



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2009-2010

Methoden voor meten en modelleren van  
*Escherichia coli* in stormbekkens

**Leendert Vergeynst**

Promotoren :

Prof. Dr. ir. Peter A. Vanrolleghem & Prof. Dr. ir. Ingmar Nopens  
(modelEAU, Université Laval) (BIOMATH, Universiteit Gent)

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van  
Master in de bio-ingenieurswetenschappen : milieutechnologie





Faculté des Sciences en Bio-ingénierie

Année académique 2009-2010

Méthodes pour la mesure et la modélisation  
d'*Escherichia coli* dans les bassins d'orage

**Leendert Vergeynst**

Directeurs :

Prof. Dr. ir. Peter A. Vanrolleghem & Prof. Dr. ir. Ingmar Nopens  
(modelEAU, Université Laval) (BIOMATH, Universiteit Gent)

Mémoire de maîtrise présentée pour l'obtention du grade de  
Maîtrise en sciences en bio-ingénierie : gestion environnementale

De auteur en promotoren geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.

The author and promoters give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using from this thesis.

L'auteur et les directeurs donnent la permission de rendre ce mémoire disponible pour consultation et de copier des parties pour l'utilisation personnelle. Chaque autre utilisation ressort aux droits d'auteur, particulièrement en ce qui concerne l'obligation de mentionner expressément la source en citant des résultats provenant de ce mémoire.

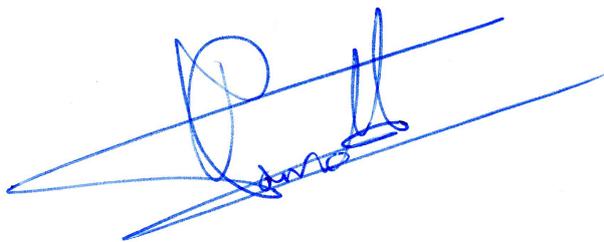
Gand, juin 2010

Les directeurs

Prof. Dr. ir. Peter A. Vanrolleghem

&

Prof. Dr. ir. Ingmar Nopens



L'auteur

Leendert Vergeynst



# Avant-propos

*Een jaartje thesissen in Canada?... Québec?... Alles in't frans? ... Cool plan!*

*Et on était parti, Wieter et moi, pour une aventure vers le pays de la nature sauvage, les belles vues, l'hiver blanc, les grosses baleines, les ours noirs et vers l'inconnu. Québec avait malheureusement prévu aussi un lourd bagage : la maîtrise. Entre tous les soucis de thèse, plusieurs fins de semaine ont été sauvées pour se distraire, se défouler et découvrir et, sous l'adage de «*tout est bien qui finit bien*», nous avons prévu encore une petite sortie avant de partir : vers Terre-neuve!*

*Au début de la fin de cette histoire, c'est le moment pour exprimer mes appréciations.*

*Je souhaiterais avant toute chose remercier Peter Vanrolleghem pour la chance extraordinaire de faire ma maîtrise à Québec. Travailler et étudier à ton département modelEAU à l'Université Laval, un environnement multiculturel, français et anglais, était une chance exceptionnelle. C'était une expérience enrichissante et je crois que ta passion pour la recherche m'a contaminé. J'espère que nos routes de recherche se croiseront encore. Merci pour être mon directeur de maîtrise.*

*Je voudrais aussi remercier tous les gens du groupe modelEAU. Je vous remercie tous pour les conversations sur la pluie et le beau temps, mais aussi pour le vrai travail que nous avons abattu. J'aimerais particulièrement remercier Bertand Vallet et Lluís Corominas pour avoir relu mes textes et pour votre esprit de modélisation. On était tous un peu WESTomane. Merci aussi à Maria Pujadas Ferrer et Cathy Brisson pour votre aide au laboratoire.*

*Apprendre le français était un début, écrire sans fautes était un but, mais une phrase en français (écrite par moi) n'est pas toujours par définition du français. Je me suis donc posé souvent la question «*Ça se dit en français?*». Toutes ces questions ont été répondues par Ariane Boivin. Merci beaucoup Ariane pour les heures de sacrifice pour corriger mes textes et pour réarranger mes phrases pour qu'elles soient plus françaises.*

---

*De familie Vergeynstjes, vijf op één rij en altijd paraat om een tandje bij te steken. Papa, mama, Lidewei en Jenna, dank je wel voor jullie nabij zijn vanop 5285 km afstand!*

*En dan zijn er nog Wieter et Kiem, met jullie erbij is het altijd raak. Dank je wel voor de ontspannende weekendjes, de ontdekkingsreizen, de overheerlijke etentjes, de wilde ideeën, jullie enthousiasme en de aangename sfeer die jullie creëren. Zoals jullie zijn er maar twee.*

*Leendert Vergeynst  
Québec, 15 mai 2010*

# Samenvatting

In stormwater wordt *E. coli* voornamelijk gevonden in drie compartimenten van het aquatisch milieu : (a) in de waterkolom als vrije bacteriën of in aggregaten, (b) vastgehecht aan gesuspenseerd materiaal of (c) in het sediment. Deze studie evalueert het gedrag van *E. coli* in de waterkolom, dus het gedrag van de vrije fractie en van deze geassocieerd met het gesuspenseerd materiaal alsook de interactie tussen beide fracties.

De gemiddelde *E. coli* concentratie gemeten in stormwater bedraagt tussen  $10^2$  et  $10^4$  CFU/100ml waarvan 20 tot 50% geassocieerd wordt aan het gesuspenseerd materiaal. De verwijdering van *E. coli* in stormbekkens wordt voornamelijk veroorzaakt door de bezinking van het gesuspenseerd materiaal, desinfectie door zonlicht en door de natuurlijke mortaliteit. Noteer dat pathogenen die vastgehecht zijn aan het gesuspenseerd materiaal meer beschermd zijn tegen zonlicht en tegen predatie.

De eerste doelstelling van deze studie was het kwantificeren van *E. coli* concentraties in een stormbekken in een residentiële wijk in Quebec, QC, Canada. De *E. coli* concentratie werd er gemeten met een telmethode op petriplaten. De kwaliteit van de gegevens verkregen via deze methode was echter onvoldoende voor de beoogde modelbouw. Deze telmethode onderschat het aantal pathogenen indien een fractie vastgehecht is aan het gesuspenseerd materiaal omdat deze methode geen onderscheid maakt tussen partikels met één of meerdere aangehechte bacteriën (telkens één kolonie). Bovendien bleek het niet makkelijk om de optimale verdunning te vinden voor het bekomen van een aanvaardbare koloniedensiteit op de petriplaten. De nodige precisie, om een verschil in *E. coli* concentratie van 20% te kunnen meten, overschreed vaak de maximaal aanvaardbare geometrische standaard afwijking van 0.04.

Deze problemen hebben geleid tot het tweede objectief van deze studie, namelijk het ontwikkelen van een methode voor enzymactiviteitsmeting van *E. coli*. Deze methode omvat een filtratie van de stalen, een incubatie met het substraat 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide en een fluorescentiemeting van het afbraakproduct 4-methylumbelliferone. Er werd reeds aangetoond dat de enzymactiviteit van het enzym  $\beta$ -D-glucuronidase van

---

*E. coli* in log-log schaal lineair gecorreleerd is met de concentratie van *E. coli*. Echter, desorptie van *E. coli* van de filter tijdens een test beïnvloedt de activiteitsmeting en een identificeerbaarheidsprobleem tussen deze desorptie et de enzymactiviteit werd gedetecteerd. Een multirespons parameterschatting heeft echter toegelaten om beide parameters toch te schatten op basis van een decorrelatie-experiment.

De derde doelstelling was het modelleren van het gedrag van *E. coli* in een stormbeken. Een multilaagmodel werd ontwikkeld en de vergelijkingen werden geïmplementeerd in de modellenbank van de modelbouw software WEST. Het model, STMa1 (*Stormwater Tank Model # a1*), beschrijft (a) de bezinking van één partikelklasse en de pathogenen geassocieerd met deze partikels, (b) de reversibele adsorptie van de pathogenen tussen het water en de partikels en (c) het afsterven en de zonnedesinfectie van de pathogenen. Een matrixnotatie werd geïntroduceerd die het schrijven van differentiaalvergelijkingen voor transport tussen de verschillende compartimenten van een multilaagmodel vereenvoudigd. Deze verwijderingsfenomenen van *E. coli* in stormbekkens werden gesimuleerd op basis van parameterwaarden gevonden in de literatuur.

# Summary

*E. coli* in stormwater has principally been found in three compartments of the aquatic system : (a) in the water column as free bacteria or in aggregates, (b) attached to suspended matter or (c) in the sediment. This study evaluates the behavior of *E. coli* in the water column, i.e. the behavior of the free fraction, of the fraction associated to particles and the interactions between both fractions. The expected *E. coli* concentration in stormwater is between  $10^2$  et  $10^4$  CFU/100ml, 20 to 50% of which are particle associated. The removal of *E. coli* in stormwater ponds is principally caused by decantation of suspended matter, solar disinfection and natural mortality. Note that the pathogens attached to suspended matter are more protected against solar radiation and against predation.

The first objective of this study was to measure *E. coli* concentrations in a stormwater pond in a residential district of Quebec, QC, Canada. The *E. coli* concentrations were measured using a colony count method on petriplates. However, the quality of the data obtained by this method was too low to be used for modeling. First, this count method underestimates the concentration of bacteria if there are bacteria attached to particles since a particle with one are more colonies is only forming one colony. Moreover, it is not always easy to find the optimal dilution for each sample to obtain an acceptable colony density on the plates. The necessary precision to be able to distinguish a difference in *E. coli* concentration of 20% often exceeded the maximal acceptable geometric standard deviation of 0.04.

These problems led to the second objective that is the development of a method for enzymatic activity measurement of *E. coli*. This method comprises a filtration of the sample, an incubation with the substrate 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide and a fluorescent spectroscopy of the decomposition product 4-methylumbelliferone. It has been proven that the enzymatic activity of the enzyme  $\beta$ -D-glucuronidase of *E. coli* is linearly correlated in a log-log way with the *E. coli* concentration. However, desorption of bacteria from the filter during the incubation influences the activity measurement and an identifiability problem was detected between the desorption rate parameter and the enzymatic activity. However, a multiresponse estimation has permitted to estimate both parameters based on

---

a decorrelation experiment.

The third objective was the modeling of the behavior of *E. coli* in a stormwater basin. A multilayer model has been developed and the equations have been implemented in the modelbase of the WEST modelling and simulation environment. The model, STMa1(*Stormwater Tank Model # a1*), describes (a) the sedimentation of a particle class and a pathogen associated to these particles, (b) the reversible adsorption of pathogens between the water and the particles and (c) the mortality and solar disinfection of the pathogen. A matrix notation has been introduced that simplifies the presentation of differential transport equations between the compartments of a multilayer model. Finally, the phenomena of removal of *E. coli* in stormwater ponds were simulated with parameter values found in literature.

# Résumé

*E. coli* dans l'eau de ruissellement se trouve principalement dans trois compartiments de l'environnement aquatique : (a) dans la colonne d'eau comme des bactéries en suspension ou en agrégats, (b) associé à la matière en suspension ou (c) dans les sédiments. Cette étude évalue le comportement d'*E. coli* dans la colonne d'eau, c'est-à-dire le comportement de la fraction en suspension et de celle associée à la matière en suspension, ainsi que les interactions entre ces deux fractions.

La concentration nominale d'*E. coli* dans l'eau de ruissellement est de  $10^2$  à  $10^4$  UFC/100ml dont 20 à 50% se trouve attaché à la matière en suspension. La réduction d'*E. coli* dans des bassins d'orage est entraînée par la décantation de la matière en suspension, par la désinfection, par la lumière solaire et par la mortalité de base. De plus, les pathogènes attachés aux particules sont plus protégés contre la lumière solaire et contre la prédation.

Le premier objectif de cette étude était d'augmenter la compréhension du comportement d'*E. coli* en menant une campagne d'échantillonnage dans un bassin d'orage qui se situe dans un quartier résidentiel de Québec, QC, Canada. La concentration d'*E. coli* a été mesurée à partir d'une méthode d'énumération en milieu de croissance sur des boîtes de pétri. La qualité des données obtenue de cette méthode n'était pas suffisamment pour la modélisation. D'abord, elle sous-estime le nombre d'*E. coli* attaché aux particules en énumérant seulement le nombre de particules ayant des bactéries attachées et les bactéries en suspension. De plus, il est essentiel de trouver la bonne dilution de l'échantillon afin d'obtenir une densité acceptable de colonies sur la boîte de pétri. Finalement, la précision nécessaire, afin de distinguer 20% d'*E. coli* attachés aux particules, dépasse souvent l'écart-type géométrique maximale acceptable de 0.04.

Ces problèmes ont mené au deuxième objectif de cette étude : le développement d'une méthode de mesure de l'activité enzymatique d'*E. coli*. Cette méthode consiste à effectuer une filtration, une incubation avec le substrat 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide, puis une spectroscopie fluorescente du produit de décomposition 4-methylumbellifère. L'activité enzymatique de l'enzyme  $\beta$ -D-glucuronidase d'*E. coli* a déjà été démontrée comme étant

---

corrélée linéaire en échelle log-log avec la concentration d'*E. coli*. Cependant, le détachement des bactéries du filtre pendant un essai influence la mesure de l'activité enzymatique et un problème d'identifiabilité a été détecté entre le détachement et l'activité enzymatique. Une estimation multi-réponse a permis d'estimer ces deux paramètres à partir d'une expérience de décorrélation.

Le troisième objectif était la modélisation du comportement d'*E. coli* dans le bassin d'orage. Un modèle multicouche a été conçu et les équations ont été implantées dans la base des modèles du logiciel WEST. Le modèle STMa1 (*Stormwater Tank Model # a1*) décrit (a) la décantation d'une classe de particules et des pathogènes attachés à ces particules, (b) l'adsorption réversible des pathogènes entre l'eau et les particules et (c) la mortalité des pathogènes et la désinfection solaire. Finalement, une formulation matricielle a été introduite, ce qui facilite l'écriture des équations différentielles de transport entre les différents compartiments d'un modèle multicouche. Ces phénomènes d'élimination d'*E. coli* dans un bassin d'orage ont été simulés avec des paramètres par défaut trouvés dans la littérature.

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction et mise en contexte</b>	<b>1</b>
<b>I</b>	<b>Étude de littérature</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Le comportement d'<i>E. coli</i> dans un bassin d'orage</b>	<b>4</b>
2.1	La présence d' <i>E. coli</i> dans l'eau de ruissellement . . . . .	4
2.2	La répartition des bactéries entre l'eau et les particules . . . . .	5
2.2.1	La dynamique de l'association microbienne aux particules . . . . .	5
2.2.2	L'attachement des bactéries aux particules . . . . .	6
2.2.3	La vitesse de sédimentation . . . . .	12
2.2.4	Comparaison des données . . . . .	12
2.3	L'inactivation d' <i>E. coli</i> . . . . .	20
2.3.1	La mortalité de base . . . . .	20
2.3.2	La prédation . . . . .	21
2.3.3	La désinfection par la lumière solaire . . . . .	21
2.3.4	La protection des bactéries attachées aux particules contre la radiation	23
<b>3</b>	<b>Les méthodes d'énumération d'<i>E. coli</i></b>	<b>25</b>
3.1	L'énumération en milieu de croissance et la méthode du NPP . . . . .	25
3.2	La dispersion des bactéries attachées aux particules . . . . .	26
3.3	La mesure de l'activité enzymatique . . . . .	27
3.3.1	Le protocole de la mesure de l'activité enzymatique . . . . .	27
3.3.2	L'induction de l'enzyme GLUase . . . . .	28
3.3.3	La spécificité : les interférences avec des organismes non-ciblés . . .	28
3.3.4	L'activité enzymatique d' <i>E. coli</i> . . . . .	28

<b>II</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Le bassin d'orage</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>La méthode d'énumération en milieu de croissance</b>	<b>33</b>
5.1	La méthode standardisée : Coliscan Easygel . . . . .	33
5.2	La décantation des particules à l'aide d'une centrifugation . . . . .	35
5.3	La dispersion des bactéries attachées aux particules : la sonification . . . . .	35
5.4	La distribution des données d'énumération des bactéries . . . . .	36
5.4.1	La distribution des populations microbiennes . . . . .	36
5.4.2	La tendance centrale d'une distribution asymétrique . . . . .	36
5.4.3	La distribution des mesures d'énumération en milieu de croissance . . . . .	37
<b>6</b>	<b>La mesure de l'activité enzymatique d'<i>E. coli</i></b>	<b>38</b>
6.1	La filtration . . . . .	38
6.2	L'incubation . . . . .	39
6.3	La spectroscopie fluorescente . . . . .	39
<b>7</b>	<b>Logiciel de modélisation WEST</b>	<b>41</b>
7.1	La base de modèles . . . . .	42
7.2	L'environnement de modélisation . . . . .	43
7.3	L'environnement d'expérimentation . . . . .	43
<b>III</b>	<b>Résultats - méthodes de quantification d'<i>E. coli</i></b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>La méthode d'énumération en milieu de croissance</b>	<b>46</b>
8.1	Campagne d'échantillonnage . . . . .	46
8.2	La décantation des particules par centrifugation . . . . .	48
8.3	La dispersion des bactéries attachées aux particules . . . . .	50
8.3.1	Agitation . . . . .	50
8.3.2	Sonification . . . . .	52
8.4	Essais de croissance et de décroissance . . . . .	54
8.5	Discussion . . . . .	57
8.6	Conclusion . . . . .	60
<b>9</b>	<b>La méthode de mesure de l'activité enzymatique d'<i>E. coli</i></b>	<b>61</b>
9.1	La qualité des mesures de fluorescence . . . . .	61

9.1.1	Les normes de qualité . . . . .	61
9.1.2	La plage de la concentration de MU anticipée . . . . .	62
9.1.3	Les essais de qualité de la mesure de fluorescence . . . . .	62
9.2	Les essais de la mesure de l'activité enzymatique d' <i>E. coli</i> . . . . .	65
9.2.1	Incubation sans filtre . . . . .	65
9.2.2	Incubation avec filtre selon le protocole A . . . . .	66
9.2.3	Incubation avec filtre selon le protocole B . . . . .	72
9.2.4	Mesure de l'activité enzymatique d'une série de dilution . . . . .	76
9.3	Discussion . . . . .	78
9.4	Conclusion . . . . .	80
9.5	Perspectives . . . . .	81
<b>IV</b>	<b>Résultats - la modélisation</b>	<b>83</b>
<b>10</b>	<b>Un concept de description de transport</b>	<b>84</b>
10.1	Le transport . . . . .	84
10.2	Le transport macroscopique . . . . .	85
10.3	Le transport diffusionnel . . . . .	88
10.4	Les matrices de conversion et de transport . . . . .	88
<b>11</b>	<b>Modélisation du comportement d'un pathogène et d'une classe de particules</b>	<b>90</b>
11.1	La définition du modèle : STMa1 . . . . .	90
11.1.1	Les composants du STMa1 . . . . .	91
11.1.2	Les médias du STMa1 . . . . .	91
11.1.3	Les compartiments du STMa1 . . . . .	91
11.2	Les équations différentielles du STMa1 . . . . .	92
11.3	Le transport : STMa . . . . .	92
11.3.1	Les débits dans le bassin . . . . .	93
11.3.2	Le transport macroscopique . . . . .	94
11.3.3	Les paramètres de transport pour le bassin d'orage . . . . .	96
11.4	Les Conversions : STM1 . . . . .	96
11.4.1	Les conditions environnementales : la température, la concentration de sel et la lumière solaire . . . . .	96
11.4.2	Les processus de conversion . . . . .	98
11.4.3	Les paramètres de conversion pour le bassin d'orage . . . . .	99

11.5 La simulation du comportement d' <i>E. coli</i> . . . . .	101
11.6 Discussion . . . . .	105
11.7 Conclusion . . . . .	106
<b>V Conclusions et perspectives</b>	<b>107</b>
12 Conclusions et perspectives	108
<b>VI Bibliographie</b>	<b>111</b>
Bibliographie	112
<b>VII Addenda</b>	<b>119</b>
A Tableaux	120
B Figures	129
C Protocoles de mesure de l'activité enzymatique d' <i>E. coli</i>	136

# Chapitre 1

## Introduction et mise en contexte

Cette étude s'intègre au projet rivEAU. Ce projet stratégique du CRSMG (Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada) vise l'intégration de l'éco-hydraulique de la rivière à la gestion des eaux de ruissellements urbains. L'objectif clé de ce projet de recherche est de développer un système de gestion des eaux de ruissellement dans le but d'améliorer la qualité de l'écosystème des rivières urbaines. Jusqu'à maintenant, la gestion des eaux de ruissellement s'est concentrée sur la minimisation des risques d'inondation. La gestion des eaux de ruissellement envisagée par ce projet a une perspective plus large. Le but est en effet de développer une gestion qui minimise l'impact sur la rivière en réduisant le stress induit par les eaux de ruissellement sur la qualité physico-chimique et biologique/écologique de l'eau, ainsi que les contraintes de cisaillement sur la morphologie de la rivière et les habitats. Le projet envisage donc l'éco-hydraulique de la rivière comme un but multi-objectif de la gestion des eaux de ruissellements urbains. Le développement d'une telle gestion d'eau nécessite l'atteinte de certains objectifs :

- le développement d'une fonction multi-objective qui exprime la qualité éco-hydraulique d'une rivière ;
- la modélisation des systèmes d'eau de ruissellement, c'est-à-dire augmenter la compréhension et construire un modèle mathématique du comportement de l'eau de ruissellement en termes des variables de la qualité d'eau ;
- le développement d'une gestion flexible en utilisant le contrôle en temps réel de la vanne de sortie du bassin d'orage basé sur des règles extraites des études de modélisation intégrée ;
- une gestion robuste contre les incertitudes des prévisions de pluie.

L'étude de ce mémoire envisage l'augmentation de la compréhension et la construction d'un modèle mathématique du comportement d'*E. coli* dans un bassin d'orage.

Les objectifs de ce mémoire sont :

- mesurer la concentration d'*E. coli* pendant une campagne d'échantillonnage dans un bassin d'orage ;
- développer une méthode de quantification d'*E. coli* à l'aide d'une mesure de l'activité enzymatique ;
- construire un modèle mathématique du comportement d'*E. coli* dans un bassin d'orage et implanter les équations dans la base de modèles du logiciel WEST.

*E. coli* dans l'eau de ruissellement se trouve principalement dans trois compartiments de l'environnement aquatique : (a) dans la colonne d'eau comme des bactéries en suspension ou en agrégats, (b) associé à la matière en suspension ou (c) dans les sédiments. Cette étude a comme but la modélisation du comportement d'*E. coli* dans la colonne d'eau, c'est-à-dire le comportement de la fraction en suspension et de celle associée à la matière en suspension et les interactions entre ces deux fractions. La répartition des pathogènes entre l'eau et les particules, la mortalité et la désinfection solaire des pathogènes sont discutées dans la première partie de cette étude.

La deuxième partie traite les matériels et méthodes utilisés pour cette étude.

La troisième partie traite les résultats de la campagne d'échantillonnage d'un bassin d'orage et discute une technique standardisée d'énumération d'*E. coli* en milieu de croissance. Cette technique d'énumération ne répond pas aux exigences de la qualité des données nécessaire à la modélisation. La modélisation des phénomènes d'adsorption / désorption des bactéries à la matière en suspension demande des données de qualité élevée, c'est-à-dire une méthode qui mesure la concentration d'*E. coli* exacte et précise. Une nouvelle méthode pour mesurer la concentration d'*E. coli* a été proposée. Cette méthode mesure l'activité enzymatique d'*E. coli*. La méthode a été développée et la mesure de l'activité enzymatique a été testée. La quatrième partie présente le modèle STMa1 (*Stormwater Tank Model # a1*) qui décrit le comportement d'une classe de particules et des bactéries pathogènes dans un bassin d'orage à l'aide d'un modèle multicouche. Les équations de répartition entre l'eau et les particules, de décantation des particules et d'élimination des pathogènes sont présentées et une nouvelle formulation matricielle qui facilite l'écriture des équations de transport est introduite. Le modèle a été implanté dans le logiciel WEST et quelques simulations ont été effectuées.

Le mémoire se termine avec des conclusions et quelques perspectives.

Première partie  
Étude de littérature

# Chapitre 2

## Le comportement d'*E. coli* dans un bassin d'orage

Ce chapitre traite la présence d'*E. coli* dans l'eau de ruissellement et son épuration causée par la décantation et par l'inactivation. Une comparaison des données de la répartition des pathogènes entre l'eau et les particules est faite afin de faire ressortir quelques tendances.

### 2.1 La présence d'*E. coli* dans l'eau de ruissellement

Les standards actuels quant à la qualité de l'eau sont basés sur la concentration des organismes indicateurs et varient en fonction de l'utilisation qui en sera faite (eau potable, irrigation, eau pour le bétail, usage récréatif) (Jamieson *et al.*, 2004). La présence d'organismes indicateurs dans l'eau est utilisée pour exprimer le risque d'infections chez les humains par des pathogènes. La concentration des coliformes fécaux est l'indicateur le plus commun. Cependant, la gastroentérite associée à la baignade est davantage corrélée avec la concentration d'*E. coli* (USEPA, 2001). Le standard de qualité pour la concentration des coliformes fécaux du Conseil canadien des ministres d'Environnement (CCME) est de 100 UFC ml<sup>-1</sup> pour l'irrigation et de 200 UFC ml<sup>-1</sup> pour l'usage récréatif. Les coliformes fécaux ne peuvent pas être présents dans l'eau potable (CCME, 1999). Cependant, le CCME ne fournit pas de standard de qualité basé sur la présence d'*E. coli*.

Plusieurs auteurs ont étudié les pathogènes dans l'eau de ruissellement et ont rapporté des concentrations d'*E. coli* entre 10<sup>2</sup> et 10<sup>4</sup> UFC/100ml (Jeng *et al.*, 2005; Krometis *et al.*, 2007; Characklis *et al.*, 2005; Garcia-Armisen & Servais, 2009).

## 2.2 La répartition des bactéries entre l'eau et les particules

Les bactéries dans la colonne d'eau se trouvent attachées aux particules (organiques ou inorganiques), comme des organismes individuels ou en agrégats (Characklis *et al.*, 2005). La répartition des bactéries entre les particules et l'eau influence fortement la décantation des bactéries attachées par sédimentation (Jeng *et al.*, 2005). Les bactéries associées aux particules, et particulièrement aux particules inorganiques à densité élevée, décantent plus vite. De plus, il a été observé que les bactéries associées aux particules dans l'eau survivent plus longtemps (Struck *et al.*, 2008). Les particules peuvent influencer le taux d'épuration des bactéries par l'extinction de la lumière ultra-violette et par la protection contre des prédateurs.

### 2.2.1 La dynamique de l'association microbienne aux particules

#### 2.2.1.1 La théorie de la double couche chargée

La théorie de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) de la double couche chargée (Verwey, 1945; Derjaguin & Landau, 1993) est la théorie la plus reconnue pour expliquer l'adsorption bactérienne. Selon cette théorie, les particules et les bactéries possèdent principalement une charge nette négative. Cette charge négative attire les cations en formant une couche diffuse. Lorsque les couches de deux colloïdes se rapprochent, elles se recouvrent et alors les colloïdes se repoussent.

La théorie dit que l'adsorption des bactéries aux particules se réalise de deux façons. La première est une adsorption réversible (premier minimum d'énergie) et consiste en un équilibre entre la répulsion de la double couche chargée (force électrostatique) et les forces d'attraction de Van der Waals-London. Cette adsorption réversible est considérée comme faible et se brise facilement dû à des forces physiques, des changements de la composition de la solution locale (Hipsey *et al.*, 2006) ou de l'énergie cinétique des bactéries nageantes (McCaulou *et al.*, 1995).

un deuxième type d'adsorption se produit (deuxième minimum d'énergie) lorsque les structures extracellulaires des bactéries s'attachent à la surface de la particule (Hipsey *et al.*, 2006). Celle-ci est plus forte et est considérée comme irréversible.

### 2.2.1.2 Les influences de l'association microbienne

La dynamique de l'association microbienne aux particules est complexe et est influencée par plusieurs facteurs. L'environnement ionique peut influencer l'épaisseur de la double couche. Dans les environnements à force ionique élevée, par exemple dans les environnements marins ou en présence d'ions tri- ou tétravalents, la double couche est réduite et donc les forces répulsives aussi (Stenström, 1989). La réduction de l'épaisseur de la couche favorise le rapprochement des colloïdes ce qui entraîne davantage d'adsorption réversible. Dans les milieux à faible force ionique, les caractéristiques de la surface de la cellule ont une influence importante sur l'association causée par l'hydrophobicité de la surface cellulaire, la charge cellulaire et la formation des polysaccharides extracellulaires (Characklis *et al.*, 2005; Stenström, 1989). Les interactions hydrophobes entre la surface de la cellule et les particules facilitent l'adsorption par la déshydratation locale ou par les réarrangements des molécules d'eau (Stenström, 1989). Les bactéries et la majorité des particules ont une charge nette négative (Marshall, 1975). La charge des particules peut localement être influencée par l'adsorption des protéines, par d'autres matériels organiques (Marshall, 1975) ainsi que par des particules possédant localement des charges positives.

Une dernière influence importante sur l'association est la minéralogie des particules. Les minéraux des argiles possèdent une certaine capacité d'échange anionique causée par les charges positives au bord des plaques d'argile (Stenström, 1989).

Si les bactéries se sont rapprochées suffisamment des particules et se trouvent dans le premier minimum d'énergie, la formation des mucopolysaccharides extracellulaires comme des pilis, fimbriaes et flagellas (Marshall *et al.*, 1971; Palmateer *et al.*, 1993) permet une association plus forte. Une adsorption irréversible s'installe alors et les bactéries se trouvent dans le deuxième minimum d'énergie. Dans les eaux à faible concentration ionique, l'adsorption de bactéries aux particules est décrite principalement comme étant irréversible ou lentement réversible (Palmateer *et al.*, 1993; Jamieson *et al.*, 2005). De plus, pour les eaux de ruissellement, les bactéries ont déjà été en contact avec une grande quantité d'eau. Selon George *et al.* (2004), les bactéries attachées de manière réversible se sont donc déjà détachées. Seulement les bactéries attachées de manière irréversible restent attachées dans ces conditions.

## 2.2.2 L'attachement des bactéries aux particules

Il existe deux techniques pour rechercher la fraction de bactéries en suspension et celle attachée aux particules (Krometis *et al.*, 2007). Plusieurs études utilisent des techniques de

filtration (Jeng *et al.*, 2005; Mahler *et al.*, 2000). Ces techniques prouvent qu'une fraction substantielle des bactéries est associée aux particules. Cependant, la filtration fractionnelle n'est capable que de distinguer les diamètres des particules et non la densité des particules. C'est la combinaison du diamètre et de la densité qui détermine la vitesse de décantation. Des techniques de sédimentation statique (Jeng *et al.*, 2005) ou des techniques de centrifugation (Krometis *et al.*, 2007; Characklis *et al.*, 2005) reproduisent de manière plus réaliste le comportement des particules dans la colonne d'eau.

### 2.2.2.1 L'efficacité d'épuration d'une décantation

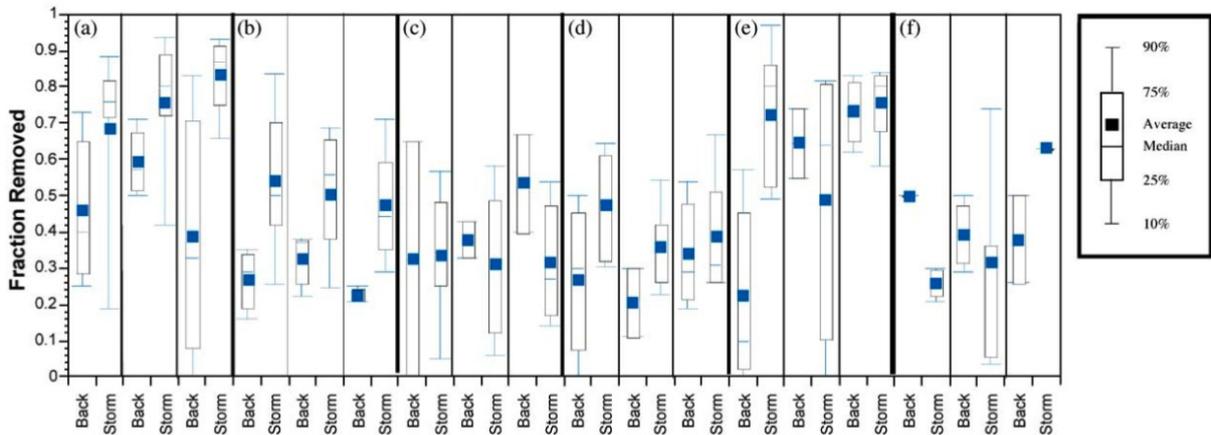
Schillinger & Gannon (1985) ont examiné l'épuration de coliformes fécaux, *Klebsiella sp.* et *Pseudomonas sp.* dans l'eau de drainage des zones résidentielles, commerciales, industrielles et libres. Une technique de sédimentation statique et de filtration fractionnelle a été utilisée. Les concentrations de coliformes fécaux variaient entre  $10^4$  et  $10^6$  UFC/100 ml et les concentrations de matières en suspension entre 250 et 2000 mg l<sup>-1</sup>. Ils ont noté un rendement d'épuration plus faible pour les coliformes fécaux (16.8%) que pour les bactéries *Klebsiella sp.* (33.0%) et *Pseudomonas sp.* (31.1%) après quatre heures de sédimentation à 40 cm de profondeur. La filtration fractionnelle a donné un résultat comparable où 15.9% des coliformes fécaux et 25,7% des *Klebsiella sp.* ont été retenus sur un filtre de 5 µm. Dans tous les cas, plus de 50% des bactéries n'ont pas été enlevées par la filtration ou la décantation.

Characklis *et al.* (2005) ont recherché la répartition des bactéries attachées aux particules dans trois rivières qui reçoivent le drainage des aires déterminées comme zone résidentielle, commerciale et institutionnelle. L'échantillonnage a été fait par temps sec et par temps pluvieux. Une technique de centrifugation (1164 g, 2000 rpm pendant 10 min) a été utilisée pour séparer les particules et les bactéries décantables de celles en suspension. Les concentrations d'*E. coli* variaient entre 60 et  $2 \cdot 10^4$  UFC/100 ml et les concentrations de matières en suspension entre 6 et 160 mg l<sup>-1</sup>. Le rendement d'épuration des matières en suspension était de 90% pour les échantillons d'eaux de ruissellement et de 70% par temps sec. Characklis *et al.* (2005) ont rapporté que, en général, les coliformes fécaux, *E. coli* et enterococci montrent une répartition comparable. La fraction moyenne des organismes décantés variait entre 20% et 35% pour les échantillons par temps sec et entre 30% et 55% pour les échantillons d'eaux de ruissellement. Cependant, alors que la fraction décantée des coliformes fécaux et enterococci augmentait lorsqu'il pleuvait, la fraction décantée d'*E. coli* diminuait. La Figure 2.1 illustre la fraction décantée par centrifugation pour les particules

et les bactéries. Celle-ci souligne la grande variabilité des fractions des bactéries décantées et l'augmentation du rendement d'épuration des particules dans les eaux de ruissellement.

La même technique de centrifugation est utilisée par Krometis *et al.* (2007) pour analyser des échantillons de deux rivières qui reçoivent les eaux de ruissellement de zones résidentielles et institutionnelles. Les concentrations d'*E. coli* variaient entre  $10^3$  et  $10^4$  UFC/100 ml et les concentrations de matières en suspension entre 70 et 270  $\text{mg l}^{-1}$ . Le rendement d'épuration pour les matières en suspension était de 90%. De plus, entre 40% et 50% des coliformes fécaux, d'*E. coli* et des enterococci ont été associés à la matière en suspension.

En général, le rendement d'épuration d'*E. coli* d'une décantation totale se situe entre 20 et 50%.

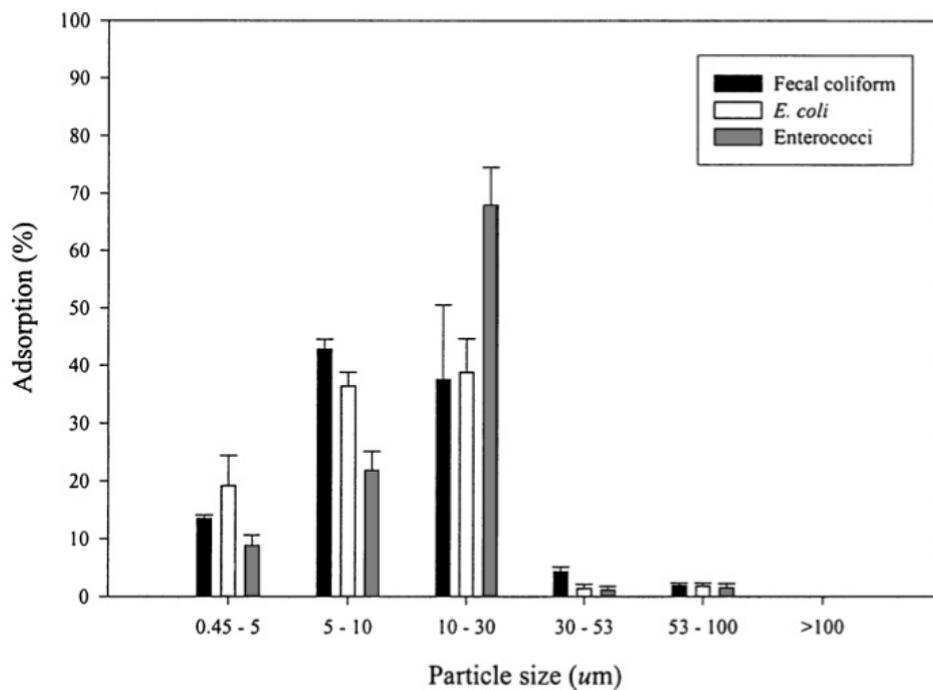


**FIGURE 2.1** – La fraction décantée par centrifugation pour (a) MeS, (b) coliformes fécaux, (c) *E. coli*, (d) Enterococci, (e) spores de *Clostridium perfringens* et (f) coliphages totales dans des ruisseaux différents pour des échantillons de temps sec (Back) et de temps pluvieux (Storm) (Characklis *et al.*, 2005).

### 2.2.2.2 La densité des bactéries attachées aux particules

Jeng *et al.* (2005) ont combiné les techniques de sédimentation statique et de filtration fractionnelle pour déterminer la vitesse de décantation des bactéries attachées aux particules et la répartition des bactéries sur les particules de différentes dimensions en suspension dans l'eau de ruissellement urbain. La combinaison de ces données leur permettait de calculer la vitesse de sédimentation des bactéries. Les concentrations d'*E. coli* variaient entre  $9 \cdot 10^2$  et  $10^4$  UFC/100 ml et les concentrations de matières en suspension entre 170 et 200  $\text{mg l}^{-1}$ .

En moyenne, 82% des particules de plus de 5  $\mu\text{m}$  ont décanté en cinq heures jusqu'à une profondeur de 40 cm. La fraction des particules inférieures à 5  $\mu\text{m}$  avait une vitesse de sédimentation négligeable et est considérée comme non décantable. L'attachement des coliformes fécaux, *E. coli* et enterococci variaient de respectivement 10% à 28%, de 22% à 30%, et de 8% à 12% dans les eaux de ruissellement. La plupart des bactéries sont attachées aux particules inférieures à 30  $\mu\text{m}$  (Figure 2.2). Respectivement 95%, 97% et 97% des coliformes fécaux, *E. coli* et enterococci sont attachées aux particules inférieure à 30  $\mu\text{m}$ , un diamètre qui correspond aux argiles et à la glaise.



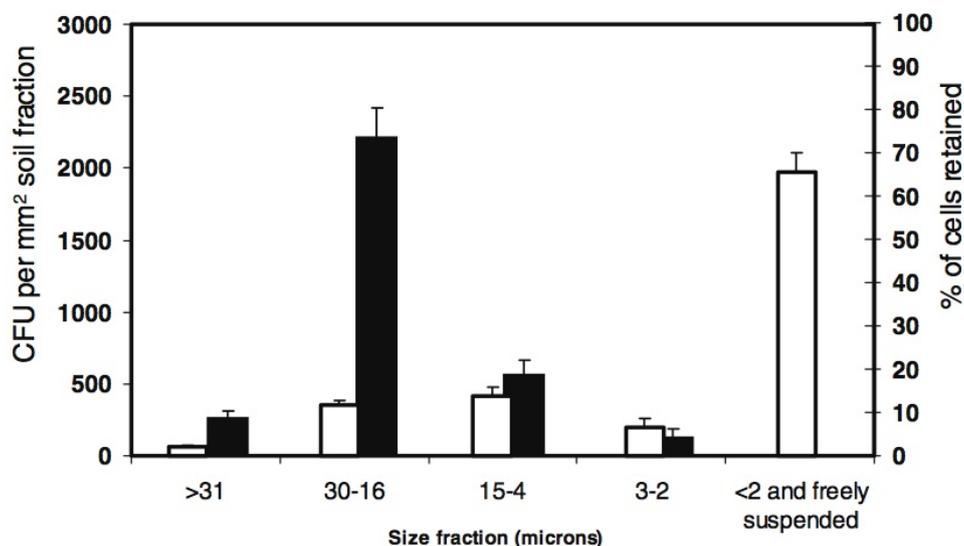
**FIGURE 2.2** – La fraction des coliformes fécaux, *E. coli* et enterococci attachée aux particules selon la grandeur des particules (Jeng *et al.*, 2005).

La densité des bactéries à la surface des particules est une mesure pouvant être utile pour la modélisation et est exprimée en nombre de bactéries par  $\text{mm}^2$  de surface de particules ( $\text{UFC mm}^{-2}$ ). Oliver *et al.* (2007) ont recherché le nombre de bactéries adsorbées aux particules par  $\text{mm}^2$  sur différentes fractions granulométriques. Ils ont fait une expérience d'adsorption avec *E. coli* et un sol argileux-glaiseux et ensuite une décantation statique pour fractionner les différentes classes. Le nombre de bactéries par classe et la masse totale des fractions ont été déterminés pour calculer la densité des bactéries pour les différentes

fractions granulométriques. Pour effectuer leurs calculs, ils ont établi deux postulats : (a) la densité des particules est de  $2.6 \text{ g cm}^{-3}$  et (b) le diamètre utilisé est le diamètre moyen de la classe granulométrique. La concentration d'*E. coli* était de  $10^9 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$  et la concentration de matières en suspension était de  $0.02 \text{ g ml}^{-1}$ . La fraction totale des bactéries qui se sont attachées aux particules ( $\geq 2 \mu\text{m}$ ) était de 35%. Les classes granulométriques de 2 - 3, 4 - 15, 16 - 30,  $\geq 31 \mu\text{m}$  ont retenu respectivement 7%, 14%, 12% et 2% des bactéries (Figure 2.3 et Tableau 2.1).

**Tableau 2.1** – Les caractéristiques des fractions granulométriques (Oliver *et al.*, 2007).

Fraction granulométrique ( $\mu\text{m}$ )	Diamètre sphérique équivalent ( $\mu\text{m}$ )	Masse totale des fractions dans 1 ml (mg)	% composition du sol
31	115.6	10.2	51.2
16 - 30	23	2.3	11.5
4 - 15	9.5	3.6	17.9
2 - 3	2.5	2.0	10.1



**FIGURE 2.3** – La portion moyenne d'*E. coli* associée à chaque fraction granulométrique dans 1 g de sol (bandes blanches) ; Nombre d'*E. coli* par  $\text{mm}^2$  associé à chaque fraction granulométrique (bandes noirs). Les particules inférieures à  $2 \mu\text{m}$  n'étaient pas différenciées des bactéries en suspension (Oliver *et al.*, 2007).

Palmateer *et al.* (1993) ont évalué la densité des bactéries sur la surface des particules

dans l'eau de drainage de terres cultivables. Ils ont distingué quatre classes granulométriques : 1 - 5, 5 - 10, 10 - 30 et 30 - 70  $\mu\text{m}$  et les bactéries en suspension. La densité des bactéries à la surface était de  $10^3$  à  $10^5$  UFC  $\text{g}^{-1}$  pour toutes les classes granulométriques. Cette densité était relativement constante pendant l'année avec une petite diminution à l'automne. Par contre, la concentration des bactéries en suspension était plus variable, soit entre  $10^3$  et  $10^8$  UFC/100 ml, et a montré une plus grande variabilité saisonnière, avec une forte diminution pendant l'automne.

Jamieson *et al.* (2005) ont modélisé l'enlèvement d'*E. coli* attachés aux particules d'un fleuve alluvial dans un environnement rural. Ils ont distingué deux classes granulométriques, 45 - 75 et 75 - 125  $\mu\text{m}$ , et ont déterminé la fraction d'*E. coli* par masse associée à chaque classe selon l'Équation 2.1. Les particules inférieures à 45  $\mu\text{m}$  sont considérées en suspension et ne sont pas modélisées.

$$C_{P_{E. coli}} = \frac{E. coli_{in} \times F}{SS_{in}} \quad (2.1)$$

$C_{P_{E. coli}}$  : la concentration d'*E. coli* associée aux particules (UFC  $\text{g}^{-1}$ )

$E. coli_{in}$  : le nombre totale d'*E. coli* (UFC)

$SS_{in}$  : la masse de matière en suspension (g)

$F$  : la fraction d'*E. coli* associée aux particules (-)

La fraction attachée ( $F$ ) variait entre 0.2 et 0.44 et augmentait pour les particules de plus petite taille (Tableau 2.2). La concentration d'*E. coli* variait entre  $10^2$  et  $10^5$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  et la concentration de matière en suspension entre 0 et 10  $\text{mg l}^{-1}$ .

**Tableau 2.2** – La fraction d'*E. coli* associée aux deux classes granulométriques (Jamieson *et al.*, 2005).

Classe granulométrique ( $\mu\text{m}$ )	$F$
45 - 75	0.34 - 0.44
75 - 125	0.20 - 0.27

Guber *et al.* (2007) ont déterminé l'effet du fumier sur l'attachement de coliformes fécaux aux particules pour différentes classes granulométriques dans des suspensions de sol dans l'eau. Ils ont utilisé une technique de centrifugation pour séparer les bactéries attachées aux particules et les bactéries en suspension. Une équation linéaire d'adsorption a été appliquée (Équation 2.2) afin de calculer les valeurs de  $K_D$  pour trois types de sol et pour

cinq fractions tamisées de chaque sol (Tableau 2.3). Il y a plus de de coliformes fécaux associés aux argiles et à la glaise qu'au sable. Comparée à différents sols, l'association au sable est la plus variable.

$$S = K_D \times C \quad (2.2)$$

$S$  : la concentration équilibrée de bactéries au sol (UFC g<sup>-1</sup>)

$C$  : la concentration équilibrée de coliformes fécaux en solution (UFC ml<sup>-1</sup>)

$K_D$  : le coefficient de partition (ml g<sup>-1</sup>)

**Tableau 2.3** – Les valeurs pour  $K_D$  pour trois types de sol et pour cinq fractions tamisées de chaque sol (Guber *et al.*, 2007).

Sol et les fractions granulométriques en suspension	Sol loameux fin	$K_D$ (ml g <sup>-1</sup> )	
		Argile sableuse	Sol loameux
Sol	513.2	46.3	9.40
Argile, ≤ 2 μm	580.9	54.4	43.4
Glaise, 2 - 50 μm	501.3	81.9	17.2
Sable, 62.5 - 125 μm	92.1	1.29	1.82
Sable, 125 - 250 μm	156.7	1.80	2.73
Sable, 250 - 500 μm	720.5	0.65	1.31

### 2.2.3 La vitesse de sédimentation

Peu d'études ont proposé des valeurs de vitesse de sédimentation des coliformes ou d'*E. coli*. Garcia-Armisen & Servais (2009) ont établi une relation entre la vitesse de sédimentation et la charge de MeS. La vitesse de sédimentation d'*E. coli* était relativement constante (0.066 m/h) pour l'eau de rivière à concentration de MeS supérieur à 50 mg/l (Figure 2.4). Auer & Niehaus (1993) ont proposé une vitesse de sédimentation de 0.048 m/h pour des coliformes fécaux associés aux particules de 0.45 à 10 μm et de 0.1 m/h pour ceux associés aux particules supérieur à 10 μm. Jamieson *et al.* (2005) ont observé des vitesses de sédimentation de 0.072 et de 0.108 m/h dans un fleuve alluvial pour respectivement des particules de 45 à 75 μm et des particules à 75 à 125 μm.

### 2.2.4 Comparaison des données

#### 2.2.4.1 La densité des bactéries attachées aux particules

Les données de Jeng *et al.* (2005), Guber *et al.* (2007), Oliver *et al.* (2007) et Davies *et al.* (2003) ont été analysées dans le but de faire ressortir quelques tendances.

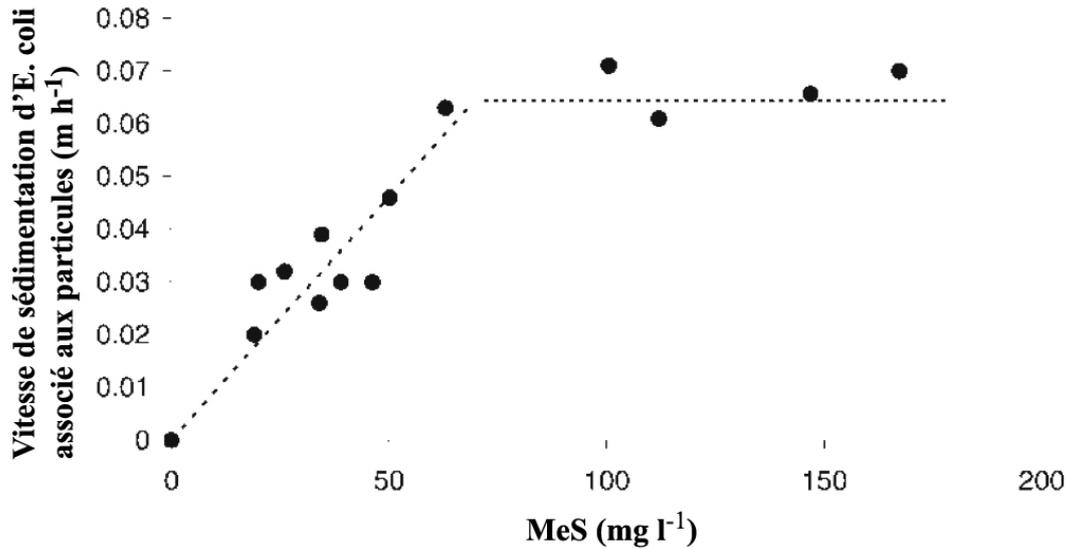


FIGURE 2.4 – La vitesse de sédimentation d'*E. coli* selon la concentration de MeS dans l'eau de rivière (Garcia-Armisen & Servais, 2009).

Premièrement, la fraction sableuse ( $\geq 30 \mu\text{m}$ ) contribue marginalement à l'adsorption totale (Figures 2.2 et 2.3). Cela peut s'expliquer par deux facteurs. D'abord, la surface totale d'un gramme de particules varie selon le diamètre des particules. Par exemple, lorsque le diamètre double, la surface totale par gramme sera diminuée de moitié. La fraction sableuse, ayant une surface spécifique relativement petite, a une capacité d'adsorption par gramme moins élevée que les argiles ou la glaise. Cependant, cela n'explique pas toujours la diminution si importante de l'absorption de la fraction sableuse. La raison de la diminution plus forte de l'adsorption à la fraction sableuse se trouve à la surface des particules. Dans les milieux à faible concentration ionique, les caractéristiques des particules deviennent plus importantes et ce sont surtout les charges positives sur les particules qui attireront les bactéries chargées négativement. C'est la matière organique, à capacité d'échange cationique élevée, attachée aux particules comme les argiles et la glaise (Marshall, 1975) et les charges positives au bord des argiles qui attirent les bactéries. Du sable sans couche organique n'attachera donc que peu de bactéries. Guber *et al.* (2007) ont étudié la couche organique sur les particules du sol et établi le rapport entre cette dernière et l'adsorption des bactéries. Leurs résultats indiquent que le sable ayant une couche organique a une occupation bactérienne élevée. L'association microbienne à la fraction sableuse sera donc dépendante de la présence ou l'absence d'une couche organique. Cette conclusion a aussi

été fait par Hipsey *et al.* (2006). Ils ont démontré que la corrélation entre la fraction de bactéries attachées par classe granulométrique et la concentration en suspension est plus élevée pour les argiles et la glaise que pour le sable.

Deuxièmement, pour la fraction argileuse ( $\leq 2 \mu\text{m}$ ) et glaiseuse (2 à  $30 \mu\text{m}$ ), la densité des bactéries par masse ou par surface dépend beaucoup des caractéristiques du sol. Pour la modélisation, il faudra faire un choix quant à l'utilisation de l'expression de la densité entre  $B_p$  (nombre de bactéries sur des particules) par  $\text{mm}^2$  et  $B_p$  par g. La Figure 2.6(d) montre une occupation d'*E. coli* par gramme plus ou moins constante jusqu'à  $30 \mu\text{m}$ . La diminution de l'occupation par gramme à partir de  $30 \mu\text{m}$  est causé par la surface spécifique petite de la fraction sableuse. La valeur du  $B_p$  par g diminue d'un facteur 10 au diamètre de  $100 \mu\text{m}$  en comparaison de la valeur initiale. L'occupation par surface ( $\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$ ) a tendance à augmenter avec le diamètre de la particule. Les Équations 2.3 à 2.6 démontrent cette relation.

$$\frac{\Delta B_p}{\Delta m} = \text{constante} \quad (2.3)$$

$$\Delta m = \Delta n \times \frac{\pi}{6} \times \rho \times \phi^3 \quad (2.4)$$

$$\Delta s = \Delta n \times \pi \times \phi^2 \quad (2.5)$$

$$\frac{\Delta B_p}{\Delta s} = \frac{\Delta B_p}{\Delta m} \times \frac{\rho}{6} \times \phi \quad (2.6)$$

$\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  : le nombre de bactéries par gramme (UFC  $g^{-1}$ )

$\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$  : le nombre de bactéries par surface (UFC  $mm^{-2}$ )

$\Delta n$  : le nombre de particules (-)

$\rho$  : la densité de la particule ( $g \text{ mm}^{-3}$ )

$\phi$  : le diamètre de la particule (mm)

Les relations entre  $\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$  ou  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  et le diamètre sont relativement linéaires dans une échelle log-log. Cependant,  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  paraît moins constant à partir d'un diamètre de  $30 \mu\text{m}$  (Figures 2.6 et 2.7). À partir de ce diamètre,  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  diminue et  $\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$  reste moins constant et peut même diminuer. Un  $\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$  constant est plus probable parce que les bactéries s'attachent à la surface des particules. Pour l'argile,  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  est constant. Cela peut s'expliquer par le fait que plusieurs particules petites, à dimension d'ordre de grandeur des bactéries ( $\phi \leq 5 \mu\text{m}$ ), ne peuvent attacher qu'une seule bactérie. Lünsdorf *et al.* (2000) ont décrit ce phénomène nommé *clay hatches*. Le  $\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$  diminue et  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  devient plus constant si plusieurs particules et seulement une bactérie s'attachent. Le Tableau 2.4 donne un exemple pour trois types d'associations microbiennes. Le type 2 représente une association entre une particule ( $\phi = 5 \mu\text{m}$ ) et 25 bactéries. Le type 1 représente un *clay hatch* existant de 10 particules ( $\phi =$

5  $\mu\text{m}$ ) et de 25 bactéries. Le type 3 représente une particule plus grande ( $\phi = 50 \mu\text{m}$ ) et 2500 bactéries. Le  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  est égal pour les types 1 et 3 et le  $\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$  est égal pour les types 2 et 3. Un  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  relativement constant peut donc être expliqué par le phénomène de *clay hutch*.

**Tableau 2.4** – Exemple de calcul pour le phénomène de *clay hutch*

	Type 1	Type 2	Type 3
$B_p$	25	25	2500
$\phi$ ( $\mu\text{m}$ )	5	5	50
n	10	1	1
Valeurs relatifs à Type 3			
$\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$	0.1	1	1
$\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$	1	10	1

Finalement, la fonction exponentielle de l'Équation 2.7 (Figure 2.5 ) décrit le  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  en fonction du diamètre des particules. Le terme  $b_m$  dépend de la concentration de bactéries en suspension, du coefficient de partition, ainsi que de la concentration et de la densité des particules d'un certain diamètre (Équation 2.2). Le coefficient  $a$  dépend quant à lui des caractéristiques de la forme des particules et de la formation de *clay hutch*.

$$\frac{\Delta B_p}{\Delta m} = b_m \times \phi^a \quad (2.7)$$

ou

$$\log\left(\frac{\Delta B_p}{\Delta m}\right) = \log(b_m) + a \times \log(\phi) \quad (2.8)$$

Si  $\phi \leq \phi_m$ ,  $a$  est 0 et  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  est constant. L'Équation 2.8 devient :

$$\frac{\Delta B_p}{\Delta m} = b_m \quad (2.9)$$

Si  $\phi > \phi_m$ ,  $a$  est égale à -1 et c'est  $\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$  qui est constant.

$$\log\left(\frac{\Delta B_p}{\Delta m}\right) = \log(b_m) + \log(\phi_m) - \log(\phi) \quad (2.10)$$

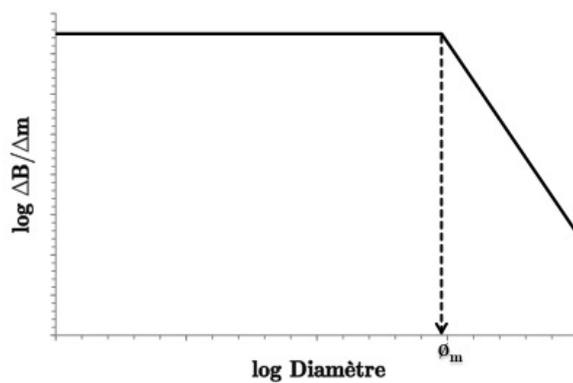
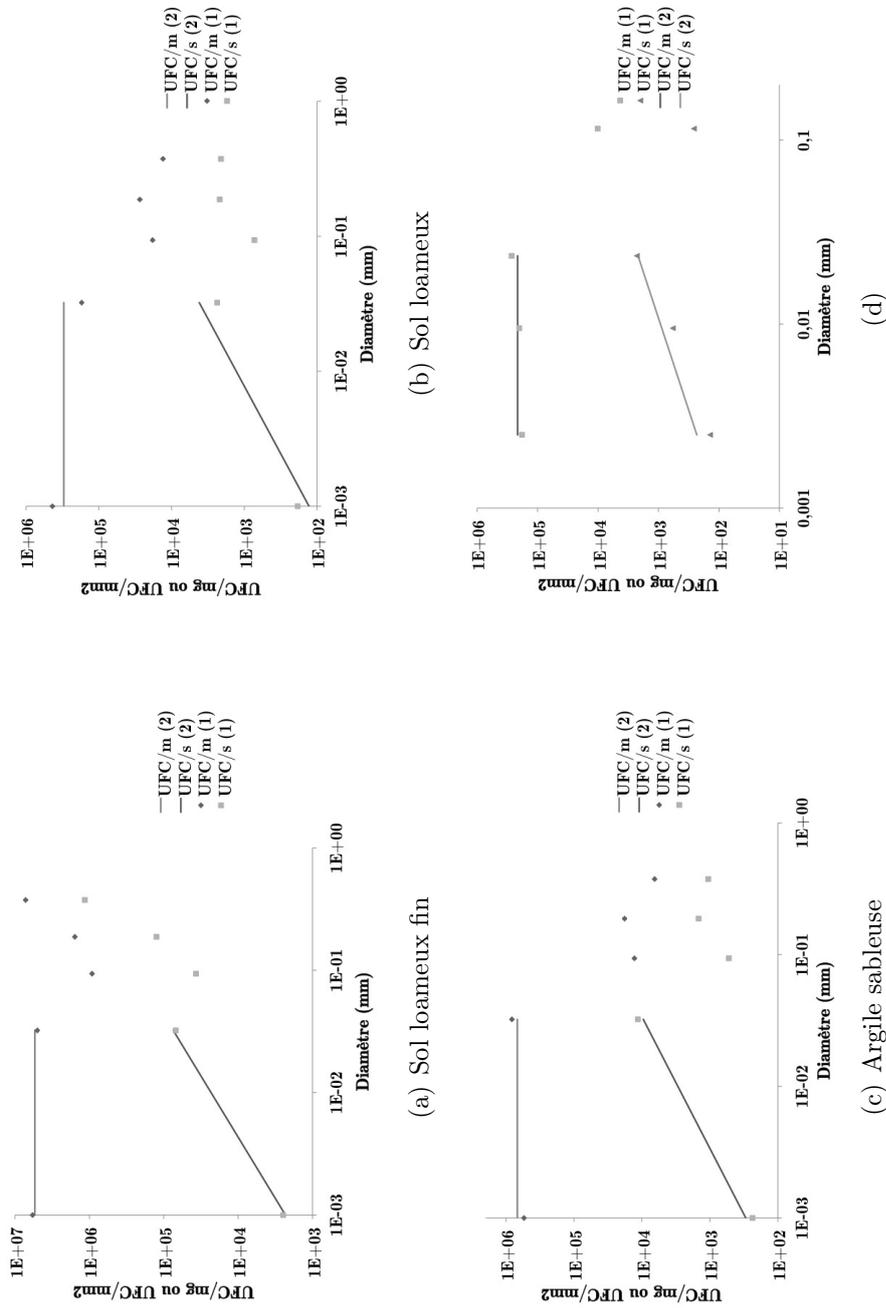
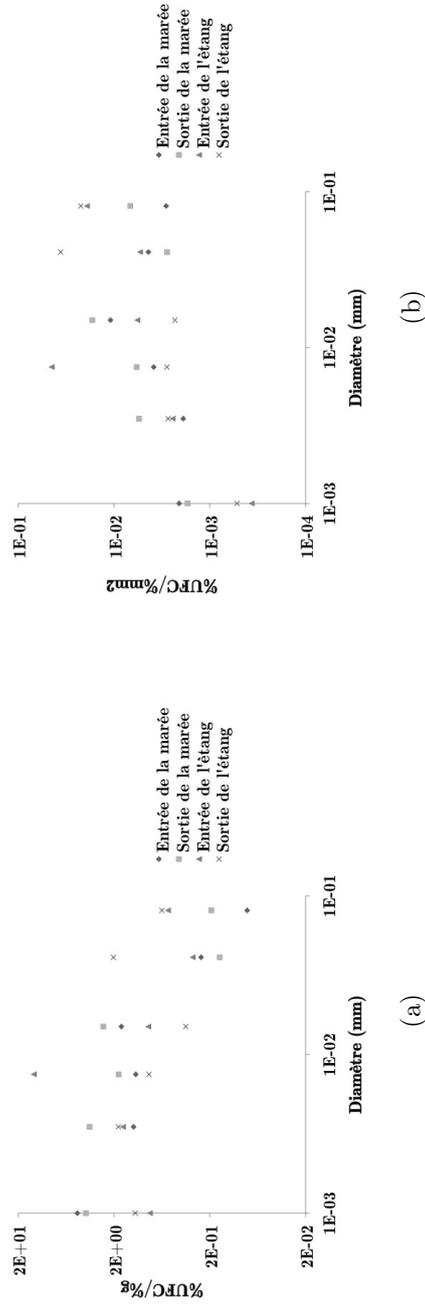


FIGURE 2.5 – Relation entre  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  et le diamètre des Équations 2.9 et 2.10.



**FIGURE 2.6** – Évolution du rapport UFC/m et UFC/s en fonction du diamètre des particules pour différents types de sol. (a), (b) et (c) Les valeurs de UFC/m (1) sont calculées avec l'Équation 2.2 et les valeurs de  $K_D$  du Tableau 2.3. UFC/m (2) est la valeur moyenne des deux premiers points de UFC/m (1); UFC/s (1) et (2) sont calculés avec l'Équation 2.6. La concentration de coliformes fécaux était de  $10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> et la concentration de la MeS était de 0.1 g ml<sup>-1</sup>. (d) Les valeurs pour UFC/m (1) de Oliver *et al.* (2007); UFC/m (2) est calculé à base de la valeur moyenne des trois premiers points de UFC/m (1); UFC/s (1) et (2) sont calculés avec l'Équation 2.6. La concentration d'*E. coli* était de  $10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> et la concentration de matières en suspension était de 0.02 g ml<sup>-1</sup>.



**FIGURE 2.7** – Relation entre (a)  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  et (b)  $\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$  et le diamètre des particules pour les coliphages somatiques dans l'eau de ruissellement (Davies *et al.*, 2003).  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$  est relativement constant pour l'argile et la glaise et diminue pour la fraction sableuse.  $\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$  est calculé à base des valeurs de  $\frac{\Delta B_p}{\Delta m}$ .  $\frac{\Delta B_p}{\Delta s}$  est relativement constant pour la fraction sableuse. La concentration de coliphages somatiques variait entre 1 et 5740 UFC/100 ml.

### 2.2.4.2 Le coefficient de distribution

Le coefficient de distribution  $K_D$  (Équation 2.2) exprime la distribution des bactéries entre l'eau et la matière en suspension lors de l'atteinte de l'équilibre et est un paramètre utile pour la modélisation. Le coefficient de distribution (Équation 2.2) calculé sur la base des données de huit auteurs est analysé en fonction de la concentration de matières en suspension pour une échelle log-log (Figure 2.8). Les échantillons des huit auteurs proviennent d'eau de ruissellement, de rivières et d'eau usée. Les valeurs minimales, moyennes et maximales sont calculées à partir des valeurs minimales, moyennes et maximales du nombre totale d'*E. coli*, de la matière en suspension et de la fraction d'*E. coli* attachés à la matière en suspension des données des huit auteurs. Il y a une relation linéaire entre le coefficient de distribution et la matière en suspension pour une échelle log-log (Équation 2.11). C'est-à-dire qu'il y a relativement moins d'*E. coli* attachés dans les eaux plus chargées de MeS. Il est probable que la MeS dans les eaux plus chargées ait une fraction sableuse plus élevée qui n'attache qu'une petite fraction d'*E. coli* par rapport à sa masse totale. Cette relation peut être utile pour estimer la fraction d'*E. coli* attachée à l'aide d'une mesure de la MeS d'un échantillon, mais peut donner une fausse estimation du  $K_D$  pour une classe spécifique de particules.

$$\log K_D = -0.988 \times \log MeS + 2.761 \quad (R^2 = 0.85) \quad (2.11)$$

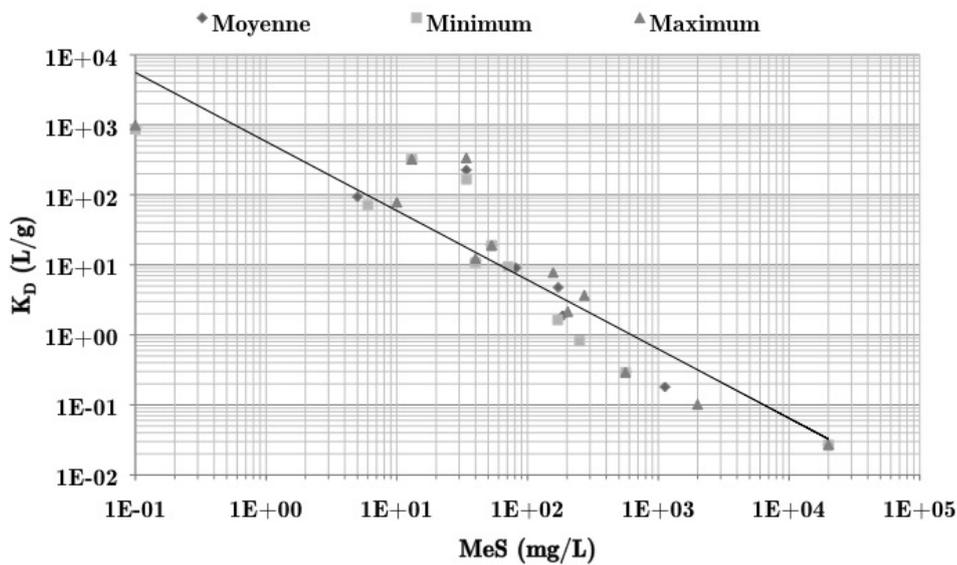


FIGURE 2.8 – Coefficient de distribution selon la concentration de MeS à partir des données du Tableau A.4.

## 2.3 L'inactivation d'*E. coli*

L'inactivation d'*E. coli* dans un bassin d'orage se fait par trois mécanismes principaux : (a) la mortalité de base, (b) la prédation et (c) la désinfection par la lumière solaire (Struck *et al.*, 2008). L'inactivation est représentée par une décroissance de premier ordre à un taux d'inactivation  $b$  (Équation 2.12). Le taux d'inactivation est la somme des taux des trois mécanismes considérés.

$$N(t) = N_0 \times e^{-b \times t} \quad (2.12)$$

$N$  : nombre de bactéries

$N_0$  : nombre de bactéries initiales

$b$  : taux d'inactivation ( $\text{j}^{-1}$ )

$t$  : temps ( $\text{j}$ )

### 2.3.1 La mortalité de base

La mortalité de base décrit la mortalité naturelle et l'inactivation causée par tous les phénomènes qui ne sont pas considérés dans les autres taux. L'environnement chimique de la bactérie et la température influencent la mortalité de base. Plusieurs auteurs (Struck *et al.*, 2008; Brookes *et al.*, 2004) multiplient le taux de mortalité de base à  $20^\circ\text{C}$  par un coefficient de température pour décrire l'influence de la température (Équation 2.13). Mancini (1978) a proposé une équation qui décrit l'influence du milieu ionique et de la température (Équation 2.14).

$$b_m = b_{20} \times \Phi_T^{T-20} \quad (2.13)$$

$$b_m = (b_{20} + b_S \times S) \times \Phi_T^{T-20} \quad (2.14)$$

$b_m$  : taux de mortalité à température  $T$  ( $\text{j}^{-1}$ )

$b_{20}$  : taux de mortalité à  $20^\circ\text{C}$  ( $\text{j}^{-1}$ )

$b_S$  : constante de proportionnalité de la salinité ( $\text{L g}^{-1} \text{j}^{-1}$ )

$\Phi_T$  : coefficient de température (-)

$S$  : salinité ( $\text{g/L}$ )

Chapra (1997) a appliqué l'Équation 2.13 et a estimé le  $b_{20}$  de  $0.8 \text{j}^{-1}$  et le  $\Phi_T$  de 1.07. Struck *et al.* (2008) ont prédit la concentration de pathogènes dans l'effluent d'un bassin de rétention et d'un marais épurateur. Ils ont appliqué un modèle de mortalité qui tient compte de la température, de l'intensité de la lumière solaire et un terme de mortalité qui inclut tous les autres facteurs comme la sédimentation, la sorption, la prédation, le

pH, l'oxygène dissous, la conductivité, etc. La mortalité de base d'*E. coli* a été estimée de  $1.4 \text{ j}^{-1}$  et le  $\Phi_T$  de 1.013. Garcia-Armisen & Servais (2009) ont mesuré l'épuration d'*E. coli* dans l'eau de rivière. Ils ont déterminé la mortalité d'*E. coli* en suspension de  $0.732 \text{ j}^{-1}$  et d'*E. coli* attaché aux particules de  $0.348 \text{ j}^{-1}$ .

Mayo & Kalibbala (2007) ont proposé un taux de mortalité qui dépend du pH et de l'oxygène dissous (Équation 2.15).

$$b_m = k_{pH} \times pH + k_{OD} \times OD \quad (2.15)$$

$k_{pH}$  : constante de désinfection relatif au pH ( $0.001 \text{ j}^{-1}$ )

$k_{OD}$  : constante de désinfection relatif à l'oxygène dissous ( $0.0037 \text{ m}^3 \text{ g}^{-1} \text{ O}_2 \text{ j}^{-1}$ )

OD : oxygène dissous ( $\text{g O}_2 \text{ m}^{-3}$ )

### 2.3.2 La prédation

La prédation peut réduire de manière importante la concentration d'*E. coli* (Struck *et al.*, 2008). Cependant, elle est difficile à différencier du taux de mortalité de base et n'est donc souvent pas considérée ou elle est incluse dans le taux de mortalité  $b_m$ .

### 2.3.3 La désinfection par la lumière solaire

La désinfection par la lumière solaire cause une inactivation notable, surtout dans des eaux peu profondes (Curtis *et al.*, 1992). La lumière solaire, en particulier la lumière ultraviolette, endommage les bactéries. Un premier effet est la photodissociation. La radiation est absorbée directement par des cibles de la cellule qui dégradent par la suite des structures cellulaires. Un effet plus prononcé est la photosensibilisation. Dans ce cas, la radiation est premièrement absorbée par un sensibilisateur. Un sensibilisateur efficace demeure excité suffisamment longtemps pour que l'énergie soit transférée à d'autres molécules en initiant des réactions photosensibles. Quand l'énergie est transférée à une molécule d'oxygène, quelques espèces réactives d'oxygène seront formées, par exemple l'oxygène singulet, le superoxide, le peroxide d'hydrogène ou les radicaux hydroxyles. C'est la photo-oxidation. Il existe deux types de sensibilisateurs : les sensibilisateurs endogènes de la cellule bactérienne et les sensibilisateurs exogènes en dehors de la cellule. Les sensibilisateurs endogènes absorbent les radiations ayant une longueur d'onde inférieure à 500 nm, soit la lumière ultraviolette. Ces longueurs d'ondes pénètrent peu dans des eaux eutrophes. Les sensibilisateurs exogènes, quant à eux, sont des substances humiques et des pigments qui absorbent

les radiations ayant une longueur d'onde entre 300 et 700 nm, soit le rayonnement photosynthétiquement actif (Curtis *et al.*, 1992). La localisation des dommages causés par la lumière dépend des sensibilisateurs en question. Pour les longueurs d'ondes entre 300 et 700 nm, la membrane cytoplasmique est la cible la plus courante pour les sensibilisateurs endogènes et exogènes, bien que l'ADN est endommagé par des sensibilisateurs exogènes avec une affinité pour l'ADN (Curtis *et al.*, 1992). Le dommage de la membrane a un impact important, puisqu'il augmente la sensibilité aux variations du pH et à une concentration de sel élevée. Aucune équation décrivant l'effet fortifiant des concentrations élevées d'oxygène dissous à la photo-oxidation et de l'augmentation de la sensibilité avec le pH causé par des dommages de la membrane cytoplasmique n'a été trouvée.

Chapra (1997) et Struck *et al.* (2008) ont utilisé l'équation suivante pour calculer le taux de désinfection par la lumière solaire :

$$b_l = \alpha_l \times I \quad (2.16)$$

$b_l$  : taux de désinfection solaire ( $j^{-1}$ )

$\alpha_l$  : constante de proportionnalité de la désinfection solaire ( $0.006 \text{ m}^2 \text{ W}^{-1} \text{ j}^{-1}$ , (Struck *et al.*, 2008))

$I$  : intensité de la lumière solaire ( $\text{W m}^{-2}$ )

La lumière solaire entrant dans la colonne d'eau subit différentes influences. Premièrement, une fraction est réfléchiée par la surface de l'eau. Le facteur de réflexion est difficile à déterminer puisque la distribution d'angles des ondes entrantes est complexe. S'il est postulé que la radiation est la même pour tous les angles d'ondes entrantes, un facteur de réflexion de 6.6% est attendu. Pour un ciel nuageux, le facteur de réflexion peut être d'approximativement 5.2% (Kirk, 1983).

Une deuxième influence non négligeable est la végétation. Struck *et al.* (2008) ont estimé que, dans un marais épurateur avec une végétation dense, seulement 10% de la lumière atteint la surface pendant 6 heures par jour. La végétation n'a pas une grande influence pendant les autres 18 heures. Dans la colonne d'eau, la radiation est absorbée et réfléchiée par les différentes composantes du système aquatique : l'eau, la matière en suspension (le phytoplancton, les particules organiques et inorganiques) et la matière organique dissoute. Le coefficient d'extinction spécifique de la lumière dans l'eau varie de  $0.0144 \text{ m}^{-1}$  pour une longueur d'onde de 430 nm à  $0.105 \text{ m}^{-1}$  pour une longueur d'onde de 310 nm et de  $0.650 \text{ m}^{-1}$  pour une longueur d'onde de 700 nm (Kirk, 1983). Le coefficient d'extinction spécifique de la MeS ( $\text{mg L}^{-1}$ ) est de  $0.55 \text{ m}^{-1} \times \text{MeS}$  (Chapra, 1997).

$$I = (1 - f_r) \times I_0 \times e^{-K_e H} \quad (2.17)$$

- I : intensité de la lumière solaire ( $\text{W m}^{-2}$ )
- $I_0$  : intensité de la lumière solaire à la surface ( $\text{W m}^{-2}$ )
- $f_r$  : facteur de réflexion (-)
- $K_e$  : coefficient d'extinction ( $\text{m}^{-1}$ )
- H : longueur du trajet de la lumière (m)

### 2.3.4 La protection des bactéries attachées aux particules contre la radiation

La MeS interfère avec l'efficacité de la désinfection par la lumière solaire par l'extinction. Le résultat est une mortalité plus lente d'une fraction des bactéries. Ce phénomène est nommé *tailing*. La mesure de l'extinction seule ne permet pas de modéliser l'inactivation parce qu'une fraction des bactéries attachées aux particules est protégée de la lumière ou reçoit une intensité plus faible (Madge & Jensen, 2006). De plus, le degré avec lequel les particules interfèrent avec l'intensité de la radiation dépend de la largeur des particules. Plusieurs auteurs (Brookes *et al.*, 2004; Madge & Jensen, 2006; Wang *et al.*, 2006; Winward *et al.*, 2008; Emerick *et al.*, 2000) ont rapporté une survie prolongée des bactéries attachées aux particules. Celles attachées aux particules d'un diamètre plus large survivent plus longtemps, ce qui cause le *tailing* (Figure 2.9). Fenner & Komvuschara (2005) partent du principe qu'une fraction des bactéries attachées à une certaine classe de particules sont protégées de la lumière et que cette fraction est plus élevée pour les particules plus grandes. Wang *et al.* (2006) ont mesuré l'efficacité de désinfection (dose d'UV :  $20 \text{ mJcm}^{-2}$ ) des coliformes fécaux pour quatre classes de particules. Le Tableau 2.5 présente l'inactivation des bactéries attachées à ces classes et l'inactivation des bactéries en suspension. La fraction des bactéries attachées aux particules ayant un diamètre supérieur à  $10 \mu\text{m}$  qui ne sont pas influencées par la lumière est de 7.1%, alors que ce taux est inférieur pour les particules plus fines.

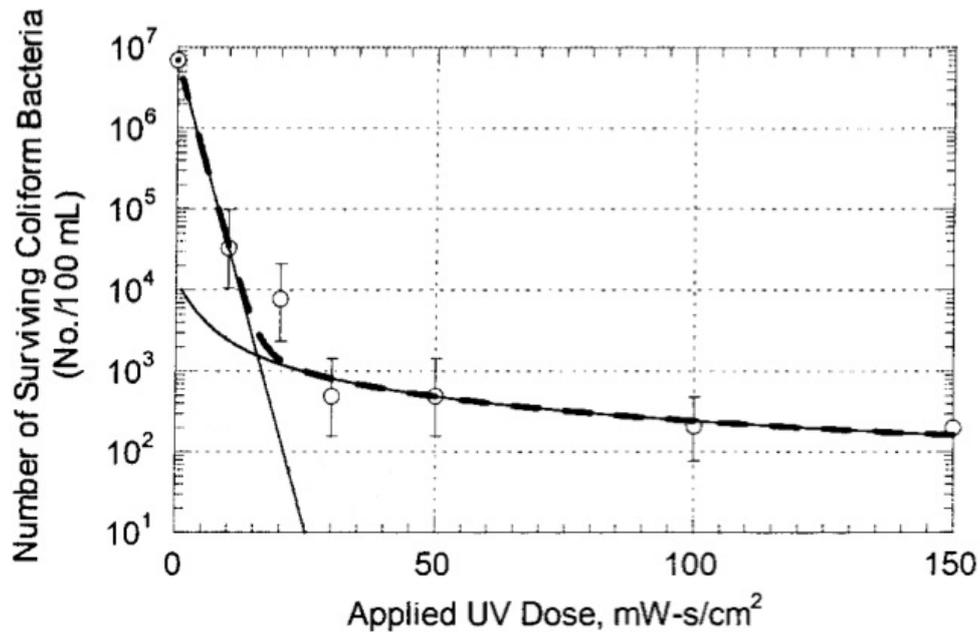


FIGURE 2.9 – Nombre de coliformes survivant en fonction de la dose d'UV appliquée. Le phénomène *tailing* causé par la protection des bactéries attachées aux particules contre la radiation est illustrée (Emerick *et al.*, 2000).

Tableau 2.5 – Inactivation des coliformes fécaux selon la classe de particules et des coliformes fécaux en suspension, exprimée par la fraction de bactéries survivantes sur le nombre de bactéries initiales ( $N_t/N_0$ ) (Wang *et al.*, 2006).  $F$  représente la fraction influencée par la lumière.

Classe de particules ( $\mu\text{m}$ )	$-\log(N_t/N_0)$	$N_t/N_0$	$F$
>10	1.148	7.115E-02	0.9289
5-10	2.765	1.717E-03	0.9983
2-5	4.017	9.607E-05	0.9999
<2	5.217	6.062E-06	0.9999
en suspension	5.28	5.248E-06	1.0

# Chapitre 3

## Les méthodes d'énumération d'*E. coli*

En général, trois méthodes pour quantifier la concentration d'*E. coli* dans un échantillon peuvent être distinguées : l'énumération en milieu de croissance, la méthode du nombre le plus probable (NPP) et des mesures de l'activité enzymatique.

### 3.1 L'énumération en milieu de croissance et la méthode du NPP

L'énumération en milieu de croissance est une méthode standardisée et a été utilisée par plusieurs auteurs (Mahler *et al.*, 2000; Borst & Selvakumar, 2003; Jamieson *et al.*, 2005; Schillinger & Gannon, 1985; Krometis *et al.*, 2007; Davies & Bavor, 2000; Boutilier *et al.*, 2009; Henry & Dillaha, 2004; Guber *et al.*, 2007; Struck *et al.*, 2008). Cette méthode est basée sur le principe que, dans un milieu spécifique, chaque bactérie se multiplie en formant une colonie. Un échantillon avec *E. coli* est incubé dans une gélose nutritive sur des boîtes de pétri. Pendant l'incubation, chaque *E. coli* se multiplie en formant une colonie. Les colonies sont énumérées après l'incubation et le nombre d'*E. coli* est rapporté en UFC (Unités Formant une Colonie) par 100 ml d'échantillon. La méthode du NPP a été utilisée par plusieurs auteurs (Fries *et al.*, 2006; Cizek *et al.*, 2008; Karim *et al.*, 2004; Hamilton & Luffman, 2009; Jeng *et al.*, 2005; Characklis *et al.*, 2005). Elle est basée sur l'effet de dilution d'un échantillon et la probabilité de détecter une bactérie dans des dilutions plus élevées. Cinq répétitions de trois dilutions sont préparées à partir d'un échantillon et un substrat décomposé spécifiquement par *E. coli* est ajouté à chaque volume. L'utilisation du substrat par *E. coli* permet de conclure la présence d'*E. coli* dans chaque dilution. Une

méthode statistique permet de calculer le NPP pour la détection d'*E. coli* dans différentes dilutions.

Une énumération en milieu de croissance ou la méthode du NPP sous-estiment le nombre de bactéries attachées aux particules. Les bactéries attachées aux particules ne forment qu'une colonie par particule, alors qu'il peut y avoir plusieurs bactéries par particule (Garcia-Armisen & Servais, 2009). Afin de déterminer la concentration totale des bactéries, des techniques physiques ou chimiques ont été appliquées pour disperser les bactéries attachées aux particules. Cependant, certains auteurs (Schillinger & Gannon, 1985; Krometis *et al.*, 2007; Struck *et al.*, 2008; Hamilton & Luffman, 2009; Jeng *et al.*, 2005; Characklis *et al.*, 2005) n'ont pas appliqué une technique de dispersion et ont donc sous-estimé le nombre de bactéries attachées aux particules.

## 3.2 La dispersion des bactéries attachées aux particules

Krometis *et al.* (2009) et Soupir *et al.* (2008) ont testé différentes techniques chimiques et physiques pour disperser les bactéries attachées aux particules. Krometis *et al.* (2009) ont comparé une méthode physique, la sonification, et une méthode chimique, l'agent de surface Tween-85.

La sonification est une méthode connue qui permet la destruction des cellules pour extraire des enzymes ou d'autres substances cellulaires en utilisant une source d'ondes ultrasoniques. Celles-ci créent des turbulences, nommées *eddys*, dans l'eau qui font éclater les cellules si la puissance des ondes est élevée. Lorsque la puissance des ondes est modérée, les turbulences ne font que disperser les particules et les bactéries.

L'agent de surface Tween-85 occupe les sites actifs sur les particules et les bactéries de sorte que les bactéries ne sont plus capable de s'adsorber aux particules.

Krometis *et al.* (2009) ont combiné une sonification (30 s, 40 Hz à 10 ml d'échantillon) et 0.02% de l'agent de surface Tween-85. Ils ont observé que les deux techniques entraînent la dispersion des agrégats de cellules dans de l'eau sans particules. Pour de l'eau contenant des particules, ils concluent que le traitement avec Tween-85 est le plus efficace, soit 17% de plus d'UFC d'*E. coli* comparé à un témoin sans traitement.

Soupir *et al.* (2008) ont comparé deux méthodes physiques, la sonification et l'agitation, et une méthode chimique, l'agent de surface Tween-85. Ils ont fait un traitement de sonification (30 s à 6 min, 50/60 Hz, 55 W), une agitation (10 min) et un traitement de l'échantillon avec l'agent de surface Tween-85 et des combinaisons de ces traitements. Leurs résultats sont comparables aux conclusions de Krometis *et al.* (2009). Le nombre d'*E. coli* énuméré

augmente peu pour de courts traitements de sonification (30 s) et leur nombre diminue pour des traitements plus longs. Après avoir agité les échantillons pendant 10 min, ils ont mesuré 24% de plus de UFC d'*E. coli*. La combinaison de 10 min d'agitation suivi par une dilution dans 1 g/l Tween-85 a augmenté l'UFC de 45%.

### 3.3 La mesure de l'activité enzymatique

*E. coli* produit une enzyme, le GLUase ( $\beta$ -D-glucuronidase), qui hydrolyse le substrat MUGlu (4-méthylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide) en formant le produit fluorescent MU (méthylumbellifère). Cette réaction enzymatique spécifique est la base d'une nouvelle méthode d'énumération d'*E. coli* (Garcia-Armisen *et al.*, 2005; George *et al.*, 2000; Servais *et al.*, 2005). Celle-ci permet d'énumérer le nombre d'*E. coli* à base d'une mesure de l'activité du GLUase. Ce type de mesure se fait en une demie heure (Garcia-Armisen *et al.*, 2005). Plusieurs études ont déjà établi une forte corrélation en échelle log-log entre l'activité du GLUase d'*E. coli* et la concentration d'UFC mesurée (Servais *et al.*, 2005; Garcia-Armisen *et al.*, 2005).

#### 3.3.1 Le protocole de la mesure de l'activité enzymatique

George *et al.* (2000) ont proposé un protocole de mesure du GLUase. Dépendant de la charge en MeS, entre 0 et 100 ml d'échantillon est filtré (pores de  $0.2 \mu\text{m}$ ). Le filtre avec les bactéries est placé dans 17 ml de tampon de phosphate à pH 6.9 et 3 ml d'une solution de MUGlu et de Triton X-100. Le Triton X-100 est un agent de surface qui entraîne la perméabilité des membranes cellulaires de sorte que les enzymes GLUase puissent sortir de la cellule. La concentration de MUGlu finale est de 165 mg/l. La cinétique de Monod de GLUase est saturée pour une telle concentration de MUGlu. La solution avec filtre est incubée à 44°C pendant 30 min. Au 5 min, une aliquote de 2.9 ml est prélevé et le pH est ajusté afin d'être supérieur à 10. Ce pH arrête la réaction par GLUase et la fluorescence du produit de décomposition MU est maximale dans ces conditions. La concentration du produit de décomposition MU est mesurée à l'aide d'une spectroscopie fluorescente. La longueur d'onde d'excitation est de 362 nm et celle d'émission est de 445 nm. L'intensité de fluorescence est calibrée à l'aide de concentrations de MU connues. Les données de l'activité enzymatique sont rapportées en pmol MU libéré par minute par 100 ml d'échantillon.

### 3.3.2 L'induction de l'enzyme GLUase

L'enzyme  $\beta$ -D-glucoronidase est une enzyme inductible. George *et al.* (2000) ont déterminé que l'enzyme GLUase d'*E. coli* est induite dans des eaux douces et des eaux peu polluées.

### 3.3.3 La spécificité : les interférences avec des organismes non-ciblés

L'enzyme GLUase a été trouvée chez plusieurs organismes autres que *E. coli* (George *et al.*, 2000). Des bactéries faussement-positifs pourraient donc influencer la mesure qui ne comprend aucune culture sélective. Fiksdal *et al.* (1997) et George *et al.* (2000) ont conclu qu'il existe une certaine influence des bactéries faussement-positives, mais que celle-ci est négligeable.

### 3.3.4 L'activité enzymatique d'*E. coli*

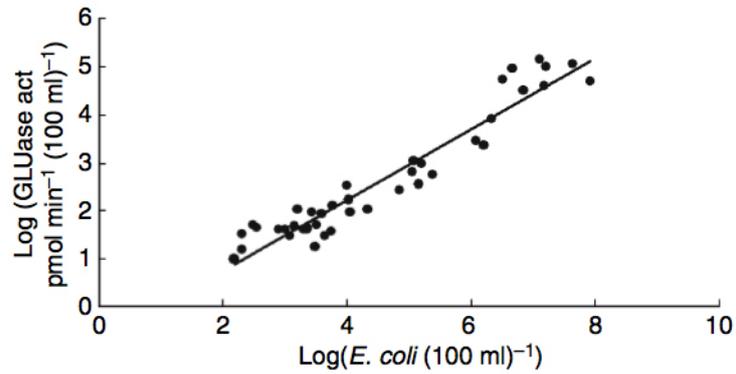
L'Équation 3.1 donne la régression linéaire entre le log activité du GLUase (pmol MU min<sup>-1</sup> 100 ml<sup>-1</sup>) et le log nombre d'*E. coli* par 100 ml. Dans cette équation, le coefficient  $a$  mesuré est inférieur à 1 lorsque le nombre d'*E. coli* est mesuré à partir d'une énumération en milieu de croissance ou la méthode du NPP. Un coefficient  $a$  inférieur à 1 signifie que l'activité enzymatique par *E. coli* mesuré avec ces méthodes augmente si la concentration d'*E. coli* diminue. Un coefficient  $a$  égal à 1 signifierait que l'activité enzymatique par *E. coli* est constante pour différents échantillons avec différentes concentrations d'*E. coli*.

$$\log(\text{activité de GLUase}) = a \times \log(E. coli/100 \text{ ml}) + b \quad (3.1)$$

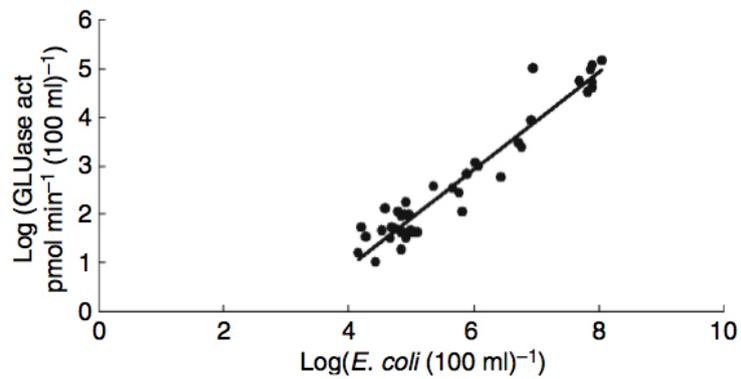
Garcia-Armisen *et al.* (2005) et George *et al.* (2000) ont démontré que la pente inférieure à 1 est causée par une présence plus grande de bactéries actives mais non cultivables dans des eaux peu polluées. La méthode d'énumération en milieu de croissance ou la méthode du NPP ne mesurent que les bactéries cultivables et non les bactéries actives mais non cultivables. George *et al.* (2000) ont démontré que le coefficient  $a$  d'une série de dilution se rapproche de 1 (Équation 3.2). Garcia-Armisen *et al.* (2005) ont quant à eux démontré que la pente de la relation log-log entre l'activité du GLUase et le nombre d'*E. coli* par 100 ml se rapproche de 1 lorsque la concentration d'*E. coli* est mesurée avec la procédure de DVC-FISH (*direct viable count - fluorescent in situ hybridisation*) qui compte toutes les bactéries (Figure 3.2). L'activité par compte totale d'*E. coli* est donc constante indépendamment

de la concentration d'*E. coli*.

$$\text{activité de GLUase} = 10^b \times (E. coli/100 \text{ ml})^1 \quad (3.2)$$



**FIGURE 3.1** – Régression linéaire log-log entre l'activité du GLUase et *E. coli* de l'eau de rivière et de l'eau usée. Les coefficients  $a$  et  $b$  de l'Équation 3.1 sont respectivement 0.731 et -0.663 (Garcia-Armisen *et al.*, 2005).



**FIGURE 3.2** – Régression log-log linéaire entre l'activité du GLUase et *E. coli* mesurée à l'aide de la procédure de DVC-FISH de l'eau de rivière et de l'eau usée. Les coefficients  $a$  et  $b$  de l'Équation 3.1 sont respectivement 0.994 et -3.053 (Garcia-Armisen *et al.*, 2005).

Deuxième partie

Matériel et méthodes



# Chapitre 5

## La méthode d'énumération en milieu de croissance

### 5.1 La méthode standardisée : Coliscan Easygel

Coliscan Easygel est une méthode commerciale d'énumération de coliformes totaux et d'*E. coli* d'échantillons d'eau provenant de l'environnement et de l'eau potable. Les bactéries sont incubées dans une gélose nutritive sur des boîtes de pétri. Les boîtes de pétri ont un fond réactif qui entraîne l'épaississement de la gélose. La méthode a été développée par Micrology Laboratories et est brevetée (Micrologylabs, 2010).



FIGURE 5.1 – Bouteille de gélose de Coliscan Easygel.

Les coliformes sont membres de la famille des Enterobacteriaceae. Deux groupes se distinguent : les coliformes fécaux et les coliformes non-fécaux. La croissance des coliformes fécaux se fait à une température de 44.5°C.

Le médium Coliscan Easygel contient deux sucres liés à un colorant différent. Le premier sucre-colorant donne la couleur rose-mauve à la colonie lorsque coupé par l'enzyme  $\beta$ -galactosidase. L'enzyme  $\beta$ -galactosidase est produit par tous les coliformes incluant *E. coli*.

Le deuxième sucre-colorant donne la couleur bleu-verte à la colonie lorsque coupé par l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase. Seul *E. coli* produit les deux enzymes ( $\beta$ -galactosidase et  $\beta$ -glucuronidase) et donc donne une couleur mauve - bleue à la colonie. Les autres bactéries ne sont pas colorées ou ont une couleur brune, verte ou bleu clair.



**FIGURE 5.2** – Une boîte de pétri avec des colonies mauves-bleues d'*E. coli*, des colonies roses-mauves de coliformes totaux et quelques colonies brunes de bactéries non-identifiées.

L'analyse d'un échantillon se fait en trois étapes principales :

1. Les échantillons sont prélevés dans le bassin avec des bouteilles en plastique d'un litre. Les bouteilles sont lavées avec un savon anti-bactérien, rincées à l'eau chaude, puis trois fois à l'eau désionisée. Les échantillons sont gardés à 4°C pendant un maximum de 24 h avant l'analyse.
2. La méthode d'ensemencement comprend différentes étapes : la dilution, l'inoculation, la solidification de la gélose et l'incubation.

La dilution est faite dans une eau isoionique afin de minimiser le changement des conditions environnementales des bactéries. L'eau d'échantillons filtrés à 0.45  $\mu\text{m}$  est utilisée comme eau de dilution. Des dilutions de 1, 10, 100, 1000 et 10000 fois sont utilisées afin d'obtenir une bonne densité de bactéries. L'eau de dilution est testée comme témoin.

L'inoculation comprend trois étapes, (a) 1 à 5 ml d'un échantillon pur ou dilué est ajouté à la gélose dans sa bouteille, (b) la gélose inoculée est homogénéisée par agitation, puis (c) est versée dans la boîte de pétri. Avant l'incubation, les boîtes sont

reposées pendant environ 45 minutes pour laisser épaissir la gélose. L'incubation est faite à 35°C pendant 24 h. Un récipient d'eau est placé au fond de l'incubateur pour maintenir l'humidité de l'air de sorte que les boîtes ne se dessèchent pas.

3. L'énumération se fait avec un crayon. Chaque colonie comptée est marquée pour éviter des sous- ou surestimations. Le nombre d'*E. coli* (les colonies mauves-bleues foncées) et de coliformes totaux (les colonies mauves-bleues foncées et les colonies roses-rouges) sont rapportés en UFC (Unité Formant une Colonie) par 100 ml.

## 5.2 La décantation des particules à l'aide d'une centrifugation

La centrifugeuse Biofuge Pico de Heraeus Instruments a été utilisée. Celle-ci est compatible avec des microtubes de 1.5 ml. Le facteur d'amplification de la gravitation G et le temps de centrifugation sont adaptables. Le G minimal de l'instrument est 2000, donc une centrifugation à  $G \times t$  de  $500 G \times \text{min}$  se compose d'une centrifugation à 2000 G pendant 15 s. Après la centrifugation, 1 ml de surnageant est utilisé comme inoculant (Figure 5.3).



**FIGURE 5.3** – Microtubes avec 1.5 ml et 0.5 ml d'échantillon après l'extraction du surnageant. La différence de hauteur de l'échantillon dans les deux microtubes est d'environ 1.3 cm.

## 5.3 La dispersion des bactéries attachées aux particules : la sonification

La dispersion des bactéries attachées aux particules a été effectuée avec la sonde de sonification d'un *mastersizer* (Mastersizer Micro, Malvern). Les ultrasons émis par la sonde ont

une fréquence de 40 kHz. La puissance d'un traitement dépend du déplacement de la sonde ce qui est un paramètre de l'appareil. Il n'était pas possible de transformer le déplacement de la probe en une unité d'énergie qui exprime la puissance. La durée du traitement est le deuxième paramètre à choisir.

## 5.4 La distribution des données d'énumération des bactéries

### 5.4.1 La distribution des populations microbiennes

Pour la plupart des analyses chimiques, la distribution des résultats est normale. Par contre, la distribution d'énumération des bactéries n'est pas nécessairement symétrique (Eaton *et al.*, 2005). La courbe de fréquence d'une énumération en milieu de croissance a une distribution asymétrique positive. Il y a donc plusieurs valeurs basses et quelques valeurs élevées. Plusieurs techniques statistiques nécessitent une distribution normale des données. Il est donc nécessaire de convertir les données afin d'obtenir une distribution normale. Celle-ci peut être obtenue en convertissant les valeurs en leurs valeurs logarithmiques correspondantes.

### 5.4.2 La tendance centrale d'une distribution asymétrique

Lorsque la distribution des valeurs logarithmiques d'une distribution asymétrique est normale, les données originales ont une distribution log-normale. La meilleure estimation de la tendance centrale de données distribuées log-normale est la moyenne géométrique (Eaton *et al.*, 2005) :

$$\log \bar{x}_g = \frac{\sum_i \log(x_i)}{n} \quad (5.1)$$

$$\bar{x}_g = \sqrt[n]{(x_1) \dots (x_n)} \quad (5.2)$$

L'estimation de l'écart-type géométrique devient :

$$\sigma_g = \sqrt{\frac{\sum_i (\log \bar{x}_g - \log x_i)^2}{n - 1}} \quad (5.3)$$

La distribution d'une population microbienne est supposée log-normale. La distribution des valeurs logarithmiques est normale avec la moyenne  $\bar{x}_g$  et la variation  $\sigma_g^2 : N(\log \bar{x}_g, \sigma_g^2)$ .

### 5.4.3 La distribution des mesures d'énumération en milieu de croissance

La méthode d'énumération d'*E. coli* en milieu de croissance nécessite l'utilisation de dilutions pour obtenir un nombre raisonnable de colonies par pétri. Une plus grande dilution mènera à un écart-type arithmétique plus large. C'est-à-dire que l'écart-type de l'énumération est multiplié par le facteur de dilution. Par exemple, l'écart-type d'une énumération sans dilution de 5, 10 et 20 UFC est de 7.64 UFC, mais aurait été de 764 UFC si une dilution d'un facteur 100 avait été utilisée. Cependant, l'écart-type géométrique de l'énumération sans ou avec dilution est 2 (sans unités). La moyenne géométrique  $\bar{x}_g$  est respectivement de 1 et de 3 pour les deux dilutions et  $\sigma_g$  est de 0.301 pour les deux mesures. L'écart-type géométrique permet de comparer plus facilement les résultats d'une méthode d'énumération en milieu de croissance.

# Chapitre 6

## La mesure de l'activité enzymatique d'*E. coli*

*E. coli* produit l'enzyme GLUase ( $\beta$ -D-glucuronidase) qui hydrolyse le substrat MUGlu (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide) en formant le produit fluorescent MU (methylumbellifère). L'activité enzymatique d'*E. coli* est corrélée avec la concentration d'UFC mesurée en échelle log-log et est égale au taux de production du produit de décomposition MU. La méthode de la mesure de l'activité enzymatique décrit par Garcia-Armisen *et al.* (2005) est utilisée comme base.

La méthode est composée de trois étapes :

1. Une filtration de l'échantillon pour concentrer les bactéries sur le filtre.
2. L'incubation d'*E. coli* sur le filtre dans un milieu tamponné avec le substrat MUGlu. *E. coli* décompose le substrat en formant le produit fluorescent MU.
3. La spectroscopie fluorescente de MU pour mesurer la concentration du MU produit.

### 6.1 La filtration

Un filtre en microfibre de verre (47 mm $\phi$ , 1.2  $\mu$ m pores, Whatman) et un filtre à membrane de cellulose (47 mm $\phi$ , 0.45  $\mu$ m pores, Whatman) sont combinés pour la filtration. Le premier filtre empêche le colmatage et retient les grandes particules tandis que le deuxième retient les particules fines et les bactéries. Selon la concentration de MeS, entre 0 et 100 ml d'échantillon est filtré. La filtration doit être faite en 10 minutes pour éviter la détérioration du filtre.

## 6.2 L'incubation

**Protocole A (Annexe C)** Les deux filtres sont placés dans un erlenmeyer de 150 ml dans 17 ml de tampon de phosphate (12.5 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ayant un pH de 6.9 auquel 3 ml d'une solution de MUGlu (Biosynth) et Triton X-100 est ajoutée (55 mg MUGlu et 20  $\mu\text{l}$  de Triton X-100 dans 50 ml d'eau désionisée). La concentration finales de MUGlu est de 165 mg/l. L'erlenmeyer est tenu dans un bain chaud à 44°C pendant l'essai.

Pendant 25 minutes, une aliquote de 3 ml est prélevée au 5 minutes et 51  $\mu\text{l}$  d'une solution de NaOH (3 mol/l NaOH) y est ajoutée pour ajuster le pH à 10.6. La solution dans l'erlenmeyer est homogénéisé à la main avant de prélever les aliquotes. Ensuite, l'aliquote est filtré (Millex-HV, Millipore) à 0.45  $\mu\text{m}$  afin de retenir des particules qui pourraient interférer avec la mesure de la fluorescence. Avant l'analyse, les aliquotes sont gardés au noir à 4°C dans des tubes en verre.

**Protocole B (Annexe C)** Les deux filtres sont placés dans un erlenmeyer de 150 ml dans 34 ml de tampon de phosphate (12.5 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ayant un pH de 6.9. Après 10 min, 17 ml du surnageant est transféré à un autre erlenmeyer et 3 ml d'une solution de MUGlu (Biosynth) et Triton X-100 est ajoutée à chaque erlenmeyer (55 mg MUGlu et 20  $\mu\text{l}$  de Triton X-100 dans 50 ml d'eau désionisée). La concentration finales de MUGlu est de 165 mg/l. Les deux erlenmeyers sont tenus dans un bain chaud à 44°C pendant l'essai.

Pendant 25 minutes, une aliquote de 3 ml est prélevée au 5 minutes des deux erlenmeyers et 51  $\mu\text{l}$  d'une solution de NaOH (3 mol/l NaOH) y est ajoutée pour ajuster le pH à 10.6. La solution dans l'erlenmeyer est homogénéisé à la main avant de prélever les aliquotes. Ensuite, l'aliquote est filtré (Millex-HV, Millipore) à 0.45  $\mu\text{m}$  afin de retenir des particules qui pourraient interférer avec la mesure de la fluorescence. Avant l'analyse, les aliquotes sont gardés au noir à 4°C dans des tubes en verre.

## 6.3 La spectroscopie fluorescente

La fluorescence de MU est mesurée à une longueur d'ondes d'excitation de 362 nm et une longueur d'ondes d'émission de 445 nm (Garcia-Armisen *et al.*, 2005).

**Le spectrofluoromètre à filtre** Le spectrofluoromètre à filtre (Turner Quantech, Barnstead, Thermolyne Corporation) avec un filtre à bande étroite de 360 nm pour l'excitation et de 450 nm pour l'émission est utilisé. Le filtre à 360 nm a une plage de transmission de 20 nm autour de sa valeur moyenne et le filtre de 450 nm a une plage de transmission de

5 nm. La transmission d'un filtre à bande étroite est maximale au milieu de la plage de transmission et est typiquement inférieure à 1% aux limites de la plage de transmission.

**Le spectrophotomètre de fluorescence** Le spectrophotomètre de fluorescence (Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer, Varian) à prisme de diffraction est utilisé à une longueur d'ondes d'excitation de 362 nm et une longueur d'ondes d'émission de 445 nm.

**Les cuvettes** Des cuvettes en verre optique (plage utilisable : 334 à 2500 nm) et en quartz (plage utilisable : 170 à 2700 nm) sont utilisées. Les cuvettes sont lavées à l'eau et au méthanol. Le méthanol est recommandé, puisque la solubilité de MU est meilleure avec l'utilisation du méthanol (Merck, 1996).

# Chapitre 7

## Logiciel de modélisation WEST

WEST (Word wide Engine for Simulation, Training and automation) est un logiciel commercial de modélisation et de simulation (MOSTforWATER, Kortrijk, Belgique). WEST permet de développer des modèles et de simuler des systèmes qui peuvent être décrits par des équations différentielles et algébriques. Il est principalement utilisé pour simuler des traitements d'eaux usées, des réseaux d'égouts et la qualité de rivières. WEST se compose de trois modules principales : la base de modèles, l'environnement de modélisation et l'environnement d'expérimentation. Figure 7.1 présente la construction fonctionnelle du logiciel WEST et les trois modules.

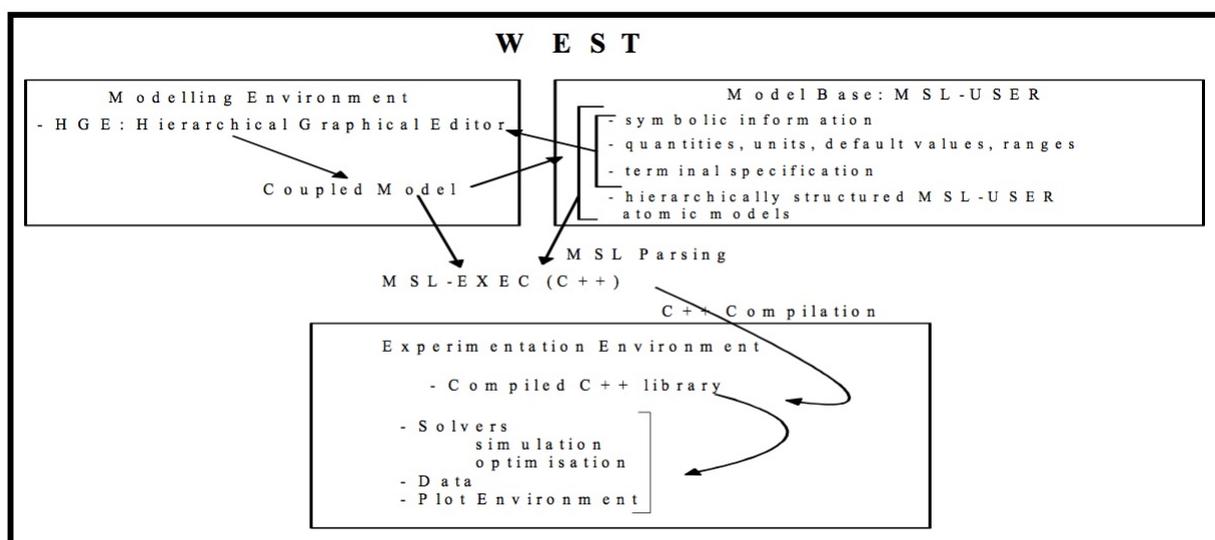


FIGURE 7.1 – La construction fonctionnelle de WEST (Vanhooren *et al.*, 2003).

## 7.1 La base de modèles

L'ensemble des modèles du logiciel WEST est implanté dans la base de modèles écrite en langage MSL-USER (Model Specification Language). MSL est un langage de modélisation et non de programmation, c'est-à-dire, il est déclaratif. MSL ne donne donc pas de solution sur la façon dont le modèle doit être résolu, mais il présente seulement les équations des modèles. Le compilateur de WEST est capable de lire le langage MSL-USER et de le réécrire en un langage de programmation qui tient compte de la façon dont le modèle doit être résolu. Pour le modélisateur, il suffit de comprendre le langage de MSL-USER pour décrire un modèle.

Les équations d'un modèle sont regroupées en classes. Ces classes consistent de six sections. La section *interface* définit les variables qui entrent et qui sortent du modèle par les *terminals*. Les paramètres sont définis dans la section *parameters*. Ceux-ci sont fixés au début d'une simulation et ne changent plus pendant l'expérience. Les variables indépendantes, comme le temps, sont définis dans la section *independent* tandis que les variables dépendantes se trouvent sous la section *state*. La partie qui comporte les équations, se compose de deux sections. La section *initials* permet d'écrire les équations qui ne doivent être calculés qu'au début d'une simulation. Les autres équations algébriques et différentielles sont écrites dans la section *equations*.

La hiérarchie de la base des modèles permet une ordonnance structurée (Figure 7.2). En plus, de cette manière, des parties communes de différents modèles ne doivent être écrites qu'une seule fois et peuvent être réutilisées.

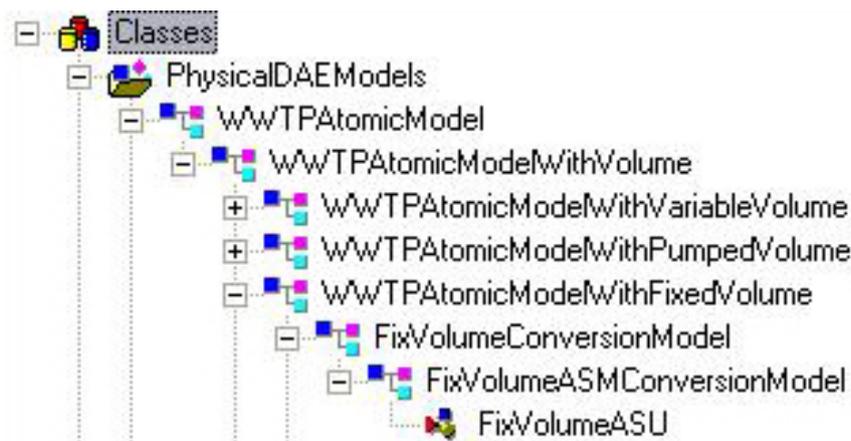


FIGURE 7.2 – Exemple de la hiérarchie des classes d'un modèle dans WEST.

## 7.2 L'environnement de modélisation

L'environnement de modélisation est développé pour pouvoir construire des systèmes complexes d'une manière visuelle. Différents composants comme des réacteurs, des décanteurs, des contrôleurs, des capteurs, etc. sont connectés dans cette interface graphique. Chaque composant a une ou plusieurs entrées et sorties, les *terminals*. Il y a deux types de *terminals* : ceux qui communiquent l'information de données provenant des capteurs, des contrôleurs, etc. et ceux qui communiquent des flux de masse entre les composants. Un nouveau composant a été conçu pour cette étude : le bassin d'orage (Figure 7.3). Les deux *terminals* considérés communiquent les flux de masse à l'entrée et à la sortie du bassin.

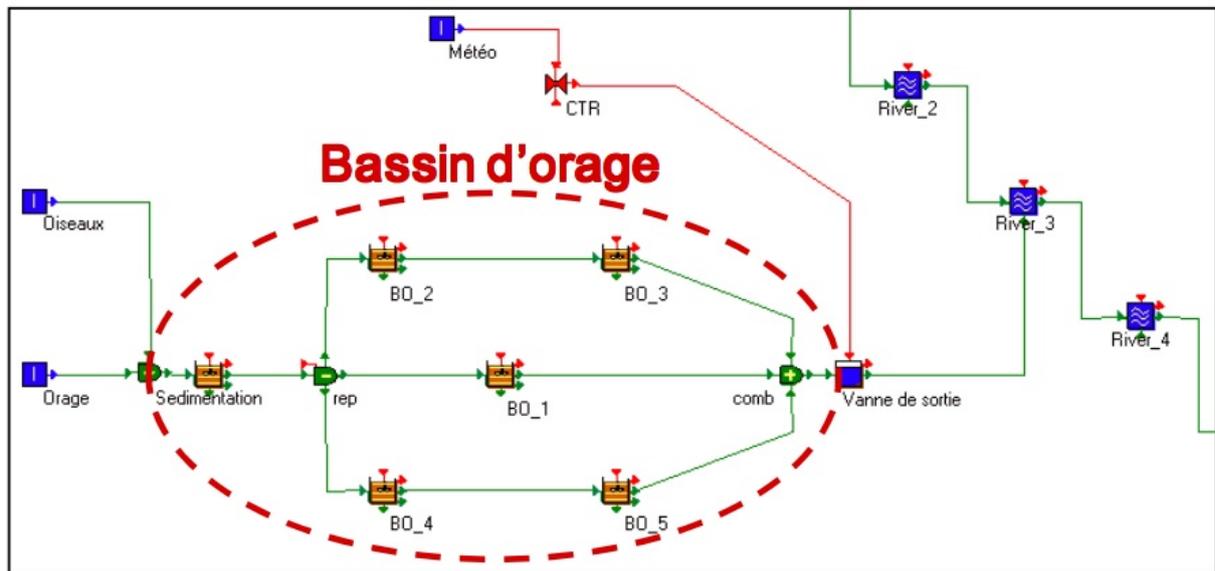


FIGURE 7.3 – L'environnement de modélisation de WEST, un exemple possible d'un modèle de bassin d'orage hétérogène.

## 7.3 L'environnement d'expérimentation

Les simulations sont effectuées dans l'environnement d'expérimentation de WEST. Dans cet environnement, les paramètres, les conditions initiales et les entrées du modèle sont définis. Quatre types de paramètres peuvent être différenciés dépendant du modèle : (a) des paramètres physiques (des surfaces, des hauteurs, des volumes, etc.) ; (b) des paramètres cinétiques, qui définissent les vitesses des équations cinétiques (des taux de croissance, etc.) ; des paramètres stœchiométrique, qui définissent les relations stœchiométrique entre

les différents composants (des fractions, des coefficients de rendement, etc.) et des paramètres de réglage des contrôleurs.

La solution temporelle du modèle est calculée à l'aide d'un intégrateur à choisir. L'intégrateur Runge-Kutta 4 avec un pas de temps variable, RK4ASC, sera utilisé dans ce projet. Les paramètres utilisés de l'intégrateur sont énumérés dans le Tableau 7.1.

Finalement, les sorties du modèle peuvent être visualisées graphiquement ou numériquement.

**Tableau 7.1** – Les paramètres de l'intégrateur RK4ASC de WEST.

Paramètre	Valeur
<i>initial step size</i>	$10^{-2}$
<i>accuracy</i>	$10^{-6}$
<i>minimum step size</i>	$10^{-4}$
<i>maximum step size</i>	$10^{-2}$

## Troisième partie

### Résultats - méthodes de quantification d'*E. coli*

# Chapitre 8

## La méthode d'énumération en milieu de croissance

Ce chapitre présente les résultats de la campagne d'échantillonnage d'*E. coli* et des coliformes fécaux dans le bassin d'orage à partir de la méthode d'énumération d'*E. coli* en milieu de croissance. Des essais de séparation des bactéries attachées aux particules de celles en suspension et des essais de dispersion des bactéries attachées aux particules sont discutés. La technique de séparation des particules avec les bactéries attachées permet de mesurer la concentration d'*E. coli* en suspension et la technique de dispersion des bactéries attachées aux particules permet de mesurer la concentration totale en *E. coli* dans un échantillon. La différence entre ces deux concentrations donne la concentration d'*E. coli* attaché aux particules. La fraction des bactéries attachées aux particules peut être calculée à partir de ces données.

### 8.1 Campagne d'échantillonnage

Les résultats d'énumération d'*E. coli* et de coliformes totaux de sept campagnes d'échantillonnage pendant l'été 2008 et 2009 sont présentés dans les Tableaux 8.1 et 8.2. Les mesures de l'été 2008 ont été faites par Émilie Berrouard et celles de l'été 2009 par Leendert Vergeynst. Par temps sec, en général, la concentration d'*E. coli* varie entre  $10^2$  et  $10^3$  UFC/100ml et la concentration de coliformes totaux entre  $10^3$  et  $10^4$  UFC/100ml. La concentration à la sortie est entre 1 à 4.5 fois plus élevée qu'à l'entrée pour les coliformes totaux et entre 1 à 3 fois plus élevée pour *E. coli*. Dans certains cas, *E. coli* n'a pas été détecté à l'entrée, mais l'a été à la sortie. Le bassin fonctionne donc comme une source de coliformes totaux par temps sec. Par temps pluvieux, la concentration de coliformes

totaux varie entre  $10^4$  et  $10^6$  UFC/100ml et celle d'*E. coli* entre  $10^2$  et  $10^4$  UFC/100ml. Cette concentration est environ 10 et 100 fois supérieure à celle par temps sec pour *E. coli* et les coliformes totaux respectivement. Il n'est pas possible d'établir une tendance quant à la concentration à la sortie et à l'entrée par temps de pluie, puisqu'il y a une manque de données. Les concentrations d'*E. coli* mesurées pendant cette campagne d'échantillonnage se trouvent dans la plage des concentrations d'*E. coli* dans les eaux de ruissellement rapportées dans la littérature (Chapitre 2). L'écart-type géométrique des énumérations d'*E. coli* varie entre 0.04 et 0.33 et l'écart-type géométrique des énumérations des coliformes totaux varie entre 0.01 et 0.52.

**Tableau 8.1** – Résumé du Tableau A.1 des résultats d'énumération d'*E. coli* et des Coliformes totaux par temps sec dans le bassin d'orage avec la sortie ouverte.

Évènement / échantillon	<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)		coliformes totaux (log UFC/100ml)	
	Moyenne	Écart-type	Moyenne	Écart-type
20080728				
Entrée Composite	2.10	0.28	2.91	0.01
Sortie Composite			3.20	
20080818				
Entrée Composite	3.13	0.04		
Sortie Composite	3.16	0.07		
20090625				
Entrée Composite	2.29	0.27	2.53	0.52
Sortie Composite	2.80	0.18	3.08	0.24
20090707				
Entrée Composite	<1.37		<1.37	
Sortie Composite	2.42	0.13		
20090707				
Entrée Ponctuelle	<1.37		<1.37	
Sortie Composite	2.42	0.13		
20091008				
Entrée Ponctuelle	<1.77		2.97	0.14
Sortie Composite	2.38	0.33	3.64	0.11

**Tableau 8.2** – Résumé du Tableau A.2 des résultats d'énumération d'*E. coli* et des Coliformes totaux par temps de pluie dans le bassin d'orage avec la sortie fermée.

Évènement / échantillon	<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)		coliformes totaux (log UFC/100ml)	
	Moyenne	Écart-type	Moyenne	Écart-type
20090918				
Entrée Composite	2.74	0.21	>4.29	
20090923				
Entrée Composite	4.40	0	>6.05	
Sortie Composite	<3.70		4.60	0.08

## 8.2 La décantation des particules par centrifugation

Afin de pouvoir mesurer la concentration des bactéries en suspension, il faut utiliser une technique de séparation des particules avec les bactéries attachées. Il existe deux techniques : la filtration et la centrifugation.

Une première technique, la filtration, est la technique la plus facile à effectuer. Des bactéries ont en général des dimensions de 1 à 3  $\mu\text{m}$ . Une filtration à 5  $\mu\text{m}$  sépare les bactéries et les particules de moins de 5  $\mu\text{m}$  des particules de plus de 5  $\mu\text{m}$ . Cependant, les particules de moins de 5  $\mu\text{m}$  ne sont pas retenues sur le filtre. Ces particules pourraient attacher une fraction non-négligeable des bactéries. En plus, les bactéries en suspension pourraient être retenues sur le filtre suite au colmatage. La filtration n'est donc pas une technique adéquate.

Une deuxième technique, la centrifugation, est plus difficile à utiliser, mais permet de séparer les particules et les bactéries à base de leur dimension et de leur densité. La loi de Stokes (Équation 8.1) stipule que la vitesse de chute d'une particule augmente avec la différence entre la densité de la particule et celle du fluide et avec le diamètre de la particule élevé au carré.

La distance parcourue par une particule pendant une centrifugation est linéaire avec le facteur d'amplification de la gravitation appliquée et le temps de décantation. Cette distance de décantation peut être exprimée en  $G \times t$ , avec  $G$  le facteur d'amplification de la gravité  $g$  (9.81  $\text{m/s}^2$ ) et  $t$  le temps de décantation en minutes (Équation 8.2).

La décantation des bactéries est négligeable par rapport à la décantation des particules pour des  $G \times t$  faibles. Par exemple, à 4°C et un  $G \times t$  de 500  $g \times \text{min}$ , une particule ayant une densité de 1.5  $\text{g/cm}^3$  et un diamètre de 1  $\mu\text{m}$  décante de 0.52 cm et une bactérie ayant

une densité de 1.01 g/cm<sup>3</sup> et un diamètre de 2 μm décante de 0.04 cm (Équation 8.1).

$$V_s = \frac{(\rho_p - \rho_f) G g \phi^2}{18 \mu} \quad (8.1)$$

$$\Delta x = a (G \times t) \quad (8.2)$$

$V_s$  : la vitesse de chute (m/s)

$\rho_p$  : la densité de la particule (kg/m<sup>3</sup>)

$\rho_f$  : la densité du fluide (kg/m<sup>3</sup>)

$\phi$  : le diamètre de la particule (m)

$g$  : la gravité (9.81 m/s<sup>2</sup>)

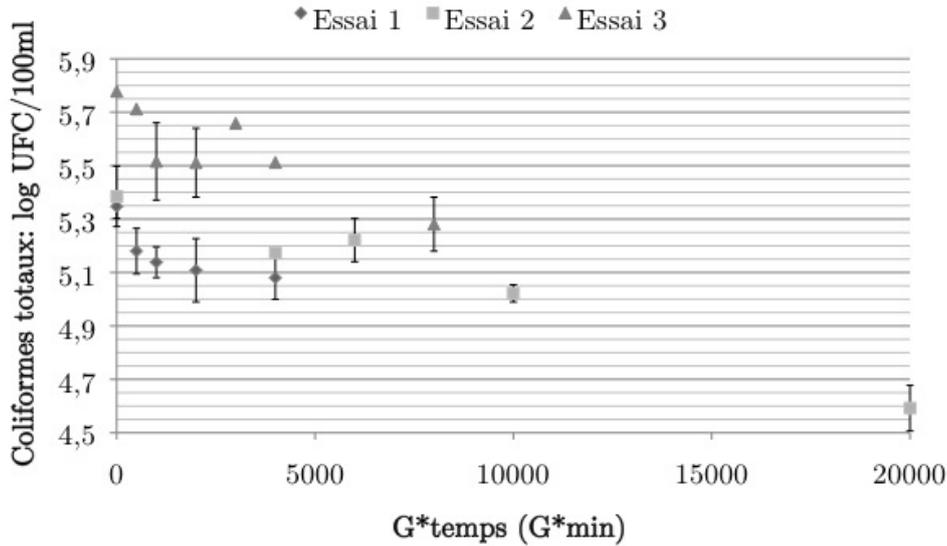
$G$  : le facteur d'amplification de la gravité (-)

$\mu$  : la viscosité du fluide (1.569 10<sup>-3</sup> Pa s à 4°C)

$\Delta x$  : la distance parcourue par une particule en chute (m)

$a$  : une constante (s)

La Figure 8.1 présente les résultats d'énumération sur boîte de pétri des coliformes totaux avant et après une centrifugation à différents  $G \times t$ . Le  $G \times t$  varie entre 0 g × min (pas de centrifugation) et 20000 g × min. La concentration de bactéries diminue avec le  $G \times t$  appliqué. Un  $G \times t$  faible permet de décanter une fraction des bactéries attachées aux particules et un  $G \times t$  très élevé permet de décanter les bactéries attachées aux particules mais aussi les bactéries en suspension (par exemple à 20000 g × min). Un  $G \times t$  optimale permet de décanter les bactéries attachées aux particules mais non les bactéries en suspension. Une centrifugation à un  $G \times t$  optimal n'a pas été trouvée, mais un  $G \times t$  de 500 g × min est préférable. La décantation de bactéries pour des valeurs de  $G \times t$  plus élevées est considérable. Pour un  $G \times t$  de 500 g × min, 14% et 31% des coliformes totaux a décanté (Figure 8.1, Essai 3 et 1). Noter qu'une centrifugation à un  $G \times t$  de 500 g × min en utilisant 1 cm du surnageant des microtubes est comparable à une décantation par gravité ( $G=1$  g) d'une sédimentation statique avec une hauteur de 60 cm pendant 21 jours (Équation 8.2).



**FIGURE 8.1** – Concentration de coliformes totaux énumérés après une centrifugation à différents  $G \times t$  et écart-types géométriques pour chaque énumération. (Code d'échantillon : Essai 1 : EP3 2209 ; Essai 2 : EP3 1809 ; Essai 3 : EC 2209)

### 8.3 La dispersion des bactéries attachées aux particules

Afin de pouvoir mesurer la concentration totale des bactéries (bactéries en suspension + bactéries attachées aux particules), il faut une technique pour disperser les bactéries des particules de sorte que toutes les bactéries soient en suspension. Deux techniques de dispersion seront discutées dans cette section : l'agitation et la sonification.

#### 8.3.1 Agitation

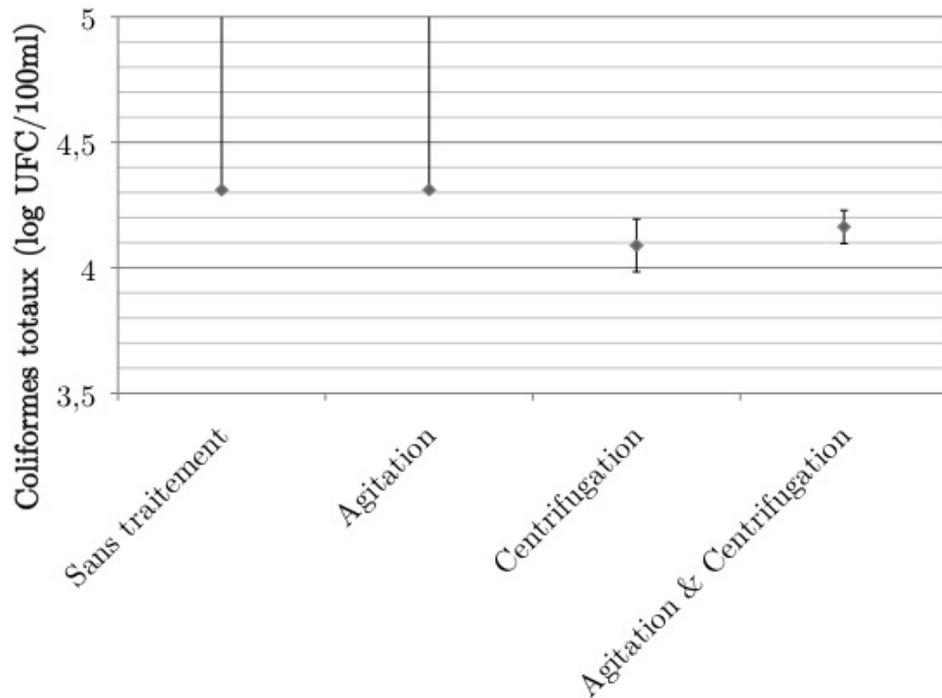
Trois traitements sont comparés avec un témoin : une agitation, une centrifugation et une agitation suivie d'une centrifugation (Figure 8.2). L'agitation sert à disperser les bactéries attachées aux particules ; la centrifugation sert à décanter les particules et les bactéries attachées aux particules et l'agitation suivie d'une centrifugation sert à décanter les bactéries attachées aux particules qui n'ont pas été dispersées suite à l'agitation.

L'échantillon témoin et l'échantillon après agitation n'ont pas été inoculés avec la bonne dilution ce qui a fait qu'il y avait une densité d'UFC trop élevée sur les boîtes de pétri. Pour ces traitements, au moins  $2 \cdot 10^4$  UFC/100 ml de coliformes totaux ont donc été détectés. La centrifugation a été effectuée à  $10000 \text{ G} \times \text{min}$ . Cependant, selon les essais de

centrifugation présentés à la Figure 8.1, une fraction des bactéries en suspension pourrait être décantée à ce  $G \times t$ .

La centrifugation a décanté une fraction d'UFC (Figure 8.2, Centrifugation et Agitation & Centrifugation comparées à Agitation). Comparé à l'échantillon après agitation, l'échantillon centrifugé contient moins de coliformes totaux détectés. La concentration de coliformes totaux de l'échantillon agité et centrifugé ne diffère presque pas de la concentration de l'échantillon centrifugé. Une dispersion des bactéries attachées aux particules ne peut donc pas être conclue

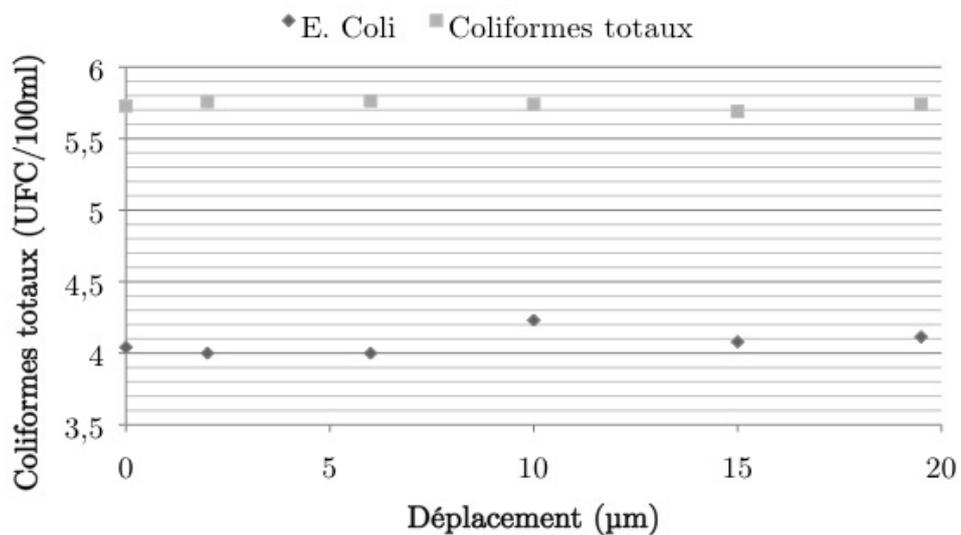
Ces résultats sont comparables aux résultats de Soupir *et al.* (2008), qui ont démontré qu'une agitation ne disperse pas toutes les bactéries attachées aux particules.



**FIGURE 8.2** – Comparaison d'un traitement de centrifugation et de centrifugation et agitation. La centrifugation est faite à  $10000 G \times \text{min}$  et l'agitation de 100 ml d'échantillon est faite dans une bouteille de 200 ml pendant 10 min. (Code d'échantillon : EC 1809)

### 8.3.2 Sonification

Il y a deux paramètres qui déterminent la puissance d'un traitement de sonification : le temps de traitement et l'amplitude d'ondes ultrasoniques. Le déplacement ou l'amplitude de l'unité de la sonde qui cause les ondes ultrasoniques est un paramètre de l'appareil. Différentes valeurs de déplacement pendant une sonification de 15 s sur 25 ml d'échantillon ont été comparées. Ces essais n'influencent pas le nombre de bactéries détectées (Figure 8.3).



**FIGURE 8.3** – Concentration de coliformes totaux et *E. coli* après un traitement de sonification à différents déplacements pendant 15 s. (Code d'échantillon : EC 2209)

La dispersion de bactéries après une sonification avec un déplacement de  $6 \mu\text{m}$  est mesurée pour différents temps de traitement dans 25 ml d'échantillon. La Figure 8.4 présente ces résultats. Le temps de traitement n'a pas une influence considérable sur la dispersion des bactéries attachées aux particules.

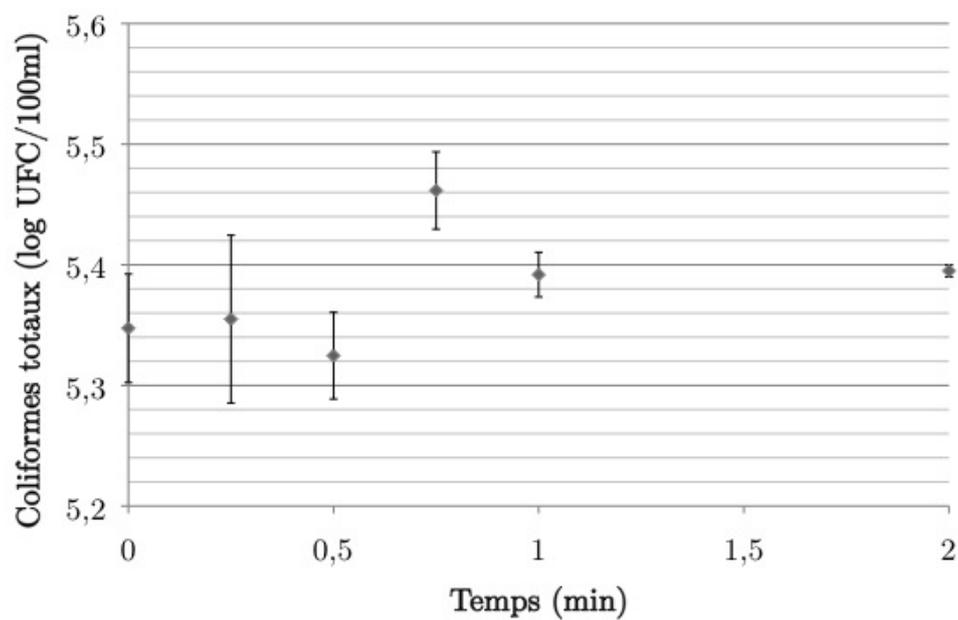


FIGURE 8.4 – Concentration de coliformes totaux après différents temps de traitement de sonification avec un déplacement d'ondes ultrasoniques de  $6\ \mu\text{m}$ . (Code d'échantillon : EP3 2209)

## 8.4 Essais de croissance et de décroissance

La croissance et la décroissance d'*E. coli* et des coliformes totaux ont été suivies pendant 17 jours à partir d'échantillons de 200 ml gardés à 4°C et à 23°C au noir.

À 4°C et à 23°C, *E. coli* et les coliformes totaux se sont multipliés de façon exponentielle d'un facteur  $10^4$  jusqu'au jour 5 à 7 (Figures 8.5 à 8.8). À 4°C, les bactéries ne peuvent pas se multiplier et une activation des bactéries actives mais non cultivables plutôt qu'une multiplication est supposée. En effet, Garcia-Armisen *et al.* (2005) ont démontré que seulement 1 à 20% d'*E. coli* dans des eaux provenant de l'environnement sont cultivables. Moins l'eau est polluée, plus il y a de bactéries qui sont actives mais non cultivables. L'échantillon avec code BP 2410 a été prélevé dans le bassin après la première neige en octobre 2009. Il est donc possible que les changements de conditions du milieu causés par la neige aient modifié le comportement des bactéries.

La croissance et la décroissance des bactéries sont ajustées à un modèle de croissance / décroissance exponentielle (Équation 8.3). À partir du jour 5 à 7, la décroissance exponentielle débute à un taux moyen de  $-0.216 \text{ jour}^{-1}$  pour *E. coli* et de  $-0.228 \text{ jour}^{-1}$  pour les coliformes totaux. Ces taux de décroissance sont comparables à ceux rapportés dans la littérature. Hellweger *et al.* (2009) rapportent que les taux de décroissance / croissance rapportés dans la littérature se situent entre  $-2.7 \text{ jour}^{-1}$  et  $0.018 \text{ jour}^{-1}$ . Un taux de croissance exponentielle plus variable est observé pour les premiers jours ; celui-ci varie entre  $0.92 \text{ jour}^{-1}$  et  $4.17 \text{ jour}^{-1}$ . Peu d'articles rapportent un taux tellement élevé, ce qui soutient l'hypothèse des bactéries actives mais non cultivables.

$$X = X_0 \exp(bt) \tag{8.3}$$

X : Concentration bactérienne (UFC/100ml)

t : Temps (jours)

b : Taux de croissance ( $\text{jours}^{-1}$ )

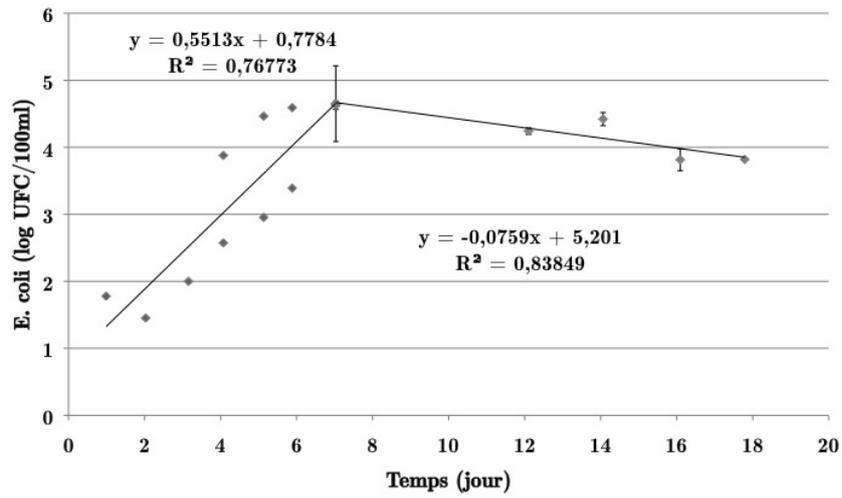


FIGURE 8.5 – Concentration d'*E. coli* pendant un essai de croissance / décroissance à 4°C. (Code d'échantillon : BP 2410)

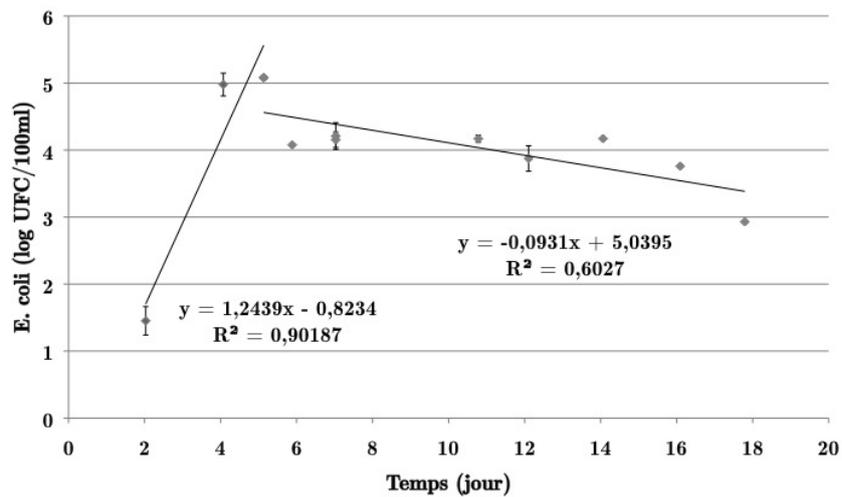


FIGURE 8.6 – Concentration d'*E. coli* pendant un essai de croissance / décroissance à 23°C. (Code d'échantillon : BP 2410)

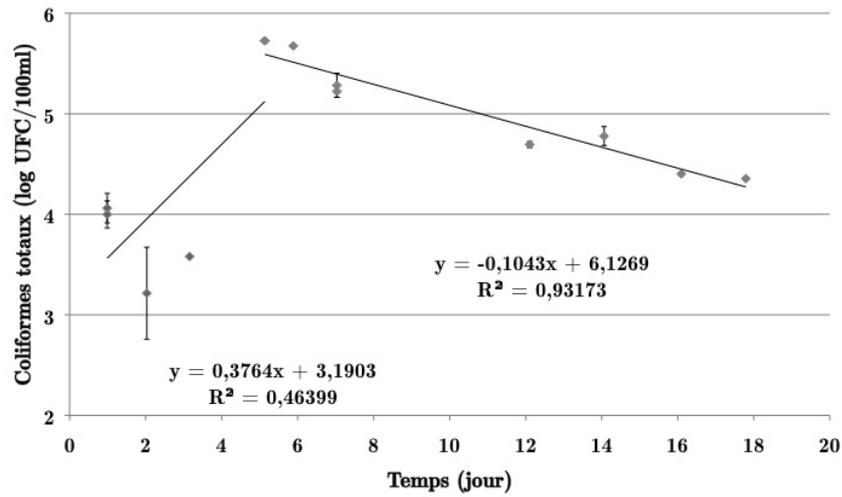


FIGURE 8.7 – Concentration de coliformes totaux pendant un essai de croissance / décroissance à 4°C. (Code d'échantillon : BP 2410)

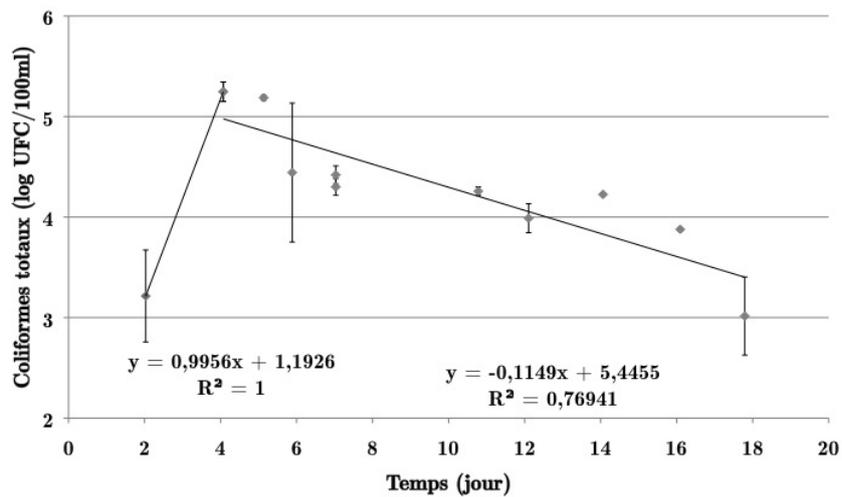


FIGURE 8.8 – Concentration de coliformes totaux pendant un essai de croissance / décroissance à 23°C. (Code d'échantillon : BP 2410)

## 8.5 Discussion

La méthode Colyscan Easygel ne répond pas aux exigences de cette étude sur quatre points : sa plage de mesure, son exactitude, sa résolution et sa précision.

**La plage de mesure** Il est essentiel de trouver la bonne dilution pour obtenir une densité de colonies sur la boîte acceptable. En pratique, les colonies sont bien identifiable s'il y en a moins de 100 par boîte. D'autre part, une densité de moins de 20 colonies par boîte n'est pas statistiquement significative (Micrologylabs, 2010). La densité préférable des colonies par boîte est donc entre 20 et 100 colonies par boîte, c'est-à-dire une plage d'un facteur 5. Par conséquent, la limite de quantification est de 20 UFC par boîte pour un volume maximal de 5 ml d'échantillon ou de 400 UFC/100ml, soit un facteur 4 de la concentration minimale d'*E. coli* attendue dans les échantillons du bassin.

La concentration attendue d'*E. coli* dans le bassin d'orage est de  $10^2$  à  $10^3$  UFC/100ml avec des extrêmes jusqu'à  $10^4$  UFC/100ml. Il faut donc faire au moins trois dilutions par échantillon pour garantir une densité de colonies dans la plage de mesure. Pour augmenter la précision, au moins trois répétitions sont exigées sur chaque énumération, donc neuf boîtes de pétri par échantillon.

Il faut considérer que le coût ne se compose pas que du prix du matériel (9 fois 3.17\$ par boîte (Tableau A.5)), mais aussi du temps d'analyse au laboratoire. En plus, la boîte et les bouteilles ne sont pas récupérables et une grande quantité de déchets est donc produite.

**L'exactitude** La méthode ne permet pas de quantifier les bactéries attachées aux particules parce que chaque particule colonisée par *E. coli* ou par des coliformes totaux ne donne qu'une colonie. Le nombre d'UFC énuméré est donc une sous-estimation du nombre réel de bactéries. Plusieurs techniques physiques et chimiques pour disperser les bactéries attachées ont été testées et seulement une dispersion chimique avec l'agent de surface Tween-85 a donné des résultats significatifs (Krometis *et al.*, 2009; Soupier *et al.*, 2008). Dans ce mémoire, les essais de dispersion des techniques physiques (agitation et sonification) n'ont pas augmenté la concentration des bactéries, ces résultats sont comparables aux ceux de Krometis *et al.* (2009) et Soupier *et al.* (2008).

Dans les eaux provenant de l'environnement, une fraction non négligeable des bactéries peut être actives mais non cultivables. Selon Garcia-Armisen *et al.* (2005), seulement entre 1 et 20% d'*E. coli* sont cultivables. Des essais de croissance / décroissance en milieu de croissance comme le Colyscan Easygel ne distinguent pas la croissance de l'activation des

bactéries actives mais non cultivables. Une mesure objective des taux de croissance ou décroissance n'est donc pas possible avec cette méthode.

**La résolution et la précision** En question de la modélisation de la répartition d'*E. coli* entre l'eau et les particules et comme la fraction d'*E. coli* attachées aux particules se situe entre 20 et 50% (Chapitre 2), il faut une méthode de haute résolution pour distinguer ces bactéries de celles en suspension. Une méthode qui est capable de distinguer une différence de concentrations d'*E. coli* d'au moins 20% en faisant trois répétitions est visée. La précision d'une énumération en milieu de croissance, exprimée comme l'écart-type géométrique, est souvent trop faible. L'écart-type géométrique d'une énumération significative, c'est-à-dire lorsqu'il y a plus de 20 colonies par boîte, est de 0.01 à 0.12 pour les coliformes totaux et diminue avec la densité des colonies sur le pétri (Figure 8.9).

Le test  $t$  permet de calculer l'écart-type géométrique maximal acceptable pour distinguer 20% de bactéries en faisant trois répétitions. Un test unidirectionnel est utilisé. Selon l'hypothèse nulle, la concentration moyenne des deux mesures est égale. L'hypothèse alternative dit que la concentration moyenne mesurée avec une méthode qui compte toutes les bactéries ( $\log \mu_{g1}$ ) est plus grande que la concentration mesurée avec une méthode qui ne compte que les bactéries en suspension ( $\log \mu_{g2}$ ), par exemple après une centrifugation (Équation 8.4). La valeur de  $t$  doit être supérieure à  $t_{\alpha;2(n-1)}$  afin de rejeter l'hypothèse nulle, ce qui équivaut à un écart-type géométrique maximal de 0.0428 en supposant l'écart-type géométrique des deux mesures  $\log \bar{X}_{g1}$  et  $\log \bar{X}_{g2}$  égales (Équations 8.5 à 8.7). En effet, avec un tel écart-type géométrique, une différence de la concentration des bactéries de 20% sera mesurable en faisant trois répétitions. Seulement la moitié des mesures présentées dans la Figure 8.9 avait un écart-type géométrique inférieure à 0.0428.

$$\begin{aligned} H_0 & : \log \mu_{g1} = \log \mu_{g2} \\ H_1 & : \log \mu_{g1} > \log \mu_{g2} \end{aligned} \tag{8.4}$$

$$t = \frac{\log \bar{X}_{g1} - \log \bar{X}_{g2}}{\sqrt{\frac{2 S_g^2}{n}}} \quad (8.5)$$

$$t = \frac{\log \frac{\bar{X}_{g1}}{\bar{X}_{g2}}}{\sqrt{\frac{2 S_g^2}{n}}} \text{ et } \bar{X}_{g2} = (1 - f)\bar{X}_{g1} \quad (8.6)$$

$$H_1 : t > t_{\alpha;2(n-1)} = 2.776$$

$$S_g < \frac{-\log(1 - f)}{\sqrt{\frac{2}{n}} t_{\alpha;2(n-1)}} = 0.0428 \quad (8.7)$$

$\bar{X}_g$  : moyenne géométrique de l'échantillon

$S_g$  : écart-type géométrique de l'échantillon (Équation 5.3)

$n$  : taille de l'échantillon (3)

$f$  : fraction des bactéries attachées aux particules (20%)

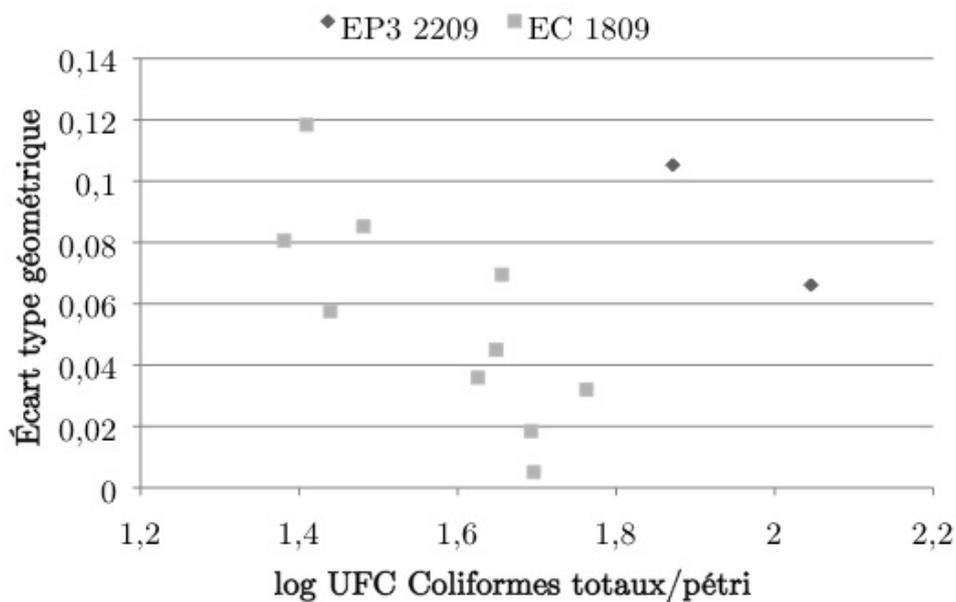


FIGURE 8.9 – L'écart-type géométrique de trois répétitions selon la densité de colonies sur le pétri de deux échantillons.

## 8.6 Conclusion

La concentration d'*E. coli* mesurée pendant l'été 2008 et 2009 dans le bassin d'orage variait entre  $10^2$  et  $10^4$  UFC/100ml, ces valeurs se trouvent dans la plage des valeurs trouvées dans la littérature. La campagne d'échantillonnage a établi plusieurs problèmes de la méthode Coliscan Easygel d'énumération d'*E. coli* en milieu de croissance :

- Des problèmes pour trouver la dilution nécessaire d'un échantillon qui mène à une densité de colonies par boîte entre 20 et 100 colonies.
- Des incertitudes causées par les bactéries actives mais non cultivables.
- Cette méthode sous-estime la concentration des bactéries attachées aux particules. Une technique de dispersion qui détache les bactéries attachées aux particules est donc nécessaire afin de pouvoir énumérer la concentration totale d'*E. coli*. Deux techniques physiques (agitation et sonification) ont été testées, mais n'étaient pas efficaces.
- La qualité des données d'énumération d'*E. coli* à partir de la méthode Coliscan Easygel est insuffisamment en question de la modélisation de la répartition d'*E. coli* entre l'eau et les particules. La précision nécessaire, afin de distinguer une différence des concentrations d'*E. coli* de 20%, est souvent trop basse causée par un écart-type géométrique des énumérations souvent trop grande.

Une autre méthode de quantification d'*E. coli* est nécessaire pour pouvoir satisfaire aux exigences liées à la modélisation de cette étude.

# Chapitre 9

## La méthode de mesure de l'activité enzymatique d'*E. coli*

Le développement de la méthode de mesure de l'activité enzymatique d'*E. coli* comporte trois étapes : (a) la vérification de la qualité des mesures de fluorescence de MU, (b) des essais de mesure de l'activité enzymatique à partir d'échantillons avec une concentration d'*E. coli* connue et (c) des essais de mesure de l'activité enzymatique à partir des échantillons du bassin d'orage. Le deux premières étapes ont été réalisées dans cette étude.

### 9.1 La qualité des mesures de fluorescence

#### 9.1.1 Les normes de qualité

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) établit des normes pour la qualité des mesures. Pour les deux spectrofluoromètres utilisés, trois normes de la mesure de MU sont vérifiées : (a) la limite de quantification (LDQ), (b) la reproductibilité de jour en jour et (c) la linéarité. La LDQ d'une mesure correspond à dix fois l'écart-type de six répétitions effectuées à une concentration 5% du domaine de mesure (ISO15839, 2003). La reproductibilité de jour en jour correspond à l'écart-type de six mesures effectuées sur six jours à des concentrations correspondant à 35% et à 65% du domaine de mesure (ISO15839, 2003). La linéarité est évaluée à l'aide d'un test statistique d'hypothèse (Dochain & Vanrollegheem, 2001) qui évalue si un modèle quadratique  $j$  décrit les données de meilleure façon qu'un modèle linéaire  $i$ . Le  $F$ -test unidirectionnel est utilisé. La valeur de  $f$  :

$$f = \frac{(SSR_i - SSR_j)/(p_j - p_i)}{SSR_j/(N - p_j)} \quad (9.1)$$

est comparée avec la distribution  $F_{\alpha, p_j - p_i, N - p_j}$  afin de décider si le modèle plus complexe  $j$  diffère significativement du modèle  $i$ .  $SSR$  correspond à la somme des erreurs carré entre la concentration de MU mesurée  $y_i$  et modélisée  $\hat{y}_k$  pondérées avec l'écart-type  $\sigma_k$  de trois répétitions (il a été postulé que l'écart-type augmente linéairement avec la concentration de MU mesurée) :

$$SSR = \sum_k \left( \frac{y_k - \hat{y}_k}{\sigma_k} \right)^2 \quad (9.2)$$

$p$  correspond au nombre des paramètres du modèle ( $p_j=3$  et  $p_i=2$ ) et  $N$  au nombre de données.

### 9.1.2 La plage de la concentration de MU anticipée

L'Équation 9.4 décrit la relation linéaire en échelle log-log entre la concentration d'*E. coli* et l'activité enzymatique (AE) (George *et al.*, 2000). Cette équation permet d'estimer les concentrations de MU anticipées (Section 3.3). La Figure 9.1 présente la concentration de MU anticipée calculée à partir des Équations 9.3 et 9.4 après 5 et 25 minutes selon le nombre d'*E. coli* sur le filtre. Comme la concentration d'*E. coli* anticipée dans le bassin est entre  $10^2$  et  $10^4$  UFC/100 ml et qu'environ 100 ml d'échantillon sera filtré, la concentration de MU anticipée se trouve entre  $10^{-9}$  et  $10^{-6}$  mol MU/l. La concentration de MU sera mesurée dans une solution avec un volume de 20 ml.

$$MU(t) = \frac{(AE \times 100 \text{ ml filtré}) \times t}{20 \text{ ml}} \quad (9.3)$$

$$\log(AE) = 0.731 \times \log(E. coli \text{ par } 100 \text{ ml}) - 0.663 \quad (9.4)$$

t : le temps (min)

MU : la concentration de MU (pmol MU/l)

AE : l'activité enzymatique de GLUase (pmol MU min<sup>-1</sup> (100ml)<sup>-1</sup>)

### 9.1.3 Les essais de qualité de la mesure de fluorescence

Plusieurs essais ont été effectués avec des concentrations de MU entre  $10^{-6}$  et  $10^{-10}$  mol MU/l. À partir de la solution de base de MU, soit de  $10^{-2}$  mol MU/l en méthanol, les dilutions nécessaires sont effectuées dans un tampon de phosphate (12.5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) à pH 10.7. Trois séries de dilutions ont été mesurées :

1. une série A avec une concentration de MU entre  $10^{-6}$  et  $10^{-8}$  mol/l
2. une série B avec une concentration de MU entre  $10^{-7}$  et  $10^{-9}$  mol/l

3. une série C avec une concentration de MU entre  $10^{-8}$  et  $10^{-10}$  mol/l

Pour chaque série, les dilutions de 100, 95, 80, 65, 50, 35, 20, 5, 2, 1 et 0% ont été mesurées avec le spectrofluoromètre à filtre et avec le spectrophotomètre à fluorescence. La mesure de chaque dilution est répétée trois fois.

### 9.1.3.1 Le spectrofluoromètre à filtre

La réponse du spectrofluoromètre à filtre est linéaire pour la série B, mais non pour la série A (Tableau A.6 et Figures B.1 à B.6). La série B a une LDQ d'environ  $10^{-8}$  mol MU/l et la réponse du spectrofluoromètre est linéaire. La série A n'est pas linéaire et l'écart-type des mesures de la série C est trop grand (Les Figures B.5 et B.6).

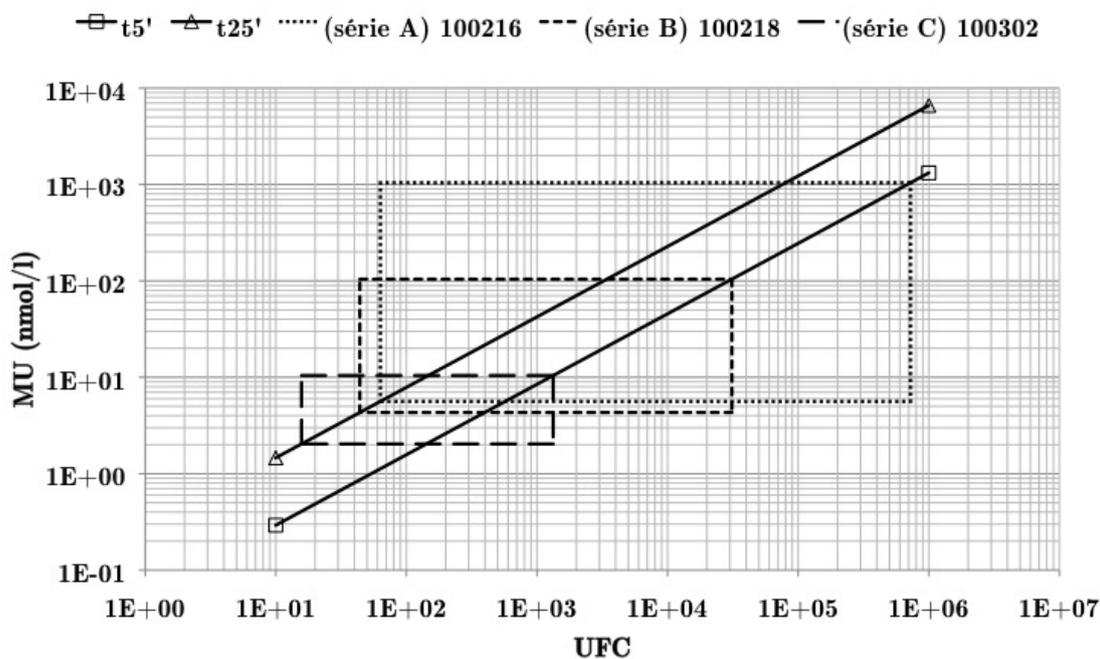
### 9.1.3.2 Le spectrophotomètre de fluorescence

La réponse du spectrophotomètre de fluorescence est significativement linéaire pour les séries A et B et a une LDQ plus basse que celle du spectrofluoromètre à filtre. Le Tableau A.7 présente les résultats de la LDQ et les valeurs de  $f$  pour le test de linéarité. La série C n'était pas significativement linéaire mais a été acceptée vu les erreurs relatives très basses (Figure B.12). Les trois séries ont une LDQ entre  $2.0 \cdot 10^{-9}$  et  $5.6 \cdot 10^{-9}$  mol MU/l. Les Figures B.7 à B.12 présentent la réponse du spectrophotomètre, l'écart-type de trois répétitions et la concentration modélisée selon la concentration de MU mesurée. L'écart-type des mesures augmentait avec la concentration de MU mesurée ce qui confirme l'hypothèse qui a été faite pour le test de linéarité (Équation 9.1).

Le spectrophotomètre de fluorescence répond aux exigences de la mesure de l'activité enzymatique, soit (a) une plage de linéarité suffisamment grande et (b) une LDQ de la série C correspondant à la concentration minimale de MU anticipée. Les séries A et C couvrent toute la plage d'intérêt, c'est-à-dire entre  $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  mol MU/l (Figure 9.1). Le coefficient de variation de six mesures sur six jours à des concentrations correspondant à 35 et 65% du domaine de mesure, soit la reproductibilité de jour en jour, est de 1.30 à 4.63%. Les séries A et C ont été utilisées comme courbes d'étalonnage.

**Tableau 9.1** – La reproductibilité de jour en jour, exprimée comme l'écart type (N=6) de six mesures sur six jours différents à des concentrations correspondant à 35% et à 65% du domaine de mesure.

Série de dilution	Concentration de MU (mol MU/l)	Moyenne (mol MU/l)	Écart type (mol MU/l)	CV
A	100% (1.04E-6)			
	35% (3.66E-6)	3.84E-07	1.78E-08	4.63%
	65% (6.79E-6)	6.94E-07	2.12E-08	3.05%
B	100% (1.04E-7)			
	35% (3.66E-7)	3.72E-08	8.19E-10	2.20%
	65% (6.79E-7)	6.83E-08	1.57E-09	2.29%
C	100% (1.04E-8)			
	35% (3.66E-8)	3.74E-09	4.86E-11	1.30%
	65% (6.79E-8)	6.98E-09	1.74E-10	2.49%



**FIGURE 9.1** – La concentration de MU anticipée après 5 et 25 minutes selon le nombre d'*E. coli*. Les plages de réponse linéaire des séries A, B et C sont présentées. Les séries A et C couvrent toute la plage d'intérêt ( $10^2$  à  $10^4$  UFC/filtre).

## 9.2 Les essais de la mesure de l'activité enzymatique d'*E. coli*

Les essais de la mesure de l'activité enzymatique ont été effectués à partir d'un échantillon de l'affluent d'un décanteur primaire d'une usine de traitement d'eau usée. L'échantillon a une concentration d'*E. coli* de  $1.12 \cdot 10^5$  UFC/100ml ( $n=6$ ,  $\sigma_g = 0.0997$ ).

### 9.2.1 Incubation sans filtre

D'abord, quatre essais sans filtration ont été effectués à partir de 1 ml d'échantillon. Ces essais ont pour but de limiter les erreurs pouvant être entraînées par l'utilisation du filtre. La Figure 9.2 montre que l'augmentation de la concentration de MU est linéaire pendant ces essais. L'activité enzymatique est de 65 nmol MU/min/100ml avec un coefficient de variation de 20% (Tableau 9.2). Il est postulé que la concentration d'*E. coli* est constante pendant l'essai afin de pouvoir calculer l'activité enzymatique.

L'estimation des deux paramètres (AE et  $MU_0$ ) est effectuée en appliquant la méthode des moindres carrés pondérées avec la concentration mesurée, c'est-à-dire, la minimisation de la fonction objective  $J$  de l'Équation 9.5 :

$$J = \sum_{i=1}^6 \left( \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \right)^2 \quad (9.5)$$

où  $y_i$  est la concentration de MU mesurée et  $\hat{y}_i$  est la concentration de MU modélisée. Il a été confirmé que l'écart-type d'une mesure de la concentration de MU augmente de façon linéaire avec la concentration mesurée, ce qui autorise la pondération avec la concentration mesurée (Section 9.1). La minimisation de la fonction objective  $J$  a été effectuée avec le *solver* du logiciel Excel.

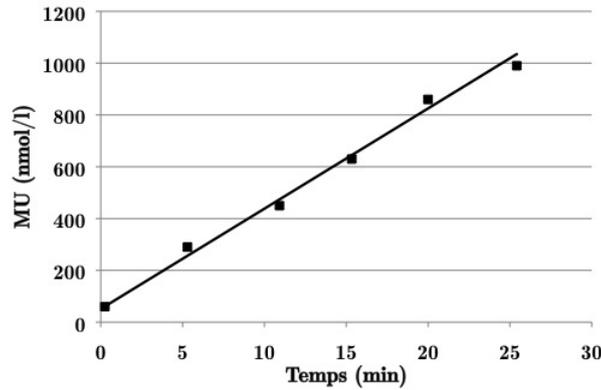


FIGURE 9.2 – Concentration de MU mesurée et modélisée d’une incubation sans filtration (Code 100310A).

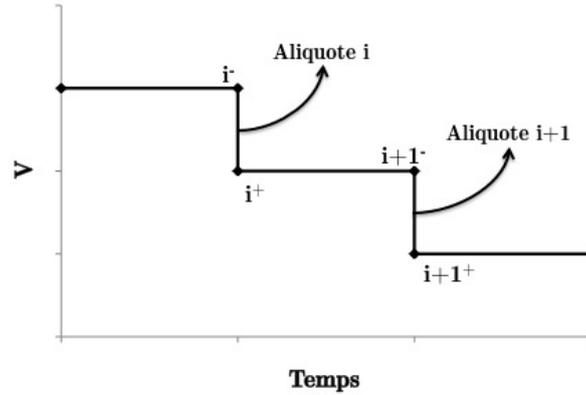
Tableau 9.2 – Activité enzymatique (AE) et concentration initiale ( $MU_0$ ) estimées dans les quatre essais sans filtre. La valeur minimale  $J_{opt}$  de la fonction objective  $J$  est présentée.

Code	AE (nmol MU/min/100ml)	$MU_0$ (nmol MU/l)	$J_{opt}$
100310A	77	61	0.021
100310B	58	43	0.0486
100310C	75	102	0.0294
100324A	51	154	0.1725
Moyenne	65		
Écart-type	13		
Coefficient de variation	20%		

### 9.2.2 Incubation avec filtre selon le protocole A

Un essai avec filtration peut entraîner des erreurs liées à la présence du filtre. Les bactéries peuvent se détacher du filtre pendant un essai. Trois situations peuvent être distinguées : (a) toutes les bactéries restent attachées au filtre, (b) toutes les bactéries se détachent pendant les cinq premières minutes ou (c) seulement une partie des bactéries se détache du filtre. Un modèle de détachement a été développé afin de mieux comprendre le détachement. La Figure 9.3 présente l'évolution discontinue du volume de la solution dans l'erenmeyer

entre l'étape  $i$  et  $i + 1$ . Les conditions avant le prélèvement d'une aliquote reçoivent l'indice  $\ominus$  et celles après le prélèvement reçoivent l'indice  $\oplus$ .



**FIGURE 9.3** – Évolution discontinue du volume de la solution dans l'erenmeyer entre étape  $i$  et  $i + 1$ .

Les Équations 9.6 à 9.9 décrivent la concentration des bactéries dans l'erenmeyer pendant un essai lorsque un aliquote de 3 ml est prélevée au cinq minutes. Dans l'erenmeyer, le nombre de bactéries totales  $Bt$  est toujours égale à la somme du nombre de bactéries sur le filtre  $Bf$  et du nombre de bactéries en suspension  $Bs$  :

$$Bt_i = Bf_i + Bs_i \quad (9.6)$$

La concentration de bactéries totales avant le prélèvement d'une aliquote (indice  $\ominus$ ) pour l'étape  $i+1$  :

$$Bf_{i+1}^{\ominus} = Bf_i^{\oplus} \times (1 - FD)^{\Delta t} \quad (9.7)$$

$$Bs_{i+1}^{\ominus} = Bs_i^{\oplus} + Bf_i^{\oplus} \times FD^{\Delta t} \quad (9.8)$$

$$C(Bt_{i+1}^{\ominus}) = \frac{Bf_{i+1}^{\ominus} + Bs_{i+1}^{\ominus}}{V_{i+1}^{\ominus}} \quad (9.9)$$

La concentration de bactéries totales après le prélèvement d'une aliquote (indice  $\oplus$ ) pour l'étape  $i+1$  :

$$V_{i+1}^{\oplus} = V_{i+1}^{\ominus} - \Delta V \quad (9.10)$$

$$C(Bt_{i+1}^{\oplus}) = \frac{Bf_{i+1}^{\oplus}}{V_{i+1}^{\oplus}} + \frac{Bs_{i+1}^{\oplus}}{V_{i+1}^{\oplus}} \quad (9.11)$$

$$Bs_{i+1}^{\oplus} = Bs_{i+1}^{\ominus} \frac{V_{i+1}^{\oplus}}{V_{i+1}^{\ominus}} \quad (9.12)$$

$t$  : temps (min)

$\Delta t$  : intervalle de temps entre le prélèvement des aliquotes (5 min)

$i$  : l'étape de l'essai,  $i$  augmente d'une unité après chaque prélèvement

$V$  : le volume de solution dans l'erlenmeyer (l)

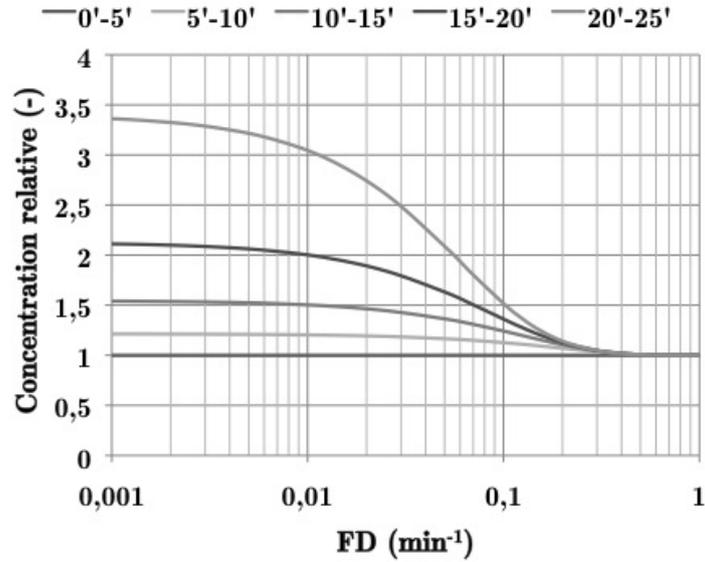
$\Delta V$  : le volume de l'aliquote prélevée au cinq minutes (3 ml)

$Bt$ ,  $Bf$  et  $Bs$  : le nombre d'*E. coli* total, attaché au filtre et en suspension (UFC)

$C(Bt)$  : la concentration totale d'*E. coli* dans l'erlenmeyer (UFC/100ml)

FD : la fraction d'*E. coli* détachée du filtre par minute ( $\text{min}^{-1}$ )

Le premier cas (a), où toutes les bactéries restent attachées aux filtre, entraîne un nombre de bactéries totales  $Bt$  constant dans l'erlenmeyer et donc la concentration totale des bactéries  $C(Bt)$  augmente lorsque le volume diminue après chaque prélèvement d'une aliquote. Le deuxième cas (b), où toutes les bactéries sont dissoutes dans la solution, entraîne une concentration constante des bactéries. La Figure 9.4 présente une simulation (Équations 9.6 à 9.12) de la concentration d'*E. coli* relative à la concentration initiale selon la fraction de bactéries détachées par minute (FD). La concentration totale d'*E. coli* dans l'erlenmeyer augmente de 20% au maximal si la fraction détachée par minute est supérieure à  $0.2 \text{ min}^{-1}$ . Si la fraction détachée par minute est inférieure à  $0.01 \text{ min}^{-1}$ , le nombre de bactéries reste plus ou moins constant pendant l'essai et la concentration augmente lorsque les aliquotes sont prélevées. Si la fraction détachée par minute se situe entre  $0.01$  et  $0.2 \text{ min}^{-1}$ , la concentration d'*E. coli* dépend plus de la valeur de FD.



**FIGURE 9.4** – Concentration anticipée relative à la concentration initiale pendant les cinq étapes d'un essai selon la fraction détachée par minute (FD).

Quatre essais, selon le protocole A (Chapitre 6), sont effectués à partir de 1 ml d'échantillon filtré. Pendant ces essais, la production de MU n'est pas constante, mais augmente avec la concentration d'*E. coli* (Figure 9.5). De plus, les erreurs de mesure de la concentration de MU sont plus grandes que pendant les essais sans filtration. Ces erreurs peuvent être dû à des limitations de diffusion de MUGlu et de MU dans le filtre. Un mélange standardisée pourrait éliminer ces limitations de diffusion. Le Tableau 9.3 présente l'activité enzymatique (AE), la fraction détachée par minute (FD) et la concentration initiale de MU ( $MU_0$ ) estimées à l'aide des Équations 9.13 et 9.14.

$$C(MU_{i+1}^{\ominus}) = C(MU_i^{\ominus}) + ae \times C(Bt_i^{\ominus}) \times \Delta t \quad (9.13)$$

$C(MU)$  : la concentration de MU dans l'erlenmeyer (pmol/l)

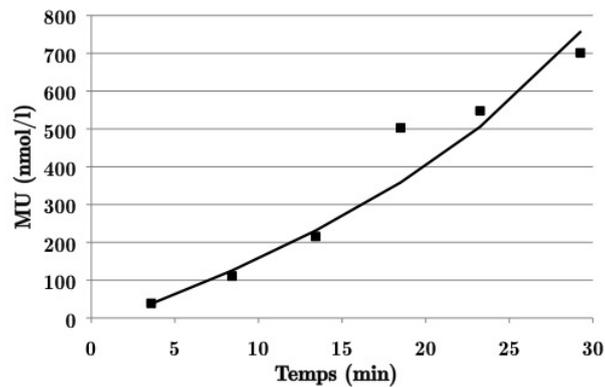
$ae$  : l'activité enzymatique par *E. coli* (pmol MU/min/*E. coli*)

L'estimation de ces trois paramètres est effectuée en appliquant la méthode des moindres carrés pondérées, c'est-à-dire, la minimisation de la fonction objective  $J$  de l'Équation 9.14 :

$$J = \sum_{i=1}^6 \left( \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \right)^2 \quad (9.14)$$

où  $y_i$  est la concentration de MU mesurée et  $\hat{y}_i$  est la concentration de MU modélisée. Il a été confirmé que l'écart-type d'une mesure de la concentration de MU augmente de façon linéaire avec la concentration mesurée, ce qui autorise la pondération avec la concentration mesurée (Section 9.1). La minimisation de la fonction objective  $J$  a été effectuée avec le *solver* du logiciel Excel.

Il peut être observé que l'activité enzymatique des essais avec filtration est plus basse que l'activité enzymatique sans filtration pour le même échantillon en comparant les valeurs des Tableaux 9.2 et 9.3. Il se peut qu'il y ait des enzymes glucuronidases extracellulaires qui ne soient pas retenues par le filtre (Communication personnelle, Julien Passerat, Université Libre de Bruxelles).



**FIGURE 9.5** – Concentration de MU modélisée et mesurée selon le protocole A d'une incubation avec filtration (Code 100310E).

**Tableau 9.3** – Activité enzymatique (AE), fraction détachée par minute (FD) et concentration initiale (MU<sub>0</sub>) estimées dans les quatre essais selon le protocole A. La valeur minimale  $J_{opt}$  de la fonction objective  $J$  est présentée.

Code	AE (nmol MU/min/100ml)	FD (min <sup>-1</sup> )	MU <sub>0</sub> (nmol MU/l)	$J_{opt}$
100310D	44	0.81	56	0.203
100310E	32	0.03	38	0.118
100310F	25	0	42	0.174
100324B	37	0.04	50	0.335
Moyenne	34	0.21		
Écart-type	8	0.39		
Coefficient de variation	23%	179%		

La Figure 9.6 présente la fonction objective  $J$  selon AE et FD dans une graphique de contour, la valeur de  $J_{opt}$  et le contour de confiance à 95% des paramètres estimées sont indiqués. L'intervalle de confiance à 95% des paramètres estimées (FC, AE et MU<sub>0</sub>) correspond aux valeurs des paramètres lorsque la valeur de  $J$  est inférieure à la valeur de  $J_{crit}$  de l'Équation 9.15 (Dochain & Vanrollegem, 2001) :

$$J_{crit} = J_{opt} \times \left( 1 + \frac{p}{N_{data} - p} F_{\alpha; p; N_{data} - p} \right) \quad (9.15)$$

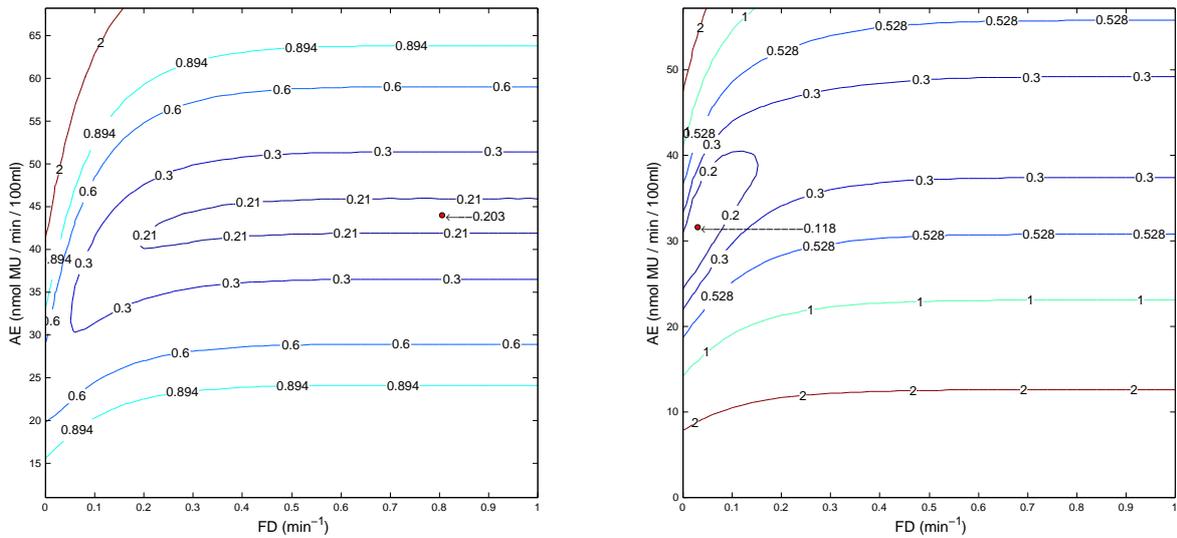
$J_{opt}$  : la valeur minimale de la fonction objective  $J$

$p$  : le nombre de paramètres à optimiser (3)

$N_{data}$  : le nombre de données (6)

$F_{\alpha; p; N_{data} - p}$  : la valeur de la distribution  $F$  avec  $p$  et  $N_{data} - p$  degrés de liberté à un seuil de confiance de  $\alpha = 0.05$ .

L'activité enzymatique et la fraction détachée par minute ne sont pas corrélées lorsque la valeur de FD est plus grande que  $0.2 \text{ min}^{-1}$  (Figure 9.6(a)). Cependant, une corrélation plus grande a été observée lorsque la fraction détachée par minute est inférieure à  $0.2 \text{ min}^{-1}$  (Figure 9.6(b)), c'est-à-dire qu'une augmentation de FD peut être compensée par une augmentation d'AE. Il y a donc un problème d'identifiabilité qui peut entraîner une estimation moins précise de l'activité enzymatique.



(a) Code 100310D,  $J_{opt}=0.203$ ,  $J_{crit}=0.894$ ,  $MU_0=56$  nmol MU/l

(b) Code 100310E,  $J_{opt}=0.118$ ,  $J_{crit}=0.528$ ,  $MU_0=38$  nmol MU/l

**FIGURE 9.6** – Graphique de contour de la fonction objective  $J$  d'essais selon le protocole A selon l'activité enzymatique et la fraction détachée par minute.

### 9.2.3 Incubation avec filtre selon le protocole B

Un concept d'expérience a été développé (protocole B, Chapitre 6) qui permet de briser la corrélation entre FD et AE et donc d'estimer l'activité enzymatique et la fraction détachée par minute avec une meilleure précision. La Figure 9.7 illustre les différentes étapes du concept d'expérience. Premièrement, 1 ml d'échantillon est filtré et ce filtre est ajouté à 34 ml de tampon de phosphate dans un erlenmeyer. Le détachement des bactéries du filtre commence. Après 10 min, 17 ml du surnageant est prélevé, versé dans un deuxième erlenmeyer et 3 ml de la solution de MUGlu est ajoutée aux deux erlenmeyers. Le premier erlenmeyer contient le filtre avec les bactéries non-détachées et la moitié des bactéries détachées du filtre tandis que le deuxième erlenmeyer contient l'autre moitié des bactéries détachées du filtre. Pendant l'essai, la concentration d'*E. coli* dans l'erlenmeyer sans filtre est constante puisque toutes les bactéries sont dissoutes. La concentration d'*E. coli* dans l'erlenmeyer avec filtre augmente selon le modèle de détachement (Équations 9.6 à 9.12). La Figure 9.8 montre que l'activité enzymatique était constante pendant un essai sans filtration et augmentait pendant un essai avec filtration.

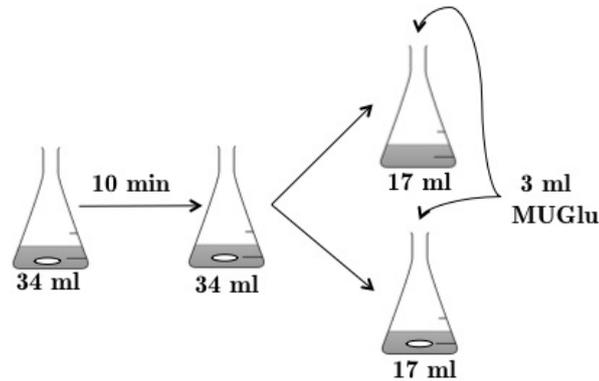


FIGURE 9.7 – Illustration des étapes du concept d'expérience.

Le protocole B décrit donc deux expériences sous des conditions différentes qui, combinées, mèneront à l'estimation d'un seul jeu de paramètres : AE, FD et  $MU_0$ . L'estimation des paramètres avec plusieurs jeux de données est appelée estimation multi-réponse (De heyder *et al.*, 1994; Dochain & Vanrolleghem, 2001) et est une technique avantageuse lorsqu'il y a un problème d'identifiabilité, soit la corrélation des paramètres trop importante. L'estimation des trois paramètres est effectuée en appliquant la méthode des moindres carrés pondérés, c'est-à-dire, la minimisation de la fonction objective  $J$  de l'Équation 9.16 :

$$J = \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^6 \left( \frac{y_{j,i} - \hat{y}_{j,i}}{y_{j,i}} \right)^2 \quad (9.16)$$

où  $y_{j,i}$  est la concentration de MU mesurée et  $\hat{y}_{j,i}$  est la concentration de MU modélisée avec  $i$  l'indice de l'aliquote et  $j$  l'indice de l'erenmeyer.

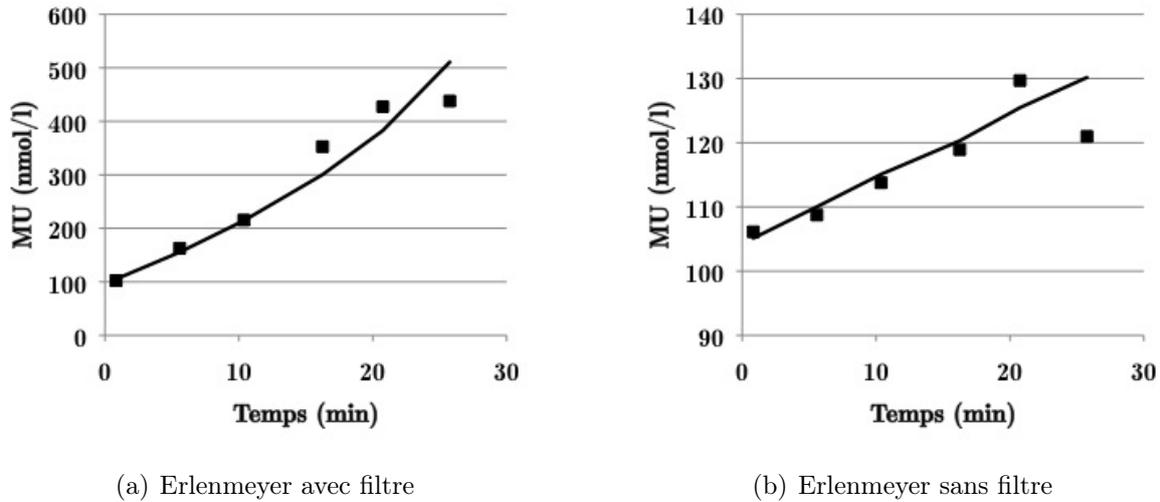


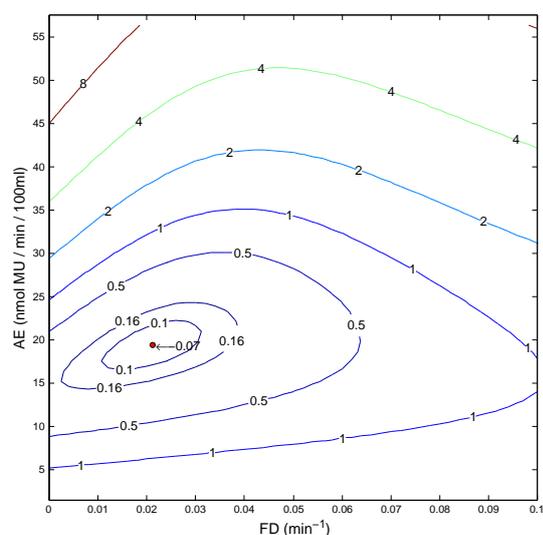
FIGURE 9.8 – Concentration de MU modélisée et mesurée selon le protocole B (Code 100331CD).

Le Tableau 9.4 présente les résultats des trois paramètres optimisés pour les cinq essais de décorrélation. La fraction détachée par minute est de  $0.021 \text{ min}^{-1}$  en moyenne et son coefficient de variation est de 59%. L'activité enzymatique était en moyenne de  $21 \text{ nmol MU/min/100ml}$  avec un coefficient de variation de 29%. La précision de l'estimation de l'activité enzymatique n'a donc pas été améliorée comparé à la précision d'une incubation selon le protocole A. Cependant, l'estimation de FD était plus précise puisque le coefficient de variation a passé de 179% à 59% (Tableaux 9.3 et 9.4).

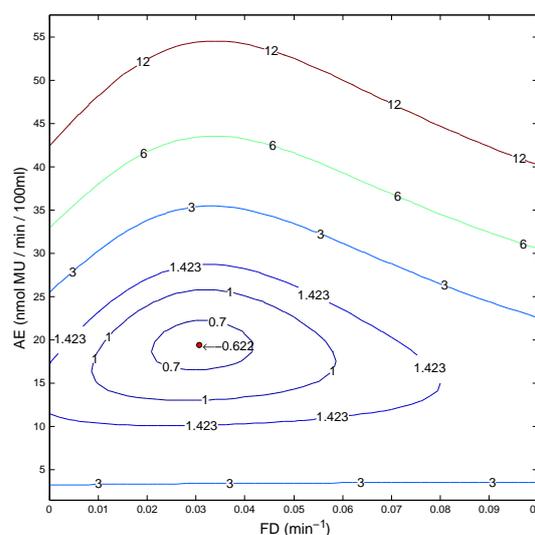
La Figure 9.9 présente un graphique de contour de la fonction objective  $J$  selon AE et FD. La surface du contour de  $J_{crit}$  (Équation 9.15,  $N_{data}=12$  et  $p=3$ ) de ces essais de décorrélation est réduite comparativement à la surface du contour de  $J_{crit}$  de l'essai selon le protocole A. La réduction de cette surface est en partie due au plus grand nombre de données par paramètre. Un essais de décorrélation selon le protocole B donne 12 points de données pour l'estimation de 3 paramètres tandis que un essai selon le protocole A donne seulement 6 points de données pour l'estimation des mêmes trois paramètres. De plus, la forme des contours moins étendue ou plus circulaire permet de conclure que les deux paramètres (AE et FD) ont été décorrélés grâce au concept d'expérience et donc qu'ils peuvent être estimés de manière plus indépendante.

**Tableau 9.4** – Activité enzymatique (AE), fraction détachée par minute (FD) et concentration initiale ( $MU_0$ ) estimés dans les cinq essais de décorrélation (protocole B). La valeur minimale de la fonction objective  $J_{opt}$  est présentée (Minimisation de la fonction objective  $J$  effectuée avec le *solver*) du logiciel Excel.

Code	AE (nmol MU/min/100ml)	FD (min <sup>-1</sup> )	$MU_0$ (nmol MU)/l	$J_{opt}$
100331AB	32	0.030	44	0.275
100331CD	21	0.021	105	0.070
100331HI	16	0	88	0.335
100324CD	21	0.031	33	0.622
100324EF	18	0.023	39	0.264
Moyenne	21	0.021		
Écart-type	6	0.012		
Coefficient de variation	29%	59%		



(a) Code 100331CD,  $J_{opt}=0.070$ ,  $J_{crit}=0.160$ ,  $MU_0=105$  nmol MU/l



(b) Code 100324CD,  $J_{opt}=0.622$ ,  $J_{crit}=1.423$ ,  $MU_0=33$  nmol MU/l

**FIGURE 9.9** – Graphique de contour d'un essai de décorrélation (protocole B) de la fonction objective  $J$  selon l'activité enzymatique et la fraction détachée par minute.

### 9.2.4 Mesure de l'activité enzymatique d'une série de dilution

L'activité enzymatique d'une série de dilution à partir de l'échantillon de l'usine de traitement d'eau usée a été effectué selon le protocole A afin de vérifier la méthode. L'activité enzymatique par *E. coli* (ae) doit être identique pour ces différentes dilutions d'un échantillon, c'est-à-dire, le coefficient  $a$  de l'Équation 9.17 doit être égale à 1.

$$\log(AE) = a \times \log(E. coli/100 ml) + b \quad (9.17)$$

Pour ces essais, la fraction détachée par minute (FD) a été fixée à  $0.021 \text{ min}^{-1}$ , ce qui est le résultat de l'estimation des paramètres des essais de décorrélation. Le Tableau 9.5 présente l'activité enzymatique (AE) et la concentration de MU initiale ( $MU_0$ ) réestimée des essais du Tableau 9.3 (facteur de dilution = 1) et celle d'une série de dilution (facteur de dilution = 2, 3.33 et 10) en considérant la fraction détachée par minute égale à  $0.021 \text{ min}^{-1}$  (Tableau 9.4). AE et  $MU_0$  sont estimés en appliquant la méthode des moindres carrés pondérés (Équation 9.14). Le coefficient de variation de l'activité enzymatique des quatre répétitions de dilution 1 a été réduite à 11% lorsque FD est fixée à  $0.021 \text{ min}^{-1}$ , comparé au coefficient de variation de 20% lorsque FD était un paramètre à estimer (Tableau 9.3). Il faut remarquer que FD est un paramètre sensible, c'est-à-dire que la concentration d'*E. coli* dans l'erlenmeyer varie beaucoup si FD se trouve entre 0.01 et  $0.2 \text{ min}^{-1}$ . FD a été estimée à  $0.021 \text{ min}^{-1}$  avec un coefficient de variation de 59% (Tableau 9.4), ce qui est dans la plage sensible du paramètre.

**Tableau 9.5** – Activité enzymatique (AE) et concentration initiale de MU ( $MU_0$ ) estimées d'une série de dilution mesurée selon le protocole A. La valeur minimale de la fonction objective  $J_{opt}$  est présentée. La fraction de détachement par minute (FD) a été fixée à  $0.021 \text{ min}^{-1}$ .

Code	Dilution	<i>E. coli</i> log UFC/100ml	AE (nmol MU/min/100ml)	$MU_0$ (nmol MU/l)	$J_{opt}$
100310D	1	5.06	28	56	0.376
100310E	1	5.06	30	38	0.120
100310F	1	5.06	27	42	0.229
100324B	1	5.06	34	50	0.339
Moyenne			30		
Écart-type			3.3		
Coefficient de variation			11%		
100310G	2	4.75	7.9	30	1.290
100310H	3.33	4.55	8.7	39	0.126
100310I	10	4.06	2.26	40	0.224

La Figure 9.10 présente l'activité enzymatique selon la concentration d'*E. coli* de la série de dilution dans une échelle log-log. La pente (coefficient  $a$  de l'Équation 3.1) est de 1.11 ce qui est relativement proche de 1, c'est-à-dire que l'activité enzymatique par *E. coli* ( $ae$ ) était relativement constante pour différentes dilutions.

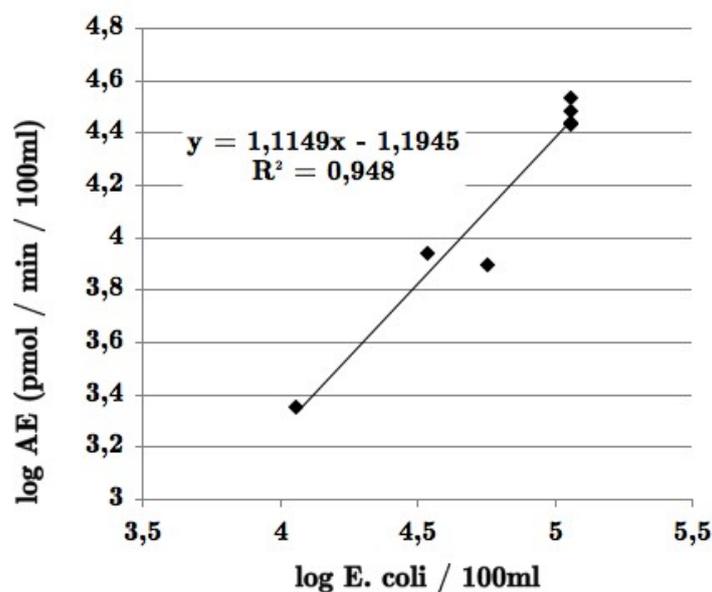


FIGURE 9.10 – Régression linéaire pour une échelle log-log entre l'activité enzymatique et la concentration d'*E. coli* pour une série de dilution d'un échantillon.

### 9.3 Discussion

La méthode de la mesure de l'activité enzymatique a démontré des avantages par rapport à la méthode d'énumération en milieu de croissance. Les améliorations sont considérables pour la plage de mesure et l'exactitude. Le coût de cette méthode est de 6.00\$ par essai dont 5.73\$ pour les huit filtres : les deux filtres pour filtrer l'échantillon et les six filtres pour filtrer les 6 aliquotes pendant l'essai (Tableau A.5). Le coût de la mesure de l'activité enzymatique est donc le double du coût de la méthode d'énumération en milieu de croissance, soit 3.17\$ par boîte de pétri. Cependant, pour obtenir une densité de colonies acceptable sur la boîte, il faut souvent mesurer trois dilutions, ce qui fait 3.17\$ fois trois dilutions fois trois répétitions ou donc 28.53\$. Pour une mesure de l'activité enzymatique, il suffit d'effectuer trois répétitions d'une mesure, ce qui fait 18.00\$. Le temps d'analyse d'un essai est d'environ 30 minutes mais il faut ajouter le temps pour effectuer la filtration ( $\pm 2$  minutes) plus le temps pour mesurer la fluorescence ( $\pm 1$  minute par aliquote). Deux à trois essais peuvent être effectués à la fois.

**La plage de mesure** La mesure de l'activité enzymatique peut être réalisée dans la plage de mesure relativement indépendante de la concentration d'*E. coli* d'un échantillon. Pour

cette étude, la plage d'intérêt de la concentration d'*E. coli* est de  $10^2$  à  $10^4$  UFC/100ml. La concentration de MU anticipée varie entre  $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  mol MU/l et deux courbes d'éta-lonnage de la mesure de fluorescence couvrent l'ensemble de cette plage. Pour mesurer des concentrations d'*E. coli* plus élevée, il suffit de calibrer le spectrofluoromètre pour des concentrations de MU plus élevée. La limite de détection du spectrofluoromètre correspond à une concentration de MU de  $2.0 \cdot 10^{-9}$  mol/l, c'est-à-dire  $10^2$  UFC d'*E. coli* sur le filtre ou une concentration d'*E. coli* de  $10^2$  UFC/100ml en filtrant 100 ml d'échantillon. Une fil-tration d'une plus grande volume permettra de mesurer des concentrations d'*E. coli* plus basses.

**L'exactitude** Cette méthode ne sous-estime pas la concentration des bactéries lorsqu'une fraction est attachées aux particules. Une centrifugation permet de séparer les particules avec les bactéries attachées et donc de mesurer la concentration des bactéries en suspension. De plus, la mesure de l'activité enzymatique quantifie toutes les bactéries, donc aussi les bactéries actives mais non cultivables.

**La résolution et la précision** Compte tenu de la modélisation de la répartition d'*E. coli* entre l'eau et les particules et comme la fraction d'*E. coli* attachés aux particules se situe entre 20 et 50% (Chapitre 2), il faut une méthode de haute résolution pour distinguer ces bactéries de celles en suspension. Une méthode qui est capable de distinguée une différence de concentrations d'*E. coli* d'au moins 20% en faisant trois répétitions était visée. La préci-sion d'une énumération en milieu de croissance, exprimée comme l'écart-type géométrique, était souvent trop faible (Section 8.5).

La distribution de l'erreur d'une mesure de fluorescence peut être considérée normale (Ea-ton *et al.*, 2005). La tendance centrale est donc la moyenne arithmétique. Le test  $t$  unidirec-tionnel permet de calculer l'écart-type arithmétique maximal acceptable afin de distinguer 20% de bactéries en trois répétitions. Selon l'hypothèse nulle, la concentration moyenne des deux mesures est égale. Selon l'hypothèse alternative, la concentration moyenne mesurée avec une méthode qui compte toutes les bactéries ( $\mu_{a1}$ ) est plus grande que la concentra-tion mesurée avec une méthode qui ne compte que les bactéries en suspension ( $\mu_{a2}$ ), par exemple après une centrifugation (Équation 9.18). La valeur de  $t$  doit être supérieure à  $t_{\alpha;2(n-1)}$  afin de rejeter l'hypothèse nulle, ce qui équivaut à un coefficient de variation (CV) maximal de 8.82% en supposant l'écart-type des deux moyennes  $\bar{X}_{a1}$  et  $\bar{X}_{a2}$  identiques (Équations 9.19 à 9.21).

$$H_0 : \mu_{a1} = \mu_{a2} \quad (9.18)$$

$$H_1 : \mu_{a1} > \mu_{a2}$$

$$t = \frac{\bar{X}_{a1} - \bar{X}_{a2}}{\sqrt{\frac{2 S_a^2}{n}}} \text{ et } \bar{X}_{a2} = (1 - f) \times \bar{X}_{a1} \quad (9.19)$$

$$H_1 : t > t_{\alpha;2(n-1)} = 2.776 \quad (9.20)$$

$$CV = \frac{S_a}{\bar{X}_{a1}} < \frac{f}{\sqrt{\frac{2}{n}} t_{\alpha;2(n-1)}} = 8.82\% \quad (9.21)$$

$\bar{X}_a$  : moyenne arithmétique de l'échantillon

$S_a$  : écart-type arithmétique de l'échantillon

$n$  : taille de l'échantillon (3)

$f$  : fraction des bactéries attachées aux particules (20%)

$CV$  : coefficient de variation

Le coefficient de variation des essais effectués était de 20% (Tableau 9.2) pour une incubation sans filtre et de 23, 29 et 11% pour différents essais avec filtre (Tableaux 9.3, 9.4 et 9.5). Les coefficients de variation obtenus des essais effectués étaient donc trop élevés. Plusieurs nouveaux essais devront confirmer la précision d'une mesure de l'activité enzymatique.

## 9.4 Conclusion

La méthode de la mesure de l'activité enzymatique d'*E. coli* a été développée. Cette méthode répond à plusieurs problèmes d'une énumération en milieu de croissance :

- La plage de mesure est suffisamment grande pour mesurer les concentrations d'*E. coli* attendue dans le bassin d'orage et peut facilement être élargie pour des concentrations d'*E. coli* plus élevées.
- Elle donne une estimation de la concentration d'*E. coli* plus exacte, c'est-à-dire, elle ne sous-estime pas la concentration lorsqu'il y a des bactéries attachées aux particules ou des bactéries actives mais non cultivables.
- Une technique pour disperser les bactéries attachées aux particules n'est donc plus nécessaire.

- Le coût de la mesure de l'activité en moins élevé que le coût d'une énumération en boîte de pétri en tenant compte des plusieurs dilutions qui doivent être essayer afin d'obtenir une densité de colonies acceptable sur la boîte de pétri.

Cependant, une précision plus élevée, afin de pouvoir distinguer une différence de 20% de la concentration d'*E. coli*, n'as pas été obtenue.

## 9.5 Perspectives

La méthode de la mesure de l'activité enzymatique est prête pour être tester sur des échantillons environnementaux du bassin d'orage. Cependant, quelques considérations devraient être vérifiées :

- La mesure de l'activité enzymatique d'un échantillon après une centrifugation, ce qui décante les bactéries attachées aux particules, permettra de mesurer la concentration d'*E. coli* en suspension. La différence entre cette concentration et la concentration totale d'*E. coli* est la concentration d'*E. coli* attaché aux particules. Une centrifugation de grandes volumes ( $\pm 100$  ml) est nécessaire pour être compatible avec la mesure de l'activité enzymatique.
- Confirmation de l'effet d'une série de dilution d'un échantillon. La mesure de l'activité enzymatique d'une série de dilution devrait donner une activité enzymatique par *E. coli* constante pour chaque dilution. Cette considération est importante et renforcera la fiabilité de la méthode. Quelques essais ont déjà été effectués (Section 9.2.4), mais doivent encore être confirmés.
- L'effet de la concentration en MeS sur le détachement des bactéries du filtre. Les essais effectués dans cette étude proviennent d'un échantillon de l'affluent d'un décanteur primaire d'une usine de traitement d'eau usée dont la concentration d'*E. coli* est plus élevée que la concentration anticipée dans le bassin d'orage. Ces essais ont donc été effectués avec des petits volumes de sorte que le nombre de bactéries sur le filtre soit dans la plage anticipée mais la charge en MeS était relativement basse. Les concentrations d'*E. coli* dans le bassin d'orage sont moins élevées et des plus grands volumes seront filtrés de sorte qu'il y aura plus de MeS sur le filtre.
- Pendant une campagne d'échantillonnage, la fraction détachée par minute d'*E. coli* pourrait être estimée une fois à l'aide du protocole B (Chapitre 6). Cette valeur estimée pourrait être utilisée pour estimer l'activité enzymatique d'*E. coli* de plusieurs échantillons.

De plus, quelques améliorations possibles devraient être évaluées :

- Les filtres forment une partie importante du coût de la mesure de l'activité enzymatique. Il faudrait évaluer les filtres utilisés pour vérifier si une réduction du coût serait possible.
- Pour écourter le temps d'analyse, le spectrophotomètre de fluorescence (Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer, Varian) peut être équipé d'un lecteur pour microplaques ce qui permettrait de mesurer la fluorescence de 96 aliquotes en 50 secondes (Varian, 2010).
- Un filtre à pores de  $0.2\ \mu\text{m}$  pourrait être utilisé afin de minimiser les pertes d'enzymes extracellulaires. Aussi les caractéristiques (comme l'hydrophobicité) du matériel du filtre pourraient être optimisées afin de mieux retenir les enzymes.
- Un mélange standardisée du contenu de l'erlenmeyer pourrait limiter les erreurs de mesure de la concentration de MU causée par la diffusion limitée du substrat et du produit de décomposition dans le filtre.
- Le protocole de la mesure de l'activité enzymatique pourrait être modifié afin d'éliminer les variations de la concentration d'*E. coli* liées au détachement du filtre. La concentration de MU pourrait n'être mesurée qu'au début et à la fin de d'un essai avec filtre. Comme le volume de la solution ne changera plus pendant l'expérience, cette méthode assurerait une concentration d'*E. coli* constante pendant l'essai, comme dans un essais sans filtre. Suivant cette approche, un protocole C (Annexe C) a été élaboré, mais il n'a pas encore été testé. Il y a plusieurs autres avantages à ce protocole. une plus grande intensité de mélange serait permise et stimulera la diffusion du substrat et du produit de décomposition dans le filtre. Ce protocole permettra d'accomplir plusieurs essais à la fois car il suffira de prélever des aliquotes au début et à la fin de l'essai, une plus grande capacité de mesures de la concentration d'*E. coli* serait possible. Le coût de cette méthode reviendrait à 2.13\$ par essai grâce à la diminution des filtrations à effectuer pour l'analyse de la fluorescence.

## Quatrième partie

### Résultats - la modélisation

# Chapitre 10

## Un concept de description de transport

La modélisation des conversions de matière dans des réacteurs biologiques ou chimiques a été conceptualisée dans une approche généralisée. L'idée de cette généralisation est d'écrire les équations de conversion dans une matrice de stœchiométrie et une matrice de cinétique. Ce concept a structuré la modélisation des conversions. Par contre, la modélisation de transport de la matière entre des systèmes ou sous-systèmes (des réacteurs ou des compartiments d'un réacteur) n'a pas encore été structurée. Ce chapitre traite le développement d'une formulation matricielle générale qui décrit le transport de masse entre différents systèmes ou sous-systèmes.

### 10.1 Le transport

Le transport de matériel est le résultat (a) de l'advection, (b) de la diffusion ou (c) de la sédimentation / flottation. L'advection est le transport avec le déplacement de l'eau. La diffusion est le transport d'échange de masse entre deux systèmes. Si les deux systèmes sont en déséquilibre, l'échange de masse nette est non nulle. Ce transport est proportionnel au gradient de concentration. La sédimentation / flottation est causée par la gravité. Les processus de transport déplacent des masses (a) de l'environnement vers le système, (b) entre les sous-systèmes et (c) du système vers l'environnement.

Une masse d'un composant  $l$  peut être transportée par les frontières du système ou des sous-systèmes. Son processus de transport est caractérisé par un flux de masse spécifique  $j_l$ . Un flux de masse spécifique est une propriété intensive et vectorielle et indique la quantité de masse  $l$  transportée par unité de temps par unité de surface. La frontière d'un système est divisée en  $t$  surfaces par lesquelles  $t$  processus de transport sont définis. Le transport

net  $J_l$  d'un composant est une propriété extensive et scalaire :

$$J_l = \sum_t j_{n,l,t} \times A_t \quad (10.1)$$

$J_l$  : le transport total du système ( $M_l T^{-1}$ )

$j_{n,l,t}$  : le flux spécifique de masse du processus de transport  $t$  ayant une direction normale à la surface  $A_t$  ( $M_l L^{-2} T^{-1}$ )

$A_t$  : la surface par laquelle chaque flux  $t$  est transporté.

$j_{n,l,t}$  est positif si le processus de transport  $t$  ajoute de la masse dans le système et est négatif si le processus extrait de la masse du système. Le flux  $j_{n,l,t}$  est obtenu par le produit vectoriel :

$$j_{n,l,t} = -\vec{j}_{l,t} \times \vec{n} \quad (10.2)$$

$\vec{j}_{l,t}$  : le flux spécifique de masse du processus de transport  $t$ , une propriété vectorielle ( $M_l L^{-2} T^{-1}$ )

$\vec{n}$  : vecteur ayant une direction normale à la surface et vers l'extérieure (-)

## 10.2 Le transport macroscopique

Le transport macroscopique décrit (a) le transport de la masse dans le système entre les compartiments et (b) la sortie des masses du système vers l'environnement. Tous ces transports sont définis à travers les frontières du système et des sous-systèmes et sont le résultat d'advection et de sédimentation. Le transport macroscopique décrit le déplacement d'une masse du système dont la concentration est connue. L'entrée de masse de l'environnement vers le système n'est pas décrite par le transport macroscopique car sa concentration n'est pas une variable d'état du système. Le transport macroscopique est calculé par un vecteur  $\vec{n}$  (-) multiplié par un flux de masse spécifique  $\vec{j}_l$  ( $g m^{-2} s^{-1}$ ).

Le flux de masse spécifique  $\vec{j}_l$  entre deux compartiments  $k_1$  et  $k_2$  ( $j[k_1 \rightarrow k_2][l]$ ) est le résultat de la vitesse de transport  $v$  ( $m s^{-1}$ ) multipliée par la concentration  $C$  ( $g m^{-3}$ ) de la masse transportée. Le flux de masse spécifique ( $g m^{-2} s^{-1}$ ) entre les compartiments est donc :

$$\vec{j}[k_1 \rightarrow k_2][l] = C[k_1][l] \times v[k_1 \rightarrow k_2][l] \quad (10.3)$$

La vitesse de transport est orientée selon la direction du transport et est donc positive. Le flux de masse spécifique  $\vec{j}[k_1 \rightarrow k_2][l]$  a la même direction que la vitesse de transport. Le flux de masse  $j_i$  est :

$$j[k_1 \rightarrow k_2][l] = -\vec{n} \times \vec{j}[k_1 \rightarrow k_2][l] \quad (10.4)$$

avec  $\vec{n}$  un vecteur ayant une direction normale à la surface et vers l'extérieure.

Le flux de masse  $j_i$  du compartiment  $k_1$  est de :

$$j[k_1][l] = -(\vec{1}) \times \vec{j}[k_1 \rightarrow k_2][l] \quad (10.5)$$

Le flux de masse  $j_i$  du compartiment  $k_2$  est de :

$$j[k_2][l] = -(-\vec{1}) \times \vec{j}[k_1 \rightarrow k_2][l] \quad (10.6)$$

Un processus de transport entre les compartiments  $k_2$  et  $k_1$  a un flux vectoriel  $\vec{j}_i[k_2 \rightarrow k_1][l]$  qui est aussi positif :

$$\vec{j}[k_2 \rightarrow k_1][l] = C[k_2][l] \times v[k_2 \rightarrow k_1][l] \quad (10.7)$$

La vitesse de transport est orientée selon la direction du transport et est donc positive. Le flux vectoriel  $\vec{j}[k_2 \rightarrow k_1][l]$  est donc positif. Le flux  $j_i$  des compartiments  $k_1$  et  $k_2$  est de :

$$j[k_1][l] = -(-\vec{1}) \times \vec{j}[k_2 \rightarrow k_1][l] \quad (10.8)$$

$$j[k_2][l] = -(\vec{1}) \times \vec{j}[k_2 \rightarrow k_1][l] \quad (10.9)$$

La direction d'un processus de transport ( $k_1 \rightarrow k_2$  ou  $k_2 \rightarrow k_1$ ) n'existe que si la vitesse de transport est positive entre les compartiments  $k_1$  et  $k_2$  ou respectivement entre les compartiments  $k_2$  et  $k_1$ . La fonction  $\langle v \rangle$  élimine les vitesses négatives et donne la valeur  $v$  si  $v > 0$  et 0 si  $v \leq 0$  :

$$\langle v \rangle = \begin{cases} v & \text{si } v > 0 \\ 0 & \text{si } v \leq 0 \end{cases} \quad (10.10)$$

Les flux nets  $J_i$  calculé à partir des équations 10.5, 10.6, 10.8 et 10.9 pour les compartiments  $k_1$  et  $k_2$  peuvent, selon équation 10.1, être écrits de la manière suivante :

$$J[k_1][l] = (-1) \times A_{k_1 \rightarrow k_2} \times \langle j[k_1 \rightarrow k_2][l] \rangle + (+1) \times A_{k_2 \rightarrow k_1} \times \langle j[k_2 \rightarrow k_1][l] \rangle \quad (10.11)$$

Et

$$J[k_2][l] = (-1) \times A_{k_2 \rightarrow k_1} \times \langle j[k_2 \rightarrow k_1][l] \rangle + (+1) \times A_{k_1 \rightarrow k_2} \times \langle j[k_1 \rightarrow k_2][l] \rangle \quad (10.12)$$

Sous forme matricielle, le transport vectoriel entre  $k_1$  et  $k_2$  s'écrit de la manière suivante :

$$\begin{bmatrix} J[k_1] \\ J[k_2] \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & +1 \\ +1 & -1 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} A_{k_1 \rightarrow k_2} & 0 \\ 0 & A_{k_2 \rightarrow k_1} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} C[k_1] & 0 \\ 0 & C[k_2] \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \langle v[k_1 \rightarrow k_2] \rangle \\ \langle v[k_2 \rightarrow k_1] \rangle \end{bmatrix} \quad (10.13)$$

En général, le transport macroscopique par composant, avec l'indice du composant, T le nombre de transports et K le nombre de compartiments, s'écrit de la manière suivante :

$$\text{MacroscopicTransportPerComponent}[k][l] = n_t \times C_t[l] \times A_t \times v_t[l] \quad (10.14)$$

La matrice  $n_t$  contient  $K \times T$  vecteurs  $n[t][k]$  (avec valeur -1, +1 ou 0) qui donnent la direction aux transports :

$$n_t = \begin{bmatrix} n[t_1][1] & \dots & n[t_T][1] \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ n[t_T][K] & \dots & n[t_T][K] \end{bmatrix} \quad (10.15)$$

$K \times T$

La matrice diagonale  $C_t$  contient sur l'axe diagonale les T concentrations  $C_t$  transportées.

$$C_t[l] = \begin{bmatrix} C[t_1] & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \ddots & 0 & \vdots \\ \vdots & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & \dots & 0 & C[t_T] \end{bmatrix}_i \quad (10.16)$$

$T \times T$

La matrice diagonale  $A_t$  contient les T surfaces par lesquelles les concentrations sont transportées.

$$A_t = \begin{bmatrix} A[t_1] & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \ddots & 0 & \vdots \\ \vdots & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & \dots & 0 & A[t_T] \end{bmatrix} \quad (10.17)$$

$T \times T$

Le vecteur  $v_t$  contient les vitesses positives des T transports.

$$v_t[l] = \begin{bmatrix} \langle v[t_1] \rangle \\ \vdots \\ \langle v[t_T] \rangle \end{bmatrix}_i \quad (10.18)$$

$T \times 1$

Le produit des termes  $C_t[l]$ ,  $A_t$  et  $v_t[l]$ , étant  $J_t[l]$ , est le flux du transport macroscopique :

$$J_t[l] = C_t[l] \times A_t \times v_t[l] \quad (10.19)$$

La transposée du terme  $n_t[l]$ , étant  $\eta_t[l]$ , est la connectivité du transport macroscopique :

$$\eta_t[l] = n_t[l]^T \quad (10.20)$$

### 10.3 Le transport diffusionnel

Le transport diffusionnel décrit la diffusion de masse causée par un gradient de concentration entre deux sous-systèmes. Cette diffusion cause l'absorption ou l'adsorption / désorption entre deux sous-systèmes. Des équations semblables aux équations du transport macroscopique peuvent être utilisées pour décrire le transport diffusionnel. La matrice diagonale  $C_t$  (Équation 10.16) du transport diffusionnel contiendrait sur l'axe diagonale les gradients considérés entre deux compartiments du système et le vecteur  $v_t$  (Équation 10.18) du transport diffusionnel contiendrait les coefficients de cinétique de diffusion. Le développement des matrices de transport diffusionnel n'est pas présenté car il n'y a pas de transports diffusionnels considérés dans le modèle présenté dans la section 11.

### 10.4 Les matrices de conversion et de transport

La Figure 10.1 présente les matrices de conversion et de transport macroscopique. Les matrices de conversion se composent d'une matrice de stœchiométrie ( $\nu$ ) et d'une matrice de cinétique ( $\rho$ ). Les matrices de transport se composent d'une matrice de flux de masse ( $J$ ) et d'une matrice de connectivité ( $\eta$ ). Les deux types de transport considérés, le transport macroscopique et le transport diffusionnel peuvent être présentés dans les mêmes matrices.

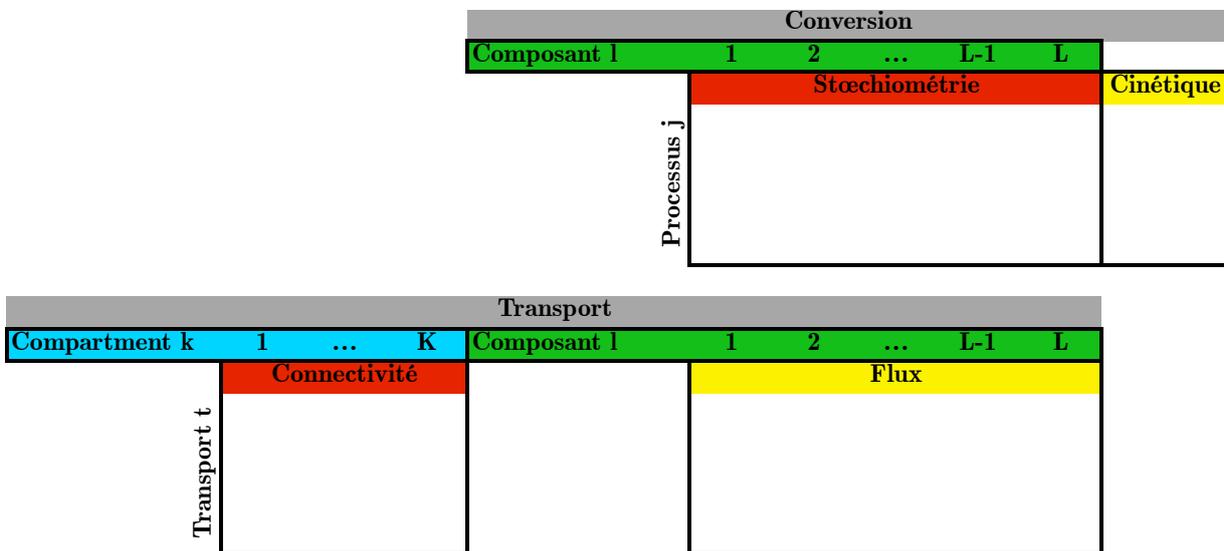


FIGURE 10.1 – La présentation des matrices de conversion et de transport.

La variation de masse par unité de temps causée par des conversions et des transports

macroscopiques ou diffusionnel peuvent être écrites comme suit :

$$\begin{aligned} \text{ConversionPerComponent}[k][l] &= V[k] \times \sum_{j=1}^{j_{max}} \nu[j][k][l] \times \rho[j][k] \\ \text{TransportPerComponent}[k][l] &= \sum_{t=1}^T \eta[t][l] \times J[t][k][l] \end{aligned} \tag{10.21}$$

où  $l$  est l'indice du composant,  $k$  l'indice du compartiment,  $j$  l'indice du processus de conversion et  $t$  l'indice du processus de transport.

# Chapitre 11

## Modélisation du comportement d'un pathogène et d'une classe de particules

L'enlèvement d'*E. coli* dans un bassin dépend de plusieurs processus. Une fraction non négligeable d'*E. coli* est enlevée par la décantation de la matière en suspension. Deux paramètres clé pour la décantation sont la partition d'*E. coli* entre l'eau et la matière en suspension et la vitesse de sédimentation de la matière en suspension. L'inactivation dans le bassin d'orage, avec une basse concentration de nutriments, est considérable et est renforcée par la désinfection par la lumière solaire.

### 11.1 La définition du modèle : STMa1

STMa1 (*Stormwater Tank Model #a1*), ou modèle d'un bassin d'orage #a1, décrit le comportement d'un pathogène, *E. coli*, en interaction avec une classe de particules. L'indice *a* correspond au modèle de transport et l'indice 1 correspond au modèle de conversion. Le bassin est décrit par plusieurs bassins en série et en parallèle afin de bien modéliser l'hétérogénéité horizontale et les courants dans le bassin. Chaque bassin comprend un nombre couches qui représentent l'hétérogénéité verticale du bassin, similaire au modèle de Takacs *et al.* (1991). Chaque couche est un réacteur complètement mélangé et homogène dans toutes ses caractéristiques.

Le modèle au complet est construit à base de trois définitions : les composants, les médias et les compartiments. Les médias et les compartiments sont les sous-systèmes du bassin. Le bassin est composé de K compartiments (indice k) et chaque compartiment est composé de M médias (indice m) et L composants (indice l). Les L composants du système sont regroupés en M médias.

### 11.1.1 Les composants du STMa1

STMa1 compte 4 variables d'état, les composants. Les composants solubles sont identifiés par  $S$  et les composants particulaires par  $X$ . Les composants solubles ne décantent pas tandis que les composants particulaires sont caractérisés par une vitesse de sédimentation.

1.  $H_2O$  [g H<sub>2</sub>O] : La masse d'eau
2.  $S_{PATH}$  [Unités de pathogènes] : Les pathogènes dans la colonne d'eau.
3.  $X$  [g MES] : Les particules caractérisées par une vitesse de décantation.
4.  $X_{PATH}$  [Unité de pathogènes] : Les pathogènes attachés aux particules.

### 11.1.2 Les médias du STMa1

Les composants sont regroupés en deux médias (Tableau 11.1). Un médium regroupe certaines caractéristiques qui sont similaires pour plusieurs composants qui l'appartiennent comme la vitesse de sédimentation de  $X$  et  $X_{PATH}$ . Le regroupement en médias permet de réduire le nombre d'équations nécessaire pour décrire un comportement similaire des composants.

1. *Water* : regroupe tous les composants solubles ( $S_{PATH}$ ) et l'eau ( $H_2O$ ). Ces composants sont transportés par l'advection, c'est-à-dire qu'ils ont une vitesse de transport égale à celle de l'eau.
2. *Particle* : regroupe une classe de particules ( $X$ ) et les composants attachés à cette classe de particules ( $X_{PATH}$ ). Ces composants ont une vitesse différente de celle de l'eau causée par la sédimentation.

**Tableau 11.1** – La matrice des indices des médias

Médias $m \rightarrow$	<i>Water</i>		<i>Particle</i>	
Composants $l \rightarrow$	$H_2O$ [g H <sub>2</sub> O]	$S_{PATH}$ [U PATH]	$X$ [g MES]	$X_{PATH}$ [U PATH]

### 11.1.3 Les compartiments du STMa1

La Figure 11.1 présente un bassin à trois couches. Chaque couche a un volume  $V[k]$  et une surface  $A$  identique, est alimentée par un débit d'entrée, vidée par un débit de sortie et est en relation avec la couche au-dessus et au-dessous. Le déversement de la couche 1 (Surverse) se fait quand le volume maximal du bassin est atteint par remplissage et est égal à la somme des débits d'entrée moins la somme des débits de sortie.

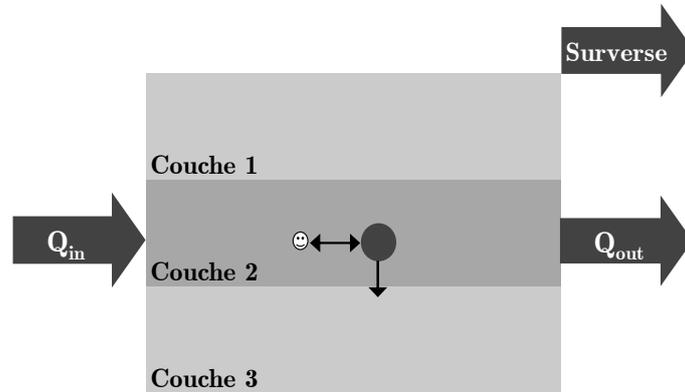


FIGURE 11.1 – Schéma du modèle STMa1 proposé avec trois couches.

## 11.2 Les équations différentielles du STMa1

Dans le modèle, la matrice  $M$  contient la masse de chaque composant  $l$  de chaque compartiment  $k$ .  $M$  a les dimensions  $K \times L$ . La variation de la masse de chaque composant  $l$  de chaque compartiment  $k$  par unité de temps est la somme de la conversion du composant et de son transport.

1. ConversionPerComponent [ $M \text{ s}^{-1}$ ] : La variation de la masse des composants dans chaque compartiment causée par des conversions. Les conversions sont décrites par le modèle STM1.
2. TransportPerComponent [ $M \text{ s}^{-1}$ ] : La variation de la masse des composants dans chaque compartiment suite (a) à l'entrée, (b) à la sortie et (c) au transport par advection du médium *Water* et de sédimentation du médium *Particle* entre les couches. Les transports sont décrits dans le modèle STMa.

$$\begin{aligned} \frac{dM}{dt}[k][l] = & \text{ConversionPerComponent}[k][l] \\ & + \text{TransportPerComponent}[k][l] \end{aligned} \quad (11.1)$$

## 11.3 Le transport : STMa

Dans le Chapitre 10, une formulation matricielle qui facilite l'écriture des équations différentielles de transport a été développée. Cette formulation pour décrire le transport macroscopique (advection et sédimentation) s'applique aux transports des composants entre

les compartiments et à la sortie des composants du système, c'est-à-dire aux transports des masses dont la concentration est connue dans la matrice M. Les entrées de masse dans chaque compartiment ne peuvent donc pas être décrites par cette formulation et doivent être ajoutées comme un flux entrant du modèle.

L'équation différentielle de transport du modèle STMa s'écrit comme suivant :

$$\begin{aligned} TransportPerComponent[k][l] = & InfluxPerComponent[k][l] \\ & + MacroscopicTransportPerComponent[k][l] \end{aligned} \quad (11.2)$$

1.  $InfluxPerComponent [M T^{-1}]$  : Le transport des composants de l'environnement dans les compartiments. Ce transport net  $J_l$  est toujours positif.
2.  $MacroscopicTransportPerComponent [M T^{-1}]$  : Le transport macroscopique d'advection et de sédimentation / flottation des composants entre les compartiments et la sortie des composants de chaque compartiment vers l'environnement. Ces processus de transport déplacent une masse d'un composant du système qui est définie dans la matrice M. Le transport net  $J_l$  de ce processus est positif ou négatif pour le compartiment.

### 11.3.1 Les débits dans le bassin

Chaque couche est caractérisée par un débit d'entrée, un débit de sortie et un débit qui monte, c'est-à-dire versant dans la couche au-dessus. Le débit d'entrée ( $Qin[k]$ ) et le débit de sortie ( $Qout[k]$ ) de chaque couche sont des entrées du modèle et ont une valeur positive. Le débit qui monte ( $Qup[k]$ ) est une variable et est calculé à partir des Équations 11.3 et 11.4 (Vallet *et al.*, 2010). La valeur de  $Qup[k]$  peut être négative ou positive.  $Qup[1]$  est le débit de la surverse du bassin et  $Qup[K+1]$ , avec K le nombre de couches, est le débit de l'infiltration. L'infiltration sera négligée pour cet exemple de STMa.

$$Qup[k] = Qin[k] - Qout[k] + Qup[k + 1] - \frac{dV}{dt}[k] \quad (11.3)$$

$\frac{dV}{dt}[k]$  est la variation du volume de chaque couche :

$$\frac{dV}{dt}[k] = \begin{cases} \frac{Qin - Qout}{k_{max}} & \text{si } V < V_{max} \\ 0 & \text{si } V \geq V_{max} \end{cases} \quad (11.4)$$

### 11.3.2 Le transport macroscopique

Le transport macroscopique par composant de STMa est écrit de la manière suivante :

$$MacroscopicTransportPerComponent[k][l] = \sum_{t=1}^T \eta[t][l] \times J[t][k][l] \quad (11.5)$$

La Figure 11.2 présente les 9 processus de transport qui sont considérés dans STMa avec trois couches : 3 transports montants, 3 transports descendants et 3 transports sortants des couches. Les Tableaux 11.2 et 11.3 montrent le flux de masse et la connectivité des 9 processus de transport. La cinétique de  $H_2O$  et  $S_{PATH}$  du médium *Water* et celle de  $X$  et  $X_{PATH}$  sont identiques. Il est donc suffisant d'écrire que les cinétiques par médium.

La Figure 11.3 présente les vecteurs des transports macroscopiques sortants du compartiment  $k$  et l'influx de compartiment  $k$ . Le flux d'un transport macroscopique d'un médium correspond à la concentration du composant du médium multiplié par la longueur du vecteur net qui est la somme vectorielle des vecteurs qui influencent le médium. Le vecteur net doit avoir une orientation normale et vers l'extérieur du compartiment  $k$  et a donc une valeur positive.

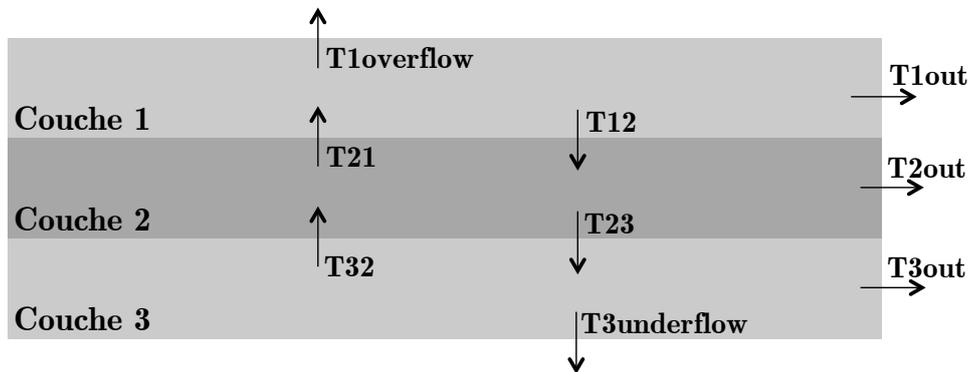


FIGURE 11.2 – Présentation des transports macroscopiques de l'exemple du modèle STMa avec trois couches. T1overflow est la surverse du bassin et T3underflow est l'infiltration.

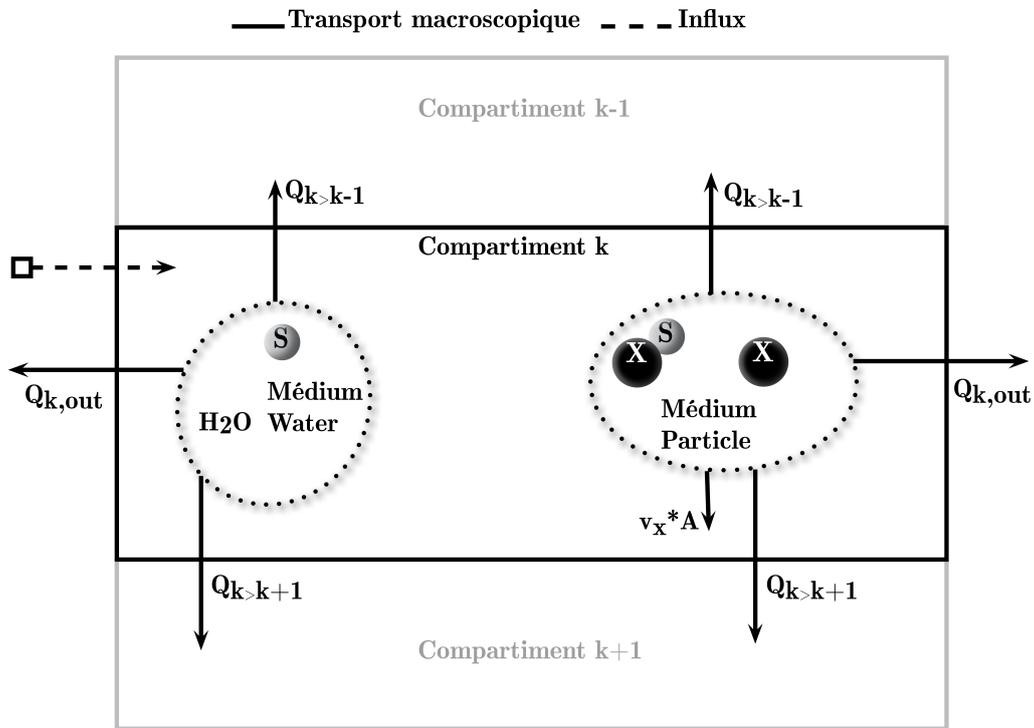


FIGURE 11.3 – Les transports macroscopiques (advection et sédimentation) et l’influx de la couche k du STMa.

Tableau 11.2 – La matrice des flux des transports macroscopiques  $J[t][k][l]$ .

Compartiments k →	1	2	3
↓ Transports t			
T1overflow	-1		
T21	1	-1	
T32		1	-1
T12	-1	1	
T23		-1	1
T1out	-1		
T2out		-1	
T3out			-1

**Tableau 11.3** – La matrices de connectivité des transport macroscopiques  $\eta[t][m]$  des médias Water et Particle.

Média m → ↓ Transport t	$J[t][\text{Water}]$ [g s <sup>-1</sup> ]	$J[t][\text{Particle}]$ [g s <sup>-1</sup> ]
T1overflow	$C[1] \times \langle \text{Qup}[1] \rangle$	$C[1] \times \langle \text{Qup}[1] - v_X \times A \rangle$
T21	$C[2] \times \langle \text{Qup}[2] \rangle$	$C[1] \times \langle \text{Qup}[2] - v_X \times A \rangle$
T32	$C[3] \times \langle \text{Qup}[3] \rangle$	$C[3] \times \langle \text{Qup}[3] - v_X \times A \rangle$
T12	$C[1] \times \langle -\text{Qup}[2] \rangle$	$C[1] \times \langle -\text{Qup}[2] + v_X \times A \rangle$
T23	$C[2] \times \langle -\text{Qup}[3] \rangle$	$C[2] \times \langle -\text{Qup}[3] + v_X \times A \rangle$
T1out	$C[1] \times \langle \text{Qout}[1] \rangle$	$C[1] \times \langle \text{Qout}[1] \rangle$
T2out	$C[2] \times \langle \text{Qout}[2] \rangle$	$C[2] \times \langle \text{Qout}[2] \rangle$
T3out	$C[3] \times \langle \text{Qout}[3] \rangle$	$C[3] \times \langle \text{Qout}[3] \rangle$
T3undeflow	0	0

### 11.3.3 Les paramètres de transport pour le bassin d'orage

Garcia-Armisen & Servais (2009) ont estimé la vitesse de décantation globale d'*E. coli* selon la charge en MeS dans l'eau de rivière. Ils ont rapporté une vitesse moyenne constante de 0.066 mh<sup>-1</sup> à partir d'une concentration de MeS de 50 mg/l. Auer & Niehaus (1993) ont estimé la vitesse de sédimentation des coliformes fécaux attachés aux particules de 0.45 à 10 μm de 0.048 mh<sup>-1</sup> et de 0.1 mh<sup>-1</sup> pour les coliformes fécaux attachés aux particules de > 10 μm.

**Tableau 11.4** – La définition, la valeur et les unités du paramètre de transport macroscopique

Symbole	Définition	Valeur	Unité
$v_X$	La vitesse de sédimentation du médium <i>Particle</i>	1.6	m j <sup>-1</sup>

## 11.4 Les Conversions : STM1

### 11.4.1 Les conditions environnementales : la température, la concentration de sel et la lumière solaire

La température, l'intensité de la lumière solaire et la salinité ne sont pas considérées comme composants du modèle, mais comme des conditions environnementales. Les trois conditions

environnementales des conversions de STM1 sont :

1.  $I$  [ $\text{W m}^{-2}$ ] : L'intensité moyenne de la lumière solaire dans chaque compartiment.
2.  $T$  [ $^{\circ}\text{C}$ ] : La température de l'eau dans le bassin.
3.  $S_{salt}$  [ $\text{g m}^{-3}$ ] : La salinité de l'eau dans le bassin.

La température et la salinité sont considérées comme étant uniformes pour tous les compartiments (Tableau 11.5). L'intensité de la lumière solaire est considérée comme étant uniforme pour chaque couche mais diminue entre les couches selon la loi de Lambert-Beer suite à l'extinction par l'eau et par la présence de la MeS. L'intensité de la lumière solaire à la surface de la couche 1 est influencée par la réflexion et par l'atténuation causée par la végétation du bassin. Kirk (1983) a estimé que la valeur du facteur de réflexion se situe entre 5.2% et 6.6%. Struck *et al.* (2008) ont estimé que, dans un marais avec une végétation dense, seulement 10% de la lumière atteint la surface pendant 6 heures par jour. La végétation n'a pas une grande influence pendant les autres 18 heures. L'intensité moyenne de la lumière solaire pour une année est estimée à  $120 \text{ Wm}^{-2}$  et l'atténuation à la surface à 28%. Le coefficient d'extinction totale pour chaque couche  $k$  (Chapra, 1997) :

$$K_e[k] = K_e(MeS) \times C[k][X] + K_e(H_2O) \quad (11.6)$$

L'intensité à la surface de chaque couche de hauteur  $H$  :

$$I_0[k] = I_0[k-1] \times e^{-K_e[k-1] \times H} \quad (11.7)$$

avec l'intensité à la surface de la première couche :

$$I_0[1] = (1 - F_{I,a}) \times I_{Surface} \quad (11.8)$$

Chapra (1997) a décrit l'intensité moyenne de la lumière dans un bassin avec un hauteur d'eau  $H$  comme suit :

$$I = I_0 \times \frac{\int_0^H e^{-K_e \times h} dh}{H} \quad (11.9)$$

L'intensité moyenne de la lumière pour chaque couche  $k$  :

$$I[k] = I_0[k] \times \frac{\int_{h_0}^{h_1} e^{-K_e[k] \times h} dh}{H} \quad (11.10)$$

$$I[k] = \frac{I_0[k]}{K_e[k] \times H} \times (1 - e^{-K_e[k] \times H}) \quad (11.11)$$

**Tableau 11.5** – Les définitions, les valeurs et les unités des paramètres des conditions environnementales

Symbole	Définition	Valeur	Unité
$I_{Surface}$	L'intensité de la lumière solaire à la surface du bassin	120	$W\ m^{-2}$
$F_{I,a}$	Atténuation de la lumière solaire à la surface du bassin	0.28	-
$K_e(MeS)$	Coefficient linéaire de l'extinction de lumière par la MeS	0.55 <sup>a</sup>	$m^{-1}\ g\ MeS^{-1}$
$K_e(H_2O)$	Coefficient d'extinction de la lumière par l'eau	0.05 <sup>b</sup>	$m^{-1}$
$T$	Température de l'eau dans le bassin	10	$^{\circ}C$
$S_{Salt}$	La salinité	0	ppt

### 11.4.2 Les processus de conversion

Le STM1 inclut six processus de conversion d'*E. coli* :

1. Mortalité de  $S_{PATH}$  : l'inactivation des pathogènes dans la colonne d'eau causée par la mortalité de base et causée par le sel (Chapra, 1997).
2. Désinfection de  $S_{PATH}$  : l'inactivation des pathogènes dans la colonne d'eau causée par la lumière solaire (Chapra, 1997).
3. Croissance de  $S_{PATH}$  : la croissance des pathogènes dans la colonne d'eau.
4. Mortalité de  $X_{PATH}$  : l'inactivation des pathogènes sur les particules causée par la mortalité de base et causée par le sel (Chapra, 1997).
5. Désinfection de  $X_{PATH}$  : l'inactivation des pathogènes sur les particules causée par la lumière solaire. Une fraction des pathogènes est protégée de la lumière solaire (Chapra, 1997).
6. Croissance de  $X_{PATH}$  : la croissance des pathogènes sur les particules.
7. Sorption de  $PATH$  sur  $X$  : la sorption linéaire des pathogènes entre l'eau et les particules. La concentration de pathogènes solubles  $S_{PATH}$  en équilibre avec la concentration des pathogènes attachées aux particules  $X_{PATH}$  est décrite par la sorption linéaire.

La conversion des composants s'écrit de la manière suivante :

$$ConversionPerComponent[k][l] = V[k] \times \sum_{j=1}^{j_{max}} \nu[j][k][l] \times \rho[j][k] \quad (11.12)$$

a. Chapra (1997)

b. Struck *et al.* (2008)

Les Tableaux 11.6 et 11.7 présentent les matrices de stoechiométrie et de cinétique des processus de conversion.

**Tableau 11.6** – La matrice de stoechiométrie  $\nu[j][k][l]$

Composants i → ↓ Processus j	H <sub>2</sub> O [g H <sub>2</sub> O]	$S_{PATH}[k]$ [ U ]	X[k] [ g MES ]	$X_{PATH}[k]$ [ U ]
Mortalité de $S_{PATH}$		-1		
Désinfection de $S_{PATH}$		-1		
Croissance de $S_{PATH}$		1		
Mortalité de $X_{PATH}$				-1
Désinfection de $X_{PATH}$				$-F_{X_{PATH},I}$
Croissance de $X_{PATH}$				1
Sorption de $PATH$ sur $X$		-1		1

**Tableau 11.7** – Les équations de cinétique  $\rho[j][k]$

Processus j	L'équation de cinétique $\rho_j$ [g m <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> ]
Mortalité de $S_{PATH}$	$(b_{S_{PATH}} + K_{Salt} * S_{Salt}) \times \theta_{b,20}^{T-20} \times C[k][S_{PATH}]$
Désinfection de $S_{PATH}$	$\alpha_I I[k] \times C[k][S_{PATH}]$
Croissance de $S_{PATH}$	$\mu_{S_{PATH}} \times \theta_{\mu,20}^{T-20} \times C[k][S_{PATH}]$
Mortalité de $X_{PATH}$	$(b_{X_{PATH}} + K_{Salt} * S_{Salt}) \times \theta_{b,20}^{T-20} \times C[k][X_{PATH}]$
Désinfection de $X_{PATH}$	$\alpha_I I[k] \times C[k][X_{PATH}]$
Croissance de $X_{PATH}$	$\mu_{X_{PATH}} \times \theta_{\mu,20}^{T-20} \times C[k][X_{PATH}]$
Sorption de $PATH$ sur $X$	$k_s \times \left( C[k][S_{PATH}] \times C[k][X] - \frac{C[k][X_{PATH}]}{K_D} \right)$

### 11.4.3 Les paramètres de conversion pour le bassin d'orage

Le Tableau 11.8 présente les paramètres des conversions d'*E. coli* du cas d'étude avec STM1. Les taux de mortalité de base  $b_{S_{PATH}}$  et  $b_{X_{PATH}}$  sont estimés à respectivement  $0.8j^{-1}$  (Chapra, 1997) et  $0.4j^{-1}$ . Le  $b_{X_{PATH}}$  de STM1 est estimé inférieur à  $b_{S_{PATH}}$  ce qui représente que l'environnement du biofilm sur les particules est plus protégé contre la prédation et d'autres influences du milieu. Le coefficient  $K_{Salt}$  est considéré identique pour  $S_{PATH}$  et  $X_{PATH}$ .

La fraction de  $X_{PATH}$  exposée à la lumière  $F_{X_{PATH},I}$  est estimée à 95% (Tableau 2.5). La croissance des pathogènes n'est pas prise en compte et le taux de croissance est donc  $0 \text{ j}^{-1}$  pour les deux types de pathogènes. Les pathogènes  $X_{PATH}$  attachés aux particules organiques ou aux particules avec une couche organique utiliseront la matière organique comme substrat et peuvent avoir un taux de croissance plus élevé.

Le coefficient de distribution  $K_D$  est estimé à  $0.005 \text{ m}^3 \text{ g}^{-1}$ . La concentration de MeS à l'entrée du bassin d'orage est en moyenne de  $163 \text{ mg/l}$  (Tableau 11.9), ce qui correspond à un  $K_D$  de  $0.002$  à  $0.008 \text{ m}^3 \text{ g}^{-1}$  (Figure 2.8) ou en moyenne  $0.005 \text{ m}^3 \text{ g}^{-1}$ . Un  $K_D$  de  $0.005 \text{ m}^3 \text{ g}^{-1}$  correspond à 45% des pathogènes totaux adsorbés aux particules, lors de l'atteinte de l'équilibre. Le coefficient cinétique d'adsorption est estimé à  $0.58 \text{ m}^3 \text{ g}^{-1} \text{ j}^{-1}$  (Chen *et al.*, 2003).

**Tableau 11.8** – Les définitions, les valeurs et les unités des paramètres des conversions d'*E. coli*

Symbole	Définition	Valeur	Unité
$b_{S_{PATH}}$	Le taux de mortalité de base de $S_{PATH}$	0.8 <sup>a</sup>	$\text{j}^{-1}$
$b_{X_{PATH}}$	Le taux de mortalité de base de $X_{PATH}$	0.4	$\text{j}^{-1}$
$K_{Salt}$	Le coefficient de mortalité dû à la salinité	0.02 <sup>a</sup>	$\text{j}^{-1} \text{ ppt}^{-1}$
$\theta_{b,20}$	Constante de dépendance de $b$ dû à la température	1.013 <sup>b</sup>	-
$\mu_{S_{PATH}}$	Le taux de croissance de $S_{PATH}$	0	$\text{j}^{-1}$
$\mu_{X_{PATH}}$	Le taux de croissance de $X_{PATH}$	0	$\text{j}^{-1}$
$\theta_{\mu,20}$	Constante de dépendance de $\mu$ dû à la température	1.013 <sup>b</sup>	-
$\alpha_I$	Le coefficient de mortalité de la lumière	0.006 <sup>b</sup>	$\text{m}^2 \text{ W}^{-1} \text{ j}^{-1}$
$F_{X_{PATH},I}$	La fraction de $X_{PATH}$ exposée à la lumière	0.95	-
$K_D$	Coefficient de distribution	0.005	$\text{m}^3 \text{ g}^{-1}$
$k_s$	Coefficient cinétique de premier ordre d'adsorption	0.58	$\text{m}^3 \text{ g}^{-1} \text{ j}^{-1}$

a. Chapra (1997)

b. Struck *et al.* (2008)

**Tableau 11.9** – La concentration moyenne de MeS à l'entrée du bassin d'orage pour plusieurs événements de pluie (Carpenter, 2010).

Date (jj/mm/aaaa)	MeS (mg/L)
14/05/2009	679
06/25/2009	559
07/07/2009	139
07/11/2009	106
07/13/2009	61
07/18/2009	51
07/27/2009	43
08/02/2009	35
08/21/2009	71
08/21/2009	74
09/18/2009	79
09/18/2009	62
Moyenne	163

## 11.5 La simulation du comportement d'*E. coli*

Les équations de transport et de conversion du modèle STMa1 ont été implantées dans la base de modèles de WEST en langage de modélisation MSL-USER. Le comportement d'*E. coli* dans un bassin décrit par trois couches avec un volume constant est simulé. Les débits d'entrée et de sortie sont nuls et les valeurs initiales des variables d'états sont de  $10^3$  UFC/100ml d'*E. coli* en suspension ( $S_{PATH}$ ) et de 163 mg/l en MeS ( $X$ ) pour les trois couches. Le volume initial du bassin est de 600l et la surface est de  $1\text{ m}^2$ . Les Figures 11.4 à 11.7 présentent les résultats de la simulation.

Les MeS des couches 1 et 2 décantent dans la couche 3. Il n'y a pas d'entrée de MeS dans la première couche, sa concentration est donc celle qui diminue la plus rapidement. Ensuite, la concentration en MeS de la couche 2 diminue moins rapidement de par l'entrée de MeS provenant de la couche 1. La concentration en MeS de la couche 3 augmente jusqu'à la fin de la première journée lorsque toutes les MeS ont décantées.

La concentration de  $S_{PATH}$  diminue rapidement au début. Cette diminution est causée par l'adsorption des pathogènes aux MeS. La concentration de  $X_{PATH}$  augmente proportion-

nellement. Après cette répartition, il y a la désinfection solaire et la mortalité qui causent la décroissance des pathogènes en suspension. Le taux de mortalité augmente jusqu'à la fin de la première journée après quoi il reste constant. Cette augmentation est causée par la décantation de la MeS ce qui entraîne l'augmentation de l'intensité de la lumière et donc le taux de la désinfection solaire. La présence de MeS dans la couche 3 diminue l'intensité de la lumière ce qui cause un taux de mortalité moins élevé dans cette couche (Figure 11.7). Après la répartition entre l'eau et les MeS, l'effet de la décantation est cumulatif à la mortalité et la désinfection solaire pour les pathogènes attachés à la MeS. Les fractions de  $X_{PATH}$  décantées des couches 1 et 2 entrent dans la couche 3, ce qui fait augmenter la présence de pathogènes attachés aux MeS pendant la première demi-journée après quoi la mortalité détermine l'épuration.

Les taux d'épuration de premier ordre d'*E. coli* ( $S_{PATH}$  et  $X_{PATH}$ ) après la première journée, qui sont égales aux pente des simulations en échelle log-normale (Figure 11.8), sont de respectivement de 1.2 et  $9\text{ j}^{-1}$  dans les deux premières couches. Ceux-ci sont plus élevés pendant la première journée du à la décantation. Ce taux est de  $0.46\text{ j}^{-1}$  pour  $S_{PATH}$  et  $X_{PATH}$  après la première journée dans la couche 3. La concentration élevée en MeS dans cette couche protège les pathogènes contre la lumière solaire et entraîne une mortalité moins élevée. Le taux d'épuration de premier ordre d'*E. coli* dans le bassin est de  $0.57\text{ j}^{-1}$  pendant les quatre premières journées.

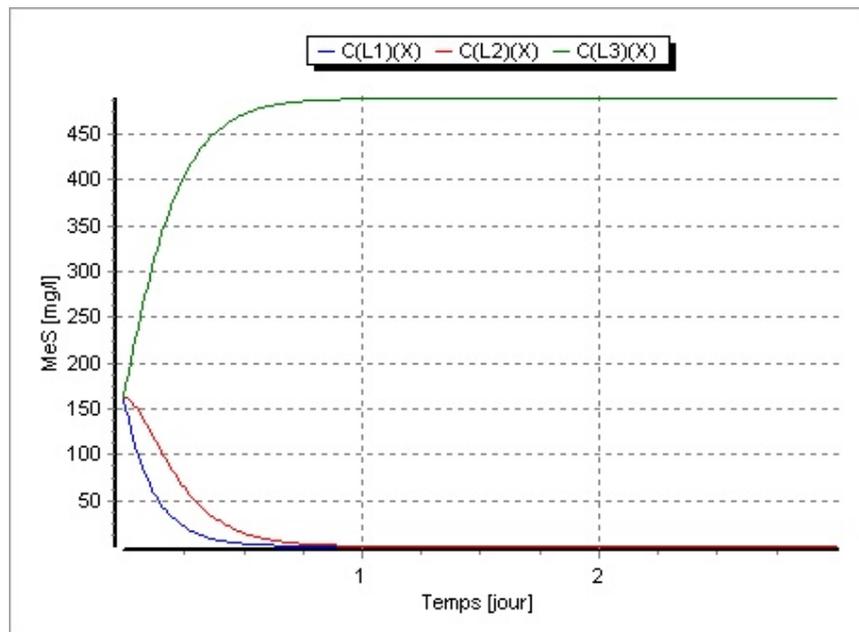


FIGURE 11.4 – Simulation de la concentration en MeS pour les trois couches du bassin.

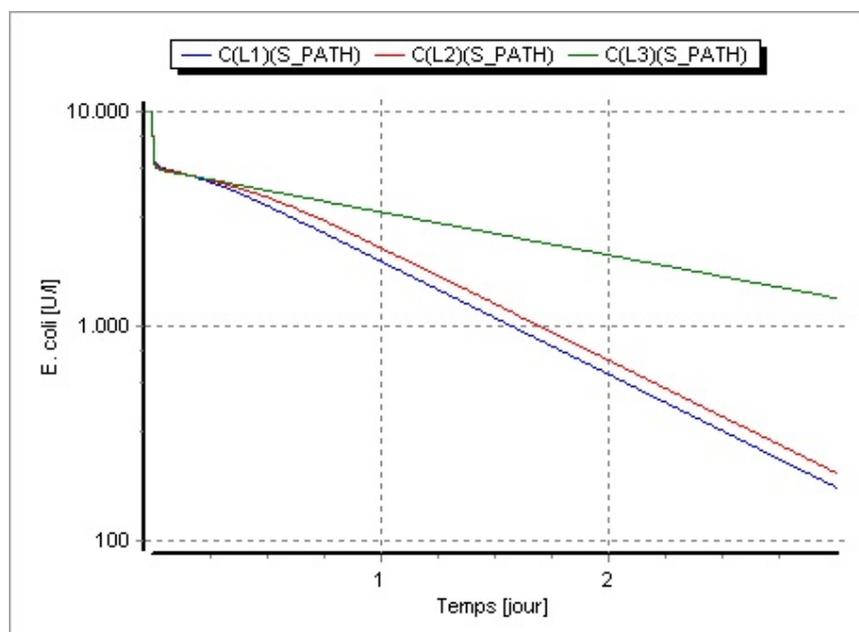


FIGURE 11.5 – Simulation de la concentration des pathogènes en suspension pour les trois couches du bassin.

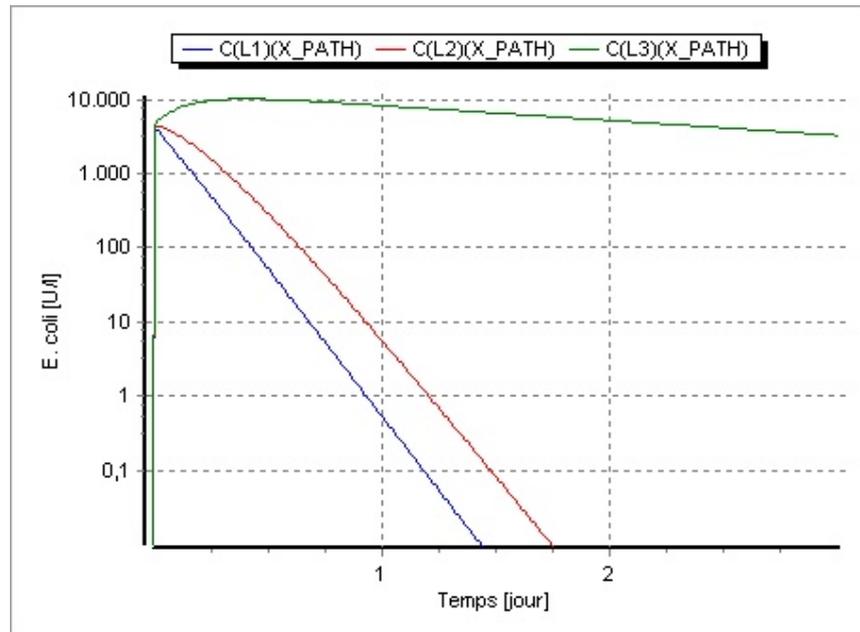


FIGURE 11.6 – Simulation de la concentration des pathogènes attachés aux particules pour les trois couches du bassin.

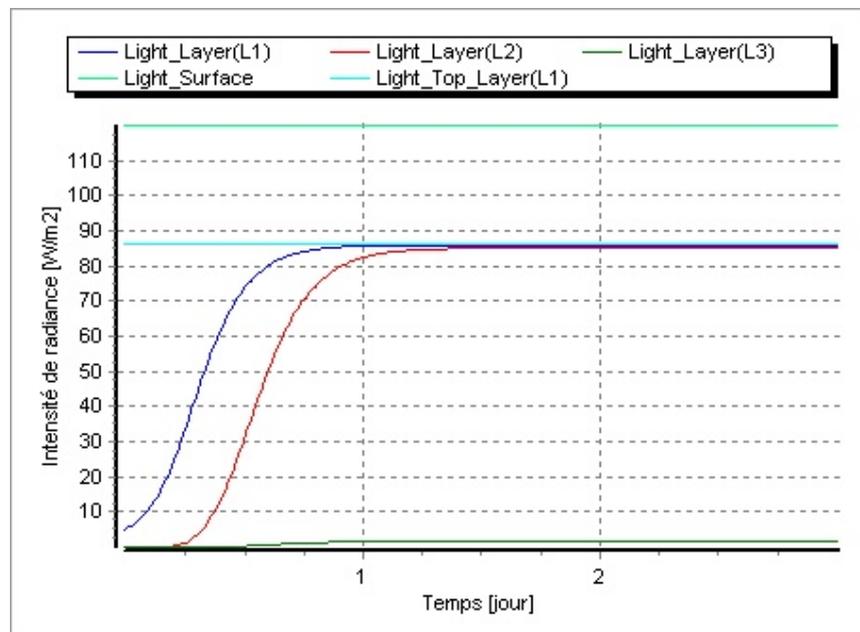


FIGURE 11.7 – Intensité de la lumière solaire au-dessus du bassin, à la surface de la première couche et l'intensité moyenne dans les trois couches.

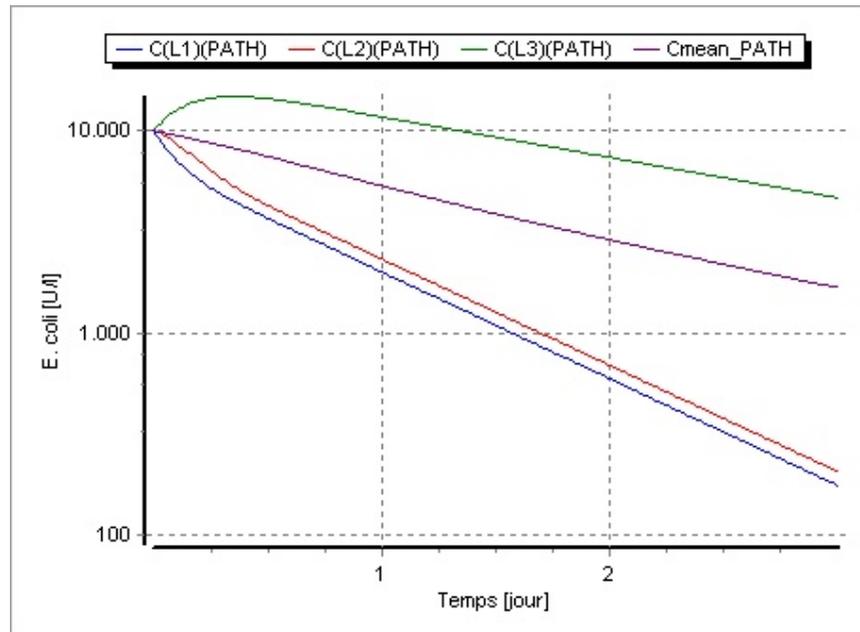


FIGURE 11.8 – Simulation de la concentration des pathogènes pour les trois couches du bassin et la concentration moyenne du bassin.

## 11.6 Discussion

Le concept des matrices de transport permet au modélisateur de schématiser les équations différentielles de transport. Cependant, un modèle plus modulaire permettrait d'utiliser des modules pour construire plus facilement une certaine configuration. Trois types de couches, soit des modules, peuvent être distingués dans un bassin d'orage : une couche de fond, une couche de surface et plusieurs couches intermédiaires. La façon d'écrire les équations de transport dans ce mémoire ne permet pas une telle modélisation modulaire.

Le modèle STMa1 simule, à partir d'une première estimation des paramètres, un taux d'épuration d'*E. coli* de  $0.57 \text{ j}^{-1}$  dans un bassin d'orage d'une profondeur de 60 cm. Ce taux est plus élevé à la surface qu'au fond du bassin. De plus, un modèle avec plus que trois couches, simulera un taux de désinfection solaire plus élevé. Dans un modèle de trois couches complètement mélangées, la concentration en MeS devient très élevée dans la couche au fond, c'est-à-dire dans un tiers du bassin. Dans cette couche de fond, l'intensité de la lumière solaire est donc très basse ce qui cause un taux de désinfection solaire limité. La réduction d'*E. coli* dans les couches supérieures d'un bassin d'orage est plus élevée que dans les couches du fond. Le taux de réduction plus élevé dans les couches à la surface

démontre l'intérêt d'une vidange graduelle d'un bassin d'orage.

## 11.7 Conclusion

la formulation matricielle qui a été développée facilite la présentation et l'écriture des transports d'advection, de sédimentation et de diffusion entre différents compartiments d'un système. Deux matrices de transport, une matrice de flux et une matrice de connectivité, ont été présentées et ont été appliquées pour un modèle multicouche.

Le modèle multicouche STMa1 qui décrit le comportement d'*E. coli* et d'une classe de particules dans un bassin d'orage à été conçu. Ce modèle décrit le transport et les conversions de l'eau, les pathogènes en suspension, des particules et des pathogènes attachés aux particules en deux sous-modèles : le modèle de transport STMa et le modèle de conversion STM1. STMa décrit le transport d'eau, d'un pathogène et d'une classe de particules entre les différentes couches du bassin d'orage et entre le bassin d'orage et l'environnement. Les processus de transport considérés sont l'advection et la sédimentation. STM1 décrit (a) la mortalité et la croissance d'*E. coli* corrigée pour la température, (b) la désinfection solaire et (c) la répartition d'*E. coli* entre l'eau et les particules. Un modèle d'extinction de la radiation, causée par les particules, a été appliqué pour décrire l'intensité de la lumière solaire dans chaque couche. Ces phénomènes d'élimination d'*E. coli* dans un bassin d'orage ont été simulés avec des paramètres par défaut trouvés dans la littérature.

## Cinquième partie

### Conclusions et perspectives

# Chapitre 12

## Conclusions et perspectives

Plusieurs auteurs ont étudié des pathogènes dans l'eau de ruissellement et ont rapporté des concentrations d'*E. coli* entre  $10^2$  et  $10^4$  UFC/100ml. En général, 20 à 50% d'*E. coli* se trouvent attachés aux particules. Ces particules influencent l'élimination d'*E. coli* dans un bassin d'orage. Premièrement, les particules diminuent la désinfection solaire par l'extinction de l'intensité de la radiation et en protégeant les bactéries attachées. Deuxièmement, la répartition augmente l'épuration d'*E. coli* dans un bassin d'orage par la décantation des bactéries attachées aux particules. Les données de répartition fournies par plusieurs auteurs ont été étudiées et quelques tendances ont été ressorties. (a) Le nombre de bactéries attachées aux particules exprimé par gramme de MeS est plutôt constant pour des particules d'un diamètre inférieur à  $30\ \mu\text{m}$ . La plupart des pathogènes attachées est associée aux particules inférieures à  $30\ \mu\text{m}$ . Il est donc avantageux d'exprimer le nombre de bactéries par gramme pour la de modélisation. (b) Une relation linéaire pour une échelle log-log entre le coefficient de distribution d'*E. coli* entre l'eau et la MeS et la concentration en MeS a été établie. Cette relation donne une estimation de la fraction d'*E. coli* attaché aux particules à l'aide d'une mesure de la concentration en MeS.

Un bassin d'orage a été échantillonné et la concentration d'*E. coli* et des coliformes totaux à été mesurée à partir d'une énumération en milieu de croissance (la méthode Coliscan Easygel). Peu de données valables ont été obtenues mais, en générale, la concentration d'*E. coli* se trouve entre  $10^2$  et  $10^4$  UFC/100ml ce qui est consistant avec la littérature. Cependant, plusieurs problèmes d'énumération en milieu de croissance ont été détectés. D'abord, à partir d'un échantillon dont la concentration en *E. coli* est inconnue, il faut souvent essayer trois dilutions afin d'obtenir une densité de colonies par boîte de pétri de façon à ce que les colonies soient bien identifiable. De plus, cette méthode ne répond pas

aux exigences de la qualité des données par rapport à la modélisation des phénomènes de répartition des bactéries entre l'eau et les particules. Le nombre de bactéries est sous-estimé lorsqu'il y a des bactéries attachées aux particules et l'écart-type géométrique des mesures était souvent supérieur à 0.04, l'écart-type géométrique maximal acceptable afin de distinguer une différence de concentration d'*E. coli* de 20%.

Une nouvelle méthode de mesure de l'activité enzymatique d'*E. coli* a été développée. Cette méthode consiste à effectuer une filtration, une incubation avec le substrat 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide, puis une spectroscopie fluorescente du produit de décomposition methylumbellifénone. Des courbes d'étalonnage ont été testées afin de pouvoir mesurer les concentrations de MU anticipées de  $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  mol/l. Le détachement des bactéries du filtre pendant un essai complique la mesure de l'activité enzymatique et un problème d'identifiabilité entre le détachement et l'activité enzymatique a été détecté. Une estimation multi-réponse a permis par contre d'estimer ces deux paramètres à partir d'une expérience de décorrélation. Lorsque la charge en MeS sur le filtre était négligeable, la fraction de détachement par minute mesurée était de  $0.021 \text{ min}^{-1}$ .

Quelques avantages d'une mesure de l'activité enzymatique par rapport à une énumération en milieu de croissance ont été identifiés. (a) La méthode de l'activité enzymatique résulte dans une mesure du nombre d'*E. coli* total, sans sous-estimer les bactéries attachées aux particules. Une technique pour disperser les bactéries attachées aux particules n'est donc plus nécessaire. De plus, cette méthode mesure aussi les bactéries actives mais non cultivables, ce qui peut signifier une grande différence si seulement 1 à 20% des bactéries dans de l'eau provenant de l'environnement est cultivable. (b) Pour mesurer des concentrations d'*E. coli* plus élevées, il suffit de développer des nouvelles courbes d'étalonnage pour mesurer la concentration de MU. (c) Le coût d'une mesure de l'activité enzymatique est de 6.00\$ mais pourrait être réduite à 2.13\$ en modifiant le protocole. La méthode de Coliscan Easygel coûte 3.17\$ par essai et, de plus, il est souvent nécessaire de mesurer plusieurs dilutions afin d'obtenir des colonies bien identifiables sur la boîte de pétri, ce qui augmente le coût proportionnellement.

Un modèle multicouche d'un bassin d'orage a été conçu. Le modèle STMa1 ou (*Stormwater Tank Model #a1*) décrit (a) la décantation d'une classe de particules et d'un pathogène attaché à cette classe avec une seule vitesse de décantation, (b) l'adsorption réversible des pathogènes entre l'eau et les particules avec une équation d'adsorption réversible et (c) la mortalité et la désinfection solaire des pathogènes en tenant compte de l'environnement

protégé des pathogènes attachés aux particules. Une formulation matricielle a été introduite, ce qui facilite l'écriture des équations différentielles de transport entre les différents compartiments du modèle multicouche.

La méthode de la mesure de l'activité enzymatique est prête pour être testée sur des échantillons environnementaux du bassin d'orage. Quelques perspectives concernant cette méthode ont déjà été formulées. Des mesures de concentration d'*E. coli* dans le bassin d'orage devront démontrer l'applicabilité de cette méthode pour la modélisation.

La généralisation du modèle STMa1 pour plusieurs classes de particules nécessite la connaissance de la répartition des pathogènes entre ces différentes classes et l'eau. Des techniques de sédimentation statique permettent de séparer les différentes classes de particules par rapport à leurs vitesses de sédimentation. Ces techniques reproduisent de manière plus réaliste le comportement des particules dans la colonne d'eau que des techniques de filtration fractionnelle. Des essais de VICAS (Chebbo & Gromaire, 2009; Vallet *et al.*, 2010), une technique de sédimentation statique, pourraient être effectués afin de séparer les différentes classes de particules et les pathogènes attachés à ces classes. La précision de la mesure de l'activité enzymatique sera un paramètre important afin de pouvoir distinguer la concentration d'*E. coli* attaché à ces différentes classes de particules. Une résolution élevée obtenue d'une mesure précise de l'activité enzymatique permettra une modélisation adéquate de ces phénomènes.

Sixième partie

Bibliographie

# Bibliographie

M. T. Auer & S. L. Niehaus (1993). Modeling fecal coliform bacteria - i. field and laboratory determination of loss kinetics. *Water Research*, 27(4) :693 – 701.

Biosynth (2010). URL <http://www.biosynth.com>.

M. Borst & A. Selvakumar (2003). Particle-associated microorganisms in stormwater runoff. *Water Research*, 37(1) :215 – 223.

L. Boutilier, R. Jamieson, R. Gordon, C. Lake & W. Hart (2009). Adsorption, sedimentation, and inactivation of *E. coli* within wastewater treatment wetlands. *Water Research*, 43(17) :4370–80.

J. Brookes, J. Antenucci, M. Hipsey, M. Burch, N. Ashbolt & C. Ferguson (2004). Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. *Environment International*, 30(5) :741–759.

Bsdlab (2010). URL <http://www.bsdlab.com>.

Canadawide Scientific (2010). URL <http://canadawide.ca/>.

Carbosynth (2010). URL <http://www.carbosynth.com>.

J.-F. Carpenter (2010). *Caractérisation du ruissellement urbain et évaluation de l'efficacité épuratoire d'un bassin de rétention*. Master's thesis, Faculté de sciences et de génie de l'Université Laval, Québec.

CCME (1999). Canadian environmental quality guidelines. Technical report, Canadian Council of Ministers of the Environment.

S. C. Chapra (1997). *Surface water-quality modeling*. The McGraw-Hill Companies, New York, USA.

- G. Characklis, M. Dilts, O. Simmons, C. Likirdopulos, L. Krometis & M. Sobsey (2005). Microbial partitioning to settleable particles in stormwater. *Water Research*, 39(9) :1773–1782.
- G. Chebbo & M.-C. Gromaire (2009). VICAS- An Operating Protocol to Measure the Distributions of Suspended Solid Settling Velocities within Urban Drainage Samples. *Journal of Environmental Engineering*, 135(9) :768–775.
- G. Chen, M. Rockhold & K. A. Strevett (2003). Equilibrium and kinetic adsorption of bacteria on alluvial sand and surface thermodynamic interpretation. *Research in Microbiology*, 154(3) :175 – 181.
- A. R. Cizek, G. W. Characklis, L.-A. Krometis, J. A. Hayes, O. D. S. III, S. D. Lonardo, K. A. Alderisio & M. D. Sobsey (2008). Comparing the partitioning behavior of Giardia and Cryptosporidium with that of indicator organisms in stormwater runoff. *Water Research*, 42(17) :4421 – 4438.
- T. Curtis, D. Mara & S. Solva (1992). Influence of pH, oxygen, and humic substance on ability of sunlight to damage fecal-coliforms in waste stabilization pond water. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4) :1335–1343.
- Daigger (2010). URL <http://www.daigger.com>.
- C. M. Davies & H. J. Bavor (2000). The fate of stormwater-associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2) :349–60.
- C. M. Davies, Z. Yousefi & H. J. Bavor (2003). Occurrence of coliphages in urban stormwater and their fate in stormwater management systems. *Letters in Applied Microbiology*, 37(4) :299–303.
- B. De heyder, P. Vanrolleghem, H. Van Langenhove & W. Verstraete (1994). Kinetic characterisation of mass transfer limited degradation of a poorly water soluble gas in batch experiments. *Biotechnology and Bioengineering*, (55) :511–519.
- B. Derjaguin & L. Landau (1993). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Progress in Surface Science*, 43(1-4) :30 – 59.
- D. Dochain & P. A. Vanrolleghem (2001). *Dynamic Modelling and Estimation in Wastewater Treatment Processes*. IWA Publishing, London, UK.

- A. D. Eaton, L. S. Clesceri, E. W. Rice & A. E. Greenberg (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Water Environment Federation, Alexandria, USA.
- R. Emerick, F. Loge, T. Ginn & J. Darby (2000). Modeling the inactivation of particle-associated coliform bacteria. *Water Environment Research*, 72(4) :432–438.
- R. A. Fenner & K. Komvuschara (2005). A new kinetic model for ultraviolet disinfection of greywater. *Journal of Environmental Engineering*, 131(6) :850–864.
- L. Fiksdal, I. Tryland & H. Nelis (1997). Rapid detection of coliform bacteria and influence of non-target bacteria. *Water Science and Technology*, 35 :415–418.
- Fisher (2010). URL <http://www.fishersci.com>.
- J. S. Fries, G. W. Characklis & R. T. Noble (2006). Attachment of Fecal Indicator Bacteria to Particles in the Neuse River Estuary, N.C. *Journal of Environmental Engineering*, 132(10) :1338–1345.
- T. Garcia-Armisen, P. Lebaron & P. Servais (2005). Beta-D-glucuronidase activity assay to assess viable *Escherichia coli* abundance in freshwaters. *Letters in Applied Microbiology*, 40(4) :278–282.
- T. Garcia-Armisen & P. Servais (2009). Partitioning and fate of particle-associated *E. coli* in river waters. *Water Environment Research*, 81(1) :21 – 28.
- I. George, A. Anzil & P. Servais (2004). Quantification of fecal coliform inputs to aquatic systems through soil leaching. *Water Research*, 38(3) :611 – 618.
- I. George, M. Petit & P. Servais (2000). Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3) :404–13.
- A. K. Guber, Y. A. Pachepsky, D. R. Shelton & O. Yu (2007). Effect of bovine manure on fecal coliform attachment to soil and soil particles of different sizes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10) :3363–3370.
- J. L. Hamilton & I. Luffman (2009). Precipitation, pathogens, and turbidity in the little river, Tennessee. *Physical Geography*, 30(3) :236–248.
- F. L. Hellweger, V. Bucci, M. R. Litman, A. Z. Gu & A. Onnis-Hayden (2009). Biphasic decay kinetics of fecal bacteria in surface water not a density effect. *Journal of Environmental Engineering*, 135(5) :372–376.

- L.-A. Henry & T. A. Dillaha (2004). Development of isotherm equations for partitioning between soil-adsorbed and planktonic *Escherichia coli*. *ASAE Annual International Meeting 2004*, pp. 1605 – 1618.
- M. Hipsey, J. Brookes, R. Regel, J. Antenucci & M. Burch (2006). In situ evidence for the association of total coliforms and *Escherichia coli* with suspended inorganic particles in an Australian reservoir. *Water, Air and Soil Pollution*, 170(1-4) :191–209.
- ISO15839 (2003). Water quality — on-line sensors/analysing equipment for water — specifications and performance tests. *International Standard*.
- R. Jamieson, R. Gordon, D. Joy & H. Lee (2004). Assessing microbial pollution of rural surface waters : A review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural Water Management*, 70(1) :1 – 17.
- R. Jamieson, D. M. Joy, H. Lee, R. Kostaschuk & R. Gordon (2005). Transport and deposition of sediment-associated *Escherichia coli* in natural streams. *Water Research*, 39(12) :2665 – 2675.
- H. Jeng, A. England & H. Bradford (2005). Indicator organisms associated with stormwater suspended particles and estuarine sediment. *Journal of Environmental Science and Health Part A - Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 40(4) :779–791.
- M. R. Karim, F. D. Manshadi, M. M. Karpiscak & C. P. Gerba (2004). The persistence and removal of enteric pathogens in constructed wetlands. *Water Research*, 38(7) :1831 – 1837.
- J. T. O. Kirk (1983). *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- L.-A. H. Krometis, G. W. Characklis, O. D. Simmons, M. J. Dilts, C. A. Likirdopoulos & M. D. Sobsey (2007). Intra-storm variability in microbial partitioning and microbial loading rates. *Water Research*, 41(2) :506–16.
- L.-A. H. Krometis, T. A. Dillaha, N. G. Love & S. Mostaghimi (2009). Evaluation of a filtration/dispersion method for enumeration of particle-associated *Escherichia coli*. *J Environ Qual*, 38(3) :980–6.
- H. Lünsdorf, R. W. Erb, W. R. Abraham & K. N. Timmis (2000). 'Clay hutchies' : a novel interaction between bacteria and clay minerals. *Environmental Microbiology*, 2(2) :161–8.

- B. Madge & J. Jensen (2006). Ultraviolet disinfection of fecal coliform in municipal wastewater : Effects of particle size. *Water Environment Research*, 78(3) :294–304.
- B. J. Mahler, J. C. Personnè, G. F. Lods & C. Drogue (2000). Transport of free and particulate-associated bacteria in karst. *Journal of Hydrology*, 238(3-4) :179 – 193.
- J. Mancini (1978). Numerical estimates of coliform mortality-rates under various conditions. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 50(11) :2477–2484.
- K. Marshall (1975). Clay mineralogy in relation to survival of soil bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 13 :357–373.
- K. C. Marshall, R. Stout & R. Michell (1971). Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Microbiology*, 68 :337–348.
- A. Mayo & M. Kalibbala (2007). Modelling faecal coliform mortality in water hyacinths ponds. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 32(15-18) :1212 – 1220.
- D. R. McCaulou, R. C. Bales & R. G. Arnold (1995). Effect of temperature-controlled motility on transport of bacteria and microspheres through saturated sediment. *Water Resources Research*, 31.
- Merck (1996). *The Merck Index*. Merck, 12 edition.
- Micrologylabs (2010). URL <http://www.micrologylabs.com/>.
- Millipore (2010). URL <http://www.millipore.com>.
- D. M. Oliver, C. D. Clegg, A. L. Heathwaite & P. M. Haygarth (2007). Preferential attachment of *Escherichia coli* to different particle size fractions of an agricultural grassland soil. *Water, Air and Soil Pollution*, 185(1-4) :369–375.
- G. Palmateer, D. McLean, W. Kutas & S. Meissner (1993). Investigation of suspended particulate-bacterial interaction in agricultural drains. In S. S. Rao, editor, *Particulate Matter and Aquatic Contaminants*, pp. 1–40.
- J. E. Schillinger & J. J. Gannon (1985). Bacterial adsorption and suspended particles in urban stormwater. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 57(5) :384–389.
- Science lab (2010). URL <http://www.sciencelab.com>.

- P. Servais, T. Garcia-Armisen, A. Lepeuple & P. Lebaron (2005). An early warning method to detect faecal contamination of river waters. *Annals of Microbiology*, 55(2) :151–156.
- Sigma-Aldrich (2010). URL <http://www.sigmaaldrich.com>.
- M. L. Soupir, S. Mostaghimi & N. G. Love (2008). Method to partition between attached and unattached e-coli in runoff from agricultural lands. *Journal of the American Water Resources Association*, 44(6) :1591–1599.
- Spectrocell (2010). URL <http://www.spectrocell.com>.
- Starnacells (2010). URL <http://www.starnacells.com>.
- T. A. Stenström (1989). Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1) :142–7.
- S. D. Struck, A. Selvakumar & M. Borst (2008). Prediction of effluent quality from retention ponds and constructed wetlands for managing bacterial stressors in storm-water runoff. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering - ASCE*, 134(5) :567–578.
- I. Takacs, G. Patry & D. Nolasco (1991). A Dynamic-Model of the Clarification Thickening process. *Water Research*, 25(10) :1263–1271.
- USEPA (2001). Protocol for Developing Pathogen TMDLs. Technical report, U. S. Environmental Protection Agency.
- B. Vallet, D. Muschalla, P. Lessard & P. A. Vanrolleghem (2010). A new dynamic storm-water basin model as a tool for management of urban runoff. In *Novatech 2010, 7th international conference on sustainable techniques and strategies in urban water management, Lyon - France - June 27 - July 1st, 2010*. (accepted).
- H. Vanhooren, J. Meirlaen, Y. Amerlinck, F. Claeys, H. Vangheluwe & P. A. Vanrolleghem (2003). WEST : modelling biological wastewater treatment. *Journal of Hydroinformatics*, 5 :27–50.
- Varian (2010). URL <http://www.varianinc.com>.
- E. Verwey (1945). Theory of the stability of lyophobic colloids. *Philips Research Reports*, 1 :33 – 49.

J. Wang, L. Wang, B. Wang, J. Zhang & Q. Zou (2006). Impact of suspended particles and enhancement techniques on ultraviolet disinfection of a secondary effluent. *Journal of Ocean University of China*, 5 :381–386.

Whatman (2010). URL <http://www.whatman.com/>.

G. P. Winward, L. M. Avery, T. Stephenson & B. Jefferson (2008). Ultraviolet (UV) disinfection of grey water : Particle size effects. *Environmental Technology*, 29(2) :235–44.

# Septième partie

## Addenda

# Annexe A

## Tableaux

**Tableau A.1** – Les résultats d'énumération d'*E. coli* et Coliformes totaux par temps sec dans le bassin d'orage avec la sortie ouverte.

Évènement / échantillon	Volume (ml)	Dilution	<i>E. coli</i> (UFC)	<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)	Coliformes totaux (UFC)	Coliformes totaux (log UFC/100ml)
<b>20080728</b>						
Témoin	5	1	0		0	
Entrée Composite	1	1	2	2.30	8	2.90
Entrée Composite	5	1	4	1.90	41	2.91
Moyenne				2.10		2.91
Écart type				0.28		0.01
Sortie Composite	1	1	4		16	3.20
<b>20080818</b>						
Témoin	3	1	0		0	
Entrée Composite	3	1	45	3.18	Gel globalement rosé	
Entrée Composite	3	1	45	3.18	Gel globalement rosé	
Entrée Composite	3	1	41	3.14	Gel globalement rosé	
Entrée Composite	3	1	38	3.10	Gel globalement rosé	
Entrée Composite	3	1	36	3.08	Gel globalement rosé	
Moyenne				3.13		
Écart type				0.04		
Sortie Composite	3	1	46	3.19	Gel globalement rosé	
Sortie Composite	3	1	36	3.08	Gel globalement rosé	
Sortie Composite	3	1	42	3.15	Gel globalement rosé	
Sortie Composite	3	1	54	3.26	Gel globalement rosé	
Sortie Composite	3	1	41	3.14	Gel globalement rosé	
Moyenne				3.16		
Écart type				0.07		
<b>20090625</b>						
Témoin	5	1	0		0	
Entrée Composite	5	1	7	2.15	11	2.34
Entrée Composite	3	1	4	2.12	4	2.12
Entrée Composite	1	1	4	2.60	13	3.11
Moyenne				2.29		2.53
Écart type				0.27		0.52
Sortie Composite	3	1	17	2.75	31	3.01
Sortie Composite	2	1	9	2.65	15	2.88
Sortie Composite	1	1	10	3	22	3.34
Moyenne				2.80		3.08
Écart type				0.18		0.24
Ponctuel Basin 3 (21min)	1	1	2	2.30	19	3.28
Ponctuel Basin 31 (1h 11min)	3	1	9	2.48	15	2.70

- a. Moins de 20 UFC par boîte de Pétri
- b. Traitement ultrasonique : 45s, déplacement de  $6\ \mu\text{m}$ , volume de 25 ml
- c. Traitement de centrifugation :  $500\ \text{g} \times \text{min}$

Annexe A. Tableaux

Évènement / échantillon	Volume (ml)	Dilution	<i>E. coli</i> (UFC)	<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)	Coliformes totaux (UFC)	Coliformes totaux (log UFC/100ml)
20090707						
Témoin	5	1	0		0	
Entrée Composite	5	1	0	<1.30	0	<1.30
Entrée Composite	5	1	0	<1.30	0	<1.30
Entrée Composite	3	1	0	<1.52	0	<1.52
Moyenne				<1.37		<1.37
Écart type						
Sortie Composite	3	1	6	2.30	TNC <sup>b</sup>	
Sortie Composite	3	1	11	2.56	TNC <sup>b</sup>	
Sortie Composite	2	1	5	2.40	TNC <sup>b</sup>	
Moyenne				2.42		
Écart type				0.13		
Entrée Ponctuelle 6 (24min)	5	1	14	2.45	TNC <sup>b</sup>	
Entrée Ponctuelle 6 (24min)	3	1	5	2.22	TNC <sup>b</sup>	
Moyenne				2.33		
Écart type				0.16		
Entrée Pontuelle 9 (31min)	3	1	14	2.67	TNC <sup>b</sup>	
Entrée Pontuelle 9 (31min)	2	1	5	2.40	56	
Moyenne				2.53		
Écart type				0.19		
20091008						
Entrée Ponctuelle	1	1	0	<2.00	13	3.11
Entrée Ponctuelle	1	1	0	<2.00	7	2.84
Entrée Ponctuelle	5	1	0	<1.30	44	2.94
Moyenne				<1.77		2.97
Écart type						0.14
Entrée Ponctuelle <sup>c</sup>	1	1	0	<2.00	12	3.08
Entrée Ponctuelle <sup>c</sup>	1	1	0	<2.00	8	2.90
Entrée Ponctuelle <sup>c</sup>	5	1	0	<1.30	59	3.07
Moyenne				<1.77		3.02
Écart type						0.10
Entrée Ponctuelle <sup>d</sup>	1	1	0	<2.00	9	2.95
Entrée Ponctuelle <sup>d</sup>	1	1	0	<2.00	6	2.78
Entrée Ponctuelle <sup>d</sup>	5	1	0	<1.30	51	3.01
Moyenne				<1.77		2.91
Écart type						0.12
Sortie Ponctuelle	1	1	4	2.60	56	3.75
Sortie Ponctuelle	1	1	1	2	34	3.53
Sortie Ponctuelle	5	1	17	2.53	225	3.65
Moyenne				2.38		3.64
Écart type				0.33		0.11
Sortie Ponctuelle <sup>c</sup>	1	1	1	2	49	3.69
Sortie Ponctuelle <sup>c</sup>	1	1	1	2	48	3.68
Sortie Ponctuelle <sup>c</sup>	5	1	10	2.30	241	3.68
Moyenne				2.10		3.68
Écart type				0.17		0.005
Sortie Ponctuelle <sup>d</sup>	1	1	3	2.48	32	3.50
Sortie Ponctuelle <sup>d</sup>	1	1	0		44	3.64
Sortie Ponctuelle <sup>d</sup>	5	1	10	2.30	205	3.61
Moyenne				2.39		3.59
Écart type				0.12		0.07

**Tableau A.2** – Les résultats d'énumération d'*E. coli* et Coliformes totaux par temps de pluie dans le bassin d'orage avec la sortie fermée.

Évènement / échantillon	Volume (ml)	Dilution	<i>E. coli</i> (UFC)	<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)	Coliformes totaux (UFC)	Coliformes totaux (log UFC/100ml)
<b>20090918</b>						
Entrée Composite	0.7636	1	3	2.59	>150	>4.29
Entrée Composite	0.7636	1	0		>150	>4.29
Entrée Composite	0.7636	1	6	2.90	>150	>4.29
Moyenne				2.74 <sup>a</sup>		>4.29
Écart type				0.21 <sup>a</sup>		
Entrée Composite <sup>b</sup>	0.7636	1	2	2.42	>150	>4.29
Entrée Composite <sup>b</sup>	0.7636	1	2	2.42	>150	>4.29
Entrée Composite <sup>b</sup>	0.7636	1	5	2.82	>150	>4.29
Moyenne				2.55 <sup>a</sup>		
Écart type				0.23 <sup>a</sup>		
Entrée Composite <sup>c</sup>	0.7636	1	1	2.12	83	4.04
Entrée Composite <sup>c</sup>	0.3818	1	3	2.90	65	4.23
Entrée Composite <sup>c</sup>	0.7636	1	0		81	4.03
Moyenne				2.51 <sup>a</sup>		4.10
Écart type				0.55 <sup>a</sup>		0.12
Entrée Composite <sup>d</sup>	0.7636	1	0		97	4.10
Entrée Composite <sup>d</sup>	0.7636	1	0		131	4.23
Entrée Composite <sup>d</sup>	0.7636	1	1	2.12	100	4.12
Moyenne						4.15
Écart type						0.07
<b>20090923</b>						
Sortie Composite <sup>e</sup>	1	50	0	<3.70	9	4.65
Sortie Composite <sup>e</sup>	1	50	0	<3.70	7	4.54
Moyenne				<3.70		4.60 <sup>a</sup>
Écart type						0.08 <sup>a</sup>
Entrée Composite <sup>f</sup>	1	50	5	4.40	125	5.80
Entrée Composite <sup>f</sup>	1	50	5	4.40	>400	>6.30
Moyenne				4.40 <sup>a</sup>		
Écart type				0		
<b>20091024</b>						
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	5	1	2	1.61	TNC	
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	5	1	1	1.30	TNC	
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	5	1	6	2.08	TNC	
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	5	1	1	1.30	TNC	
Moyenne				1.57 <sup>a</sup>		
Écart type				0.37 <sup>a</sup>		
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	1	10	0	<3.00	16	4.20
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	1	1	0	<2.00	13	3.11
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	1	10	0	<3.00	11	4.04
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	1	1	0	<2.00	106	4.03
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	1	10	0	<3.00	15	4.18
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	1	1	0	<2.00	108	4.03
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	1	10	0	<3.00	12	4.08
Basin Ponctuel <sup>g</sup>	1	1	0	<2.00	79	3.90
Moyenne				<2.50		3.95 <sup>a</sup>
Écart type						0.35 <sup>a</sup>

**Tableau A.3** – Données d'*E. coli*, coliformes totaux et MeS des échantillons utilisés pour les essais de centrifugation et dispersion. EC, EP et BP représentent respectivement un échantillon Composite de l'Entrée, un échantillon Ponctuel de l'Entrée et un échantillon Ponctuel du Bassin

Code d'échantillon	EC 1809	EP3 1809	EC 2209	EP3 2209	BP 2410
<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)					
Moyenne	2,59	2,33	4,12	3,7	1,57
Écart type			0,39		0,37
Coliformes totaux (log UFC/100ml)					
Moyenne	>4,30	5,39	5,78	5,35	3,95
Écart type		0,11		0,04	0,35
MeS (mg/l)	185	120	146	120	29 (4,6)

- 
- a. Moins de 20 UFC par boîte de Pétri
  - b. Traitement d'agitation : 10 min shaker
  - c. Traitement de centrifugation : 10000 G \* min
  - d. Traitement d'agitation et de centrifugation : 10 min shaker + 10000 G \* min
  - e. Vidange du bassin
  - f. Début de la pluie après le vidange du bassin
  - g. Échantillon pris près de la sortie avant le vidange du bassin, vidange à cause de risque de débordement

**Tableau A.4** – Les données de la concentration d'*E. coli* totale, la MeS, la fraction d'*E. coli* attachées aux particules et le coefficient de distribution.

	UFC/100ml		MeS (mg/l)		Fraction attachées aux particules			K <sub>D</sub> (l/g)			
	Minimum	Maximum	Moyenne	Minimum	Maximum	Moyenne	Minimum	Maximum	Moyenne		
Schillinger & Gannon (1985) <sup>a</sup>											
12E+3	11E+5	1997	55.75E+4	250	1997	1123.5	0.169	0.169	0.813	0.102	0.18
Characklis <i>et al.</i> (2005) <sup>b</sup>											
24E+3	63E+3	157	43.5E+3	6	157	81.5	0.3	0.55	71.429	7.785	9.069
Krometis <i>et al.</i> (2009) <sup>c</sup>											
3.5E+3	27E+3	272	15.25E+3	71	272	171.5	0.4	0.5	9.390	3.676	4.771
Jeng <i>et al.</i> (2005) <sup>d</sup>											
0.9E+3	11E+3	203	5.95E+3	170	203	186.5	0.218	0.304	1.640	2.152	1.894
Jamieson <i>et al.</i> (2005) <sup>e</sup>											
1E+4	1E+5	10	5.5E+4	0	10	5	0.2	0.44		78.571	94.118
Oliver <i>et al.</i> (2007) <sup>f</sup>											
1E+09	1E+09	20000	1E+09	20000	20000	20000	0.35	0.35	0.027	0.027	0.027
Boutilier <i>et al.</i> (2009) <sup>g</sup>											
			4.2E+6			53					19
			1.5E+5			13					324
			7.5E+4			561					0.293
Garcia-Armisen & Servais (2009) <sup>j</sup>											
			5E+4			40	0.3	0.33	10.714	12.313	11.496
						0.1	0.08	0.09	869.565	989.011	928.962
						34	0.85	0.92	166.667	338.235	226.343

- a. Des échantillons d'eau de drainage des zones résidentielles, commerciales, industrielles et libres
- b. Des échantillons de trois rivières qui reçoivent le drainage des aires déterminées comme zone résidentielle, commerciale et institutionnelle
- c. Des échantillons de deux rivières qui reçoivent l'eau de ruissellement de zones résidentielles et institutionnelles
- d. Des échantillons d'eau de ruissellement urbaine
- e. Des échantillons d'un fleuve alluvial dans un environnement rural
- f. Essai d'adsorption avec *E. coli* et un sol argileux-glaiseux
- g. Des échantillons de l'effluent d'une fosse septique
- h. Des échantillons de l'effluent d'un marais épurateur de l'effluent d'une fosse septique
- i. Des échantillons d'eau usée d'une laiterie
- j. Des échantillons d'une rivière

Tableau A.5 – Les prix des différentes compagnies des matériaux et produits utilisés. (\* matériaux et produits utilisés)

Produit	Société	Quantité	unité	Prix (CAD)	Prix (CAD) / Unité
Boîte de Pétri					
Coliscan Easygel	Micrology labs (2010)	10		21.25	2.13
*Coliscan Easygel	Canadawide Scientific (2010)	50		158.29	3.17
Filtres					
*Mixed cellulose ester, 0.45 $\mu$ m, $\phi$ 47mm	Fisher (2010)	100		71.76	0.72
Mixed cellulose esters, Hydrophilic, 0.45 $\mu$ m, $\phi$ 25 mm, white, plain	Fisher (2010)	100		246.75	2.47
Mixed cellulose esters, Hydrophilic, 0.45 $\mu$ m, $\phi$ 25 mm, white, plain	Millipore (2010)	100		94.00	0.94
Glass microfibre filtre 1827-025 Grade 934-AH circles, $\phi$ 25 mm	Whatman (2010)	100		22.05	0.22
Glass microfibre filtre 1827-047 Grade 934-AH circles, $\phi$ 47 mm	Fisher (2010)	100		147.52	1.48
*Glass microfibre filtre 1827-047 Grade 934-AH circles, $\phi$ 47 mm	Whatman (2010)	100		39.22	0.39
*VWR Syringe filters nylon 0.45 $\mu$ m	VWR International	100		76.71	0.77
Porte-filtre					
Analytical Filter Holders, $\phi$ 25mm, 50ml	Fisher (2010)	1		277.20	277.20
Glass Microanalysis Filter Holders, $\phi$ 25mm, 15ml	Fisher (2010)	1		794.25	794.25
Analytical Filter Holders, $\phi$ 25mm, 50ml	Millipore (2010)	1		738.00	738.00
Glass Microanalysis Filter Holders, $\phi$ 25mm, 15ml	Millipore (2010)	1		285.00	285.00
Cuvettes en verre					
Cuvette : Optical Glass windows, Useable range : 334 to 2500 nm	Starnacells (2010)	1		65.00	65.00
Cuvette : Fluorimeter cells with cover, 4 windows and base polished, ext. HxW is 45x12.5mm	Daigger (2010)	1		91.00	91.00
Cuvette : Open top vacuum formed cell w/P/TFE lid, 5 polished windows	Spectrocell (2010)	1		64.00	64.00
Cuvette : Fluorometer Cell G-204 (320-2600nm)	Bsdlab (2010)	1		12.80	12.80
Produits chimiques					
MUGlu M9130 >=98% (TLC)	Sigma-Aldrich (2010)	25	mg	56.20	2.25
MUGlu M9130 >=98% (TLC)	Sigma-Aldrich (2010)	100	mg	14300	1.43
MUGlu M9130 >=98% (TLC)	Sigma-Aldrich (2010)	250	mg	307.50	1.23
MUGlu M9130 >=98% (TLC)	Sigma-Aldrich (2010)	1000	mg	946.00	0.95
*MUGlu	Biosynth (2010)	1000	mg	57.93	0.06
MUGlu	Biosynth (2010)	10000	mg	421.90	0.04
MUGlu	Science lab (2010)	1000	mg	1402.06	1.40
MUGlu	Carbosynth (2010)	2000	mg	150.00	0.08
*Triton X-100 T8787 for molecular biology	Sigma-Aldrich (2010)	50	ml	26.50	0.53
Triton X-100 T8787 for molecular biology	Sigma-Aldrich (2010)	100	ml	41.30	0.41
Triton X-100 T8787 for molecular biology	Sigma-Aldrich (2010)	250	ml	76.80	0.31
MU					
*MU	Sigma-Aldrich (2010)	25	g	33.10	1.32
MU	Sigma-Aldrich (2010)	100	g	69.20	0.69
MU	Biosynth (2010)	250	g	60.00	0.24
MU	Science lab (2010)	100	g	103.01	1.03
MU	Science lab (2010)	500	g	341.24	0.68

**Tableau A.6** – La LDQ et le test auxiliaire  $f$  du test statistique de linéarité du spectrofluoromètre à filtre. La réponse du spectrofluoromètre est significativement linéaire si la valeur de  $f < F$ .

Code	Figures	Série de dilution (mol MU/l)	LDQ	$f$	$F(0.05, 1, N - 3)$
100121		A (1.04E-6)	-1,27E-8	20.48	5.32
100122s1	B.1 et B.2	A (1.04E-6)	1.46E-7	22.84	5.59
091209s1		B (2.10E-7)	1.38E-8	0.29	5.59
100120	B.3 et B.4	B (2.09E-7)	1.09E-8	1.26	5.32
091209s2		C (2.10E-8)	2.71E-9	0.04	5.59
100122s2	B.5	C (2.09E-8)	7.54E-8	-4.18	6.61
100126	B.6	C (2.09E-8)	1.51E-9	4.07	5.99
100128		C (2.09E-8)	1.46E-8	-1.87	5.99

**Tableau A.7** – La LDQ et la valeur de  $f$  du test de linéarité du spectrophotomètre de fluorescence. La réponse du spectrophotomètre est significativement linéaire si la valeur de  $f < F$ .

Code	Figures	Série de dilution (mol MU/l)	LDQ	$f$	$F(0.05, 1, N - 3)$
100216	B.7 et B.8	A (1.04E-6)	5.62E-9	1.06	5.32
100218	B.9 et B.10	B (1.04E-7)	4.32E-9	0.46	5.32
100302	B.11 et B.12	C (1.04E-8)	2.04E-9	5.47	5.32

# Annexe B

## Figures

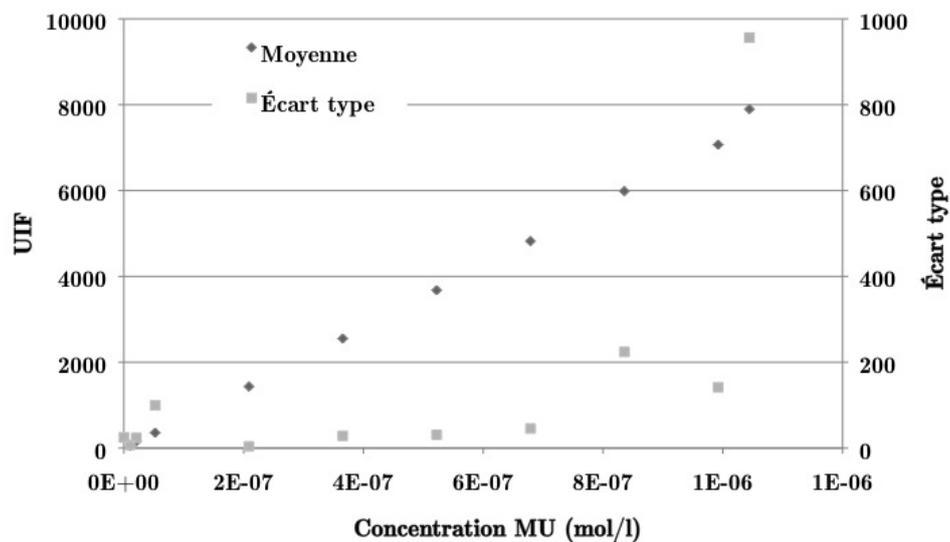


FIGURE B.1 – Les unités d'intensité de fluorescence de MU mesurées avec le spectrofluoromètre à filtre et l'écart-type de la série A. (code : 100122s1)

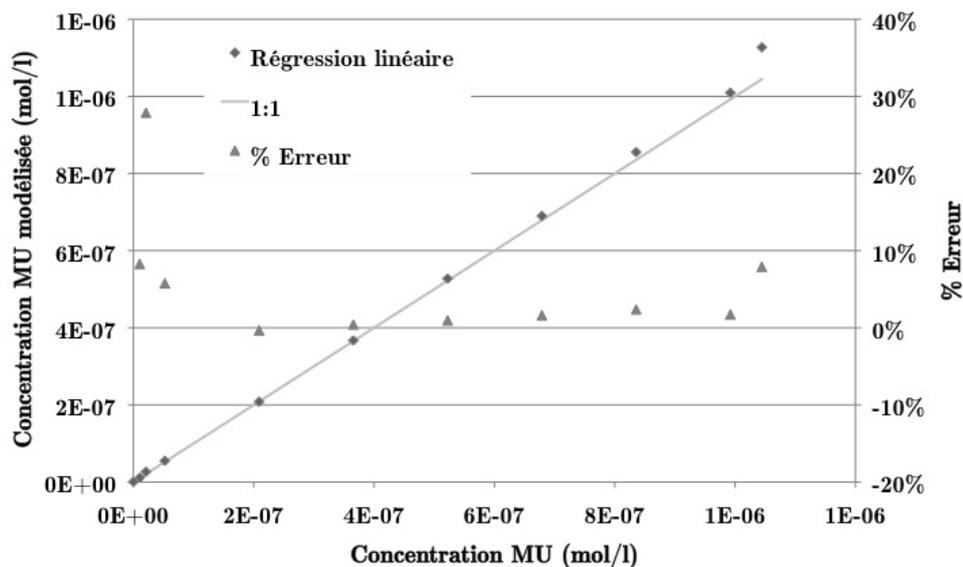


FIGURE B.2 – La concentration de MU modélisée et l’erreur relative de la série A. (code : 100122s1)

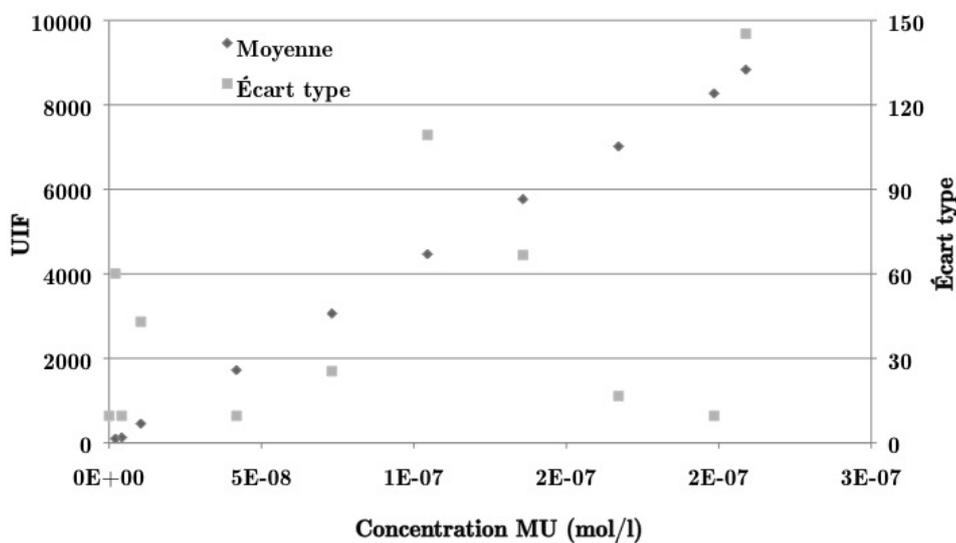


FIGURE B.3 – Les unités d’intensité de fluorescence de MU mesurées avec le spectrofluoromètre à filtre et l’écart-type de la série B. (code : 100120)

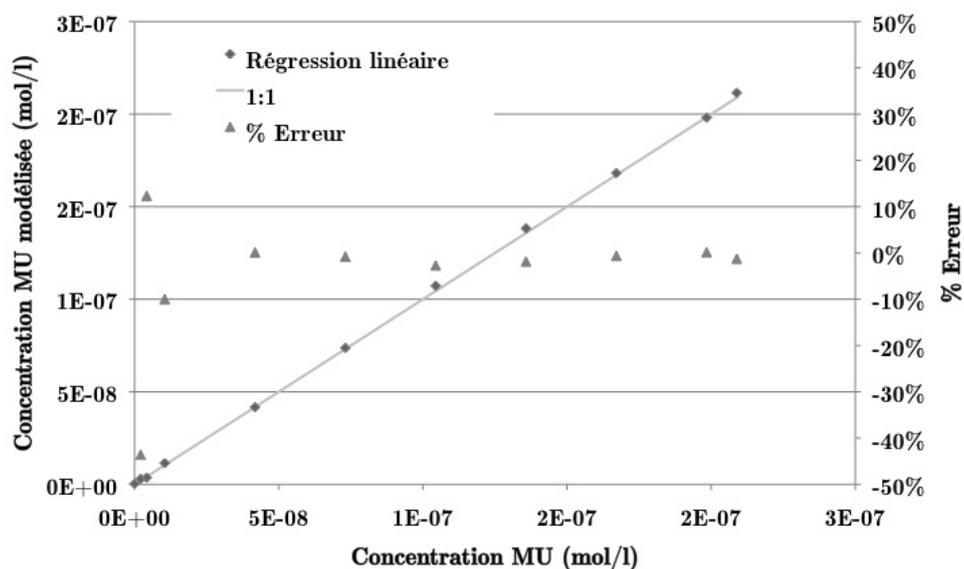


FIGURE B.4 – La concentration de MU modélisée et l’erreur relative de la série B. (code : 100120)

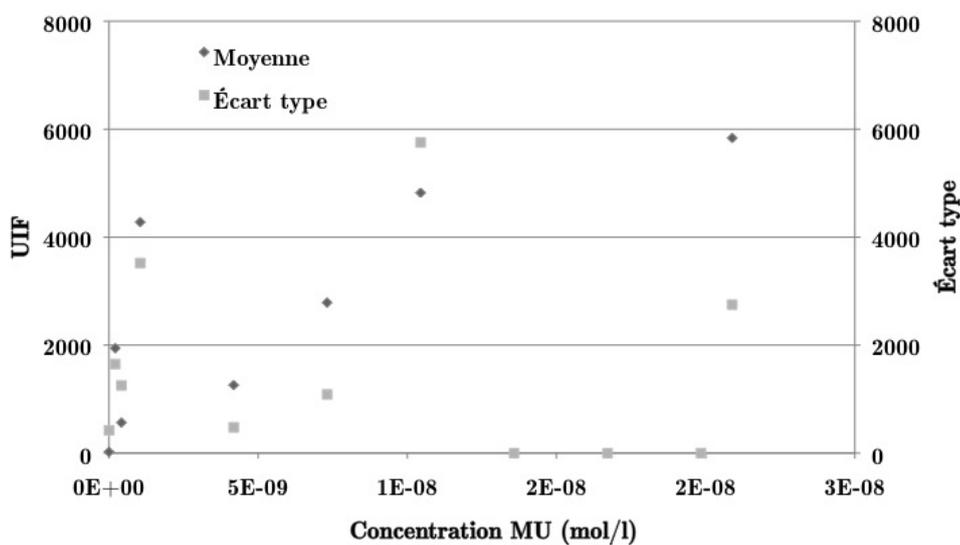


FIGURE B.5 – Les unités d’intensité de fluorescence de MU mesurées avec le spectrofluoromètre à filtre et l’écart-type de la série C. (code 100122s2)

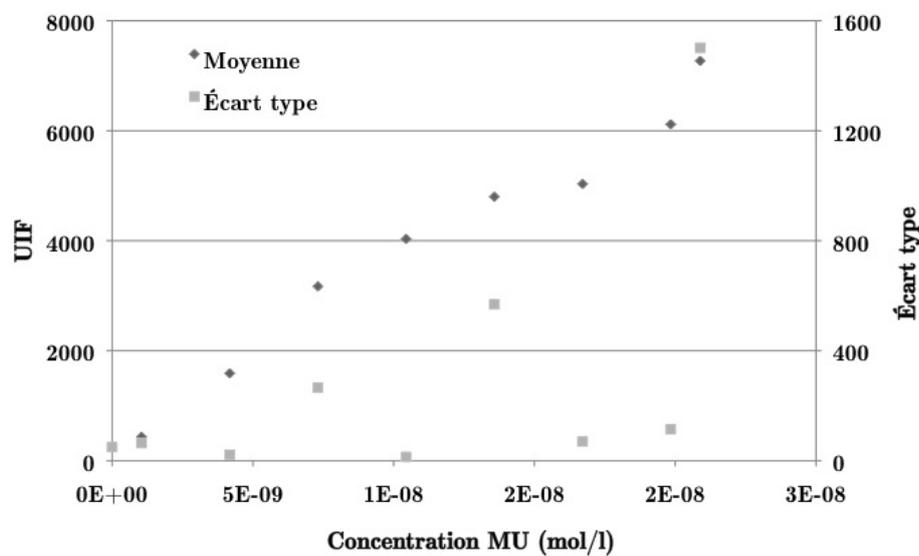


FIGURE B.6 – Les unités d'intensité de fluorescence de MU mesurées avec le spectrofluoromètre à filtre et l'écart-type de la série C. (code : 100126)

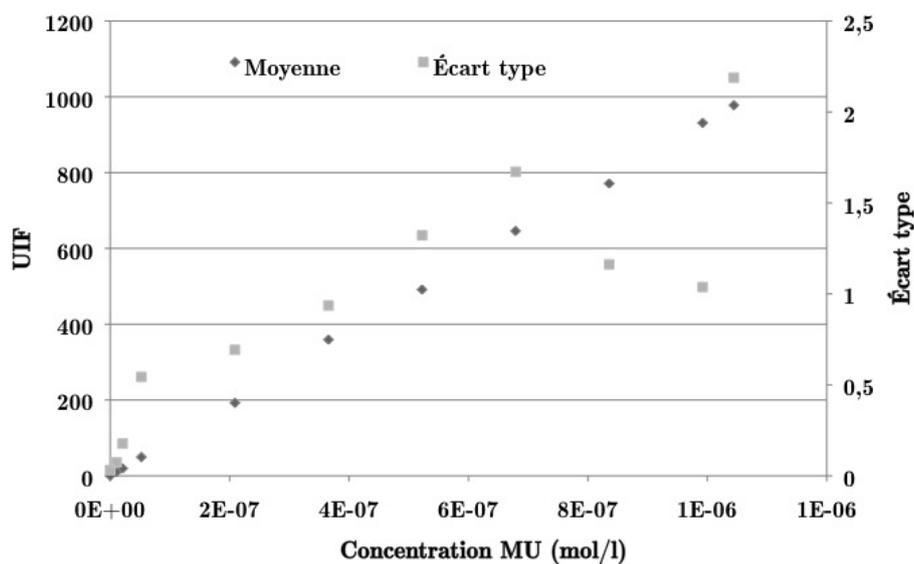


FIGURE B.7 – L'unité d'intensité de fluorescence de MU mesuré avec le spectrophotomètre de fluorescence et l'écart-type de la série A. (code : 1000216)

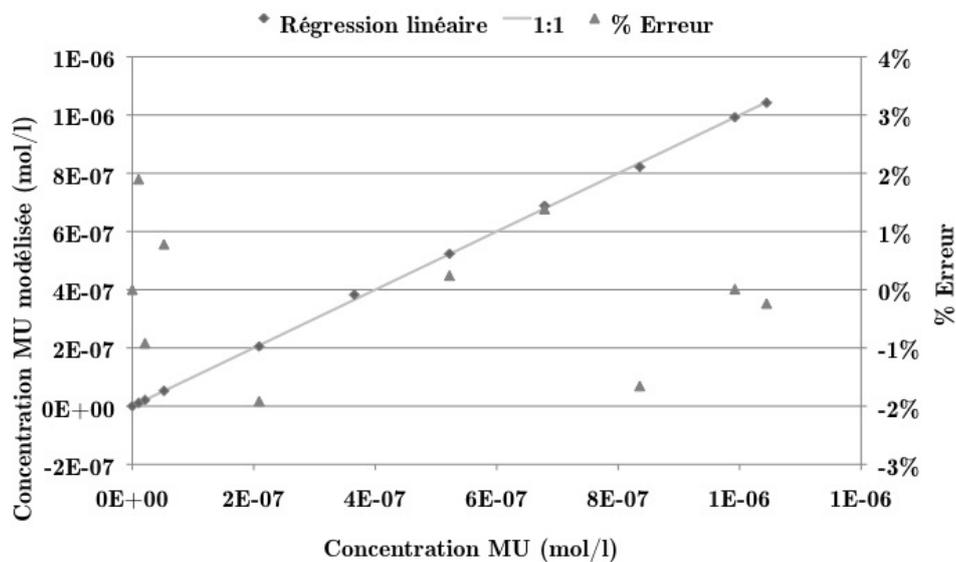


FIGURE B.8 – La concentration de MU modélisée et l’erreur relative de la série A. (code : 100216)

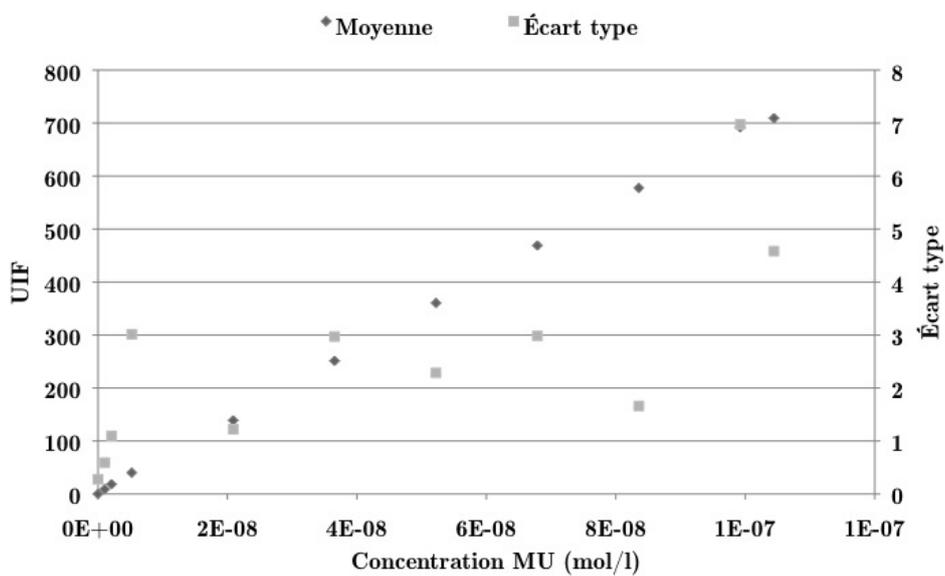


FIGURE B.9 – L’unité d’intensité de fluorescence de MU mesuré avec le spectrophotomètre de fluorescence et l’écart-type de la série B. (code : 1000218)

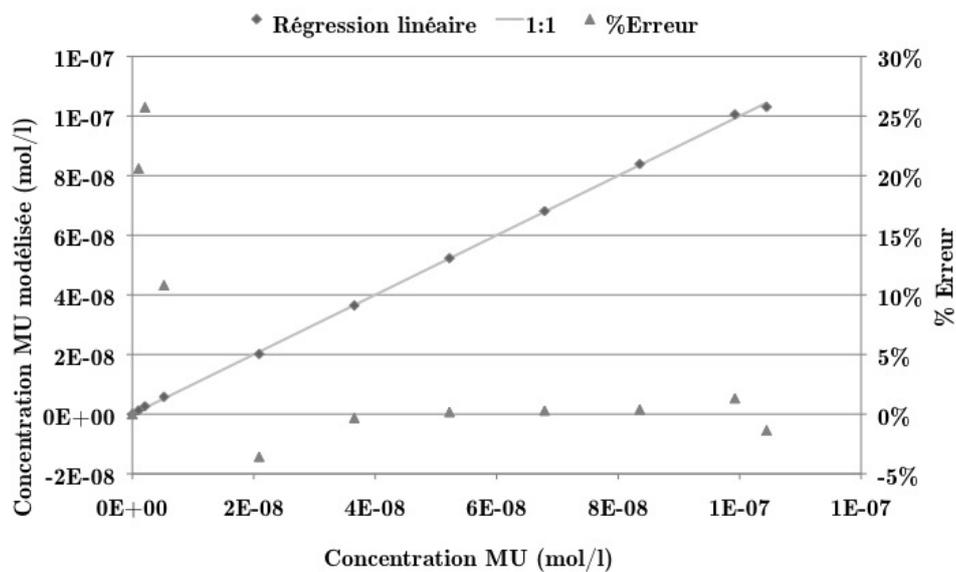


FIGURE B.10 – La concentration de MU modélisée et l’erreur relative de la série B. (code : 100218)

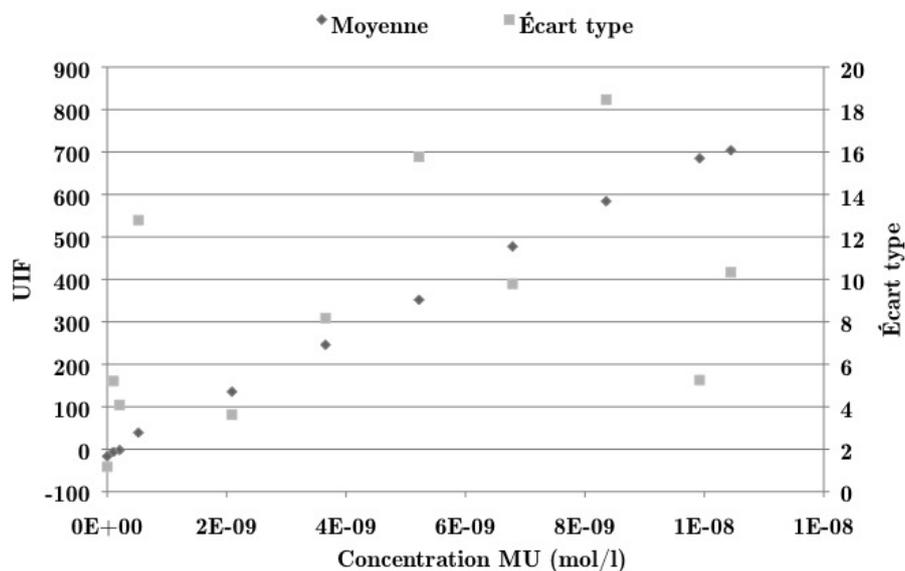


FIGURE B.11 – L’unité d’intensité de fluorescence de MU mesuré avec le spectrophotomètre de fluorescence et l’écart-type de la série C. (code : 1000302)

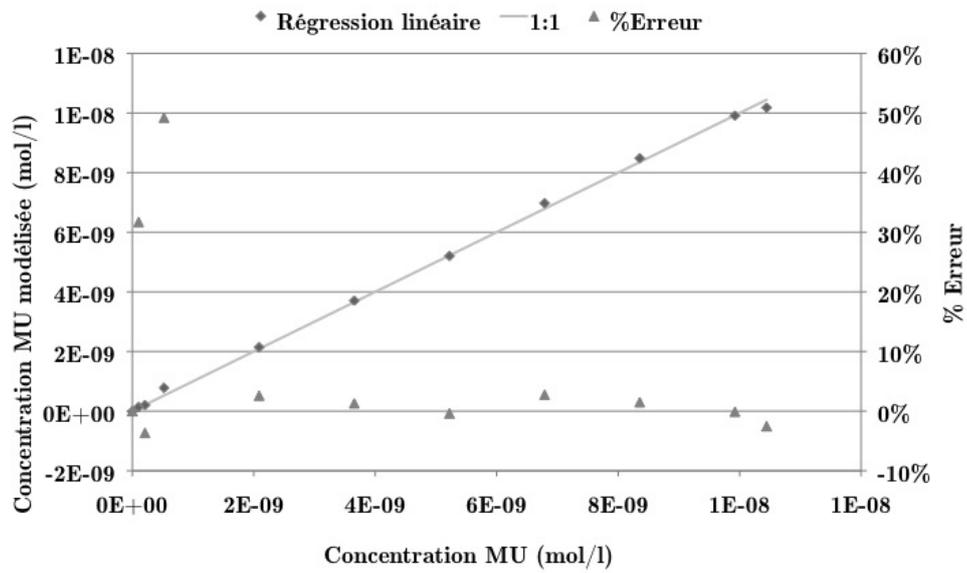


FIGURE B.12 – La concentration de MU modélisée et l’erreur relative de la série C. (code : 100302)

# Annexe C

## Protocoles de mesure de l'activité enzymatique d'*E. coli*

### Réactifs

#### Tampon de phosphate

Préparer 12.5 g/l  $KH_2PO_4$  ( $M = 136.09 \text{ g mol}^{-1}$ ) dans de l'eau desionisée et ajuster le pH à 6.9.

Le tampon est utilisé pour maintenir le pH optimal pour la réaction enzymatique.

#### Solution de MUGlu

Préparer une solution de 1.10 g/l MUGlu et 40 ml/l de 1/100 (v<sub>à</sub>ol/vol) Triton X-100 dans le tampon de phosphate.

Préparer seulement la quantité nécessaire pour l'utilisation immédiate.

Composition finale par essai : 3.3 mg MUGlu et 8  $\mu\text{l}$  Triton X-100. 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide dihydrate (MUGlu) :  $C_{16}H_{16}O_9 \cdot 2H_2O$  :  $M = 388.32 \text{ g mol}^{-1}$  (conservation à  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ , protégée de la lumière)

MUGlu est hydrolysé par l'enzyme  $\beta$ -D-glucuronidase en glucuronide et 4-methylumbelliferone (MU). MU est fluorescent. Triton X-100 est un agent de surface non-ionique et est utilisé pour augmenter la perméabilité des membranes des cellules bactériennes.

## Solution de NaOH (3M)

Préparer 120 g/l NaOH ( $M = 40.00 \text{ g mol}^{-1}$ ) dans de l'eau desionisée.

La solution de NaOH est utilisée pour ajuster le pH du tampon de phosphate et pour ajuster le pH des aliquotes à 10.7 pour une fluorescence maximale

## Courbes d'étalonnage de MU

Préparer une solution mère de MU :  $10^{-2} \text{ mol/l}$  MU en méthanol (MU, 4-methylumbelliferone,  $M = 176.17 \text{ g/mol}$ ). Préparer à partir de la solution mère de MU des solutions de  $10^{-6} \text{ mol/l}$ ,  $10^{-8} \text{ mol/l}$  et  $10^{-9} \text{ mol/l}$  MU dans le tampon de phosphate à pH 10.7.

La réponse du spectrophotomètre de fluorescence (Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer, Varian) est linéaire dans ces deux plages.

## Protocole A

- chauffer un bain à  $44.5^\circ\text{C}$
- chauffer les échantillons à température pièce
- préparer la solution de MUGlu dans le tampon de phosphate dans un erlenmeyer de 150 ml (3 ml solution de MUGlu dans 17 ml tampon de phosphate) et chauffer la dans le bain à  $44.5^\circ\text{C}$  (15 minutes)
- filtrer un échantillon ( $\pm 100 \text{ ml}$ , dépendant de la charge en MeS) sur un *mixed cellulose easter* filtre ( $0.45 \mu\text{m}$  pores, 47 mm  $\Phi$ , Whatman) + *glass microfibre* filtre (47 mm  $\Phi$ , Whatman)
- prélever une aliquote de 3 ml (concentration initiale) et ajouter les deux filtres (temps = 0 min)
- homogénéiser avant de prélever les aliquotes
- prélever des aliquotes de 3 ml (temps = 5, 10, 15, 20, 25 min)
- ajuster le pH des aliquotes à 10.7 ( $\pm 50 \mu\text{l}$  3 M NaOH (calibrer))  
ajuster le pH de l'aliquote à 10.7 ( $\pm 150 \mu\text{l}$  3 M NaOH (calibrer)) et filtrer (Millex-HV,  $0.45 \mu\text{m}$  pores)
- mesurer la fluorescence à  $\lambda$  excitation 362 nm et  $\lambda$  émission 445 nm

## Protocole B

- chauffer un bain à  $44.5^\circ\text{C}$

- chauffer les échantillons à température pièce
- préchauffer 34 ml du tampon de phosphate dans le bain à 44.5°C (15 minutes)
- filtrer un échantillon ( $\pm 100$  ml, dépendant de la charge en MeS) sur un *mixed cellulose easter* filtre (0.45  $\mu\text{m}$  pores, 47 mm  $\Phi$ , Whatman) + *glass microfibre* filtre (47 mm  $\Phi$ , Whatman)
- ajouter les deux filtres (temps = 0 min)
- à temps = 10 min, homogénéiser et prélever 17 ml du surnageant
- ajouter 3 ml aux deux erlemeyers et prélever une aliquote de 3 ml (temps = 10 min, concentration initiale)
- prélever des aliquotes de 3 ml (temps= 15, 20, 25, 30, 35 min)
- ajuster le pH des aliquotes à 10.7 ( $\pm 50 \mu\text{l}$  3 M NaOH (calibrer))  
ajuster le pH de l'aliquote à 10.7 ( $\pm 150 \mu\text{l}$  3 M NaOH (calibrer)) et filtrer (Millex-HV, 0.45  $\mu\text{m}$  pores)
- mesurer la fluorescence à  $\lambda$  excitation 362 nm et  $\lambda$  émission 445 nm

## Protocole C

- chauffer un bain à 44.5°C
- chauffer les échantillons à température pièce
- préparer 20 ml la solution de MUGlu dans le tampon de phosphate dans un erlenmeyer de 150 ml et chauffer la dans le bain à 44.5°C (15 minutes)
- filtrer un échantillon ( $\pm 100$  ml, dépendant de la charge en MeS) sur un *mixed cellulose easter* filtre (0.45  $\mu\text{m}$  pores, 47 mm  $\Phi$ , Whatman) + *glass microfibre* filtre (0.45  $\mu\text{m}$  pores, 47 mm  $\Phi$ , Whatman)
- prélever une aliquote de 9 ml (concentration initiale) et ajouter les deux filtres (temps = 0 min)  
ajuster le pH de l'aliquote à 10.7 ( $\pm 150 \mu\text{l}$  3 M NaOH (calibrer)) et filtrer (Millex-HV, 0.45  $\mu\text{m}$  pores)
- rincer le filtrer avec de l'eau afin de le réutiliser pour la deuxième aliquote.
- prélever une aliquote de 9 ml (concentration finale) (temps = 30 min)  
ajuster le pH des aliquotes à 10.7 ( $\pm 150 \mu\text{l}$  3 M NaOH (calibrer)) et filtrer (Millex-HV, 0.45  $\mu\text{m}$  pores)
- mesurer la fluorescence à  $\lambda$  excitation 362 nm et  $\lambda$  émission 445 nm