU variaient de $9 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ à $26 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Tableau 8). Les taux de disparition estimés à partir des mesures d'activité GLU sont donc du même ordre de grandeur que les taux de mortalité, ce qui met en évidence que la mortalité bactérienne est le processus dominant de disparition des bactéries d'origine fécale dans le tronçon concerné. Par ailleurs, si on calcule les taux de disparition sur base des dénombrements de CF cultivables, on obtient des valeurs plus élevées (de $27 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ à $43 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) que celles obtenues sur base de l'activité GLU. Les taux de disparition déduits des dénombrements sur milieu gélosé spécifique semblent donc bien surestimer la mortalité réelle des coliformes.

Tableau 7 : Taux de mortalité totale (K_t) and taux de mortalité dû à l'activité bactériovore des protozoaires (K_g) d'*E.coli* marqués à la thymidine tritiée et rejetés dans des échantillons d'eau de Seine .

Station d'échantillonnage	Température de l'eau ($^{\circ}\text{C}$)	K_t (10^{-3} h^{-1})	K_g (10^{-3} h^{-1})	% de la mortalité totale due à l'activité bactériovore des protozoaires	Référence
Paris (PK 0)	10	33.9	31.9	94	Menon, 1993
Argenteuil (PK 57)	17	20.4	9.6	47	Menon, 1993
Herblay (PK 68)	21	12.9	11.7	91	Menon, 1993
Herblay (PK 68)	9	31.1	30.8	99	Menon, 1993
Herblay (PK 68)	20	13.5	12.7	94	Menon, 1993
Porcheville (PK 105)	21	7.9	4.3	54	Menon, 1993
Porcheville (PK 105)	9	21.8	15.3	70	Menon, 1993
Rouen (PK 242)	20	25.3	16.6	66	Ce travail

Tableau 8 : Taux de disparition des coliformes dans la Seine estimés pour les 5 campagnes d'échantillonnage à partir des mesures d'activité GLU le long d'un tronçon de 117 km entre Triel (PK 85) et Poses (PK 202).

Date de la campagne d'échantillonnage	Taux de disparition estimé (10^{-3} h^{-1})
Mai 1997	9.0
Juillet 1997	22.2
Mars 1998	25.9
Septembre 1998	15.6
Mai 2001	17.8

Par ailleurs, les expériences visant à estimer la part de la mortalité totale due à l'activité bactériovore des protozoaires ont montré que celle-ci était clairement le facteur dominant de mortalité des coliformes dans la Seine fluviale, puisqu'elle était responsable de 47 à 99% de cette mortalité (Tableau 7). D'autres études confirment le rôle prédominant de l'activité bactériovore des protozoaires dans la mortalité des bactéries fécales en milieu naturel (Barcina et al. 1991), comme il l'est d'ailleurs pour les bactéries autochtones (Servais & Menon 1991, Iriberry et al. 1994).

Ce type d'expérience pour évaluer la mortalité des coliformes dans les eaux naturelles, et la part de celle-ci due au grazing par les protozoaires, n'a pas encore été réalisé ailleurs dans le bassin de la Seine que sur la partie fluviale de celle-ci. Cependant, les abondances en coliformes mesurées dans les ruisseaux en tête du bassin hydrographique (et présentées au chapitre 3) soulèvent de nombreuses questions sur les processus de disparition des bactéries fécales dans les rivières d'ordre 1 à 4 du bassin de la Seine: si les rivières sont déjà aussi contaminées dès l'amont, quels processus éliminent aussi efficacement les coliformes le long de ces ordres? Sur des petites rivières normandes d'ordre 2 à 5, Beaudeau *et al.* (1998, 2001) ont mesuré des taux de disparition de coliformes cultivables allant jusqu'à $450 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, c'est à dire 10 fois plus que les taux de disparition des coliformes cultivables mesurés en aval d'Achères. Ces résultats suggèrent que les taux de disparition des bactéries mesurés dans la Seine fluviale ne sont peut-être pas valables sur les rivières de petits ordres. Ce point devrait faire l'objet de nouvelles expériences dans le cadre de la prochaine phase du programme PIREN-Seine.

4.2.2 Attachement des coliformes aux matières en suspension (MES)

Un des facteurs pouvant contribuer à la disparition apparente des bactéries coliformes dans la colonne d'eau est leur adsorption sur des particules en suspension dans l'eau puis leur sédimentation avec celles-ci. De nombreuses études ont montré que les sédiments constituent un réservoir très important de germes fécaux car ce milieu est favorable à une meilleure survie des micro-organismes en raison de son effet protecteur contre les rayonnements solaires (Pommepuy *et al.* 1992), et de sa teneur parfois élevée en nutriments et en matière organique.

En rivière, le stockage temporaire des bactéries fécales dans les sédiments est difficilement quantifiable, car son importance dépend de la charge sédimentaire de la rivière et de sa morphologie (zones de calme), de la qualité des sédiments (capacité d'adsorption des microorganismes, capacité à favoriser leur survie) et de l'hydrologie (phases de dépôt et de remise en suspension lors des crues). A notre connaissance, aucune étude à part celle de Pommepuy *et al.* (1992) ne s'est intéressée à évaluer la proportion de bactéries fécales attachées aux particules dans les eaux naturelles et ainsi susceptibles de sédimenter. Dans le bassin de la Seine, nous avons étudié ce lien entre CF et MES dans les petites rivières des zones amont du bassin de l'Oise d'une part, et dans l'axe fluvial de la Seine d'autre part.

L'objectif de la première étude, dont la stratégie d'échantillonnage a été présentée au chapitre 3, était d'évaluer sous quelle forme (libre ou attachée aux particules) les coliformes arrivent aux rivières par le lessivage des bassins versants. Douze ruisseaux ont été échantillonnés plusieurs fois pendant 1 an, et l'activité GLU, l'abondance en CF cultivables et la concentration en MES ont été mesurées dans chaque échantillon. Nous avons précédemment montré à la Figure 16 que l'activité enzymatique présente dans les petits ruisseaux était globalement corrélée à leur concentration en MES. D'autre part, les échantillons collectés en novembre 2000 ont été filtrés sur des membranes en polycarbonate de porosité $5 \mu\text{m}$ (qui retient l'essentiel des MES), et la fraction d'activité GLU retenue

sur les filtres a été comparée à celle des échantillons bruts. Cinq μm est considéré dans ces expériences comme la porosité limite séparant les coliformes libres de ceux qui sont adsorbés sur des particules organiques ou minérales. Le pourcentage d'activité dans la fraction $> 5 \mu\text{m}$ s'est avéré d'autant plus élevé que la concentration en MES de l'échantillon était élevée (Figure 26). Une fraction non négligeable des coliformes est donc bien liée aux MES dans les ruisseaux en tête du bassin hydrographique, et elle augmente avec la concentration en MES de l'eau. Typiquement, les apports les plus importants de coliformes et de MES aux ruisseaux ont lieu lors d'événements pluvieux, comme discuté précédemment au chapitre 3.

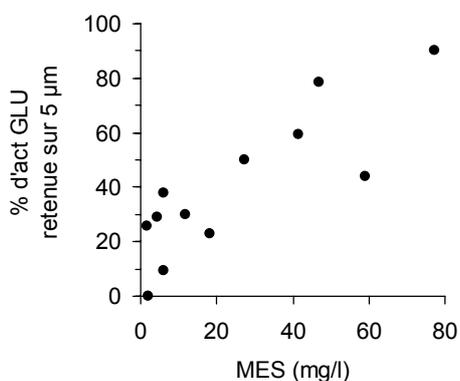


Figure 26: Relation entre l'activité GLU dans la fraction supérieure à $5 \mu\text{m}$ et la concentration en MES dans les ruisseaux du suivi temporel en novembre 2000.

Dans les rejets ponctuels d'eaux usées en rivière, une partie de la population de coliformes est également attachée aux particules. Sur base de mesures d'activité GLU dans la fraction retenue sur des filtres de porosité $5 \mu\text{m}$ par rapport à l'activité totale des échantillons d'eaux usées, nous avons évalué cette fraction à 50 à 60% dans les rejets bruts et 25 à 50% dans les rejets traités. Il s'agit cependant d'une estimation assez grossière, car elle est basée sur un faible nombre d'échantillons.

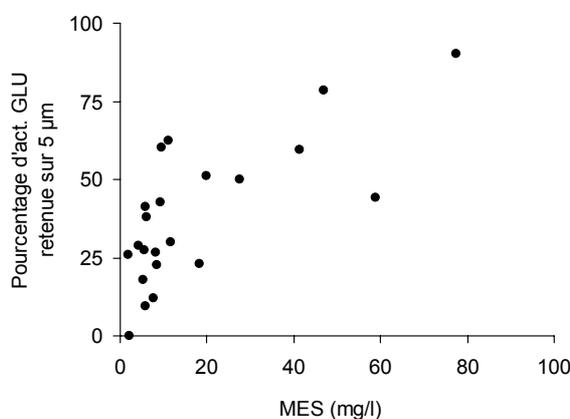


Figure 27: Relation entre le pourcentage d'activité GLU dans la fraction supérieure à $5 \mu\text{m}$ et la concentration en MES dans les rivières du bassin de la Seine (zone de turbidité maximale de l'estuaire non incluse).

La même expérience a été répétée en septembre 1998 sur des échantillons de l'axe fluvial de la Seine (bouchon vaseux non inclus), de la Marne, de l'Oise et de l'Yonne ($n=9$). Dans ces échantillons, le pourcentage d'activité GLU retenue sur $5 \mu\text{m}$ variait de 12 à 60% de l'activité GLU totale. Les pourcentages d'activité GLU retenue sur $5 \mu\text{m}$ dans les grandes rivières du bassin et les petits ruisseaux du bassin de l'Oise amont ont été présentés ensemble en fonction de la concentration en MES dans la Figure 27. Cette figure confirme qu'il existe une relation entre la proportion de bactéries fécales liées aux MES et la concentration en MES des échantillons. Les travaux de Pommepuy *et al.* (1992) dans la baie de Morlaix ont abouti aux mêmes conclusions. Enfin, selon les rivières du bassin

considérées, les bactéries fécales sont probablement liées à des particules de tailles différentes, puisqu'on observe une répartition de l'activité GLU dans diverses classes de taille quand les échantillons sont filtrés sur des membranes de porosités différentes (Figure 28).

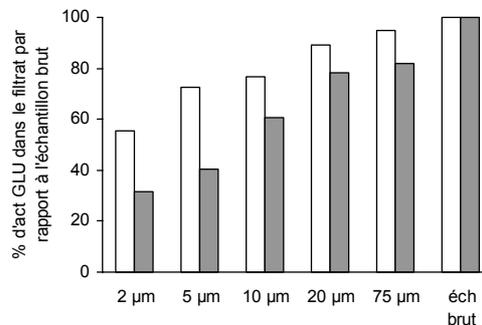


Figure 28: Activité GLU mesurée dans les filtrats de deux eaux naturelles filtrées sur des membranes de porosités différentes. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'échantillon brut (éch brut). □ = eau de Seine prélevée à Paris le 03/12/1999. ■ = eau d'un ruisseau du bassin de l'Oise échantillonné le 06/09/2000.

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

Les connaissances acquises au cours de cette étude sur les sources et le devenir des coliformes fécaux (CF) en rivière ont été intégrées dans les modèles biogéochimiques et écologiques existant sur le bassin hydrographique de la Seine. Plus précisément, un compartiment décrivant la dynamique des CF a été ajouté aux modèles SENESTRE (Billen *et al.* 1994) et MODESTE (Billen *et al.* 1996). Pour rappel, le modèle SENESTRE, appliqué aux quatre sous-bassins de la Seine (Marne, Oise, Eure, Seine en amont d'Orly), permet de simuler les variations saisonnières de la qualité de l'eau à l'exutoire de ces sous-bassins avec un pas de temps décadaire. Le modèle MODESTE, appliqué à l'axe fluvial de la Seine de Orly à Caudebec, permet quant à lui de simuler les variations décadaires de la qualité de l'eau à différentes stations le long de l'axe fluvial ou de simuler des profils longitudinaux de qualité moyenne annuelle ou décadaire. L'ajout d'un compartiment « coliformes fécaux » à ces modèles avait pour objectif de pouvoir prédire par des modèles les abondances en CF à l'exutoire des sous-bassins Marne, Oise et Seine en amont d'Orly, ainsi que dans l'axe fluvial de la Seine jusqu'à Poses. Une fois validés, ces modèles ont été utilisés pour réaliser quelques scénarios prédictifs sur l'impact du type de traitement utilisé dans la STEP Seine Aval sur la qualité de la Seine en aval des rejets.

5.1. Description du compartiment « coliformes fécaux » inclus dans les modèles SENESTRE et MODESTE

Une nouvelle variable d'état, l'abondance en coliformes fécaux (CF) cultivables, a été ajoutée dans les modèles SENESTRE et MODESTE. Dans le modèle MODESTE, nous avons également ajouté une autre variable, l'activité β -D-glucuronidasique (act. GLU) par unité de volume (pmoles MUF min⁻¹ par l d'eau de rivière), car des mesures d'activité GLU dans l'axe fluvial de la Seine réalisées en 1997 et 1998 permettaient de valider les simulations.

De plus, dans le modèle MODESTE, le compartiment "coliformes fécaux" a été séparé en deux: une fraction de la population de CF arrive en rivière attachée aux MES *via* les rejets d'eaux usées et y est soumise à la dynamique complexe des MES, alors que l'autre fraction est constituée de bactéries libres qui ne sédimentent pas. Dans un objectif de simplification, nous avons considéré que ces deux fractions évoluaient indépendamment, sans aucune interaction entre elles (ni décrochage, ni adsorption).

5.1.1 Prise en compte des apports diffus

Dans le modèle SENESTRE, les apports diffus de CF aux rivières du bassin de la Seine par le lessivage des sols ont été calculés sur base des échantillonnages réalisés en 2000 et 2001 sur les petits ruisseaux du bassin de l'Oise, et sur base du pourcentage des différents types de couverture végétale dans chacun des quatre grands sous-bassins (Tableau 9). Dans le modèle MODESTE, les apports diffus de CF à l'axe fluvial de la Seine par le lessivage de son bassin versant propre ont été négligés.

Tableau 9 : Abondance moyenne en CF cultivables ($CF\ l^{-1}$) dans les ruisseaux alimentés par le lessivage de zones forestières, cultivées ou d'élevage extensif^a, et calcul de l'abondance moyenne en CF cultivables ($CF_{moy}\ l^{-1}$) dans les apports diffus aux 4 grands sous-bassins de la Seine, en fonction de la répartition^b des différents types de couverture végétale dans chaque sous-bassin.

	forêts	terres arables (cultures)	prairies (pâtures)	
moyenne considérée ($CF\ l^{-1}$)	2150	1790	23690	
	type de couverture végétale			
sous-bassin considéré	forêts	terres arables (cultures)	prairies (pâtures)	$CF_{moy}\ l^{-1}$
Seine Amont (amont d'Orly)	29 %	63 %	8 %	2870
Marne	26 %	66 %	8 %	2860
Oise	22 %	68 %	10 %	3180
Eure	21 %	75 %	4 %	2170

^a calcul sur base des 4 premières campagnes d'échantillonnage dans le bassin de l'Oise amont (voir chapitre 3)

^b valeurs 1996, Billen, com. pers.

5.1.2 Prise en compte des apports ponctuels

Dans le modèle SENESTRE, les apports de CF par les rejets d'eaux usées ont été calculés sur base de la charge organique des rejets (demande biologique en oxygène (DBO)), comme cela avait été fait pour les bactéries hétérotrophes et nitrifiantes. Un facteur de proportionnalité entre le nombre de CF cultivables (ou l'activité GLU), et la DBO des eaux usées a été calculé sur base de la régression linéaire forcée par l'origine entre l'abondance en CF cultivables (ou l'activité GLU) et la DBO mesurée dans des échantillons d'eaux usées brutes et traitées lors de notre étude sur les STEPs en 1999 et 2000 (Figure 29).

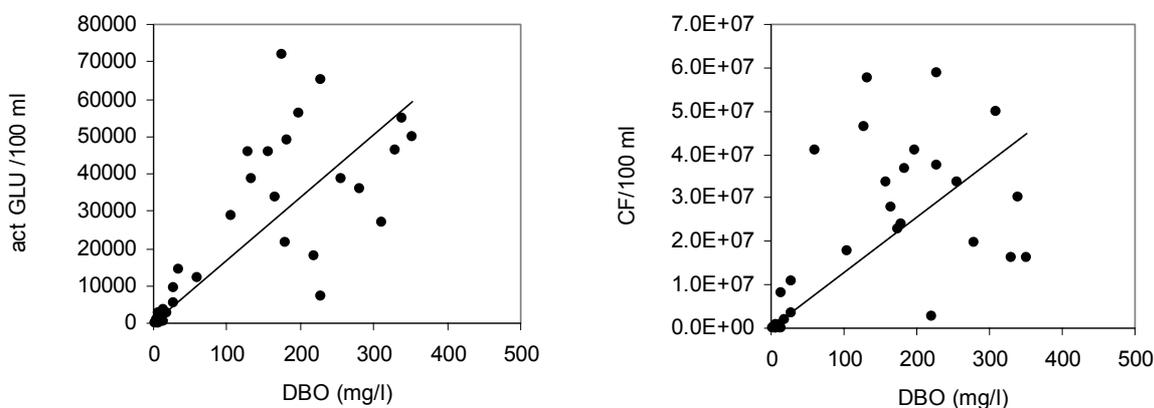


Figure 29: Relation entre l'activité glucuronidasique (act GLU) ou les CF cultivables et la DBO. Droites de régression forcées par l'origine: $act\ GLU = 169 * DBO$ ($r^2=0.63$) et $CF = 127455 * DBO$ ($r^2=0.40$).

Dans le modèle MODESTE, les apports de CF à la Seine par les eaux usées ont été estimés de manière plus fine. Un fichier d'apports de CF cultivables ou d'activité GLU km par km le long de l'axe fluvial a été construit sur base d'un fichier de l'Agence de l'Eau Seine-Normandie de 1996 reprenant la localisation, la capacité nominale, le coefficient de charge² et le type de traitement d'épuration de l'ensemble des STEPs du bassin de la Seine. Les CF et l'activité GLU apportés par jour par chacune des STEPs localisées le long de l'axe fluvial ont été calculés en multipliant la capacité nominale de la STEP par son coefficient de charge, et par le nombre d' "équivalents-habitants CF" ou le nombre d'"équivalents-habitants act. GLU" (en CF cultivables ou activité GLU hab⁻¹ j⁻¹) en fonction du traitement en vigueur dans la STEP considérée (voir chapitre 3). Pour les rares rejets domestiques non repris dans le fichier dont nous disposons, les apports de CF et d'activité GLU ont été calculés sur base de la charge organique des rejets, comme cela a été fait dans le modèle SENESTRE. Nous avons considéré dans le modèle MODESTE que 40 % des CF étaient liés aux MES dans les rejets ponctuels.

Précisons que dans le modèle MODESTE sur l'axe fluvial de la Seine, seuls les apports de coliformes par des rejets de STEPs ont été pris en compte, alors que les apports de coliformes par les affluents ont été négligés, à l'exception de la Marne, de l'Oise et de l'Eure (Tableau 10). En effet, même si certains affluents de la Seine sont fortement contaminés, leur débit est tellement faible par rapport à celui de la Seine dans son axe fluvial qu'ils ne modifient guère les concentrations en coliformes dans celle-ci.

Nous avons considéré que 30 % des CF étaient adsorbés sur des MES dans l'eau de Seine en amont de Paris et dans la Marne, l'Oise et l'Eure avant leur confluence avec la Seine. Ce nombre est basé sur des pourcentages de coliformes attachés aux MES mesurés en 1998 dans la Marne, l'Oise et la Seine à leur entrée dans Paris, qui variaient entre 23 et 41%.

Tableau 10 : Conditions limites pour le modèle MODESTE: concentrations en CF cultivables (CF l⁻¹) et activité glucuronidasique (Act GLU l⁻¹) dans la Seine à Ris-Orangis (avant Paris) et dans la Marne, l'Oise et l'Eure avant leur confluence avec la Seine.

rivière	CF l ⁻¹	Act GLU l ⁻¹
Seine (Ris-Orangis)	20000 ^a	130 ^a
Marne (Joinville-le-Pt)	115000 ^a	640 ^a
Oise (fin d'Oise)	62000 ^a	380 ^a
Eure	100000 ^b	550 ^b

^a moyenne des valeurs mesurées en mars 1998 et septembre 1998

^b valeurs estimées

5.1.3 Prise en compte des processus en rivière

A ce premier stade de développement du compartiment "coliformes fécaux" des modèles SENESTRE et MODESTE, les processus pris en compte dans le contrôle de la dynamique des CF dans la colonne d'eau sont une mortalité totale et une sédimentation des bactéries. Aucune éventuelle croissance de CF en rivière n'a été prise en compte.

Mortalité des coliformes fécaux

La processus de mortalité résulte de la somme de l'activité bactéricivore des protozoaires et d'une lyse spontanée ou induite. La mortalité bactérienne est considérée dans le modèle comme étant d'ordre 1 et est donc caractérisée par une constante de premier ordre, kd_{GLU} ou kd_{FEC}, exprimée en h⁻¹. Le taux de mortalité des CF cultivables kd_{FEC} inclut en plus de la mortalité réelle une perte de cultivabilité (voir chapitre 4). La mortalité dépend de la température; cette dépendance est décrite par une relation sigmoïdale.

$$dFEC/dt = -kd_{FEC} * FEC \quad \text{avec } kd_{FEC} = kd_{FEC20} * fct(t^\circ)$$

$$\text{où } fct(t^\circ) = [e^{-(t-25)^2/dt^2}] / [e^{-(20-25)^2/dt^2}] \quad (t^\circ_{\text{opt de mortalité}} = 25^\circ\text{C})$$

² Le coefficient de charge représente le rapport de la capacité réellement utilisée sur la capacité nominale d'une STEP.

$kd_{FEC20} = 40 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (taux de mortalité, incluant la perte de cultivabilité, mesuré à 20°C) dans le modèle MODESTE

kd_{FEC20} variable suivant l'ordre dans le modèle SENESTRE

$$dGLU/dt = -kd_{GLU} * GLU \quad \text{avec } kd_{GLU} = kd_{GLU20} * fct(t^\circ)$$

$$\text{où } fct(t^\circ) = [e^{-(t-25)^2/dt^2}] / [e^{-(20-25)^2/dt^2}] \quad (t^\circ_{\text{opt de mortalité}} = 25^\circ\text{C})$$

$$kd_{GLU20} = 30 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1} \quad (\text{taux de mortalité mesuré à } 20^\circ\text{C})$$

Dans le modèle MODESTE, les mêmes taux de mortalité ont été considérés pour les coliformes libres dans la colonne d'eau et ceux liés aux MES en l'absence d'informations sur ce sujet. Dans le modèle SENESTRE, nous avons considéré un kd_{FEC20} variable en fonction de l'ordre (Figure 30). Il a été estimé pour chaque ordre sur base des taux de disparition des coliformes dans la Seine fluviale mesurés par Menon (1993) et dans cette étude, ainsi que sur base des taux de disparition des CF cultivables mesurés par Beaudeau *et al.* (1998, 2001) dans des rivières normandes d'ordre 2 à 5. Aucun terme de disparition des CF cultivables n'a été considéré dans les ruisseaux d'ordre 1, car la mortalité et la perte de cultivabilité des CF dans les ordres 1 sont déjà implicitement prises en compte dans les valeurs d'apports diffus de CF qui servent de données d'entrée dans le modèle (qui sont basées sur des échantillonnages de ruisseaux d'ordre 1). Dans chacun des deux modèles, l'importance de différents facteurs intervenant dans ces taux de mortalité (brouillage par les protozoaires, action de la lumière, etc.) a été considérée de manière globale.

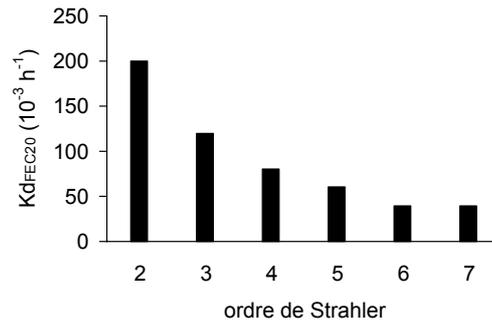


Figure 30: Taux de disparition (à 20°C) des CF cultivables en fonction de l'ordre de Strahler, établis sur base des résultats des travaux de Menon (1993) et Beaudeau *et al.* (1998, 2001) et de ce travail.

Sédimentation des coliformes fécaux

Dans le modèle SENESTRE, la sédimentation des CF est exprimée par l'équation suivante:

$$dFEC/dt = -(v_{FEC}/\text{prof}) * FEC$$

avec v_{FEC} = vitesse de chute des coliformes = 0.02 m h⁻¹ (valeur de la vitesse de chute des grosses bactéries (taille > à 1 µm) dans le modèle MODESTE), prof = profondeur de la colonne d'eau (en m)

Dans le modèle MODESTE, le terme de sédimentation a été raffiné en considérant que seules les bactéries attachées aux MES sédimentent.

$$dGLU_a/dt = -sed_{GLU} + eros_{GLU}$$

$$\text{où } sed_{GLUC} = sed_{MES} * GLU_a/MES$$

$$\text{et } eros_{GLU} = eros_{MES} * GLU_a/MES \quad (\text{en amont de Poses})$$

$$dFEC_a/dt = -sed_{FEC} + eros_{FEC}$$

où $sed_{FEC} = sed_{MES} * FEC_a / MES$

et $eros_{FEC} = eros_{MES} * FEC_a / MES$ (en amont de Poses)

avec sed_{FEC} , $eros_{FEC}$, sed_{GLU} , $eros_{GLU}$ = sédimentation et érosion des CF cultivables (nbre $l^{-1} h^{-1}$) ou de l'activité GLU (unités d'activités $l^{-1} h^{-1}$), sed_{MES} et $eros_{MES}$ = sédimentation et érosion des MES ($mg l^{-1} h^{-1}$), GLU_a et FEC_a = activité GLU et nombre de CF cultivables attachés aux MES (unités d'activité l^{-1} , nombre l^{-1}), MES = concentration en MES ($mg l^{-1}$).

5.2. Simulations et validation du modèle aux résultats expérimentaux

5.2.1 Simulations à l'exutoire des quatre grands sous-bassins

Les simulations d'abondance en coliformes à l'exutoire des sous-bassins de l'Oise, la Marne et la Seine à Orly ont été validées à l'aide des dénombrements hebdomadaires de coliformes fécaux effectués par le SEDIF et la Compagnie Générale des Eaux de 1992 à 1998 sur les prises d'eau de Neuilly-sur-Marne, Méry-sur-Oise et Choisy-le-Roi. Les Figure 31 et Figure 32 présentent des exemples de simulations réalisées à l'aide du modèle SENESTRE à l'exutoire des sous-bassins Marne et Seine-Amont sur un cycle annuel.

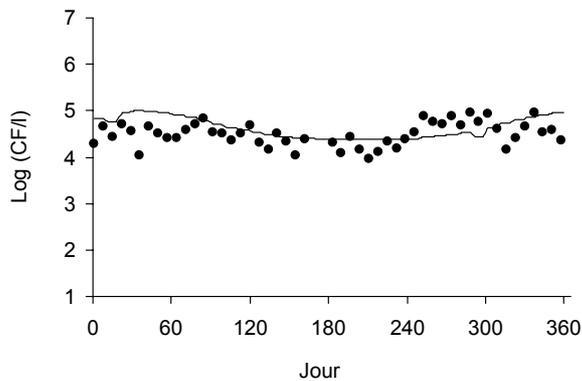


Figure 31: Simulation par le modèle SENESTRE des variations d'abondance en CF cultivables à l'exutoire de la Marne au cours de l'année 1998 et dénombrements de CF cultivables à la prise d'eau de Neuilly-sur-Marne la même année (Jour1 = 1^{er} janvier 1998).

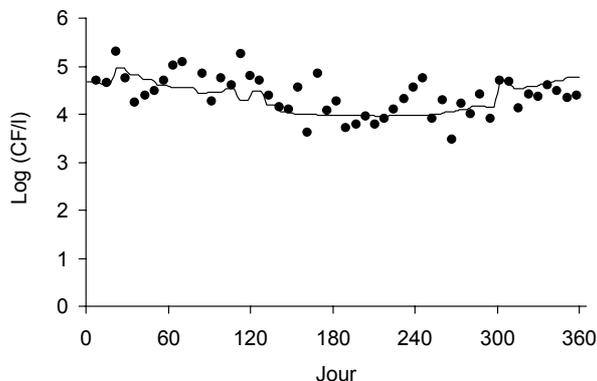


Figure 32: Simulation par le modèle SENESTRE des variations d'abondance en CF cultivables dans la Seine à Orly (entrée de Paris) au cours de l'année 1998 et dénombrements de CF cultivables à la prise d'eau de Choisy-le-Roi la même année. (Jour1 = 1^{er} janvier 1998)

Les niveaux de contamination fécale à l'exutoire des sous-bassins sont simulés de manière satisfaisante sur un cycle annuel. Les niveaux de contamination simulés et observés sont moins élevés en été qu'en hiver, car l'activité bactéricide des protozoaires est favorisée par les températures estivales. Rappelons que les données expérimentales peuvent être influencées par des conditions très locales (par exemple la présence d'un rejet domestique juste en amont du point de prélèvement) alors que le modèle ne calcule qu'une qualité moyenne par ordre, et qu'il n'est donc pas possible de reproduire parfaitement avec ce type de modèle la qualité de l'eau en un point précis du bassin. Par ailleurs, le modèle SENESTRE ne prend en compte que des situations de temps sec. Il est donc possible que sur un cycle annuel, des pics de contamination fécale soient observés en rivière par temps de pluie (quand les orages provoquent des surverses d'eaux usées brutes ou incomplètement traitées), qui ne seront pas correctement simulés par le modèle SENESTRE.

5.2.2 Simulations dans l'axe fluvial de la Seine

Les simulations réalisées à l'aide du compartiment "coliformes fécaux" ajouté au modèle MODESTE ont été validées sur l'axe fluvial de la Seine de Orly à Poses sur les 4 profils longitudinaux réalisés en 1997 et 1998. La Figure 33 présente les simulations et dénombrements de CF cultivables correspondant à ces 4 campagnes, et un exemple de simulation de l'activité GLU est repris à la Figure 34.

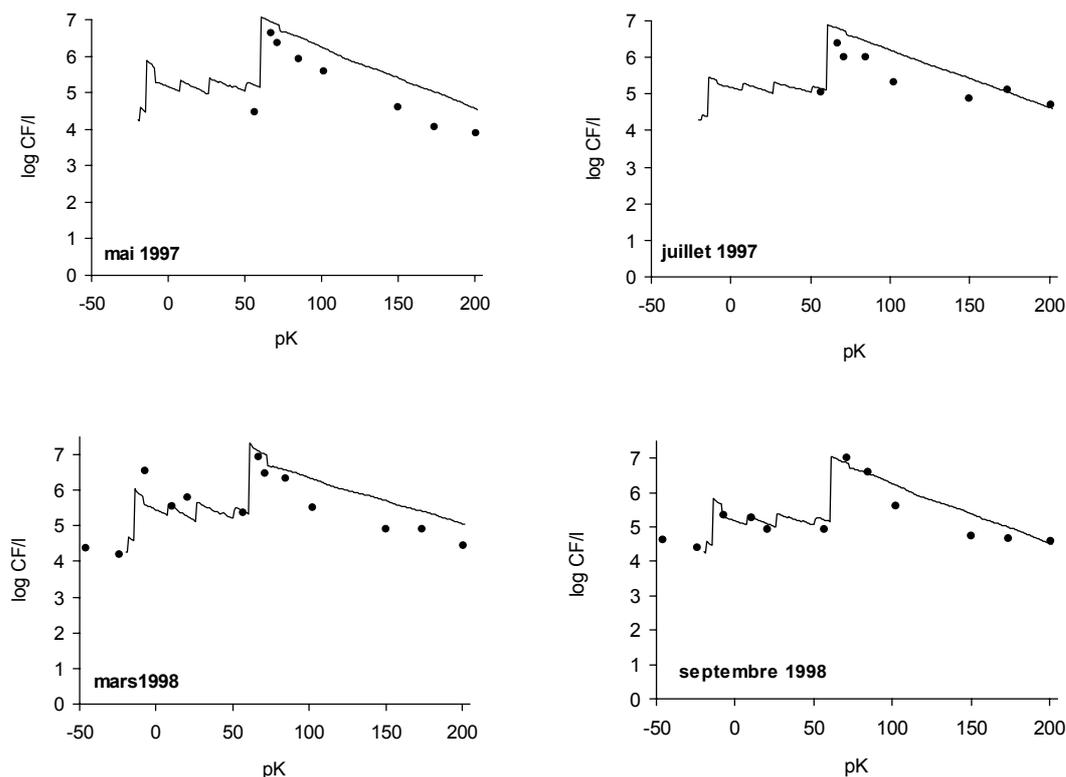


Figure 33: Abondance en CF cultivables dans l'axe fluvial de la Seine jusqu'à Poses en mai 1997, juillet 1997, mars 1998 et septembre 1998 et simulations par le modèle MODESTE. pK est une échelle kilométrique dont le zéro correspond au Pont d'Austerlitz à Paris. La simulation en chaque point est la somme des abondances en CF libres dans la colonne d'eau et ceux attachés aux MES.

Le modèle reproduit assez fidèlement l'abondance et l'activité GLU des CF dans l'agglomération parisienne et les pics de contamination dus aux effluents des STEPs Seine Amont (pK

-9) et Seine Aval (pK 62) (Figure 33 et Figure 34). En aval des rejets de la STEP Seine Aval, le modèle simule correctement les niveaux de contamination fécale au barrage de Poses (pK 202). Néanmoins, la disparition des CF simulée par le modèle semble trop faible par rapport aux points expérimentaux dans les 90 premiers kms en aval immédiat de la STEP, puis trop élevée dans les 50 kms avant Poses. Ces différences peuvent s'expliquer par une disparition plus rapide des coliformes en aval immédiat de la STEP, là où les protozoaires sont plus abondants car une partie d'entre eux sont apportés en rivière par les effluents de la STEP (Menon 1993), alors que nous avons considéré de manière simplifiée dans le modèle MODESTE que le taux de disparition des CF était constant sur tout l'axe fluvial.

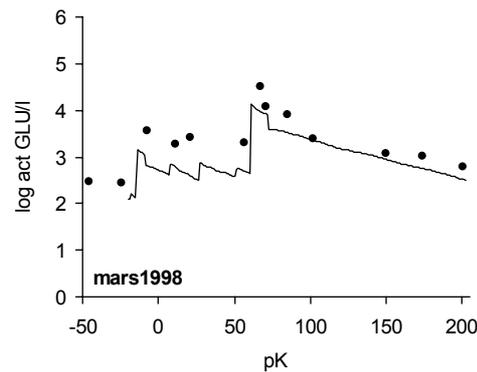


Figure 34: Activité GLU (pmoles MUF min⁻¹ l⁻¹) dans l'axe fluvial de la Seine jusqu'à Poses en mars 1998 et simulation de l'activité GLU par le modèle MODESTE. pK est une échelle kilométrique dont le zéro correspond au Pont d'Austerlitz à Paris. La simulation en chaque point est la somme de l'activité GLU des bactéries libres dans la colonne d'eau et de celles attachés aux MES.

Enfin, le modèle MODESTE a été utilisé pour réaliser quelques scénarios prédictifs sur l'impact du type de traitement utilisé dans la STEP Seine Aval sur la qualité de la Seine jusqu'à Poses. Nous avons imaginé que le traitement par boues activées en vigueur actuellement à Seine Aval était remplacé par un traitement par boues activées à temps de séjour prolongé (pour permettre la nitrification, et éventuellement la dénitrification), ou complété par une biofiltration permettant la nitrification des effluents (ce qui sera bientôt réellement le cas), ou encore complété par une désinfection des effluents aux UV (Figure 35). Le modèle montre que l'ajout d'une étape de biofiltration ou la mise en place d'un traitement par boues activées à temps de séjour prolongé à Seine Aval améliorerait significativement la qualité de l'eau dans toute la zone à l'aval d'Achères et à l'entrée dans l'estuaire, puisque les abondances en CF cultivables y serait inférieures d'environ 1 log₁₀. La qualité de l'eau de la Seine au barrage de Poses serait d'avantage compatible avec la norme impérative de qualité des eaux de baignade si des traitements plus sophistiqués (boues activées à temps de séjour prolongé avec dénitrification, ou désinfection aux UV) étaient mis en place à Seine Aval. Il faut cependant se montrer prudent avec les résultats de ces simulations, car nous considérons ici que la modification du type de traitement des eaux usées à Seine Aval modifie uniquement les apports de coliformes en Seine. Les modifications des apports de protozoaires ne sont, par exemple, pas prises en compte, alors qu'elles sont susceptibles de modifier l'intensité du processus de broutage à l'aval des rejets.

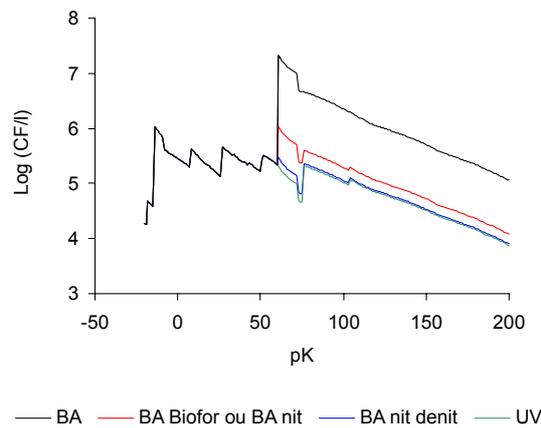


Figure 35: Simulations d'abondance en CF cultivables (CF/l) dans la Seine en aval de la STEP Seine Aval (pK 62) pour différents types de traitements d'épuration (situation de mars 1998). BA= boues activées, BA Biof= boues activées suivie d'une biofiltration sur filtre BIOFOR, BA nit= boues activées à temps de séjour prolongé (nitrification), BA nit dénité= boues activées à temps de séjour prolongé (nitrification + dénitrification en zone anaérobie), UV= boues activées suivies d'une filtration sur sable et d'un traitement des effluents aux ultra-violets.

6. Conclusion et perspectives

Dans le cadre de ce travail sur les bactéries d'origine fécale dans le bassin de la Seine, des méthodes enzymatiques directes ont été développées pour estimer l'abondance des coliformes totaux et fécaux. Ces méthodes offrent divers avantages par rapport aux méthodes culturelles traditionnelles: rapidité, sensibilité, simplicité et prise en compte de bactéries actives mais non cultivables et donc non dénombrables par les méthodes classiques.

L'étude des sources de coliformes, réalisées à la fois par méthodes enzymatiques et culturelles, a permis de quantifier les apports de bactéries fécales aux rivières via les rejets d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées par divers types de techniques. Les eaux usées brutes contiennent des teneurs extrêmement élevées en CF (entre 10^7 et $10^8/100$ ml). Malgré des abattements importants, dépendant du type de traitement d'épuration appliqué, les eaux usées traitées restent très riches en bactéries d'origine fécale et leur déversement dans le milieu naturel y a souvent un impact majeur sur la qualité microbiologique des eaux de rivières. Les apports diffus de coliformes par le lessivage des sols ont également été estimés pour divers types d'occupation du sol (forêts, cultures, pâtures). Même si à l'échelle d'un grand bassin versant les rejets ponctuels via les eaux usées dominent très largement les apports diffus dus au lessivage des sols agricoles, on constate que les apports diffus sont néanmoins susceptibles d'engendrer dans les petites rivières du bassin, en amont de toute contamination domestique, des teneurs en bactéries fécales non négligeables.

L'étude de la distribution des bactéries fécales dans le bassin de la Seine a montré que les abondances en coliformes dans les grandes rivières du bassin de la Seine (Seine chenalisée, Marne en aval de Châlons-en-Champagne, Oise en aval de Compiègne) sont élevées et généralement supérieures aux normes impératives de la directive européenne sur la qualité des eaux de baignade (10000 CT et 2000 CF/ 100 ml). Des pics de contamination fécale sont observés dans la Seine en aval des grandes STEPs de la région parisienne, mais également au niveau d'agglomérations de moindre importance (Troyes, Rouen). Les taux de mortalité des coliformes dans l'axe fluvial de la Seine ont été évalués par une méthode de suivi de la disparition de la radioactivité associée à l'ADN d' *E.coli* marqués à la thymidine tritiée. Ces taux de mortalité varient de 8 à $34 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, et sont proches des taux de mortalité des bactéries autochtones cités dans la littérature. Ils sont du même ordre de grandeur que les taux de disparition calculés sur base des mesures d'activité enzymatique dans ce secteur de la Seine. Les taux de disparition calculés sur base des comptages de coliformes cultivables sont plus élevés car ils incluent très vraisemblablement une perte de cultivabilité en plus d'une mortalité réelle des bactéries. Ces taux restent cependant nettement inférieurs à ceux mesurés par Beaudeau *et al.* (1998, 2001) sur des rivières d'ordres inférieurs. La disparition des coliformes dans l'axe fluvial de la Seine

est principalement due à l'activité bactériovore des protozoaires. Le broutage efficace des coliformes par les protozoaires explique sans doute que l'impact des rejets de STEP sur les abondances en coliformes des rivières reste finalement assez limité dans l'espace. Un autre processus qui peut être responsable de la disparition des coliformes de la colonne d'eau est leur sédimentation avec les MES sur lesquelles ils sont adsorbés. En effet, dans les eaux usées et les petits ruisseaux alimentés par le lessivage des bassins versants, une proportion non négligeable de coliformes est attachée aux particules. Dans les apports diffus, cette proportion est maximale lors des fortes pluies, quand le ruissellement de surface riche en MES alimente les ruisseaux. Dans les rivières du bassin, la fraction de bactéries adsorbées sur les MES est très variable (de 0 à 95%), et augmente globalement avec la concentration en MES de l'eau

Les modifications apportées aux modèles MODESTE et SENESTRE pour prendre en compte la dynamique des bactéries fécales ont permis de reproduire de manière satisfaisante l'abondance en CF à l'exutoire des sous-bassins Marne, Oise et Seine amont, et dans l'axe fluvial de la Seine jusqu'à Poses. Diverses améliorations restent cependant à apporter à ces modèles dans une prochaine phase du programme PIREN Seine. En premier lieu, il serait nécessaire d'améliorer nos connaissances sur les processus de disparition des bactéries fécales dans les petites rivières pour pouvoir modéliser de manière déterministe le comportement des coliformes dans ces zones. Ensuite, les sorties du modèle SENESTRE devront être validées sur des rivières de différents ordres et non pas uniquement sur les données collectées à l'exutoire des grands sous-bassins amont. Ceci n'a pu être réalisé jusqu'à présent par manque de données expérimentales ; celles-ci devront être acquises dans le futur. Par ailleurs, l'activité GLU pourrait être ajoutée comme nouvelle variable d'état dans le modèle SENESTRE. Un autre objectif serait de lier les deux modèles concernant la dynamique des coliformes dans le bassin, c'est-à-dire que les simulations du modèle SENESTRE d'abondance en CF cultivables et d'activité GLU à l'exutoire des grands sous-bassins pourraient servir de conditions limites pour le modèle MODESTE. Enfin, dans le modèle SENESTRE, la population de CF pourrait être séparée en une fraction libre et l'autre attachée aux MES, à l'instar de ce qui a été fait dans le modèle MODESTE. Cette amélioration impliquerait de poursuivre l'étude sur l'attachement des coliformes aux particules. Une meilleure connaissance du lien entre les coliformes et les MES permettrait d'ailleurs de considérer dans les deux modèles une fraction de CF liés aux MES qui soit variable, par exemple en fonction de la teneur en MES de l'eau.

7. Références bibliographiques

- Agence française de normalisation (AFNOR) (1990). Eaux - méthodes d'essais. *Recueil de normes françaises*. 4th édition. Paris, la Défense, France, 735 pages.
- American Public Health Association (APHA) (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th edition. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Apte S.C., Davies C.M. and Peterson S.M. (1995). Rapid detection of faecal coliforms in sewage using a colorimetric assay of b-D-Galactosidase. *Water Research* **29(7)**: 1803-1806.
- Ashley R.M. and Dabrowski W. (1995). Dry and storm weather transport of coliforms and faecal streptococci in combined sewage. *Water Science and Technology* **31(7)**: 311-320.
- Bahlaoui M.A., Baleux B. and Troussellier M. (1997). Dynamics of pollution-indicator and pathogenic bacteria in high-rate oxidation wastewater treatment ponds. *Water Research* **31(3)**: 630-638.
- Barcina I., Gonzales J.M., Iriberry J. and Egea L. (1989). Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Applied and Environmental Microbiology* **55(1)**: 246-251.
- Barcina I., Gonzalez J.M., Iriberry J. and Egea L. (1991). Role of protozoa in the regulation of enteric bacteria populations in seawater. *Marine Microbial Food Webs* **5(2)**: 179-187.
- Baudart J., Lemarchand K., Brisabois A. and Lebaron P. (2000). Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Applied and Environmental Microbiology* **66(4)**: 1544-1552.

- Baudisová D. (1997). Evaluation of *Escherichia coli* as the main indicator of faecal pollution. *Water Science and Technology* **35(11-12)**: 336-336.
- Beaudeau P., Tousset N. et Lefèbvre A. (1998). Disparition des *Escherichia coli* dans les rivières normandes. Rapport d'activités du Laboratoire d'Etudes et d'Analyses de la ville du Havre, Agence de l'Eau Seine-Normandie, Direction des Rivages Normands.
- 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.
- Berg J.D. and Fiksdal L. (1988). Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone-b-D-galactosidase. *Applied and Environmental Microbiology* **54(8)**: 2118-2122.
- 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.
- Billen G. et Garnier J. (1996). RIVE et MODESTE: modélisation du fonctionnement microbiologique du continuum Seine fluviale - estuaire amont. In: *rapport 1995-FIN-2 du programme Scientifique Seine Aval, thème "Fonctionnement microbiologique et contrôle de l'oxygénation"*.
- Cabelli V.J. (1978). Swimming associated disease outbreaks. *Journal of Water Pollution Control Federation* **50(2)**: 1374-1377.
- Cabelli V.J., Dufour A.P., Levin M.A., McCabe L.J. and Haberman P.W. (1979). Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches. *American Journal of Public Health* **69(7)**: 690-696.
- Cabelli V.J., Dufour A.P., McCabe L.J. and Levin M.A. (1983). A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. *Journal of Water Pollution Control Federation* **55(10)**: 1306-1314.
- Cabelli V.J. (1989). Swimming-associated illness and recreational water quality criteria. *Water Science and Technology* **21(2)**: 13-21.
- Colwell R. R., Brayton P. R., Grimes D. J., Roszak D. B., Huq S. A. and Palmer L. M. (1985). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered micro-organisms. *Biotechnology* **3**: 817-820.
- Davies C.M., Apte S.C., Peterson S.M. and Stauber J.L. (1994). Plant and algal interference in bacterial β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase assays. *Applied and Environmental Microbiology* **60(11)**: 3959-3694.
- Davies C.M., Apte S.C. and Peterson S.M. (1995). B-D-galactosidase activity of viable, non culturable coliform bacteria in marine waters. *Letters in Applied Microbiology*. **21**: 99-102.
- Dupray E., Pommepuy M., Derrien A., Caprais M.P. and Cormier M. (1993). Use of Direct Viable Count (DVC) for the assessment of survival of *E.coli* in marine environments. *Water Science and Technology* **27(3-4)**: 395-399.
- Ferley J.P., Zmirou D., Balducci F., Baleux B., Fera P., Larbaigt G., Jacq E., Moissonnier B., Blineau A. and Boudot J. (1989). Epidemiological significance of microbiological pollution criteria for river recreational waters. *International Journal of Epidemiology* **18(1)**: 198-205.
- Fiksdal L., Pommepuy M., Caprais M-P. and Midttun I. (1994). Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. *Applied and Environmental Microbiology* **60(5)**: 1580-1584.
- Fiksdal L., Tryland I. and Nelis H. (1997). Rapid detection of coliform bacteria and influence of non-target bacteria. *Water Science and Technology* **35(11-12)**: 415-418.
- Fiksdal L. and Tryland I. (1999). Effect of UV light irradiation, starvation and heat on *Escherichia coli* β -D-galactosidase activity and other potential viability parameters. *Journa of Applied Microbiology* **87(1)**:62-71.
- Garcia-Lara J., Menon P., Servais P. and Billen G. (1991). Mortality of fecal bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 885-888.
- Gatel D., Elain C., Menge C., Gagnon J.L., Cavard J. (1996). Contrôle et modélisation dela qualité de l'eau potable en réseau. *Tribune de l'Eau* **2** : 33-40.

- Geldreich E.E., Kenner B.A. and Kabler P.M. (1964). The occurrence of coliforms, fecal coliforms and streptococci on vegetation and insects. *Applied Microbiology*. **12(1)**: 63-69.
- 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. (2001a). Etude des sources et de la dynamique des coliformes dans les bassins versants anthropisés : l'exemple du bassin de la Seine (France). Thèse de doctorat de l'Université Libre de Bruxelles.
- 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., Crop P., Servais P. (2002). Fecal coliforms removal by wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods. *Water Research*, sous presse.
- Grimes D. J. and Colwell R. R. (1986). Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiol. Letters* **34**: 161-165.
- Guerrini M.-C., Mouchel J.-M., Meybeck M., Penven M.J., Hubert G. et Muxart T. (1998). Le bassin de la Seine: la confrontation du rural et de l'urbain. Meybeck M., de Marsily G. et Fustec E. (eds), *La Seine en son bassin, fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé*, Elsevier, Paris.
- Guivarc'h H. et Chevreuil M. (1998). Etude du comportement des produits phytosanitaires à l'échelle d'un petit bassin versant. *rapport 1998 du programme Scientifique PIREN Seine, thème 2 "Zones humides riveraines"*.
- Hagedorn C., Robinson S.L., Filtz J.R., Grubbs S.M., Angier T.A. and Reneau R.B. (1999). Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* **65(12)**: 5522-5531.
- Haslay C. et Leclerc H. (1993). Microbiologie des eaux d'alimentation. Techniques et documentation, Lavoisier, Paris, France.
- Helmer R., Hespanhol I. and Saliba L.J. (1991). Public health criteria for the aquatic environment: recent WHO guidelines and their application. *Water Science and Technology* **24(2)**: 35-42.
- Iriberry J., Ayo B., Artolozaga I., Barcina I. and Egea L. (1994). Grazing on allochthonous vs autochthonous bacteria in river water. *Letters in Applied Microbiology* **18**: 12-14.
- Joux F., Lebaron P. and Troussellier M. (1997). Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **22**: 65-76.
- Khaleel R., Reddy K.R. and Overcash M.R. (1980). Transport of potential pollutants in runoff water from land areas receiving animal wastes: a review. *Water Research* **14**: 421-436.
- Kueh C.S.W., Tam T.-Y., Lee T., Wong S.L., Lloyd O.L., Yu I.T.S., Wong T.W., Tam J.S. and Bassett D.C.J. (1995). Epidemiological study of swimming-associated illnesses relating to bathing-beach water quality. *Water Science and Technology* **5-6(31)**: 1-4.
- Leclerc H., Devriese L.A. and Mossel D.A.A. (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Bacteriology* **81**: 459-466.
- Leenen E.J.T.M. and Havelaar A.H. (2000). Health complaints related to recreation in surface waters in the summers of 1990-1999 in the Netherlands. *Proceedings of the 1st World Water Congress of the International Water Association*, Book 7 (Health-related microbiology), p. 33, Paris, July 2000.
- Menon P. (1993). Mortalité des bactéries allochtones rejetées dans les milieux aquatiques. *Thèse de doctorat de l'Université Paris VI, option Science de la Terre*.
- Moriñigo M.A., Borrego J.J. and Romero P. (1986). Comparative study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella* spp. in natural waters. *Journal of Applied Bacteriology* **61**: 169-176.

- Petit M., George I., Servais P. (2000). Survival of *Escherichia coli* in freshwaters: β -D-glucuronidase activity measurements and characterization of cellular states. *Canadian Journal of Microbiology* **46**(7): 679-684.
- Polo F., Figueras M.J., Inza I., Sala J., Fleisher J.M. and Guarro J. (1998). Relationship between presence of *Salmonella* and indicators of faecal pollution in aquatic habitats. *FEMS Microbiology Letters* **160**: 253-256.
- Pommepeuy 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.
- Pommepeuy M., Fiksdal L., Gourmelon M., Melikechi H., Caprais M.P., Cormier M. and Colwell R.R. (1996a). Effect of seawater on *Escherichia coli* β -galactosidase activity. *Journal of Applied Bacteriology* **81**: 174-180.
- Pommepeuy M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M., Colwell R.R. and Cormier M. (1996b). Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(12): 4621-4626.
- Pommepeuy M., Le Guyader F., Menard D., Dubois E., Gourmelon M., Derrien A., Guillerm D., Janex M.-L., Mandra V., Rodrigues J.-M., Audic J.-M., Fiksdal L., Bohne R.-A., Dalen A., Barcina I., Arana I., Muela A., Arturo M., Cormier M., Gougeon A., Sauvaget F., Oberg C., Rudolph K.-U. and Kopecka H. (1998). NEWTECH: comparative evaluation of new techniques for wastewater disinfection. Editions IFREMER, Plouzané, France.
- Rockabrand D., Austin T., Kaiser R. and Blum P. (1999). Bacterial growth state distinguished by single-cell protein profiling: does chlorination kill coliforms in municipal effluent? *Applied and Environmental Microbiology* **65**(9): 4181-4188.
- 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., Martinez J. and Vives-Rego J. (1989). Estimating bacterial mortality by the disappearance of ^3H -labeled intracellular DNA. Technical validation and field measurements. *FEMS Microbiology Ecology* **62**: 119-126.
- Servais P. and Menon P. (1991). Fate of autochthonous and fecal bacteria in marine ecosystems. *Kieler Meeresforsch* **8**: 290-296.
- Servais P., Vives-Rego J. and Billen G. (1992). Survival and mortality of bacteria in natural environments. J. C. Fry & M. J. Day (eds.), *Release of genetically engineered and other microorganisms*, p. 100-119, Cambridge University Press.
- Servais P. Garnier J., Demarteau N., Brion N. and Billen G. (1999). Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through wastewater effluents. *Water Research* **33**(16):3521-3531.
- Seyfried P.L., Tobin R.S., Brown N.E. and Ness P.F. (1985a). Prospective study of swimming-related illness. I. Swimming-associated health risk. *American Journal of Public Health* **75**(9): 1068-1070.
- Seyfried P.L., Tobin R.S., Brown N.E. and Ness P.F. (1985b). A prospective study of swimming-related illness. II. Morbidity and the microbiological quality of water. *American Journal of Public Health* **75**(9): 1071-1075.
- Stevenson A.J. (1953). Studies of bathing water quality and health. *American Journal of Public Health* **43**: 529-538.
- Thibert S. (1994). Exportations naturelles et anthropiques des ions majeurs et des éléments nutritifs dans le bassin de la Seine. *Thèse de doctorat de l'Université Paris VI*, 204 p.
- Tryland I. and Fiksdal L. (1998). Enzyme characteristics of β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(3): 1018-1023.
- Van Poucke S.O. and Nelis H.J. (1997). Limitations of highly sensitive enzymatic presence-absence tests for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(2): 771-774.
- WHO. (1982). Rapid assessment of sources of air, water and land pollution. WGO Offset Publication n° 62 World Health Organisation, Geneva, Switzerland.

- Wyer M.D., Kay D., Dawson H.M., Jackson G.F., Jones F., Yeo J. and Whittle J. (1996). Delivery of microbial indicator organisms to coastal waters from catchment sources. *Water Science and Technology* **33(2)**: 37-50.
- Wyer M.D., O'Neill G., Kay D., Crowther J., Jackson G. and Fewtrell L. (1997). Non-outfall sources of faecal indicator organisms affecting the compliance of coastal waters with Directive 76/160/EEC. *Water Science and Technology* **35(11/12)**: 151-156.