

Etude et modélisation de la qualité microbiologique des eaux du bassin de la Seine

Pierre Servais, Tamara Garcia Armisen, Philippe Mercier, Patricia Lizin et Adriana Anzil

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

Etude et modélisation de la qualité microbiologique des eaux du bassin de la Seine	1
1. Introduction	3
2. Développements méthodologiques.....	4
2.1. Méthode FISH utilisée sur souches pures.....	4
2.2. Suivi en batch des <i>E.coli</i> rejetés en eau de rivière : comparaison de diverses méthodes d'énumération.....	5
2.3. Méthode FISH utilisée sur des échantillons d'eaux usées et de rivières.	6
3. Sources de contamination fécale dans le bassin de la Seine.....	8
3.1. Sources ponctuelles et sources diffuses de contamination fécale.....	8
3.2. Apports de bactéries fécales par les eaux usées	8
3.2.1 Abondance des bactéries fécales dans les eaux usées brutes.....	9
3.2.2 Abattement des bactéries fécales dans les STEP et abondance dans les eaux usées traitées	9
3.3. Apports de coliformes par le lessivage des sols	11
3.3.1 Comparaison des apports par lessivages dans diverses régions du bassin	12
3.3.2 Apports par lessivage des diverses bactéries indicatrices	13
4. Contamination microbienne de la Vesle en aval de Reims	14
5. Qualité microbiologique des eaux de la Marne.....	15
6. Modélisation de la dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine.....	15
6.1. Description du compartiment « coliformes fécaux » inclus dans l'applicatif SENEQUE 3.1 16	
6.1.1 Prise en compte des apports diffus	16
6.1.2 Prise en compte des apports ponctuels	16
6.1.3 Prise en compte des processus en rivière.....	17
6.2. Simulations et validation du modèle aux résultats expérimentaux.....	17
6.2.1 Simulations à l'exutoire du bassin de la Marne	17
6.2.2 Simulations dans l'axe fluvial de la Marne.....	17
7. Références bibliographiques	20

1. Introduction

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

Dans le cadre de la troisième phase du PIREN, des travaux avaient été entrepris sur les coliformes fécaux (CF) qui constituent un des principaux groupes indicateurs de contamination fécale repris dans les normes de qualité des eaux. Ce groupe inclut à la fois des bactéries pathogènes et d'autres bactéries qui ne le sont pas. Le fait de travailler sur les coliformes fécaux comme modèle de micro-organismes d'origine fécale se justifie, d'une part, parce que ces bactéries constituent l'un des indicateurs courants de contamination microbiologique des eaux et que, par conséquent, des normes sont fixées pour l'abondance maximale de ces bactéries selon l'usage de l'eau et, d'autre part, parce que ces bactéries sont abondantes dans le milieu aquatique ce qui permet d'étudier leur écologie sans trop de problème. Il est apparu primordial de mieux appréhender 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 fécaux dans le bassin de la Seine s'est inscrite dans ce contexte. Ainsi dans le cadre de la troisième phase du programme PIREN, une nouvelle technique enzymatique de détection directe (sans passage par une mise en culture) des CF a été développée (George et al., 2000). Les sources de CF (George et al., 2001b, 2002, 2003) et leur devenir dans les rivières (George et al., 2001a, c) ont, par ailleurs, été étudiés ce qui a permis de développer un premier modèle mathématique de la dynamique des coliformes fécaux en rivière (George et Servais, 2002).

Les travaux réalisés en 2002 l'ont été dans la continuité des recherches menées par notre équipe sur le sujet durant la phase III du programme PIREN Seine (George et Servais, 2002). En 2002, notre effort a porté sur (1) du développement méthodologique visant à tester la possibilité de dénombrer les CF par la technique d'hybridation in situ avec une sonde oligonucléotidique spécifique ; (2) la poursuite de collectes de données sur les apports ponctuels de bactéries fécales aux rivières via les rejets de stations d'épuration et sur les apports diffus par lessivage des sols avec une attention particulière aux apports par lessivage des zones d'élevage (bassin versant de la Blaise); (3) l'étude de l'impact des apports de bactéries fécales d'une ville de moyenne importance (Reims) sur la qualité microbiologique des eaux d'une rivière de faible débit (la Vesle) ; (4) l'acquisition de données de terrain (profils longitudinaux des abondances en CF dans la Marne) ; (5) la modélisation avec l'introduction dans l'applicatif du modèle SENEQUE 3.1 du compartiment « Coliformes fécaux ».

2. Développements méthodologiques

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

Des méthodes de biologie moléculaire sont par ailleurs développées actuellement pour caractériser les micro-organismes présents dans les eaux de rivières. Le FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), qui se base sur l'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques de séquences pertinentes, semble l'une des techniques les plus prometteuses. Après une recherche bibliographique sur les différentes méthodes de biologie moléculaire qui pourraient être utilisées dans le cadre de notre étude (voir par exemple, Rompré *et al.* 2002), nous avons décidé d'essayer de mettre au point pour le dénombrement des *E.coli* dans les milieux naturels une méthode moléculaire dont des applications aux eaux de distribution ont été décrites (Delabre *et al.*, 2001). Cette méthode se base sur l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique marquée avec un fluorochrome, qui s'hybride de manière spécifique avec une séquence complémentaire présente chez *E.coli*. Cette méthode s'intitule Fluorescent In Situ Hybridisation (FISH).

La séquence de la sonde que nous avons choisie a été publiée par Regnault *et al.* (2000) sous le nom de sonde « Colinsitu ». Elle est spécifique de l'ARN ribosomal 16S de *E.coli*. Dans le même article, ces auteurs proposent une procédure complémentaire appelée RWCD (Revivification without cell division) qui consiste à incuber quelques heures l'échantillon dans un milieu riche, additionné d'antibiotiques qui inhibent la division cellulaire. Cette étape a le double objectif, d'une part, d'augmenter la quantité d'ARN ribosomal des cellules et de les rendre ainsi plus aisément détectables en microscopie et, d'autre part, de permettre un dénombrement des bactéries *E.coli* viables uniquement. Au cours du dénombrement au microscope à fluorescence, on compte les bactéries fluorescentes élargies correspondant aux *E.coli* viables. La sonde « Colinsitu » a été marquée avec le fluorochrome CY3 et une hybridation complémentaire avec la sonde EUB 338 qui s'hybride sur toutes les bactéries a été effectuée chaque fois comme contrôle de l'efficacité d'hybridation.

2.1. Méthode FISH utilisée sur souches pures.

Les premiers essais ont été réalisés sur des cultures pures de la souche d' *E.coli* ATCC 25922. Une préculture est faite pendant la nuit et 1 ml de cette préculture est repiqué dans 10 ml de milieu frais (Tryptone casein soya complétement d'extrait de levure) et incubé à 37°C pendant 2 heures pour que les bactéries soient en phase exponentielle de croissance. Cette culture est centrifugée et resuspendue dans une solution de Ringer stérile. Des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} de cette suspension ont été filtrées sur des filtres de polycarbonate de porosité 0,45 μ m. Pour la RWCD, le filtre est incubé à 30°C en chambre humide sur un PAD imbibé de milieu TCS (Tryptone casein soya) additionné d'extrait de levure et contenant les antibiotiques empêchant la division cellulaire (10 μ g/ml d'acide nalidixique et 1 μ g/ml de ciprofloxacine). Pour l'hybridation, les bactéries sont fixées sur le filtre avec du paraformaldéhyde 3% pendant 15 minutes, rincées avec de l'eau distillée, puis incubées en chambre humide pendant 2h à 42°C, en présence des sondes (10 pmoles par filtre de la sonde colinsitu et 25 pmoles par filtre de la sonde EUB338) et du tampon d'hybridation. Le tampon d'hybridation est composé de NaCl 0.9 M, Tris-HCl 20 mM (pH 7.2), SDS 0.1%, BSA fraction V 0.2%, Acide

poliadenylique 0.1 mg/ml, Formamide desionisé 22%. Les filtres sont lavés avec une solution de NaCl 0.1M, Tris-HCl 20 mM (pH 7.2), SDS 0.1%, 5mM EDTA et incubés dans cette solution à 51°C pendant 20 minutes. Après lavage les filtres sont déposés sur une lame de microscope et couverts par une goutte d'huile et un couvre-objet, pour l'observation au microscope à épifluorescence.

Les résultats des observations de ces premières hybridations avec la sonde « colinsitu » sur souches pures en phase exponentielle de croissance sont tels qu'attendus. Nous avons en effet observé des bactéries significativement plus grandes que celles qui n'ont pas subi la RWCD et caractérisées par une fluorescence intense. Afin d'éviter, le problème de photobleaching (rapide diminution de la fluorescence sous excitation durant l'observation), les cellules sont dénombrées sur des photos prises au moyen d'une caméra digitale (Figure 1).



Figure 1. Hybridation de la sonde "Colinsitu" sur une culture pure en phase exponentielle.

Des comptages comparatifs du nombre de bactéries dans la même dilution de la culture en phase exponentielle de croissance par différentes méthodes montrent qu'on retrouve des valeurs similaires entre une énumération après coloration au DAPI qui détecte l'ensemble des cellules et une énumération avec la procédure FISH+RWCD décrite ci-dessus. Ceci montre que, sur des cultures d'*E.coli* en phase de croissance, la technique FISH+RWCD permet un dénombrement correct.

2.2. Suivi en batch des *E.coli* rejetés en eau de rivière : comparaison de diverses méthodes d'énumération.

Une expérience a été réalisée pour évaluer la performance de ces hybridations dans le cas de bactéries qui ne sont pas en culture dans un milieu riche mais soumises à des conditions de stress nutritionnel similaires à celles du milieu naturel. En début d'expérience, une quantité connue de cellules d'*E.coli* a été introduite dans 2 litres d'eau de rivière filtrée sur 0.22µm et autoclavée. Ce milieu naturel reconstitué a été incubé pendant 11 jours à 20°C sous agitation et un rythme circadien a été créé par un éclairage de 12 heures suivi de 12 heures d'obscurité. La souche d'*E.coli* ATCC 25922 utilisée pour cette expérience a été cultivée dans du milieu TSB sans dextrose additionné de 0.2 g/l de β-D-glucuronide pour induire l'activité de la β-D-glucuronidase. Un premier prélèvement a été fait 8h après l'inoculation des bactéries et ensuite toutes les 48 heures.

L'évolution de l'abondance des bactéries a été évaluée par 4 méthodes différentes : coloration au DAPI et comptage direct au microscope ; culture sur boîte de Petri sur milieu spécifique des coliformes fécaux (milieu Tergitol-TTC)(AFNOR, 2001) ; mesure directe de l'activité enzymatique β-D-glucuronidase (méthode qui ne passe pas par une mise en culture et permet une estimation quantitative de l'abondance des *E.coli* métaboliquement actifs)(George *et al.*, 2000); FISH-RWCD (protocole identique que dans les expériences décrites ci-dessus avec les souches pures). Les résultats obtenus sont présentés à la figure 2.

On observe d'abord que le nombre obtenu par coloration au DAPI reste constant au cours du temps. L'énumération après coloration au DAPI compte non seulement les bactéries vivantes mais aussi des bactéries mortes mais morphologiquement intactes. Des observations du maintien du nombre de bactéries fécales au cours du temps après introduction de celles-ci dans de l'eau de rivière stérile a déjà été décrit dans la littérature (Petit *et al.*, 2000). Le dénombrement par mise en culture montre une disparition rapide (presque 3 log) des bactéries pendant les premières 150 heures d'incubation. Ceci montre que plus de 99 % des cellules de *E.coli* introduites dans l'expérience ont atteint après 150 h. d'incubation un état non cultivable. La méthode enzymatique, par contre, suggère une disparition beaucoup plus lente, de seulement un demi log tout au long de l'expérience. Ceci est peut être du au fait que cette méthode prend vraisemblablement en compte les bactéries viables mais non cultivables (George *et al.*, 2000). Concernant la méthode FISH, on observe une diminution beaucoup plus lente que pour les comptages de bactéries cultivables. Ceci met clairement en évidence la potentialité de la méthode FISH à dénombrer des cellules non cultivables et donc non énumérables sur milieu gélosé.

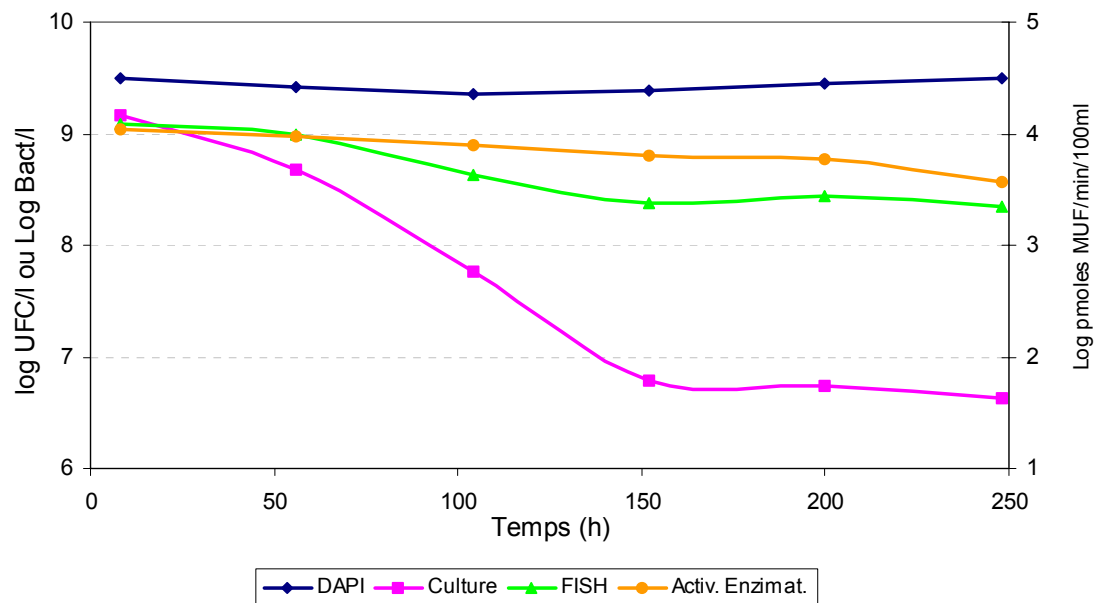


Figure 2. Suivi de la disparition des *E.coli* rejetés dans de l'eau de rivière stérile.

2.3. Méthode FISH utilisée sur des échantillons d'eaux usées et de rivières.

A la suite des expériences présentées ci-dessus, nous avons analysé divers échantillons naturels présentant des teneurs très différentes en coliformes fécaux :

- Eau d'entrée d'une station d'épuration.
- Eau de sortie d'une station d'épuration.
- Eau prélevée dans un collecteur unitaire d'eau.
- Eau d'une rivière d'ordre 3

Tous les échantillons ont été traités pendant 45 secondes dans un bain à ultrasons pour briser les agrégats de particules contenant aussi des bactéries afin de faciliter le comptage, des études précédentes ayant montré que cette procédure n'affecte pas l'intégrité des bactéries. Pour le reste, le protocole utilisé est identique à celui décrit ci-dessus pour les essais sur souches pures. Le Tableau 1 reprend les volumes filtrés, le nombre de champs microscopiques comptés pour chaque échantillon et

les résultats des dénombrements par FISH. Les comptages de coliformes fécaux sur la gélose tergitol-TTC sont présentés pour comparaison.

Tableau 1. Comptage des *E.coli* et des coliformes fécaux pour les différents échantillons traités.

Type d'eau	Volume filtré (ml)	Nombre de champs comptés	Nombre de <i>E.coli</i> dénombré par FISH (bact/100ml)	Nombre de CF dénombré sur gélose (bact/100ml)
Entrée de STEP	2	50	94400000	5200000
Sortie de STEP	10	50	1230000	60000
Eau collecteur	5	50	92000000	4000000
Eau de rivière	20	100	64800	3700

On peut observer que les valeurs des dénombrement par FISH sont systématiquement plus élevées que les dénombrement sur milieu gélosé Tergitol-TTC, bien que sur ce milieu on dénombre tous les coliformes fécaux et pas seulement les *E.coli* comme c'est le cas avec la méthode FISH. Ceci vient appuyer l'idée que la méthode FISH permet de compter les bactéries viables non cultivables. Les valeurs plus élevées observées en FISH peuvent être aussi être expliquées par le fait que, dans les milieux riches en particules plusieurs CF attachés à une même particule ne donne lieu qu'à une colonie sur gélose.

Concernant l'utilisation de la méthode FISH pour les eaux très chargées en coliformes (concentrations supérieures à 10^5 bact/100ml) le comptage est aisé car le volume filtré peut être réduit tout en conservant un nombre suffisant de cellules par champ microscopique, ce qui limite le bruit de fond lié aux MES présentes sur le filtre. La figure 3a montre les bactéries bien allongées avec une fluorescence intense que l'on compte comme positives. La figure 3b montre que malgré un certain bruit de fond du aux MES qui se déposent sur le filtre et aux adhésions non-spécifiques de la sonde, les bactéries «positives» sont facilement identifiables. Dans le cas de l'eau de rivière testée ici, en limitant le volume filtré à 20 ml, on est à la limite de détection de la méthode car on observe en moyenne moins d'une bactérie *E.coli* par champ. Les essais réalisés avec la sonde « Colinsitu » et la procédure RWCD apparaissent extrêmement encourageants et seront poursuivis et comparés avec des dénombrements sur gélose spécifiques des bactéries *E. coli*.

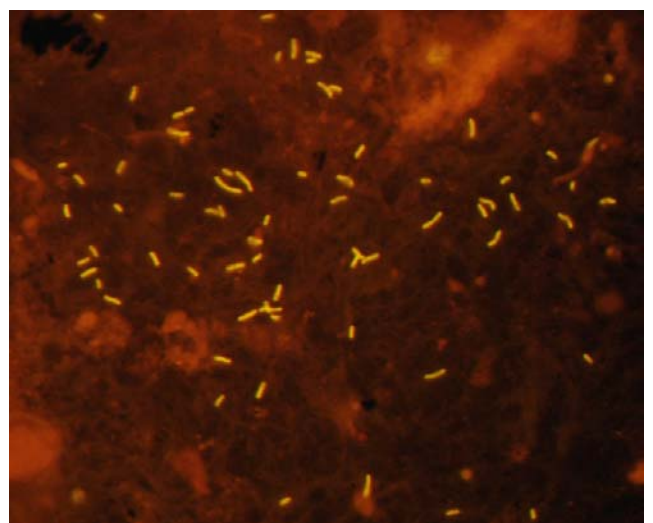
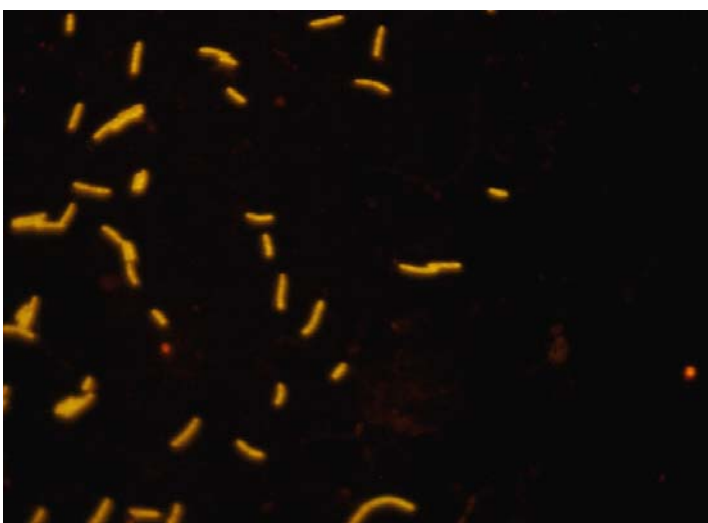


Figure 3. Hybridation avec la sonde « Colinsitu » des *E. coli* présents dans un échantillon d'eau usée.

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. Les résultats présentés dans ce rapport visent à compléter les données acquises précédemment (George et Servais, 2002 ; George *et al.*, 2002)

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...) mais sont principalement d'origine animale (lessivage de sols contaminés par des fèces d'animaux sauvages ou du bétail, ou de sols sur lesquels des engrais organiques d'origine animale ont été épandus). Des premières données avaient été acquises l'importance de ce type d'apport lors de la phase III du PIREN (George et Servais, 2002 ; George *et al.*, 2003). Elles ont été complétées en 2003 par des campagnes sur les ruisseaux du bassin amont de l'Oise, de l'Andelle, la Risle et la Blaise

3.2. Apports de bactéries fécales par les eaux usées

En 2002, l'étude sur les sources ponctuelles de contamination fécale a été réalisée sur six STEPs rejetant leurs effluents dans la Seine. Sur les six STEPs étudiées, quatre ont été échantillonnées en entrée et en sortie. La STEP de Jumièges n'a pu être échantillonnée qu'en sortie et celle de La Mailleraye qui présentait un dysfonctionnement dans son traitement le jour de l'échantillonnage n'a pu être prise en compte que pour les valeurs échantillonnées en entrée. L'abondance en bactéries fécales, évaluée pour les eaux brutes et traitées, a permis de quantifier l'efficacité du traitement appliqué sur la pollution microbienne.

Au contraire de nos études antérieures basées uniquement sur le dénombrement des coliformes fécaux, nous avons, sur les six STEPs échantillonnées, analysé les différents indicateurs de contamination fécale (coliformes fécaux (CF), coliformes totaux (CT) et stéptocoques fécaux (SF) (dénombrements sur gélose , AFNOR 2001). Ces STEPS se différencient par leur type de traitement (traitement primaire ou secondaire par boues activées) et leur capacité nominale comprise entre 1500 et 550000 équivalent-habitant (EH), la plus importante étant la station d'Emeraude qui traite tous les effluents de l'agglomération rouennaise.

Tableau 2. : Caractéristiques des STEP s échantillonnées lors de la campagne effectuée en avril 2002.

Implantation	Traitement	Equivalent-habitant (capacité nominale)
Petit-Quévilly (Emeraude)	Boues activées (nitrification-dénitrification)	550000
Grand-Quévilly	Boues activées (nitrification)	57000
Elboeuf	Boues activées	100000
Le Trait	Boues activées	7000
La Mailleraye	Boues activées	2000
Jumièges	Primaire	1500

3.2.1 Abondance des bactéries fécales dans les eaux usées brutes

La figure 4 présentent les teneurs en bactéries fécales des eaux brutes. Les concentrations en coliformes fécaux cultivables sont comprises entre 10^7 et 10^8 CF cultivables/100 ml, la moyenne pour les cinq stations étant de 2.3×10^7 CF/100 ml. Les concentrations moyennes en coliformes totaux et streptocoques fécaux cultivables sont respectivement de 5.5×10^7 CT cultivables/100 ml et de 4.3×10^6 SF cultivables/100 ml. Pour le STEP Emeraude, la concentration en coliformes fécaux déterminée dans l'effluent brut est de 2.6×10^7 CF cultivables/100 ml. Cette valeur est en accord avec les valeurs déterminées antérieurement (1.7×10^7 et 2.2×10^7 par Servais *et al.* (1999) et George *et al.* (2002).

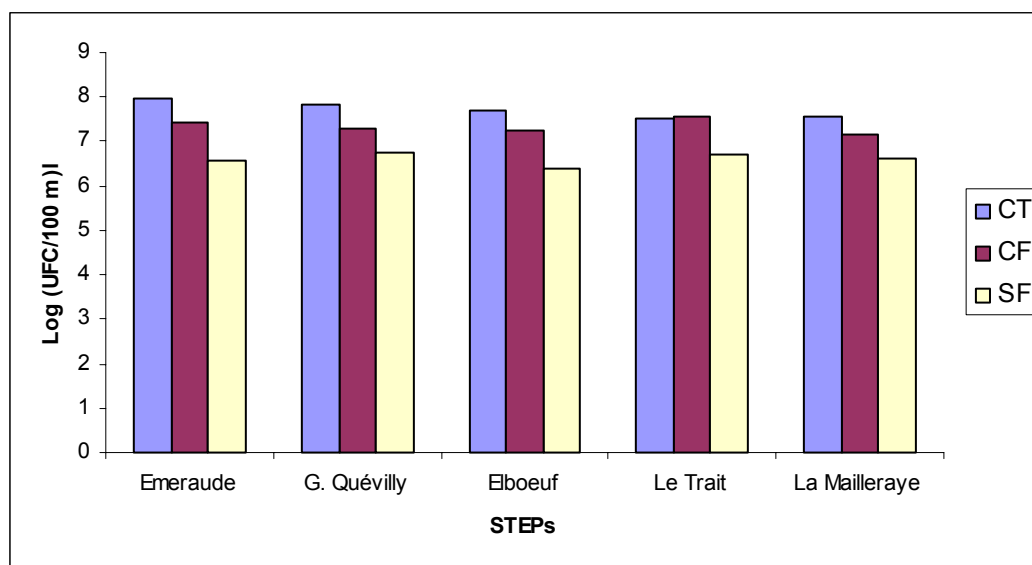


Figure 4: Abondance en bactéries indicatrices de contamination fécale (en coordonnées logarithmiques) des eaux usées brutes prélevées à l'entrée des cinq stations d'épuration étudiées en 2002.

3.2.2 Abatement des bactéries fécales dans les STEP et abondance dans les eaux usées traitées

Dans les eaux usées traitées, on observe une abondance moyenne en CF cultivables de 1.6×10^5 CF/100 ml. Les abondances moyennes en coliformes totaux et streptocoques fécaux sont respectivement de 6.2×10^5 CT/100 ml et de 2×10^4 SF/100 ml. (Figure 2).

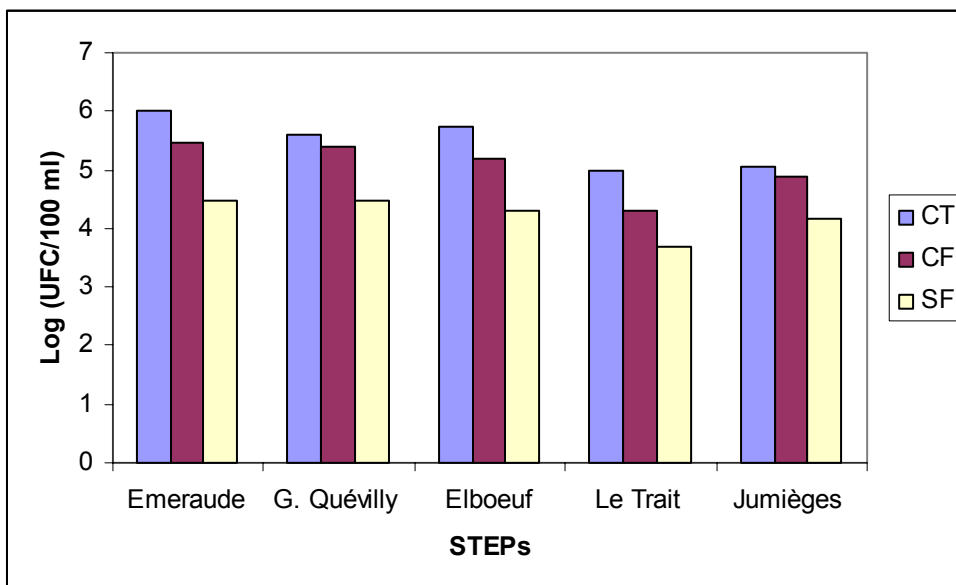


Figure 5. : Abondance en bactéries indicatrices de contamination fécale (en coordonnées logarithmiques) des eaux usées traitées prélevées à la sortie des cinq stations d'épuration étudiées en 2002.

L'abattement des trois types d'indicateurs de contamination a été étudiés ici sur quatre STEPs avec traitement secondaire par boues activées sur les six échantillonnées : Emeraude, Grand-Quévilly, Elboeuf et Le Trait. Les abattement (en log) sont portés à la figure 6 pour les différentes STEPs et les différents indicateurs.

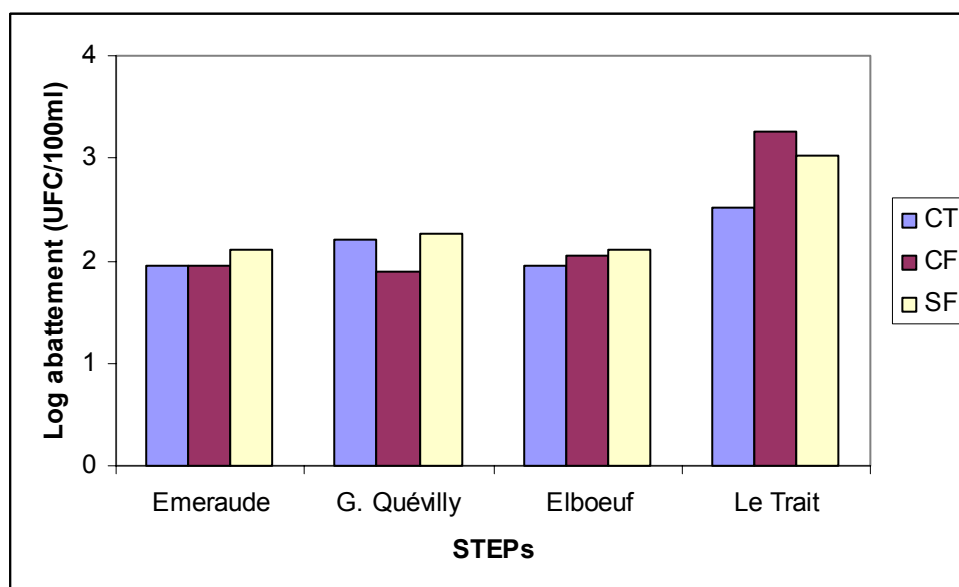


Figure 6: Abattement des bactéries indicatrices de contamination fécale (CF, CT, SF) en coordonnées logarithmiques dans les STEPs échantillonnées en 2002.

Au vu de ces résultats, on constate qu'il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne les abattements enregistrés pour les CT, CF et SF dans une STEP donnée. Les différents

micro-organismes semblent donc affecter de manière identique par le traitement des eaux usées par décantation suivie d'un traitement biologique par boues activées. En comparant les abattements dans les différentes STEPs, on voit que ils sont tous proches de 99 % (2 log) pour les trois premières STEPs, mais ils sont significativement plus élevés à la STEP du Trait. Ces abattements sont du même ordre de grandeur que ceux observés dans d'autres STEPs pour des traitement du même type par George *et al.* (2000).

A partir des données d'abondance dans les eaux brutes et traitées, on peut calculer les valeurs d'"équivalents-habitants en indicateurs" (EH), c'est-à-dire les quantités des différentes bactéries indicatrices cultivables rejetées par habitant et par jour dans les eaux usées brutes ou traitées. Ces EH-colis ont été calculés d'après Servais *et al.* (1999b) en considérant une demande biologique en oxygène (DBO) de 54 g par habitant et par jour dans les eaux usées brutes (WHO, 1982). Pour les trois STEPs pour lesquels nous disposons des données de DBO en entrée (Emeraude, Grand Quevilly et Elbeuf), 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 $g \text{ hab}^{-1} \text{ j}^{-1}$ par la DBO moyenne mesurée dans les eaux usées brutes ($mg \text{ l}^{-1}$). L'abondance en bactéries indicatrices 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 correspondant (exprimé en CT, CF et SF cultivables $\text{hab}^{-1} \text{ j}^{-1}$) dans les eaux usées brutes ou traitées. Les valeurs d'équivalents habitants trouvées sont reprises au Tableau 2. Les valeurs données au Tableau 2 pour les CF sont dans la gamme des valeurs citées par George *et al.* (2002). Les EH-bactéries indicatrices permettent d'estimer, pour toute STEP dont on connaît le traitement et la capacité nominale, la quantité de bactéries indicatrices rejetés par jour dans l'environnement ce qui très important dans une optique de modélisation.

Tableau 3.: *Equivalents- habitants moyens en bactéries indicatrices (CT, CF et SF cultivables hab-1 j-1) dans les eaux usées brutes et traitées (décantation suivie de boues activées) par les STEPs Emeraude, Grand Quevilly et Elbeuf. Les valeurs maximales et minimales sont reprises entre parenthèses.*

		UFC cultivables $\text{hab}^{-1} \text{ j}^{-1}$	
		Moyenne	Min-Max
Eaux brutes	CT	12.6×10^{10}	$(8.5-20.0) \times 10^{10}$
	CF	3.8×10^{10}	$(2.8-5.7) \times 10^{10}$
	SF	6.9×10^9	$(4.4-8.5) \times 10^9$
Eaux traitées	CT	12.8×10^8	$(5.7-23.0) \times 10^8$
	CF	4.2×10^8	$(2.6-6.4) \times 10^8$
	SF	4.8×10^7	$(3.5-6.6) \times 10^7$

3.3. Apports de coliformes par le lessivage des sols

Les apports diffus de coliformes dus au lessivage des sols ont été étudiés dans diverses régions du bassin de la Seine (bassin de l'Oise amont, bassins de l'Andelle et de la Risle en Normandie et bassin de la Blaise). La stratégie d'échantillonnage a consisté à prélever des échantillons dans des ruisseaux d'ordre 1 caractérisés par 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 (Guivarc'h & Chevreuil, 1998). L'objectif était d'évaluer les apports en bactéries fécales en fonction de l'utilisation du sol dans chaque régions. Pour chaque ruisseau des différents bassins, des dénombrements traditionnels des CF sur milieux gélosés spécifiques sont effectués, ainsi que des mesures d'activité glucuronidasique des *E. coli*

présentes. Les ruisseaux des bassins de l'Andelle et la Risle des dénombrements de CT et SF ont de plus été effectués pour comparer les apports de ces indicateurs avec ceux de CF.

3.3.1 Comparaison des apports par lessivages dans diverses régions du bassin

Au cours de diverses campagnes d'échantillonnage menées de 2000 à 2002, des ruisseaux ont été échantillonnés en amont de tout rejet domestique afin d'évaluer les apports en CF par le lessivage des sols. Sept campagnes ont été réalisées sur le bassin de l'Oise amont (à différentes périodes de l'année et dans différentes conditions de pluviosité), deux campagnes sur les bassins de l'Andelle et de la Risle en Normandie et une sur le bassin de la Blaise (campagne particulièrement focalisée sur les zones d'élevage). La figure 7 présente les résultats des valeurs moyennes en CF (moyenne géométrique des moyennes par campagne) par type de couverture végétale et par région.

Les résultats montrent clairement une différence importante dans les niveaux moyens de contamination en fonction de l'usage du sol. Ainsi, les niveaux moyens de contamination en CF sont de l'ordre de 100 CF/100 ml en zone forestières et cultivées alors que les niveaux se situent entre 500 et 1000 CF/100 ml en zone de pâtures. Ceci confirme les résultats de George et al. (2002). La prépondérance des bactéries fécales dans les zones de pâtures s'explique facilement par la présence de déjections de bovins en prairies et leur lessivage par les pluies le long des bassins versants. La contamination par les forêts est beaucoup plus faible car issue uniquement de déjections de petits animaux, rongeurs et oiseaux, emmenées en rivière par le ruissellement. La contribution des zones cultivées aux apports diffus en rivière, de même ordre que celle des forêts, s'explique par les épandages d'engrais organique sur les cultures. Les niveaux moyens de contamination dans les trois zones du bassin de la Seine qui se distinguent par leur lithologie sont peu différents. Même si cette comparaison est un peu biaisée par les différences de nombre de campagne et des périodes où les mesures ont été réalisées sur les différents bassins, il ressort quand même clairement que les différences liées à l'utilisation du sol sont largement supérieures à la variabilité inter régionale dans le bassin.

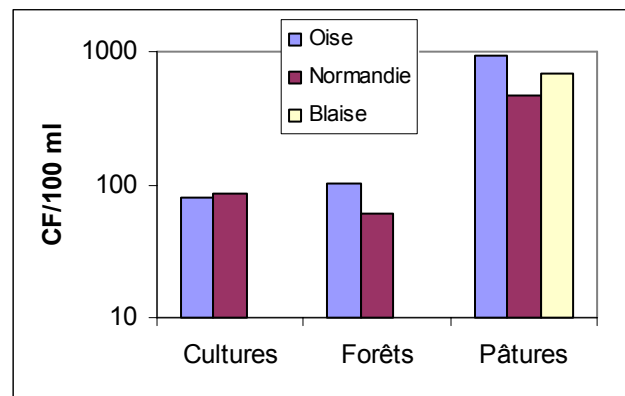


Figure 7: Concentration en coliformes fécaux dans les eaux des ruisseaux des bassins de l'Oise amont (moyenne de 7 campagnes), de l'Andelle et la Risle (Normandie)(moyenne de 2 campagnes) et de la Blaise (une campagne en octobre 2002) en fonction de la couverture végétale de leur bassin versant.

Les données acquises sur les petits ruisseaux du bassin de la Seine indiquent clairement que le niveau de contamination en CF dû au lessivage des sols n'est pas négligeable étant donné que les normes guide et impérative de qualité des eaux de baignade sont respectivement fixées à 100 CF/100 ml et 2000 CF/100 ml. Les niveaux de CF mesurés en zones forestières et cultivées sont donc souvent

proches et parfois supérieurs à la valeur guide des eaux de baignade ; en zone de pâtures, on est toujours au dessus de la norme guide et l'on dépasse parfois la norme impérative.

Cependant, même si les apports diffus enregistrent parfois des dépassements des normes européennes de qualité des eaux de baignades en zone rurale, on a montré que leur contribution pouvait être considérée comme négligeable par rapport aux apports de bactéries fécales dus à des rejets ponctuels d'eaux usées à l'échelle d'un grand bassin versant (George et Servais, 2002).

3.3.2 Apports par lessivage des diverses bactéries indicatrices

Lors de la campagne réalisée sur les ruisseaux de l'Andelle et al Risle en mars 2002, les différentes bactéries indicatrices ont été dénombrées. La figure 8 présente les résultats des abondances moyennes (moyenne géométrique) de chaque indicateur en fonction de la couverture végétale du bassin versant du ruisseau considéré.

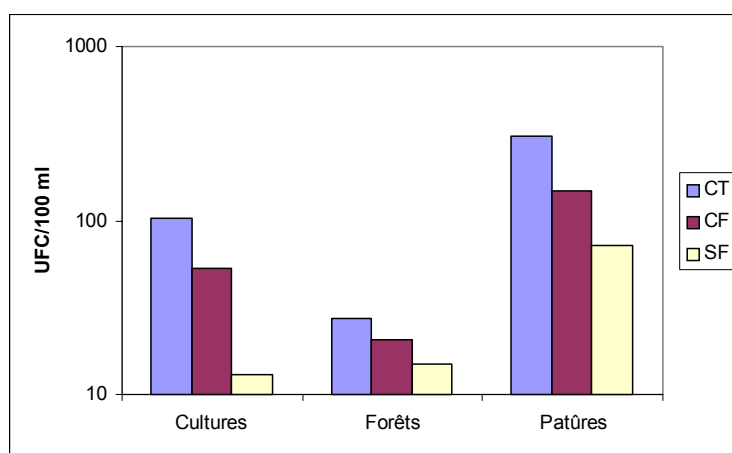


Figure 8. : Comparaison de l'abondance des coliformes fécaux (CF) et totaux (CT) ainsi que des streptocoques fécaux (SF) estimés par dénombrement sur milieux gélosés spécifiques.. Ruisseaux de l'Andelle et de la Risle, (mars 2002).

La figure montre très clairement que l'impact de la couverture végétale et de l'occupation du sol sur la qualité microbiologique des eaux résultant du lessivage des sols que nous avons mis en évidence pour les CF est identique sur les deux autres indicateurs. Dans tous les cas, les abondances dues au lessivage sont les plus élevées dans les pâtures. La contamination y est de 3 à 6 fois supérieure à celle des zones de cultures et de 5 à 11 fois supérieure à celle des zones forestières.

Les indicateurs de la contamination qui ont été recherchés (CT, CF et SF) sont des bactéries provenant du système digestif des animaux à sang chaud, ils ne font pas spécifiquement d'origine animale ou humaine mais leur abondance proportionnelle semble varier selon l'origine de la contamination. Ainsi Jagals *et al.* (1995) proposent une discrimination de l'origine de la contamination basée sur le rapport des abondances de CF et de SF. Ils indiquent que le rapport (CF/SF) est compris entre 3.5-4.7 dans les fèces humaines, compris entre 0.8-1.7 dans les fèces des animaux (Jagals *et al.*, 1995). Sur cette base, ces auteurs concluent qu'un rapport CF/SF élevé (>4) peut être considéré comme un bon indice que la pollution observée est d'origine humaine et un rapport faible montre une origine animale de la pollution. Nous avons calculé le rapport moyen CF/SF sur base de nos résultats expérimentaux à la fois pour les mesures faites en STEPs et celles effectuées dans les ruisseaux d'ordre 1. Nos données semblent confirmer les observations de Jagals *et al.* (1995) puisque nos rapports moyens CF/SF étaient de 5.9 pour les eaux usées qui doivent contenir des bactéries fécales essentiellement d'origine humaine et de 2.1 pour les petits ruisseaux en amont de tout rejet domestique 2.1 qui doivent contenir des bactéries fécales essentiellement d'origine animale.

4. Contamination microbienne de la Vesle en aval de Reims

Deux campagnes d'échantillonnage ont été réalisées sur la Vesle, rivière d'ordre 4 de Champagne, affluent de l'Aisne. La première campagne a été réalisée en mai 2002 et la deuxième en août 2002. Le premier objectif était d'évaluer l'impact des rejets d'une ville de moyenne importance (Reims) sur la qualité microbiologique des eaux du milieu récepteur (La Vesle, une rivière d'ordre 4) ; le second objectif était d'évaluer la pertinence de ce site pour l'étude des processus de devenir des bactéries fécales dans les rivières d'ordre moyen.

Nous observons (Figures 9 et 10) dans le cas des deux profils un pic important entre les points 3 et 4 qui correspond aux rejets provenant de la ville de Reims (190000 habitants) qui entraîne une contamination bactérienne extrêmement élevée (abondance en coliformes fécaux supérieur à 10^5 /100 ml). En aval, on observe une diminution continue tout le long de la zone échantillonnée jusqu'à la confluence avec l'Aisne. Une fois de plus, nous pouvons constater, pour les deux profils, une disparition plus rapide des coliformes fécaux cultivables (environ 1.5 log) que des activités enzymatiques (0.7 log).

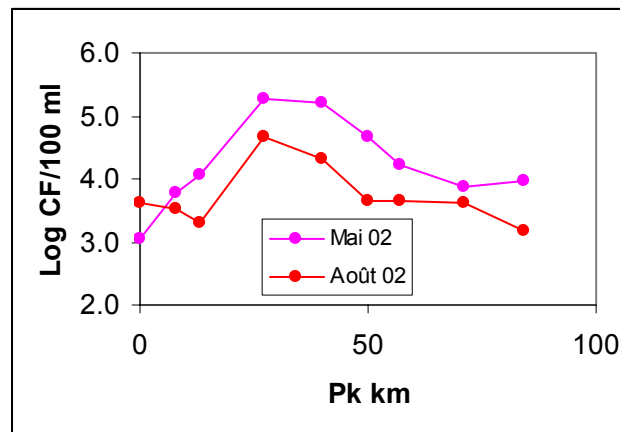


Figure 9. Abondances des CF le long de la Vesle en mai et en août 2002 estimées par des dénombrements sur gélose (Echelle logarithmique pour les abondances de CF ; échelle kilométrique sur l'axe : STEP de Reims : Pk = 20; confluence Aisne : Pk = 84).

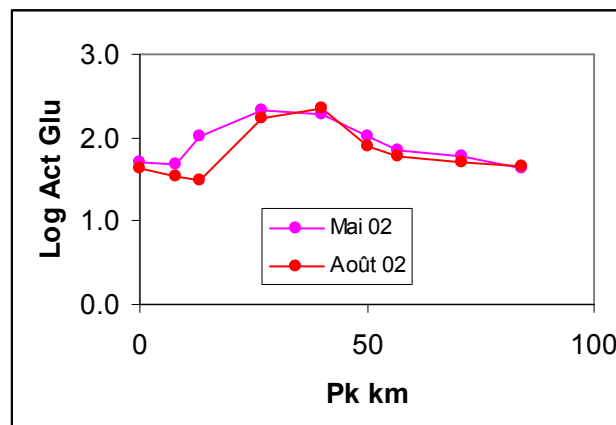


Figure 10. Activité glucuronidasique des CF le long de la Vesle en mai et en août 2002 (Echelle logarithmique pour les activités enzymatiques; échelle kilométrique sur l'axe : STEP de Reims : Pk = 20; confluence Aisne : Pk = 84).

Cet exemple met en évidence l'impact direct d'une ville telle que Reims sur la qualité microbiologique de la rivière qui la traverse. Ainsi il faut se trouver à 60 ou 70 km en aval de Reims pour retrouver une qualité microbiologique comparable à ce que l'on observait à l'amont où la qualité microbiologique ne peut déjà pas être considérée comme bonne puisque les teneurs en CF y sont dans la plupart des cas supérieure aux normes impératives des eaux de baignade (2000 CF/100 ml). Ce site apparaît, par ailleurs, un endroit de choix pour l'étude expérimentale et la modélisation de l'impact d'une ville de moyenne importance sur la contamination d'une rivière d'ordre intermédiaire.

5. Qualité microbiologique des eaux de la Marne

Deux campagnes d'échantillonnage ont été réalisées sur la Marne (des environs de Langres à la confluence avec la Seine) en juin et août 2002. Au moment de ces campagnes, le débit de la Marne était à l'étiage (débit d'environ 50 m³/sec à Gourmay). Les résultats de dénombrements des coliformes fécaux sur milieu gélosé spécifique sont repris à la figure 11. Cette figure reprend en plus des résultats de 2002 deux profils (des environs de Châlons en Champagne à la confluence avec la Seine) réalisés en 1998 par notre équipe. On observe des valeurs assez élevées dès l'aval de Langres ; les abondances en CF décroissent ensuite vers l'aval pour remonter à l'aval de Saint Diziers (km 200) ; par la suite les valeurs restent relativement stables jusqu'à la confluence avec la Seine.

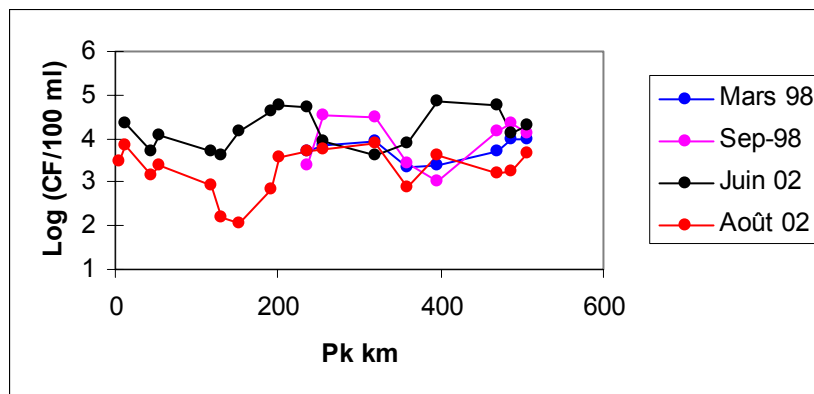


Figure 11. Abondances des CF le long de la Marne en juin et en août 2002 et en mars et septembre 1998 estimées par des dénombrements sur gélose (Echelle logarithmique pour les dénombrements et échelle kilométrique sur l'axe horizontal avec la confluence Marne - Seine au km 512).

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

Les connaissances acquises sur les sources et le devenir des coliformes fécaux (CF) en rivière ont été intégrées dans 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 à l'applicatif SENEQUE 3.1 issu du modèle SENEQUE (Billen *et al.* 1994) et actuellement opérationnel sur le bassin de la Marne et de l'Oise. L'ajout d'un compartiment « coliformes fécaux » aux modèles du PIREN avait pour objectif de pouvoir prédire par des modèles les abondances en CF à diverses échelles spatiales et temporelles.

6.1. Description du compartiment « coliformes fécaux » inclus dans l'applicatif SENEQUE 3.1

Une nouvelle variable d'état, l'abondance en coliformes fécaux (CF) cultivables, a été ajoutée dans l'applicatif SENEQUE 3.1 opérationnel aujourd'hui pour le bassin de la Marne et de l'Oise; cette variable est intitulée FEC, elle est exprimée en CF/l et présentée sur les graphiques en log CF/l.

6.1.1 Prise en compte des apports diffus

Dans le modèle, les apports diffus de CF aux rivières du bassin par le lessivage des sols ont été calculés sur base des échantillonnages réalisés de 2000 à 2002 sur les petits ruisseaux du bassin de la Seine (George et Servais, 2002). On définit la concentration en CF dans la composante superficielle (s) et profonde du débit (n). La concentration dans la composante superficielle résulte de la multiplication des valeurs du tableau 3 par le pourcentage des différents types de couverture végétale dans le bassin considéré. La concentration dans la composante profonde est considérée comme constante et égale à 200 CF/l.

Tableau 3 : Abondance moyenne en CF cultivables ($CF\ l^{-1}$) dans la composante superficielle des ruisseaux alimentés par le lessivage de zones forestières, en herbe, de terres arables et de zones urbanisées ($CF_{moy}\ l^{-1}$)

	Forêts (ou assimilés)	En herbe	Terres arables	Zones urbanisées
Moyenne considérée ($CF\ l^{-1}$)	2100	25000	1800	50000

6.1.2 Prise en compte des apports ponctuels

Dans le modèle, les apports de CF par les rejets d'eaux usées ont été calculés sur du base fichier des stations d'épuration (STEP). Ce fichier des STEP reprend notamment, outre des indications d'identification et de localisation :

la capacité nominale de chaque station (capacité) en équivalent habitants

sa charge effective (Hecc) en équivalent habitants

le type de traitement appliqué ('cote') selon le code repris au Tableau 4

Tableau 4: Types de traitements appliqués dans les stations d'épuration du bassin de la Seine

Cote	Type de traitement
D	décantation
PC	traitement physico-chimique
B0	traitement biologique classique
B1	lagunage
B2	traitmt biologique + nitrification
B3	traitmt biol + nitrification + dénitrification
B4	traitmt biol + déphosphatation biologique
B5	traitmt biol + déphosphatation physico-chimique
B6	traitmt biol + nitrification et déphosph. biologique
B7	traitmt biol + nitrification et déphosph. physico-chimique
B8	traitmt biol + nitrification + dénit + déphosph. biologique
B9	traitmt biol + nitrif + dénit + déphosph. physico-chim
EE	épandage

Le rejet effectif de bactéries fécales, $rFEC$ (en 10^9bact/jour), est estimé, en l'absence de données directes, à partir du mode de traitement appliqué, en se basant sur les rejets spécifiques établis par George *et al.* (2002) (Tableau 5).

Tableau 5: Calcul du rejet en CF par les eaux usées diversement traitées dans les stations d'épuration

Type de traitement (Tableau)	Caractérisation des STEP selon George et al., 2002	Calcul du rejet effectif (rFEC en 10^6 bact/jour)
NT	NT	rFEC = 80 * Hecc
D, PC	décantation	rFEC = 50 * Hecc
B0, B5	A	rFEC = 5 * Hecc
B2, B7, B4	B	rFEC = 1.3 * Hecc
B3, B6, B8, B9	D	rFEC = 0.15 * Hecc
B1	F	rFEC = 0.02 * Hecc
EE		-
désinfection UV	G	rFEC = 0.0002 * Hecc

6.1.3 Prise en compte des processus en rivière

A ce premier stade de développement du compartiment "coliformes fécaux" du modèle SENEQUE 3.1, 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 bactéricide 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_{FEC} , exprimée en h^{-1} . Le taux de mortalité des CF cultivables kd_{FEC} inclut en plus de la mortalité réelle la perte de cultivabilité. La mortalité dépend de la température; cette dépendance est décrite par une relation sigmoïdale.

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

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

$kd_{FEC20} = 45 * 10^{-3} h^{-1}$ (taux de mortalité, incluant la perte de cultivabilité, mesuré à $20^\circ C$) (sur base des travaux de Garcia Lara et al. (1991), Servais et al. (1992), Menon (1993), Menon et al. (2003), George et al. (2001c))

Sédimentation des coliformes fécaux

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

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

avec v_{FEC} = vitesse de chute des coliformes = $0.02 m h^{-1}$ (valeur de la vitesse de chute des grosses bactéries (taille $> 1 \mu m$) dans les modèles du PIREN, prof = profondeur de la colonne d'eau (en m)).

Des expérimentations de laboratoire sont actuellement en cours pour mesurer la vitesse de sédimentation des CF.

6.2. Simulations et validation du modèle aux résultats expérimentaux

6.2.1 Simulations sur l'axe fluvial de la Vesle

Des simulations ont été réalisées à l'aide de l'appliquatif SENEQUE3.1 sur l'axe fluvial de la Vesle. Un exemple est présenté à la figure 12. Il s'agit dans le cas présenté d'une simulation en condition estival (débit aux environs de $2 m^3/sec$ à Reims) de l'abondance en CF le long de la Vesle

entre l'amont de Reims et la confluence avec l'Aisne. Cette simulation est comparée aux données expérimentales acquises en 2002 (vois section 4 de ce rapport). La figure montre que le calcul du modèle reproduit bien les données expérimentales. A la fois les niveaux d'abondances en CF et l'allure de la décroissance à l'aval de Reims sont bien reproduit.

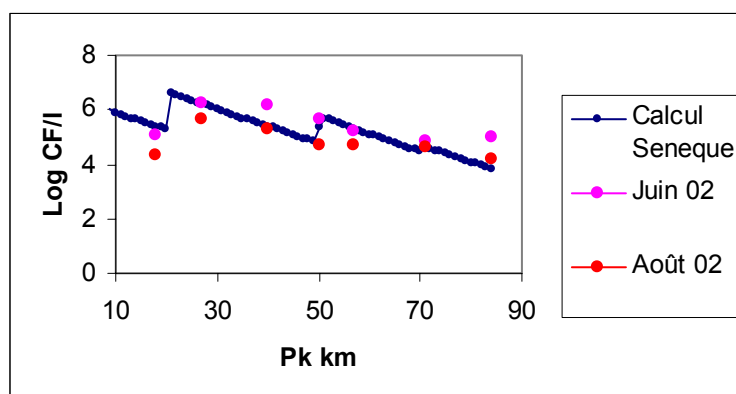


Figure 12: Abondance en CF cultivables dans la Vesle. Résultats de modélisation obtenus avec l'appli SENEQUE 3.1 et résultats expérimentaux. Sur cette figure Reims se situe au Pk 20 et la confluence Vesle – Oise au Pk 84.

6.2.2 Simulations à l'exutoire du bassin de la Marne

Les simulations d'abondance en CF à l'exutoire du bassin de la Marne 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 la prise d'eau de Neuilly-sur-Marne. La figure 13 présente un exemple de simulations à l'exutoire du bassin de la Marne pour l'année 1998.

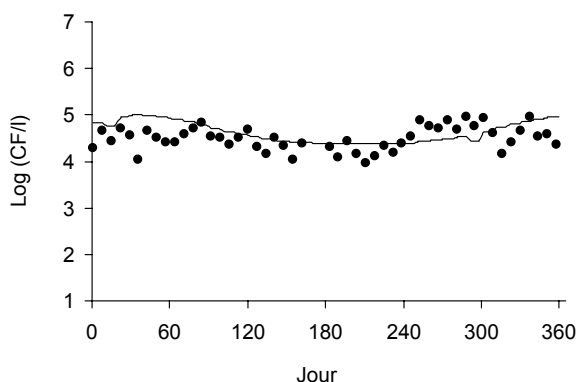


Figure 13: Simulation des variations d'abondance en CF cultivables à l'exutoire de la Marne au cours de l'année 1998 et dénombrements de CF cultivables à la prise d'eau de Neuilly-sur-Marne la même année (Jour1 = 1^{er} janvier 1998) Cette simulation a été réalisée avec la version Seneque 1.3 adaptée pour prendre en compte les CF.

Les niveaux de contamination fécale à l'exutoire du bassin de la marne 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 bactériovore des protozoaires est favorisée par les températures estivales.

Les deux exemples de comparaison de simulations et de données expérimentales montrent que les modèles sont maintenant à même de décrire correctement les fluctuations spatiales et temporelles des bactéries indicatrices de contamination fécale que sont les coliformes fécaux.

7. Références bibliographiques

- Agence française de normalisation (AFNOR) (2001). Eaux - méthodes d'essais. *Recueil de normes françaises*. 6th édition. Paris, la Défense, France, 695 pages.
- Billen G., Garnier J. and Hanset P. (1994). Modelling phytoplankton development in whole drainage networks: the RIVERSTRAHLER model applied to the Seine river system. *Hydrobiologia* 289: 119-137.
- Delabre K., Dile V., Roubin M.R., Gatel D., Poty F. and Cavard J. 2001. New analytical tools for distribution system surveillance. In American Water Works association WQTC Proceedings CD Rom.
- Garcia-Lara J., Menon P., Servais P. and Billen G. (1991). Mortality of fecal bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 885-888.
- George I., Petit M., Servais P. (2000). Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *Journal of Applied Microbiology* 88(3): 404-413.
- George, I., Petit, M., Theate, C. and P. Servais. (2001a) Use of rapid enzymatic assays to study the distribution of fecal coliforms in the Seine river (France). *Water Science and Technology*. 43(12) : 77-80
- George I., Crop P. and Servais P. (2001b). Use of β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase activities for quantitative detection of total and fecal coliforms in wastewater. *Canadian Journal of Microbiology* 47(7): 670-675.
- George I., Petit M., Theate C., Servais P. (2001c). Distribution of coliforms in the Seine river and estuary (France) studied by rapid enzymatic methods and plate count. *Estuaries* 24(6b): 994-1002.
- George I. et Servais P. (2002). Sources et dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine. Rapport de synthèse. *Programme PIREN Seine. Février 2002*.
- George I., Crop P., Servais P. (2002). Fecal coliforms removal by wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods. *Water Research*, 36: 2607-2617
- George, I., Anzil, A. & Servais, P. (2003). Quantification of fecal coliform inputs to aquatic systems through soil leaching. *Wat. Res.* Soumis.
- 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"*.
- Jagals P., Grabow W.O.K. and de Villiers J.C. 1995. Evaluation of indicators for assessment of human and animal faecal pollution of surface runoff. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6): 235-241.
- Le Hir P., Guillaud J.F., Bassoulet P. and L'Yavanc J. 1990. Application d'un modèle sédimentaire au devenir des contaminant particulaires. In *IFREMER – Actes de colloque, vol 11*, p.221-236, IFREMER éditions, Plouzané, France.
- 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*.
- Menon P., Billen G & Servais P. (2003) Mortality rates of autochthonous and fecal bacteria in natural aquatic ecosystems. *Water Research*. Soumis
- 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.
- Pommepeuy M., Guillaud J.F., Dupray E., Derrien A., Le Guyader F. and Cormier M. 1992. Enteric bacteria survival factors. *Wat. Sci. Tech.* 25(12): 93-103.
- Regnault B., Martin-Delautre S. Lejay-Collin M., Lefèvre M. and Grimont P.A.D. 2000. Oligonucleotide probe for the visualisation of *E.coli/E.fergusonii* cells by in situ hybridisation: specificity and potential applications. *Res. Microbiol.* 151: 521-533.
- Rompré A., Servais P., Baudart J., de Roubin M.R. and Laurent P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water : current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. 49: 31-54.

- 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., Castignolles, N., Petit, F., George, I., Buffet Janvresse, C. & A. Ficht. (1999a). L'estuaire de la Seine. Contamination bactérienne et virale. Fascicule Seine-Aval. Ifremer, eds. 27pp.
- Servais P. Garnier J., Demartean N., Brion N. and Billen G. (1999b). Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through wastewater effluents. *Water Research* 33(16):3521-3531.