

# Rapport d'activité final

## I. Numéro et Intitulé du projet

### **QUALICO – projet 2008-06**

### **Qualité et potentiel d'usage des eaux de ruissellement collectées sur les toitures des pavillons en Ile de France**

## 2. Objectifs du projet

Le projet QUALICO vise à établir un cadre de référence - du point de vue de la qualité physico-chimique et microbiologique des eaux - pour la collecte, le stockage et l'utilisation des eaux de ruissellement de toiture par les particuliers dans les zones pavillonnaires d'Ile de France.

Qualico doit permettre de mieux cerner les risques et enjeux sanitaires éventuels liés à la diversité des usages des eaux de ruissellement de toiture susceptibles d'être mis en œuvre, sans contrôle, par les particuliers.

Il a pour objectifs de :

Déterminer les critères de qualité de l'eau et les niveaux de traitement requis pour les différents usages potentiels des eaux de ruissellement collectées par les particuliers ;

Analyser l'aptitude des toitures du péri-urbain francilien à la récupération des eaux pluviales, en terme de qualité physico-chimique des eaux ;

Evaluer la qualité microbiologique des eaux stockées en fonction de la zone d'apport, des conditions de stockage et des conditions d'entretien de la cuve.

L'accent sera mis en particulier sur l'incidence des pratiques de traitement des couvertures et des pratiques de maintenance et d'entretien des cuves sur la qualité chimique et microbiologique des eaux et leur aptitude à différents usages.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet devraient permettre d'orienter le particulier dans les différents choix qu'il a à faire lors de la mise en place d'un dispositif de collecte / utilisation des eaux pluviales, de façon à assurer une bonne adéquation entre la qualité des eaux et les usages envisagés. Il convient notamment de lui permettre d'évaluer l'incidence sur la qualité des eaux récupérées, du type de couverture et de localisation de la surface de collecte, de certaines pratiques d'entretien de la toiture, du mode de stockage de l'eau et des pratiques d'entretien du dispositif de stockage.

## 3. Problématique

La collecte et le stockage des eaux pluviales en vue de leur utilisation connaissent un succès croissant en France depuis quelques années, non seulement en milieu rural mais aussi en milieu urbain et péri-urbain. L'Ile de France n'échappe pas à cette tendance, et l'on rencontre de plus en plus fréquemment des pavillons équipés d'un bidon ou d'une cuve de récupération d'eaux pluviales. Ce mouvement de collecte/utilisation des eaux pluviales, qui est dans certains cas encouragé par les collectivités locales, est motivé à la fois par des intérêts économiques (réduction de la facture d'eau potable) mais aussi par une sensibilisation nouvelle aux questions environnementales (préservation des ressources en eau). Il traduit une évolution dans le rapport des usagers au service public de l'eau et de l'assainissement. La généralisation de ces pratiques de collecte/utilisation des eaux pluviales est

susceptible d'affecter de façon globale la gestion des eaux en ville, en impactant à la fois les services de distribution d'eau potable et les services d'assainissement.

Un large choix de dispositifs de collecte des eaux de toitures est actuellement proposé au grand public dans les grandes surfaces de bricolage et les jardineries. Les cuves utilisées pour les divers usages de l'eau en extérieur sont aisées à mettre en œuvre, y compris dans l'ancien, et ne nécessitent pas de gros investissements. Ces installations bénéficient depuis 2007, du fait de l'article 49 de la loi sur l'eau et les milieux aquatiques, d'un crédit d'impôts qui devrait renforcer leur développement.

D'autres usages de l'eau sont également amenés à se développer dans les années à venir. Ainsi, les données de vente des cuves dénotent d'un probable développement de l'utilisation de l'eau de pluie à l'intérieur des habitations ; bien que cet usage nécessite une installation plus lourde, et malgré les réticences du ministère de la santé. Par ailleurs, les possibilités de collecte/stockage des eaux pluviales sont également à l'étude dans de nombreuses collectivités pour des usages publics en extérieur tels que le nettoyage de la voirie et l'arrosage des espaces verts.

Compte tenu de l'importance de la périurbanisation pavillonnaire en Ile de France (la maison individuelle représente environ 30% du parc de logement en Ile de France) c'est dans ce type d'urbanisme que se situe le plus grand potentiel de développement en terme de nombre d'installations de collectes d'eau pluviale.

Alors que les projets d'équipements de collecte /utilisation des eaux pluviales dans les établissements publics, dans l'industrie ou dans les logements collectifs donnent lieu à des études préalables, et sont encadrés par les DDAS, aucun cadre n'existe pour les dispositifs de collecte des particuliers. Or, les eaux pluviales collectées par les surfaces urbaines sont loin d'être « pures », y compris dans le cas des toitures. Diverses études ont montré qu'elles étaient susceptibles d'être contaminées en éléments métalliques (Robert et al., 2007) et en micropolluants organiques (Burkhardt et al., 2007). Cette contamination est fonction de l'environnement de la surface de collecte, des matériaux mis en oeuvre et des éventuels produits de traitements appliqués.

Peu de données existent par ailleurs concernant la qualité microbiologique des eaux collectées. Dans l'atmosphère, l'eau de pluie se charge de microorganismes puis entre en contact avec différentes surfaces qui peuvent être contaminées par les poussières, les débris végétaux et les déjections animales. La pluie lessive alors différents types de bactéries, moisissures, algues et protozoaires et autres contaminants dans la citerne de collecte. Des études précédentes ont identifié une variété de pathogènes opportunistes ou d'origine fécale dans les citernes de récupération d'eau de pluie, incluant *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Klebsiella*, et *Vibrio* (Spinks et al 2006, Fewtrell et Kay, 2007 ; Simmons et al., 2007). Par la suite la charge en pathogènes est susceptible d'évoluer au cours du stockage de l'eau en citerne, en fonction de la durée et des conditions de stockage, mais aussi en fonction des pratiques de maintenance de la cuve.

A l'heure actuelle, les connaissances concernant la qualité physico-chimique et microbiologique des eaux pluviales collectées, leur évolution en fonction des modes et des durées de collecte et de stockage, et les risques potentiels liés à différents usages de ces eaux paraissent insuffisamment documentés. De plus, le développement rapide des pratiques de collecte d'eau pluviale ne s'est pas accompagné d'une réflexion de fond sur les niveaux de qualité de l'eau requis pour les différents usages potentiels des eaux pluviales et l'adéquation entre la qualité des eaux recueillies et les usages envisagés. Le projet QUALICO se propose de combler en partie ces lacunes.

#### **4. Programme de travail**

##### **Partie I, WPI - Usages d'eau : critères de qualité et niveaux de traitement**

Le but du WPI est de dresser un tableau mettant en relation usages / critères de qualité / types de traitement à appliquer, tableau qui puisse avoir une valeur prospective dans le cas français. L'approche de définition des critères doit intégrer l'enjeu sanitaire mais également incorporer

d'autres enjeux tels que la durabilité des matériaux mis en œuvre dans l'installation, les besoins des végétaux (usage arrosage), ... La méthode mise en œuvre consistera à :

- réaliser un premier tableau de mise en relation usage/qualité/traitement à partir d'un travail de « retours d'expériences » portant sur les expérimentations et sur les systèmes commercialisés en France.
- dresser un tableau plus complet en élargissant l'analyse à des pays ayant plus de recul sur la thématique avec des conditions de développement comparable (niveau de vie, développement des infrastructures urbaines,...). En Europe : Allemagne, Belgique, pays scandinaves. Hors Europe : USA, Australie, Nouvelle Zélande.

*Situation française : une relation obérée par la focalisation sur le positionnement des autorités sanitaires.*

Aujourd'hui la réglementation française balbutiante sur la thématique spécifique de l'utilisation de l'eau de pluie comme ressource ne définit pas de critères de qualité en fonction de l'usage. Dans la plupart des projets menés au sein de bâtiments collectifs effectivement réalisés en France (de Gouvello, 2004), l'utilisation de l'eau de pluie – qu'elle ait été autorisée ou non par les autorités sanitaires, qu'elle ait été ou non l'objet d'un traitement – est limitée à quelques usages restreints, pour lesquels il a été reconnu que les traitements ne sont pas essentiels, i.e. qu'une eau de pluie de toiture correctement collectée et n'ayant subi qu'un dégrillage peut suffire. Ces usages sont :

- à l'intérieur du bâtiment : l'alimentation des toilettes et le nettoyage de sols<sup>1</sup> ;
- à l'extérieur du bâtiment : l'arrosage du jardin, le nettoyage des voiries ou sols, plus rarement nettoyage de véhicules.

Concernant les usages évoqués ci-dessus, il existe une sorte de « consensus implicite » qu'ils ne représentent de risque sanitaire sérieux<sup>2</sup>. Dans certaines opérations de type usage industriel, des considérants de qualité interviennent, car ils conditionnent l'effectivité du processus basé sur la ressource utilisée.

Au niveau des réalisations dans l'habitat individuel, peu d'informations de type « retour de terrain » sont disponibles. Toutefois, certains installateurs « spécialisés » dans la récupération/utilisation de l'eau de pluie proposent des systèmes dotés de traitement pour certains usages (principalement le lave-linge, et, dans des cas plus rares, salles de bains voire eau de cuisine y compris eau de boisson). Mais, ces critères de qualité ne font pas l'objet d'une évaluation indépendante des entreprises qui les proposent et peuvent donc être sujet à caution.

En résumé, concernant la situation française, la question de la définition des critères s'étant cristallisée presque exclusivement autour des enjeux sanitaires, l'analyse de la relation entre usages et critères de qualité et/ou niveau de traitement à appliquer est faible. Il conviendra tout de même de l'explicitier au travers de :

- la description systématique des procédés de traitement appliqués à l'eau de pluie récupérée en fonction des usages visés [et des critères de qualité associés] mis en œuvre par les « sociétés spécialisées » présentes sur le marché français.
- Les critères de qualité ou de traitement mis en œuvre sur des opérations pilotes ou expérimentales (notamment celles menées par le CSTB).

*Allemagne, Belgique, USA, Australie et Nouvelle-Zélande : l'élaboration pragmatique des critères de qualité / usage.*

---

<sup>1</sup> Il s'agit ici de sols de locaux techniques (exemple : local poubelle).

<sup>2</sup> Rappelons ici, qu'en matière d'analyse de risques sanitaires, trois types de risques sont envisagés : ingestion, inhalation et contact. Dans les usages listés ci-dessus, les risques évoqués sont faibles, voire inexistantes.

Compte tenu de leur structure administrative moins centralisée que la France (Allemagne, Belgique) et/ou de leur culture anglo-saxonne plus pragmatique (USA, Australie, Nouvelle Zélande), ces pays ont eu recours à la récupération/utilisation de l'eau de pluie en contexte urbain bien avant et plus largement qu'en France. Par ailleurs, deux pays développés importants se sont intéressés de près à la récupération/utilisation de l'eau de pluie car ils sont touchés par le stress hydrique sur au moins une fraction de leur territoire : les USA et l'Australie. Sur ces pays, nous formulons l'hypothèse de l'existence d'une formalisation sensiblement plus aboutie qu'en France de la relation usages/critères de qualité/types et niveaux de traitement. L'objectif du travail sera d'identifier, extrapoler et unifier cette formalisation. Ce travail s'effectuera par deux tâches complémentaires :

- Tout d'abord un travail de nature bibliographique portant à la fois sur la documentation juridiques et réglementaire (lois et normes du pays) et para réglementaire (guide de bonnes pratiques)
- Enquête et entretiens dont l'objectif est faire expliciter aux praticiens eux-mêmes les relations qu'il considère entre usage qualité et niveaux de traitement.

## **Partie 2 - Qualité physico-chimique des eaux de ruissellement collectées au pied des toitures**

La qualité des eaux de ruissellement collectées au pied d'une toiture est conditionnée par :

- les apports atmosphériques à l'échelle régionale (industrie, incinérateurs, centrales thermiques, circulation automobile, activité agricoles...)
- les émissions locales : chauffage/cheminée, végétation, oiseaux, ...
- les émissions par les matériaux de couverture, ainsi que les émissions consécutives à l'épandage de produits de traitement.

D'importants travaux de caractérisation et de quantification de certains de ces flux polluants ont déjà été menés, y compris en Ile de France. Ainsi peut-on citer les travaux de quantification des retombées atmosphériques menés dans le cadre du Piren-Seine, les travaux de caractérisation des eaux de ruissellement de voirie et de toitures à Paris dans le cadre du projet OPURI, et plus récemment l'étude des émissions de métaux par la corrosion des matériaux de couverture (projet TOITEAU). Les données issues des recherches nationales et internationales restent cependant assez disparates et hétérogènes. Elles n'ont en générales pas été acquises et exploitées dans un objectif d'utilisation des eaux pluviales, ou alors concernent des pays aux contextes climatiques et urbanistiques très différents de l'Ile de France. Il est nécessaire de dresser un bilan de l'état des connaissances et des données disponibles en les replaçant dans une perspective « usage de l'eau » et un contexte « Ile de France » (WP2).

La connaissance des apports de polluants par la surface de collecte elle-même (émissions par les matériaux et traitements de ces matériaux) est déterminante pour la conception d'un dispositif de collecte des eaux de ruissellement. En effet les émissions locales, lorsqu'elles existent, seront largement prévalentes par rapport au bruit de fond atmosphérique. Des travaux menés récemment en collaboration entre le Cereve et le CSTB ont permis de caractériser les émissions de métaux lourds par les couvertures et accessoires de couvertures, et de hiérarchiser les différents matériaux en fonction de leur potentiel émissif. Les données concernant les émissions de micropolluants organiques sont en revanche tout à fait insuffisantes. Cet aspect sera plus spécifiquement développé dans le WP3.

### *WP2 - Constitution d'une base de données sur la qualité des eaux de ruissellement de toitures*

Cette action, basée sur une synthèse des données bibliographiques, vise à dresser un état des connaissances complet sur :

- les flux polluants liés aux retombées atmosphériques dans deux types de contextes caractéristiques de l'Ile de France : le contexte urbain et le contexte agricole,

- les flux polluants liés aux différentes sources locales,
- les niveaux de concentration dans les eaux de ruissellement de toitures, en fonction du contexte atmosphérique de la toiture, de l'environnement local et des caractéristiques de la surface de collecte.

Ce travail portera sur les différents paramètres physiques, chimiques et microbiologiques identifiés dans la partie I, en se limitant cependant à des contextes et des types de surfaces de collecte correspondant à ce qui peut être trouvé dans les zones résidentielles d'Ile de France.

Il devra permettre d'identifier les principales lacunes concernant la connaissance de la qualité des eaux de ruissellement de toiture en vue de leur utilisation : - certains paramètres sont-ils mal documentés ? - certaines sources sont-elles mal connues ?

Les données bibliographiques seront reprises dans une base de données. Cette base de données couplée aux résultats sur les critères de qualités pour différents usages du WP I est une première étape dans la constitution d'un outil permettant à un utilisateur, dans un contexte de collecte connu, d'identifier les types d'usages de l'eau de ruissellement qui sont ou non possibles et les critères de qualités qui posent problème.

### *WP3 - Evaluation de l'incidence des matériaux de couverture et des pratiques d'entretien de la toiture sur la qualité physico-chimique des eaux de ruissellement*

Dans le cadre de cette action, nous évaluerons les risques de contamination en micropolluants organiques, et notamment en biocides, des eaux de ruissellement de toitures du fait des produits de traitement des couvertures mis en œuvre. Il s'agit d'évaluer l'impact de ces traitements sur le potentiel d'usage des eaux de ruissellement et déterminer les procédures de gestion de la cuve de stockage suite à un traitement de la toiture.

L'habitat pavillonnaire en Ile de France est le plus souvent couvert en tuiles (béton ou terre cuite) ou en ardoise. Ces matériaux sont relativement inertes, mais sont sujets à des traitements destinés à améliorer leur apparence esthétiques et leurs propriétés mécaniques (traitements fongicides et algicides, produits imperméabilisants, produits colorants...) susceptibles de contaminer les eaux de ruissellement.

### Typologie des produits de traitement mis en œuvre sur les pavillons d'Ile de France et analyse des pratiques

Un travail d'enquête sera mené auprès des distributeurs et des professionnels afin de recenser et de classer les produits de traitements utilisés sur des toitures en tuile ou en ardoise, de déterminer leurs modes de mise en œuvre, d'identifier leur composition et notamment le principe actif. Une distinction sera faite entre les produits disponibles au grand public et ceux réservés aux professionnels. Les données concernant la toxicité des molécules mises en œuvre, leur rémanence après application et leur dégradation seront recherchées. Des enquêtes auprès des particuliers et des couvreurs permettront de plus de mieux cerner les comportements individuels en terme de traitement des toitures (fréquence des traitements, motivations, facteurs déclenchants...) ainsi que les interactions entre pratiques de traitement toit et pratiques de collecte des eaux.

### Evaluation de la contamination des eaux ruisselées sur les surfaces traitées

La contamination des eaux de ruissellement après épandage d'un produit de traitement, et son évolution durant les 6 à 12 mois qui suivent le traitement, sera étudiée sur un banc d'essai constitué de mini-toitures exposées en extérieur. Deux types de tuiles (béton et terre cuite) correspondant aux matériaux de couverture les plus courants sur les pavillons d'Ile de France et présentant des caractéristiques différentes en terme de porosité et de rugosité seront utilisés. On sélectionnera une gamme de produits de traitement correspondant à différentes familles de produits, représentatifs des

usages en Ile de France ou jugés intéressants du fait de leur toxicité. Ces produits seront épandus conformément aux recommandations du fabricant. Une première pluie sera simulée artificiellement au bout de 24h, afin d'analyser la contamination des premières eaux de ruissellement dans les conditions météorologiques les plus défavorables. Le lessivage du produit sera ensuite suivi durant plusieurs mois par échantillonnage lors de pluies réelles. L'analyse des échantillons d'eau en chromatographie GC-MS permettra d'étudier la composition globale du produit lessivé (molécules actives + adjuvants). Une attention particulière sera donnée au suivi de l'évolution du chromatogramme sur les pluies successives, afin de mettre en évidence les processus de dégradation du produit épandu. Dans le cas où la molécule active ne pourrait pas être quantifiée correctement en GC-MS, une autre technique séparative (LC ou CI) sera mise en oeuvre.

En complément à la quantification chimique, des tests de toxicité sur les végétaux seront conduits sur un nombre limité d'échantillons représentatifs des concentrations les plus fortes observées aux cours des essais sur bancs.

### **Partie 3 – Evaluation de la qualité microbiologique des eaux après collecte et stockage**

Il n'y a pas de consensus clair sur la qualité bactériologique des eaux pluviales collectées. Le risque sanitaire n'est pourtant pas négligeable et il est d'autant plus élevé que les équipements sont souvent inappropriés et peu entretenus.

Le but de cette partie 3 est donc de déterminer la qualité microbiologique des eaux de ruissellement collectées en nous intéressant à l'écologie microbienne dans la citerne. On se focalisera dans cette partie sur les types d'installations de collecte des eaux pluviales les plus représentatifs des pavillons d'Ile de France, tant en terme de surface de collecte qu'en terme de type de cuve. Les travaux menés dans le cadre du programme de recherche R2DS S-R-UTIL serviront de base à la définition des caractéristiques structurelles de la cuve à prendre en compte (matériau, volume, installation extérieure ou enterrée, arrivée d'eau, soutirage et trop plein) mais aussi à la définition des pratiques d'entretien de ces cuves.

#### *WP4 - Qualité microbiologique de l'eau collectée*

Comme il n'existe pas de norme pour la qualité microbiologique de ces eaux, les pathogènes ou indicateurs recherchés varient d'une étude à l'autre en fonction des usages de l'eau collectée, rendant difficile les comparaisons.

L'objectif de cette action est d'identifier le type d'organismes pathogènes que l'on peut rencontrer dans ces eaux en lien avec les paramètres de qualité de l'eau identifiés dans le WPI. Pour ce faire, nous réaliserons un inventaire des microorganismes susceptibles de diminuer la qualité des eaux de ruissellement en fonction du type de toiture et de cuve. Comme les usages peuvent varier de l'arrosage à la consommation, nous nous baserons sur les normes les plus contraignantes à savoir la norme de qualité des eaux destinées à la consommation humaine (Code de la santé publique). Nous rechercherons également des pathogènes émergents susceptibles d'être inhalés, avalés ou d'entrer en contact avec la peau : entérovirus, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Campylobacter*, *Legionella* et les mycobactéries non-tuberculeuses. En parallèle les paramètres physico-chimiques pertinents pour la croissance microbienne seront également analysés (pH, température, potentiel redox, oxygène, carbone organique dissous, azote, phosphore). Ces recherches seront faites dans deux cas extrêmes d'environnements (toiture ancienne avec végétation haute et couverture moussue, toitures neuves peu entourées de végétation). Les échantillons collectés comprendront :

- des eaux de ruissellement à la sortie de la gouttière après une période sèche suffisamment longue au printemps et à l'automne, deux années de suite.
- de l'eau, du biofilm et des dépôts dans deux types de cuves (cuve extérieure exposée au soleil et cuve enterrée) Les échantillons seront collectés avant et après une longue période sans soutirage d'eau (typiquement avant et après les vacances d'été des propriétaires).

Les résultats permettront de déterminer des paramètres bactériologiques pertinents pour le suivi de qualité des eaux pluviales collectées en fonction des systèmes de collecte et de leur environnement.

#### *WP5 - Incidence de différents modes d'entretien ou de gestion de la cuve*

La qualité bactériologique des eaux stockées ne dépend pas que de la composition des microorganismes et des polluants chimiques lessivés par la pluie dans la citerne. Le temps de stockage a également une influence sur la qualité de l'eau de la citerne. En effet, Le développement de microorganismes saprophytes joue un rôle important dans l'exclusion compétitive des pathogènes, le recyclage des nutriments et la biotransformation des polluants chimiques. Cependant, le type d'installation et sa maintenance peuvent grandement influencer la composition des communautés microbiennes dans les cuves, créant des conditions plus ou moins favorables au développement de biofilm ou de dépôts.

Le but de l'action II est d'étudier les risques liés à une longue période de stagnation des eaux dans la cuve et ceux liés aux traitements du toit et de la cuve. La croissance des pathogènes pendant le stockage, l'impact de la chloration et l'impact des traitements de la toiture sur la résistance des communautés microbiennes aux invasions seront testés en microcosmes, à partir d'échantillons collectés prélevés au pied de la gouttière ou en cuve lors du WP4.

Développement microbien lors de la stagnation d'eau. Afin d'évaluer le risque de développement de microorganismes indésirables durant les périodes de non renouvellement de l'eau (correspondant à une période sans soutirage, ou à une période sans pluie), nous laisserons vieillir en microcosme des communautés microbiennes. La capacité de développement d'un pathogène sera évaluée en contaminant la moitié des microcosmes une souche *Escherichia. coli* marquée par le gène Green Fluorescent Protein (GFP). L'évolution temporelle de la structure de la communauté sera analysée par profils RISA (espace intergenic entre les gènes ARNr 16S et 23S).

Ce test doit mettre en évidence la nécessité ; ou non de vidanger les cuves après des périodes de stagnation d'eau. Une analyse du fonctionnement des cuves (configuration de dispositifs d'alimentation, de soutirage et de trop plein) couplée à une simulation du fonctionnement sera réalisée pour évaluer les temps de séjour de l'eau pertinents à considérer dans ces tests.

Impact d'une perturbation sur la résistance aux invasions (Chloration ou antifongiques). Une perturbation qui diminuerait la diversité microbienne dans la cuve devrait favoriser l'invasion de la cuve par un pathogène résistant à cette perturbation. Ainsi la chloration couramment pratiquée pour l'entretien des cuves, pourrait déstabiliser les communautés établies et augmenter le risque d'avoir un développement de mycobactéries non-tuberculeuses (NTM) qui sont résistantes au chlore. De même, l'apport de pesticides par l'entretien du toit pourrait générer une perturbation toxique pour les bactéries et donc diminuer la diversité des microorganismes présents dans la cuve.

Afin de tester ces hypothèses, des communautés mûres issues de cuves seront soumises à des perturbations (antifongiques, chloration...) Le changement de diversité de la communauté sera analysée par profils RISA. Les résultats permettront de déterminer d'une part si un entretien hygiéniste (chloration de la cuve) est plus pertinent qu'une approche écologique (maintient de la diversité microbienne), en fonction du type de cuve et des usages de l'eau.

## 5. Profil des équipes de recherche et partenariat

- potentiel scientifique :
  - nombre total de chercheurs et enseignants chercheurs travaillant sur le projet : 6
  - nombre total de doctorants et post-doctorants travaillant sur le projet : 2
  - nombre total de doctorants et post-doctorants bénéficiant d'une allocation de la région : 2
  - laboratoires travaillant en interaction avec d'autres réseaux : pôles de compétitivité, RTRA, réseaux européens –  
Oui, les réseaux liés au projet sont : OPUR (Observatoire des Polluants Urbains en Ile de France), SOERE URBIS (réseau des observatoires en hydrologie urbaine)
- financement du projet : description des principaux partenaires financiers
  - Part du financement régional dans le plan de financement du projet : 78% du coût marginal du projet
  - Part de financement des agences de moyens nationales (ANR/AII) : 0
  - Part des financements européens : 0
  - Part des financements propres des institutions parties prenantes du programme
  - Part des autres financements : institutionnels, industriels

## 6. Résultats scientifiques

### Partie I, WPI - Usages d'eau : critères de qualité et niveaux de traitement

#### Situation française. Analyse du thème de la qualité d'eau au travers de l'arrêté du 28 août 2008 sur l'utilisation de l'eau de pluie

Les aspects relatifs à la qualité de l'eau de pluie (avant ou après traitement) en vue de son utilisation sont évoqués dans plusieurs articles de l'arrêté du 28 août 2008 sur l'utilisation de l'eau de pluie, le plus souvent de manière implicite.

- L'article 1 définit le domaine d'application du texte. Il restreint de facto le type – et donc la qualité – des eaux de pluie prises en compte. D'une part, n'est concernée que « l'eau de pluie récupérée en aval de toitures inaccessibles », c'est-à-dire de couvertures de bâtiments non accessibles au public, « à l'exception des opérations d'entretien et de maintenance ». D'autre part, l'eau de pluie est définie comme « une eau de pluie non, ou partiellement, traitée », ce qui exclut du champ du texte la production d'eau potable à partir d'eau de pluie. Est ainsi définie une catégorie intermédiaire entre les eaux pluviales urbaines – fortement polluées – et l'eau potable.

- L'article 2 s'attache aux usages autorisés de l'eau de pluie collectée. Si les usages domestiques extérieurs au bâtiment sont autorisés, l'utilisation à l'intérieur du bâtiment impose des toitures « autres qu'en amiante-ciment ou en plomb », ce qui restreint encore le type d'eau utilisable. Quant aux usages domestiques intérieurs, ils sont limités à l'évacuation des excréments et au lavage des sols, et « à titre expérimental », au lavage du linge, « sous réserve de mise en œuvre de dispositifs de traitement de l'eau adaptés ». Deux catégories de qualité d'eau de pluie à l'intérieur du bâtiment sont ainsi implicitement créées : celle utilisable pour les toilettes et le lavage du sol qui n'exige aucun traitement (autre que la filtration amont requise dans l'alinéa III de l'article 3, cf. infra) et celle requise pour le lavage du linge qui suppose un dispositif de traitement de l'eau adapté. Toutefois, une forte faiblesse du texte est justement de ne pas définir cette expression. Les acteurs ne disposent ainsi actuellement d'aucun critère objectif pour évaluer la qualité de l'eau requise pour cet usage. Enfin, les usages professionnels et industriels de l'eau de pluie sont autorisés, dès lors qu'ils ne requièrent pas – selon d'autres textes réglementaires (en particulier ceux relatifs à l'industrie agro-alimentaire) – l'emploi d'eau potable. Une nouvelle distinction est ici induite entre eau de pluie à usage domestique et eau de pluie à usage autre.

- Les alinéas II.1 et II.5 de l'article 3 précisent des conditions requises de stockage de l'eau de pluie pour préserver sa qualité. Les réservoirs doivent : être protégés « contre toute pollution d'origine extérieure » ; pouvoir être nettoyés et vidangés totalement aisément (absence de stagnation résiduelle) ; avoir des parois intérieures « constituées de matériaux inertes vis-à-vis de l'eau de pluie » et des aérations « munies de grilles anti-moustiques de mailles de 1 millimètre au maximum » ; enfin, ne recevoir aucun produit antigel.

- L'alinéa III. de l'article 3 introduit des exigences complémentaires spécifiques pour les utilisations internes au bâtiment. Plusieurs de ces exigences visent à améliorer ou préserver la qualité de l'eau de pluie, notamment : « l'obligation de mise en place d'un dispositif de filtration inférieure ou égale à 1 millimètre (...) en amont de la cuve afin de limiter la formation de dépôts à l'intérieur » ; la protection des réservoirs « contre les élévations importantes de température ». En introduisant ces exigences complémentaires spécifiques, le législateur induit une nouvelle catégorisation de l'eau de pluie en termes de qualité requise entre les eaux destinées aux seuls usages extérieurs et celles utilisables à l'intérieur pour les usages autorisés.

- Enfin, l'article 4 précise les opérations d'entretien et maintenance du système devant être réalisées par le propriétaire. Celui doit vérifier « semestriellement la propreté des équipements de récupération des eaux de pluie » et procéder « annuellement au nettoyage des filtres, à la vidange, au nettoyage et à la désinfection de la cuve de stockage ».

Ainsi, en dépit du caractère partiel de son domaine d'application et d'une finalité non directement liée à cette question, l'arrêté fait implicitement émerger trois catégories intermédiaires de qualité d'eau entre l'eau potable et l'eau pluviale : l'eau de pluie utilisable à l'extérieur ; l'eau de pluie utilisable à l'intérieur du bâtiment pour les usages lavage du sol et toilettes ; l'eau de pluie utilisable pour le lavage du linge. Ces différentes catégories sont définies en termes d'obligations de moyens à mettre en œuvre, dont certaines sont insuffisamment précises. Elles ne font pas l'objet de critères de qualité définis au travers de paramètres à respecter, ce qui rend difficile leur objectivation en termes de qualité.

### Panorama international

Sur la base d'une étude documentaire prenant en compte guides, expérimentations, retours d'expérience et réglementations définis à l'étranger, une grille méthodologique mettant en relation les usages de l'eau de pluie à l'intérieur du bâtiment et les critères de qualité et/ou moyens de traitement requis et les technologies possibles pour y répondre a été dressée. Ce travail s'est essentiellement appuyé sur l'analyse de 32 références scientifiques et techniques, pour la plupart issues des actes des conférences de l'IRCSA (International Rainwater Catchment System Association), ainsi que d'une recherche internet et de contacts mails (Australie + Maine). Les données sont issues de deux groupes de pays : des pays développés (France, Ecosse, Japon, Allemagne, Angleterre, Belgique, Etats-Unis (différents Etats), Australie) et des pays en voie de développement (Sri Lanka, Corée, Ile Maurice, Kenya, Chine (différentes provinces)). Sur cette base 2 tableaux ont été dressés : « Réglementations ou Références » par pays, « Critères ou moyens » des pays par usage.

Cette première analyse met en évidence une scission entre pays développés et pays en voie de développement. Les premiers se distinguent par l'existence ou l'amorce de réglementations ou de normes, tandis que le second groupe est caractérisé par une pratique de facto pour pallier l'absence de réseaux et par des guides pratiques pour monter des installations.

Il est clairement apparu une prédominance de règles relatives aux moyens à mettre en œuvre (différence avec eau potable), plutôt que des règles en termes de niveau de qualité de l'eau. La grande variété des usages recouverts par l'eau de pluie selon les pays a été soulignée. Certains de ces usages font l'unanimité (chasse d'eau des toilettes, arrosage), mais on trouve également des cas où l'eau de pluie sert de base d'eau de boisson. La faible intégration territoriale des règles applicables a été remarquée. En effet, il n'existe pas de références codifiées supra-nationales spécifiques au thème (ex: Europe). Dans les grands pays (Etats-Unis, Chine) plusieurs « réglementations » existent en fonction des états.

## Partie 2 - Qualité physico-chimique des eaux de ruissellement collectées au pied des toitures

### WP2 - Constitution d'une base de données sur la qualité des eaux de ruissellement de toitures

Un travail exhaustif de recherche des publications scientifiques relatives à la qualité des eaux de ruissellement de toiture, dans les pays développés, a été réalisé. 78 publications ont été collectées, et partiellement exploitées. Une base de données, synthétisant les informations contenues dans ces publications a été développée sous Accès, avec une interface utilisateur conviviale et de requêtes pour l'interrogation de la base.

### WP3 - Evaluation de l'incidence des pratiques d'entretien de la toiture sur la qualité physico-chimique des eaux de ruissellement

#### OBJECTIFS :

L'évaluation de l'incidence des pratiques d'entretien des toitures sur la qualité des eaux de ruissellement a fait l'objet de la thèse de A. Van, de Voorde, soutenue en juin 2012. Les objectifs de ce travail étaient de :

- ✓ Identifier et hiérarchiser les pratiques d'entretien de toiture mises en œuvre et les molécules présentes dans la formulation des produits utilisés,
- ✓ Evaluer le niveau de contamination des eaux de ruissellement après un traitement de toiture et identifier les principaux facteurs influençant l'émission des composés,
- ✓ Discuter de l'incidence de la contamination des eaux de ruissellement induite par les pratiques de traitement des toitures à l'échelle locale (en lien avec les usages autorisés par l'Arrêté du 21/08/2008), ainsi qu'à l'échelle du bassin versant, dans le cas de la collecte des eaux de pluie par un réseau d'assainissement séparatif.

#### METHODOLOGIE :

La méthodologie mise en place s'articule autour des trois objectifs principaux qui ont été mentionnés précédemment. Celle-ci est schématisée ci-après (Figure 1) :

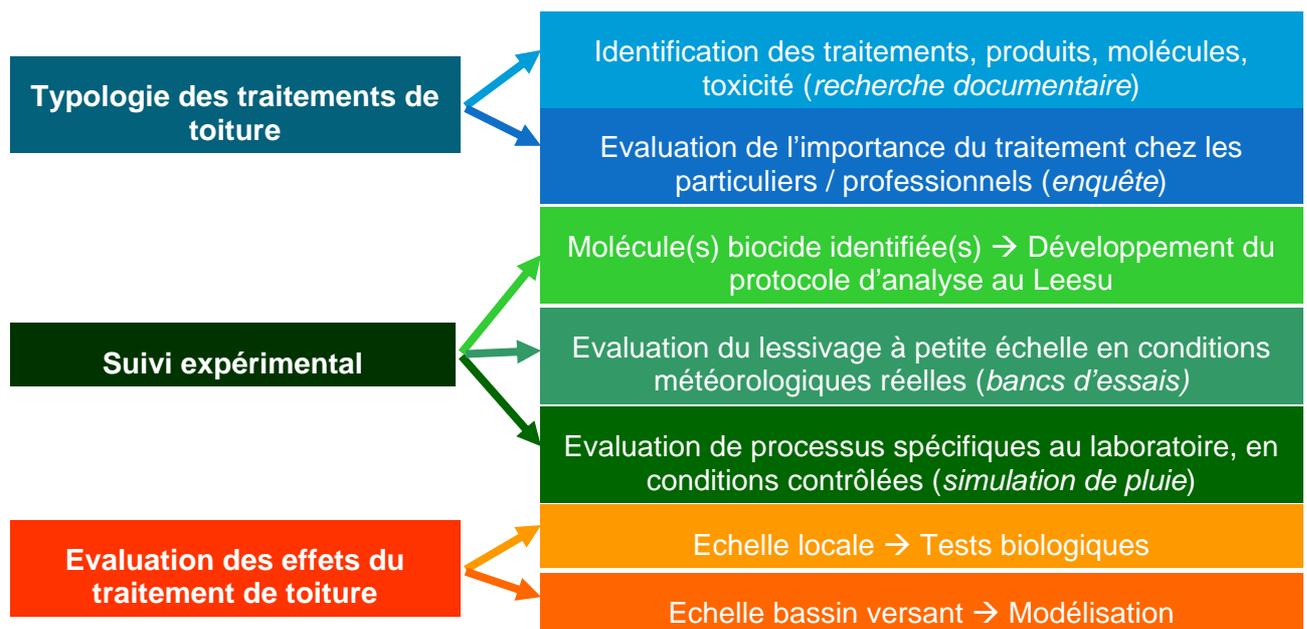


Figure 1. Méthodologie générale mise en place dans le cadre de la thèse du projet Qualico

La première partie du travail a donc été la mise en évidence des pratiques d'entretien des toitures existantes en France et de leur importance relative, ainsi que des produits et molécules utilisés. Ceci a été mené au travers d'une recherche documentaire (recensement des produits existants, analyse des Fiches de Données Sécurité (FDS) et de la bibliographie scientifique) et par des travaux d'enquête (encadrés par Bernard de Gouvello).

Une fois que les molécules d'intérêts ont été ciblées, nous en avons développé le protocole d'analyse au laboratoire. Par la suite, un suivi expérimental de l'émission des composés biocides par une toiture traitée a été mené à deux échelles distinctes, correspondant à deux sous objectifs. Dans un premier temps, des petites toitures ont été fabriquées dans le but de suivre l'émission en conditions météorologiques réelles. Le but a ici été d'obtenir un ordre de grandeur de la contamination des eaux de ruissellement après un traitement, aucune donnée n'étant disponible au moment de la thèse. Dans un deuxième temps, un travail au laboratoire en simulation de pluie a permis de travailler en conditions contrôlées sur l'influence de paramètres spécifiques pouvant influencer le lessivage des composés.



Figure 2. Photographie des bancs d'essais mis en place en conditions in situ et du système de simulation de pluie utilisé au laboratoire

Enfin, la troisième et dernière partie du travail a utilisé l'ensemble des données acquises précédemment pour étudier les effets du traitement de toiture, à deux échelles : une échelle locale via des tests de toxicité sur des plantes (en lien avec les pratiques de réutilisation des eaux de ruissellement récemment autorisées (Arrêté, du 21/08/08)) et une échelle bassin versant, via un modèle mathématique, dans le but d'évaluer les flux et concentrations émis à l'aval d'un réseau d'eau pluvial.

## RESULTATS

### I. Typologie des traitements de toiture

- *Types de traitement mis en œuvre*

Les résultats de la recherche documentaire ont permis de mettre en évidence 4 grands types de pratiques de traitement de toiture :

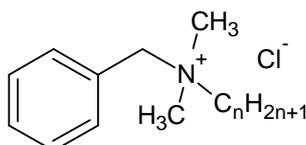
- ✓ le nettoyage simple (pour le dégrassage grossier des toitures),
- ✓ le traitement biocide anti-mousses (action biocide d'élimination des mousses et lichens incrustés),
- ✓ l'imperméabilisation (utilisés sur les matériaux de toiture poreux tels que les tuiles afin d'augmenter leur résistance au mouillage),

- ✓ la peinture (qui permettra d'une part un embellissement de la toiture, ainsi qu'une imperméabilisation du support).

Les produits biocides anti-mousses présentent l'offre la plus large sur le marché (19 produits différents listés). Ce résultat a été appuyé par les enquêtes, qui ont montré que le traitement le plus mis en œuvre par les particuliers et les professionnels est le démoussage (73% des entreprises interrogées réalisant ce traitement). Par conséquent, dans la suite du travail, nous avons fait le choix de nous centrer sur cette pratique.

- *Molécule biocide utilisée et toxicité*

Une analyse des FDS des produits anti-mousses a permis de montrer qu'une même molécule active est présente dans l'ensemble de ces produits : le chlorure de benzalkonium (Figure 3).



Chlorure de benzalkonium (n° CAS : 8001-54-5)

Composition majoritaire des produits biocides de démoussage : n = 12 (75%), 14 (25%)

Figure 3. Formule générale du benzalkonium

Cette molécule est déclarée par les fabricants comme irritante, corrosive et très dangereuse pour l'environnement aquatique. En effet, les EC50 (effective concentration) déclarées au sein des FDS sont inférieures à 1 mg/L (seuil en dessous duquel un composé doit être déclaré « très dangereux pour l'environnement aquatique »). Il est également fait part d'une biodégradabilité importante du composé (> 90%).

Les données obtenues au sein de la bibliographie scientifique appuient la grande toxicité du benzalkonium (Kreuzinger et al., 2007; USEPA, 2006). Cependant, les EC50 collectées sont beaucoup plus faibles que celles déclarées par les fabricants de produits (jusqu'à seulement 5,9 µg/L pour les invertébrés). De plus, des données sur l'homme ont montré que le benzalkonium peut être non seulement irritant pour la peau ou les yeux, mais qu'il peut également être une source d'allergies ou de réactions asthmatiques (Hemery, 2008).

## 2. Suivi expérimental de l'émission de benzalkonium à l'aval d'une toiture traitée

- *Mise au point du protocole d'analyse du benzalkonium*

L'analyse du benzalkonium a été mise au point pour les fractions dissoute et particulaire. L'analyse est réalisée en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Cette partie du travail a fait l'objet d'un article international paru dans le journal Environmental Pollution (Van de Voorde et al., 2012).

Concernant la partie chromatographique, nous avons optimisé la fragmentation et la détection de la molécule, afin de pouvoir mesurer des concentrations très inférieures aux EC50 listées, pour identifier de possibles effets toxiques des eaux de ruissellement.

Pour la fraction dissoute, le protocole mis au point utilise la technique d'extraction en phase solide (SPE) par échanges cationiques, et élution au méthanol acidifié. Le benzalkonium étant chargé positivement (via l'atome d'azote), ce type d'extraction est tout à fait possible, et possède l'avantage d'être très spécifique, éliminant une grande quantité d'interférents potentiels. Les rendements d'extraction se sont révélés très bons pour le benzalkonium à 12 atomes de carbone (90%), qui représente environ 75% de la composition des produits anti-mousses. Pour le benzalkonium à 14 atomes de carbones, le rendement est moins bon (60%), mais ces composés ne représentent que 25% de la composition. Par ailleurs, des tests ont montré que pour les échantillons fortement

contaminés ( $> ? \mu\text{g/l}$ ), l'étape d'extraction n'était pas nécessaire. Dans ce cas, une simple dilution de l'échantillon est réalisée avant l'injection en LC-MS/MS.

Pour l'extraction des particules, nous avons mis au point une extraction par microondes, avec du méthanol acidifié comme solvant d'extraction. Le protocole a été optimisé pour deux types de matrices : des mousses de toiture et des tuiles (béton et terre cuite). Comme pour le dissous, les rendements se sont révélés très bons pour le benzalkonium à 12 carbones (de l'ordre de 90%), et légèrement plus faible pour le benzalkonium à 14 carbones (à 80%).

Le protocole global utilisé peut être schématisé comme dans la Figure 4.

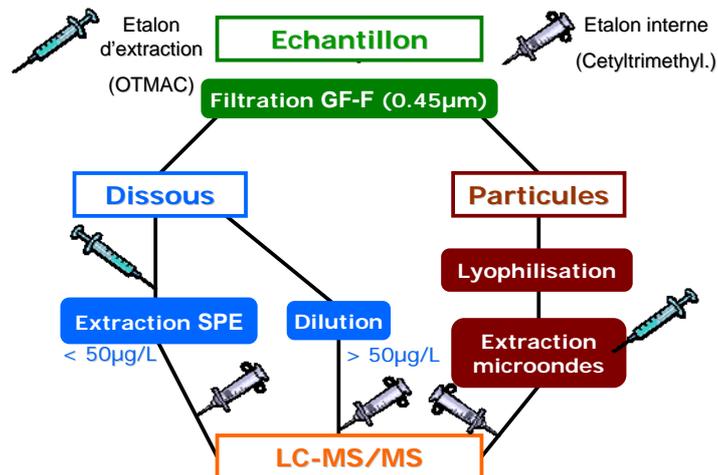


Figure 4. Protocole global de l'analyse du benzalkonium dans les eaux de ruissellement

- Réflexion amont sur le mécanisme de lessivage du benzalkonium épanché lors d'un traitement de toiture

Afin de préparer au mieux le suivi de l'émission de benzalkonium, une réflexion en amont a été menée, afin d'identifier comment le benzalkonium va être réparti sur une toiture traitée, et comment ces stocks vont évoluer dans le temps. Cette réflexion a donné lieu à la Figure 5.

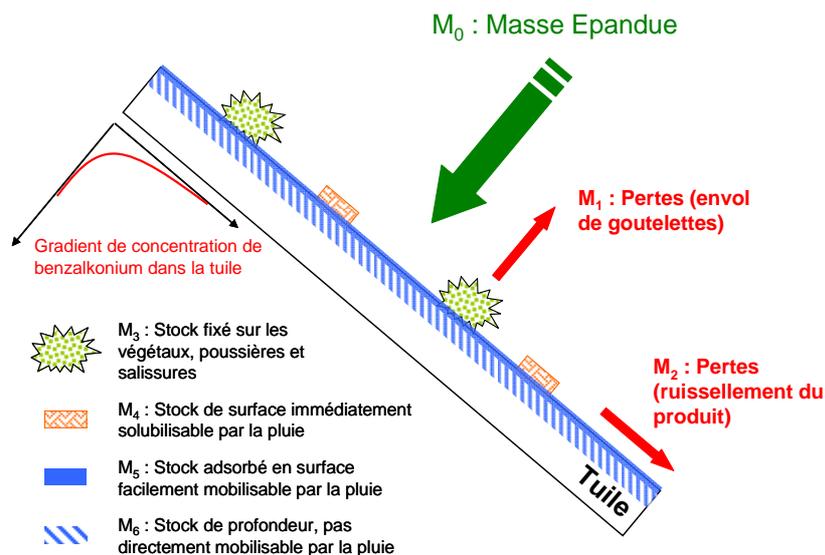


Figure 5. Création des stocks de benzalkonium sur une tuile après un traitement de toiture

Comme nous pouvons le voir, lors de l'épandage, des pertes vont pouvoir intervenir par un envol de micro gouttelettes ou un ruissellement du produit. Par ailleurs, les stocks restant au niveau de la tuile vont pouvoir évoluer, par temps sec et par temps de pluie. Par temps sec, des phénomènes de

dégradation (chimique, photochimique, ou thermique) pourraient diminuer les stocks. Par temps de pluie, les stocks restant vont pouvoir être émis dans l'eau de ruissellement par différents processus :

- ✓ Une érosion des végétaux pour le stock M3
- ✓ Une dissolution du stock M4, non lié à la tuile
- ✓ Une désorption des stocks M5 et M6, avec pour ce dernier des mécanismes possibles de diffusion au sein du matériau.

L'ensemble de ces processus peut être influencé par plus d'une vingtaine de paramètres. Nous avons donc sélectionné ceux qui nous sont apparus comme étant les plus importants. Pour les bancs d'essais, nous avons décidé d'étudier l'impact du matériau de toiture, de son état de surface et de l'orientation de la toiture au soleil et à la pluie. Au laboratoire, nous avons étudié l'influence d'autres matériaux de toiture, de l'intensité de la pluie, de la concentration et de la masse de produit épandu.

- *Les bancs d'essais*

#### Mise en place

12 bancs d'essais de toitures, d'une surface projetée de l'ordre de 1 m<sup>2</sup> chacun et d'une pente de 40°, ont été construits et exposés en extérieur.. Ils comprenaient 2 types de tuiles usagées (béton et terre cuite - matériaux de toiture les plus représentés en Ile de France (MSI-Etude, 2006)) exposées suivant les 4 orientations Nord / Sud / Est / Ouest (Figure 2), 2 types de tuiles neuves exposées au nord et 2 bancs témoin en tuiles usagées exposés au sud. 10 des 12 bancs ont fait l'objet d'un traitement anti-mousse en respectant le mode opératoire et le dosage (produit à 24 g/l, épandage de 1 l pour 5 m<sup>2</sup>) préconisés par le fabricant.

Le Tableau 1 résume les caractéristiques des bancs.

Tableau 1. Synthèse des bancs d'essais mis en place

Matériaux	Epandage biocide	Etat de surface	Exposition	Désignation des bancs	Caractéristiques générales
Terre Cuite (TC) / Béton (Bét.)	Non	Usagé	Sud	TC Blc, Bét. Blc (blancs)	Surface projetée : ~1 m <sup>2</sup> Pente : 40°
	Oui	Usagé	Nord / Sud / Est / Ouest	TCN, TCS, TCE, TCO Bét. N, Bét. S, Bét. E, Bét. O	
	Oui	Neuf	Nord	TC Neuf, Bét. Neuf	

#### Evènements pluvieux échantillonnés

La concentration en benzalkonium dans les eaux de ruissellement des bancs a été suivie sur une période de 13 mois (640 mm de pluie) suivant le traitement. 9 évènements pluvieux ont été analysés sur cette période, dont les cinq premiers évènements qui correspondent à l'ensemble des précipitations au cours du premier mois d'exposition après le traitement. (50 mm). Les données caractéristiques des pluies sont présentées dans le Tableau 2. Huit évènements sur les neuf échantillonnés présentent des hauteurs de pluie assez voisines, entre 7,2 et 11,2 mm. En revanche, ces pluies présentent des caractéristiques très variables en termes de durée (entre 4 et 43 heures) et d'intensité maximale sur 5 minutes (entre 3,5 et 45 mm/h sur 5 minutes). Les évènements 6 et 7 correspondent en outre à des chutes de neige, ce qui explique les informations manquantes.

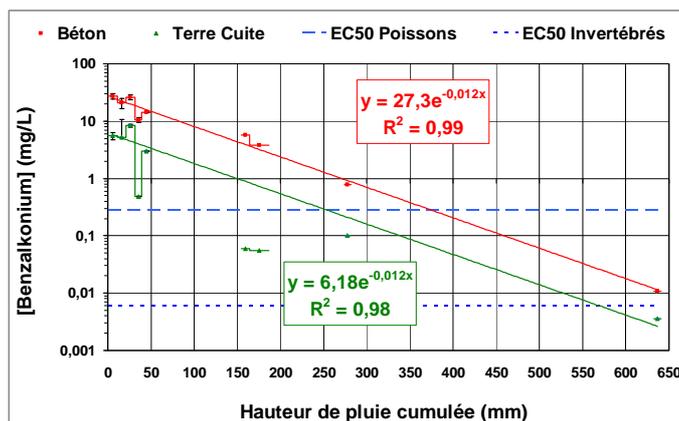
Tableau 2. Détails des pluies échantillonnées lors du suivi par bancs d'essais

N°	Date de début	Date de fin	Durée (h)	Durée depuis D0 (jours)	Hauteur de pluie totale depuis D0 (mm)	Hauteur de pluie de l'évènement (mm)	Intensité maximale sur 5 min (mm/h)
1	23/09/2010 22:35	24/09/2010 6:54	8,5	2	11,2	11,2	23,1
2	26/09/2010/ 16:11	27/09/2010 1:30	9,5	5	20,8	9,6	4,8
3	30/09/2010/ 5:41	2/10/2010 1:41	43	9	31,6	10,8	5,2
4	16/10/2010/ 2:30	16/10/2010 6:37	4	25	39,2	7,6	5,3
5	23/10/2010/ 11:59	23/10/2010 19:02	7	32	50,2	11	45
6	04/12/2010/	-	-	74	164,4	9,6	-
7	14/12/2010/	-	-	84	186,6	22,2	-
8	19/02/2011/ 9:05	19/02/2011 19:34	10,5	151	281,4	7,2	4,1
9	18/10/2011 13:56	19/10/2011 3:59	14	390	640,8	8	3,5

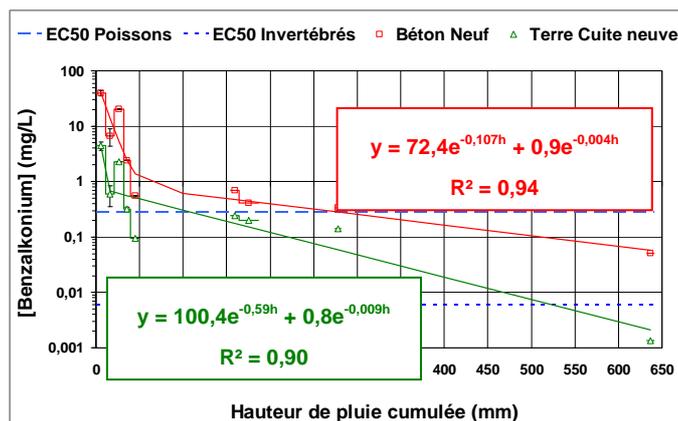
#### Niveau de concentration en benzalkonium dans le ruissellement

Sur les matériaux anciens (Figure 6 (a)), les résultats de concentration ont montré une contamination très forte dans les premiers 30 millimètres de pluie, comprise entre 5 mg/L (pour les tuiles terre cuite) et 27 mg/L (pour les tuiles béton), très largement supérieure à l'EC50 des invertébrés (5,9 µg/L). Par la suite, la concentration diminue rapidement, suivant une loi exponentielle. Il faut attendre de 5 à 7 mois (175 à 375 mm de pluie) pour que la concentration en benzalkonium passe en deça de l'EC50 des poissons (280 µg/l). Après 13 mois d'exposition, la concentration n'est plus que de 4 µg/L pour les tuiles terre cuite, et 11 µg/L pour les tuiles béton. Ces concentrations restent proches voir supérieures à l'EC50 des invertébrés, ce qui permet d'envisager des effets toxiques à long terme. Il est intéressant de noter que les tuiles béton ont émis systématiquement plus de benzalkonium que les tuiles terre cuite. Ceci pourrait s'expliquer par la colonisation des tuiles terre cuite beaucoup plus prononcée que pour le béton, une partie du benzalkonium ayant pu être dégradée. Cette dégradation explique l'évolution de la concentration identique entre les matériaux (même mécanisme d'émission), mais avec une concentration initiale plus faible pour la terre cuite. Ce phénomène pourrait également avoir pour cause une affinité plus ou moins prononcée du benzalkonium pour le matériau de toiture ou encore une pénétration du produit plus ou moins profonde dans le matériau, pouvant le rendre indisponible au lessivage.

Pour les matériaux neufs (Figure 6 (b)), les concentrations initiales se sont révélées dans un ordre de grandeur tout à fait similaire aux matériaux anciens (4 à 40 mg/L). Cependant, l'évolution de la concentration est très différente. Nous constatons que celle-ci suit une loi en double exponentielle, avec un abattement très rapide dans les 30 à 50 premiers millimètres, suivi par une évolution plus lente. Ceci s'explique par la nature des stocks formés lors de l'épandage. Pour les tuiles anciennes, et donc légèrement poreuses en surface, une partie du stock a pu migrer en profondeur, ce qui se traduit par une évolution en simple exponentielle. Pour les matériaux neufs, le produit n'a pas pu pénétrer dans le support du fait de son état de surface très peu poreux. Aussi, le benzalkonium a pu rester en surface, très facilement mobilisable, ce qui explique la dynamique rapide dans les premiers millimètres. Par la suite, l'émission est due à un stock lié au matériau, et qui est donc émis plus lentement.



(a) Bancs anciens



(b) Bancs neufs

Figure 6. Evolution de la concentration en benzalkonium à l'aval des bancs d'essais (moyenne des quatre orientations)

Par la suite, nous avons effectué un bilan de masse sur les bancs d'essais anciens, visant à mesurer le taux de récupération du benzalkonium dans le ruissellement et la masse de biocide encore présente dans le matériau. Nous avons donc évalué la masse de benzalkonium épandue sur les bancs d'essais, la masse totale ruisselée (via une intégration sur la hauteur d'eau de la loi d'abattement de la concentration) et enfin la masse incluse dans le matériau (via l'extraction de broyats de tuiles collectées sur les bancs d'essais après la dernière pluie échantillonnée). Les résultats de ce bilan sont rapportés dans le Tableau 3. Comme nous pouvons le voir, la récupération totale du benzalkonium est faible, inférieure à 40% au maximum pour le béton, et moins de 6% pour la terre cuite. Cette perte de la molécule semble s'expliquer par un phénomène de biodégradation, ce qui va dans le sens d'une plus faible récupération pour les tuiles terre cuite, beaucoup plus colonisées avant le traitement.

Tableau 3. Résultats du bilan de masse du benzalkonium épandu sur les bancs d'essais anciens

	Béton	Terre Cuite
<b>Masse épandue (mg/m<sup>2</sup>)</b>	5900 ± 300	
<b>Masse lessivée par la pluie</b>		
<b>Min. - Moy. - Max.</b>	980 - 1690 - 2540	65 - 150 - 300
<b>(mg/m<sup>2</sup>)</b>		
<b>Masse résiduelle (mg/m<sup>2</sup>)</b>	130 ± 17	30 ± 16
<b>Récupération totale</b>	18% < P < 48%	1% < P < 6%

- *Analyses en conditions contrôlées*

Au laboratoire, nous avons cherché à évaluer l'incidence du matériau, de l'intensité de la pluie, de la concentration et de la masse de produit épandu sur la dynamique de lessivage. Les essais ont été effectués à l'échelle de la tuile, sous condition de pluie simulée (pluie continue d'intensité fixe de l'ordre de 5 mm/h ou de 20 mm/h et de hauteur totale 40 mm) (Tableau 4).

Tableau 4 : Plan d'expérience optimisé pour les tests au laboratoire

Intensité Produit	5 mm/h				20 mm/h Algimouss ALN20
	Algimouss ALX3	Casto' CAConc	Casto' CADil	Algimouss ALN	
Référence du test					
Masse épandue (g/m <sup>2</sup> )	21,7	4,3	3,1	7,2	7,2
Concentration de produit (g/L)	29,5	60,8	10,4	29,5	29,5
Volume épandu (mL/m <sup>2</sup> )	735	71	295	245	245
Béton Neuf	X	X	X	X	
Terre cuite naturelle	X	X	X	X	
Terre cuite siliconée	X	X	X	X	
Béton ancien				X	X
Terre cuite ancienne				X	X

Légende :

Etude matériau

Etude dosage

Etude intensité de pluie

#### Impact du matériau

Les résultats obtenus ont montré que les tuiles bétons peintes retiennent très peu le benzalkonium, qui est émis rapidement, dès les premiers millimètres de pluie. Par la suite, l'émission est beaucoup plus faible. Pour les terre cuite, il semble qu'un mécanisme de fixation du benzalkonium à la surface du matériau existe, du fait que l'émission a été faible et très semblable, que se soit pour des matériaux terre cuite poreux ou non.

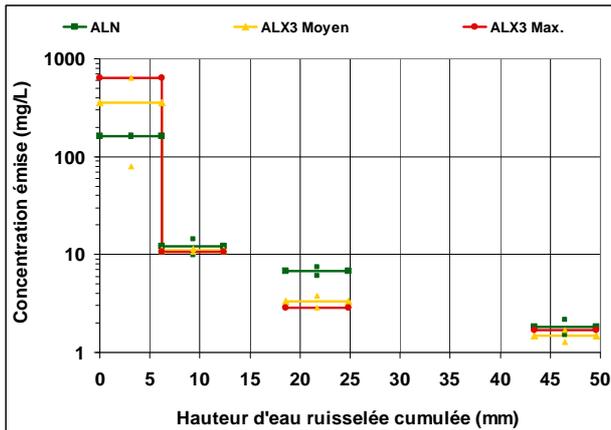
#### Impact de la masse épandue

Les résultats de ce test ont montré que les matériaux avec un revêtement de surface imperméable (béton neuf, terre cuite siliconnée) émettent une masse de benzalkonium quasi proportionnelle à ce qui a été épandu (Figure 7 (a)). Ceci pourrait s'expliquer par la localisation du stock qui, restant en surface, crée une masse importante de benzalkonium non liée au matériau et donc très mobilisable. Aussi, l'émission est augmentée lorsque la masse épandue augmente. Pour les matériaux poreux, la pénétration du produit engendre une concentration en benzalkonium constante à la surface du matériau, mais sur une épaisseur plus profonde. Aussi, l'émission est identique dans les premiers millimètres (Figure 7 (b)).

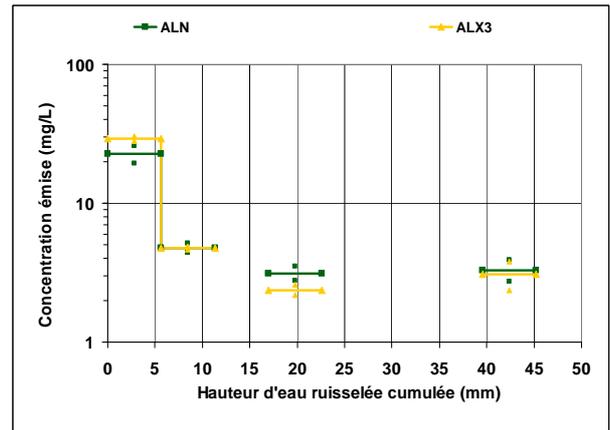
Ces résultats ont été identiques lors des tests portant sur la concentration du produit utilisé.

#### Impact de l'intensité de la pluie

Ce paramètre ne s'est pas révélé déterminant dans le lessivage du benzalkonium.



(a) Béton



(b) Terre cuite poreuse

Figure 7. Impact de la masse de produit appliquée (ALN : masse normale / ALX3 : masse triplée)

### 3. Evaluation des effets de la contamination en benzalkonium

- *Echelle locale*

Les tests sur végétaux ont montré que la contamination en benzalkonium ne gêne pas la germination des graines. En effet, celles-ci possèdent déjà les composés nutritifs nécessaires à leur développement. Cependant, les plants ayant été arrosés à l'aide d'eau fortement contaminée (> 10 mg/L) se sont révélés significativement plus petits que des plants arrosés avec de l'eau faiblement contaminée (< 1 mg/L). Par ailleurs, des tests d'aspersion ont montré qu'une eau contaminée en benzalkonium engendre un phénomène de corrosion des feuilles.

- *Echelle bassin versant*

Un modèle a été construit dans le but d'évaluer la masse et la concentration mensuelle observable dans les eaux pluviales d'un bassin versant équipé d'un réseau pluvial, et ce sur une durée de 5 ans (durée d'efficacité d'un traitement biocide). Afin de tenir compte de l'incertitude qui existe sur la pratique de traitement de toiture (mois, dosage du produit) ainsi que sur la pluviométrie, nous avons utilisé une approche stochastique s'appuyant sur les résultats des enquêtes, ainsi que sur une base de données de pluviométrie. Concernant les lois d'émission du benzalkonium, nous avons utilisé les résultats des bancs d'essais anciens (lois en simple exponentielle). Le modèle a été appliqué à un quartier de la ville de Sucy en Brie (Val de Marne) de 210 ha.

Les résultats obtenus en termes de concentration sont rapportés dans la Figure 8. Les résultats montrent que l'évolution annuelle de la concentration est répétable d'une année sur l'autre. Celle-ci décroît rapidement en l'absence de traitement (durant l'hiver et les mois de juillet et août). La concentration minimale est observée en hiver (~0,004 mg/L en moyenne). Cette dernière n'augmente pas d'une année sur l'autre, indiquant que les émissions s'estompent très rapidement après un traitement. Aussi, à l'arrêt de la période de traitement, au mois de Novembre, la concentration moyenne passe de 0,03 mg/L à 0,004 mg/L pour le mois de Février suivant, soit en 3 mois seulement.

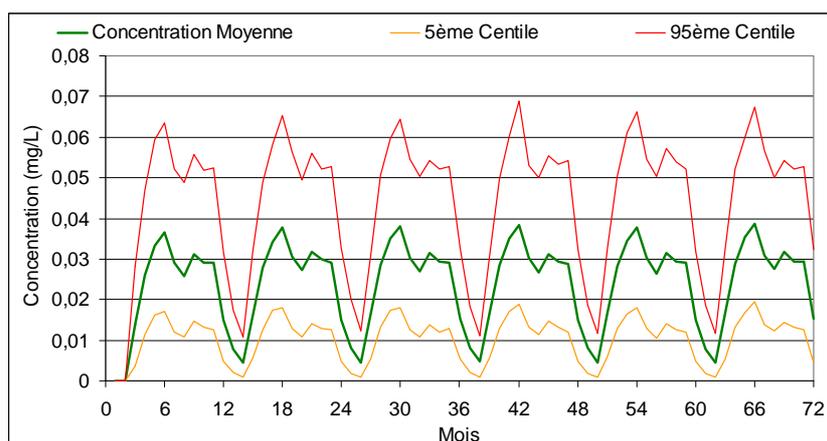


Figure 8. Evolution de la concentration mensuelle à l'aval du bassin versant de Sucy en Brie

Par ailleurs, les résultats obtenus via le modèle ont été comparé avec des mesures réelles effectuées à l'exutoire du bassin versant modélisé. Afin de pouvoir comparer les résultats, nous avons implémenté dans le modèle une chronique de pluie fixe, correspondant à la période 2006 – 2011. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5. Nous pouvons voir que la concentration totale que nous avons mesurée pour chaque échantillon est comprise dans l'intervalle des valeurs obtenues dans le modèle, aux même mois (67 pour Juillet et 70 pour Octobre 2011). L'intervalle des valeurs de Juillet s'étale ainsi entre 0,013 mg/L et 0,035 mg/L (pour 0,028 mg/L et 0,007 mg/L mesuré). La deuxième pluie de Juillet est légèrement plus faible (0,007 mg/L), se qui s'explique par la hauteur de pluie très importante pour cet évènement qui a engendré un facteur de dilution fort. Pour Octobre, les concentrations simulées sont comprises entre 0,014 mg/L et 0,041 mg/L (pour 0,028 mg/L mesuré). Au final, le modèle montre une bonne adéquation des résultats avec des données réelles.

Tableau 5. Pluies échantillonnées et résultats de concentration en benzalkonium à l'exutoire du réseau pluviale de Sucy en Brie

Evènement	Concentrations mesurées					Log Kd
	Concentration dissoute (mg/L)	Concentration particulaire (mg/kg)	MES (mg/L)	Concentration particulaire (mg/L)	Concentration totale (mg/L)	
16/07/2011	0,00013	50	105	0,028	0,028	2,7
19/07/2011	0,00029	73	34	0,007	0,007	2,4
18/10/2011	0,00028	84	83	0,028	0,028	2,4

Une analyse de la sensibilité du modèle a également été effectuée, dans le but de tester l'impact des différentes données d'entrée sur le résultat final. Ce travail a montré que les lois de lessivage, mais aussi les informations du bassin versant (occupation du sol, répartition des matériaux, coefficients de ruissellement) peuvent influencer grandement le calcul de la concentration et du volume.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis d'atteindre les trois objectifs suivants :

- ✓ L'identification et la hiérarchisation des pratiques d'entretien de toiture mises en œuvre et des molécules présentes dans la formulation des produits utilisés – ce qui a permis de mettre en évidence la prédominance du traitement biocide démoussant, utilisant comme principe actif le chlorure de benzalkonium, une molécule très dangereuse pour l'environnement aquatique.
- ✓ L'évaluation du niveau de contamination des eaux de ruissellement après un traitement de toiture et l'identification des principaux facteurs influençant l'émission des composés – après avoir mis au point la technique d'analyse du benzalkonium au laboratoire, les résultats obtenus

sur bancs d'essais ont montré que le niveau de contamination dans les premiers millimètres est très important (à plusieurs mg/L). Par ailleurs, l'évolution de la concentration est exponentielle, mais la contamination reste significative même après 13 mois d'exposition. Enfin, les résultats au laboratoire ont montré la forte influence de l'état et de la nature de la surface des tuiles quant au lessivage.

- ✓ La discussion de l'incidence de la contamination des eaux de ruissellement induite par les pratiques de traitement des toitures à l'échelle locale ainsi qu'à l'échelle du bassin versant.– A l'échelle locale, les résultats des tests biologiques ont montré un effet sur les végétaux. Au niveau d'un bassin versant, les résultats de la modélisation ont permis de voir qu'il est nécessaire de diluer suffisamment le rejet afin d'éviter des effets toxiques à court terme.

Pour aller plus loin dans l'étude, il serait intéressant d'enrichir la compréhension des processus d'émission, par des tests au laboratoire et une mise en équation des phénomènes observés. Le modèle d'émission pourrait être amélioré, en affinant les données d'entrée, notamment la répartition des matériaux de toiture, en augmentant les connaissances quant à la diffusion de ces pratiques de traitement, ou encore en passant à une échelle événementielle en plus de l'échelle mensuelle.

Par ailleurs, un état des lieux complet de la contamination en benzalkonium dans les eaux urbaines et de surfaces en France serait intéressant, du fait de son important usage dans différents secteurs d'activité (hôpitaux, industries agroalimentaires, etc). Enfin, d'autres composés inclus dans les matériaux urbains pourraient être suivis, via une méthode de screening, ou une analyse ciblée.

### **Partie 3 – Evaluation de la qualité microbiologique des eaux après collecte et stockage (EPR)**

#### **WP4 - Qualité microbiologique de l'eau collectée**

##### Choix des sites et méthodologie d'échantillonnage

Après une étude de terrain et des visites de sites, nous avons sélectionné dix maisons individuelles pour l'échantillonnage. Cinq maisons à Champigny-sur-Marne (Val-de-Marne/94) ont été choisies pour effectuer les prélèvements de l'eau de pluie issue de cuves extérieures et cinq maisons à Chaumontel (Val d'Oise/95) pour des cuves enterrées (Figure 9). Ces sites représentent des situations intéressantes pour évaluer la qualité de l'eau de pluie de ruissellement de toiture (EPR). Les deux types de système de récupération de l'EPR diffèrent en fonction des moyens d'installation, mais aussi des caractéristiques de la surface de collecte: en tuiles de terre cuite anciennes et sales pour les cuves extérieures, en tuiles de terre cuite neuves et propres pour les cuves enterrées (Tableau 6).

Tableau 6: Caractéristiques des systèmes de récupération de l'EPR de toiture avec cuve extérieure ou cuve enterrée et usage de cette eau. (PEHD : polyéthylène haute densité)

	Système de récupération de l'EPR de toiture avec cuve extérieure (n=5)	Système de récupération de l'EPR de toiture avec cuve enterrée (n=5)
Caractéristiques de toiture	Tuiles anciennes (4), zinc (1), sales (5) et mousse (2)	Tuiles neuves (5)
Environnement et végétation	Herbacée (3), arborée (3) et arbustive (3)	Arbustive (3/5)
Filtration	Crapaudine (2), grille de gouttière (1)	Boîte de filtration grossière (1 mm) et filtration à 25µm avant utilisation (5)
Caractéristiques des cuves	Age (2005-2008), PEHD, 800L, couleur claire, ouverture petite, 2 sorties en bas	Age (2007-2010), PEHD, 3000L (3) et 4000L (2), ouverture large, entrée d'eau calme, sous tirage flottant
Position des cuves	Exposée au soleil (4) et à l'abri (1)	Enterrée en dehors de la maison
Entretien des cuves	Vidage et dis-connexion pendant l'hiver (2/5)	Vidage et nettoyage tous les ans (2/5)
Usage de l'EPR	Usage extérieur: arrosage du jardin (5), nettoyage de terrasse ou véhicule (5)	Usage extérieur + chasse d'eau + lave-linge (5), remplissage de piscine (1), douche (1)

+ A Champigny-sur-Marne, le conseil général a installé un modèle unique de cuves extérieures (800 L) pour la récupération de l'EPR issue de ruissellement de toiture. Cette eau est utilisée pour l'arrosage du jardin et le nettoyage de terrasse (Figure 10A).

+ A Chaumontel, les cinq maisons choisies sont situées dans un nouveau lotissement et sont équipées d'une cuve enterrée (3m<sup>3</sup>-4m<sup>3</sup>). L'EPR récupérée est utilisée à la fois pour l'arrosage du jardin, le nettoyage de terrasse, la chasse d'eau et le lave-linge (Figure 10B). Parmi ces cinq maisons, un des propriétaires utilise l'EPR récupérée pour remplir une piscine et un autre l'utilise pour la douche.

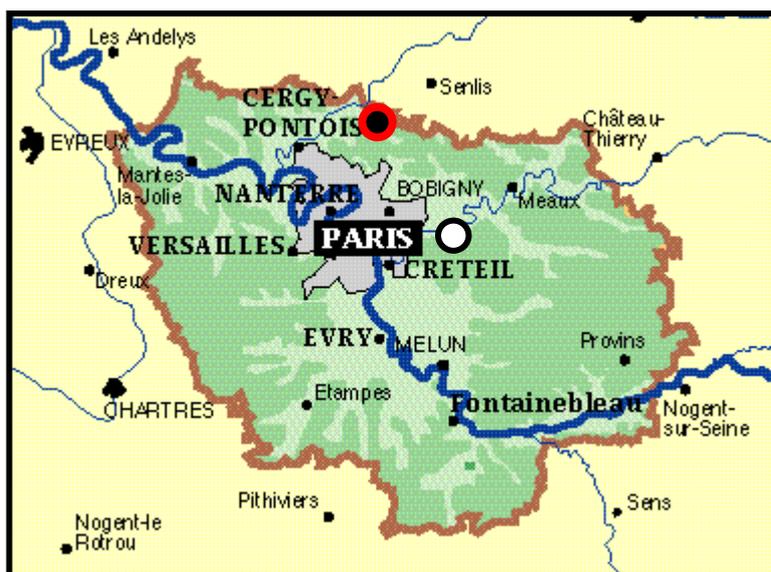


Figure 9 : Localisation des sites d'études (Le point noir entouré de rouge représente la commune Chaumontel/Val d'Oise et le point blanc entouré de noir la commune Champigny-sur-Marne/Val-de-Marne).

Du point de vue technique, les installations étudiées sont globalement conformes aux normes réglementaires de l'arrêté du 28 août 2008. Toutefois l'ouverture des cuves extérieures est trop petite pour facilement nettoyer les cuves et ces cuves n'ont pas de filtre à 1mm (anti-moustique) à l'entrée. Il n'y a pas de plaque de signalisation comportant la mention « eau non potable » ou de pictogramme pour le robinet connecté à la cuve d'EPR, bien que ceci soit fortement recommandé par les textes réglementaires. Le non respect de la réglementation est principalement lié aux pratiques d'entretien: la plupart des propriétaires ne vident et ne nettoient pas leur cuve une fois par an. Ce non respect est aussi lié aux types d'usages de l'eau: remplissage de piscine et douche. Ces deux usages ne sont pas autorisés par l'arrêté ministériel de 2008 concernant l'usage de l'EPR issue de ruissellement de toiture. Cela montre que ces pratiques ne respectent pas la législation nationale, bien qu'il existe des directives techniques pour l'installation du système de captage et pour limiter certains usages afin d'éviter les risques sanitaires.

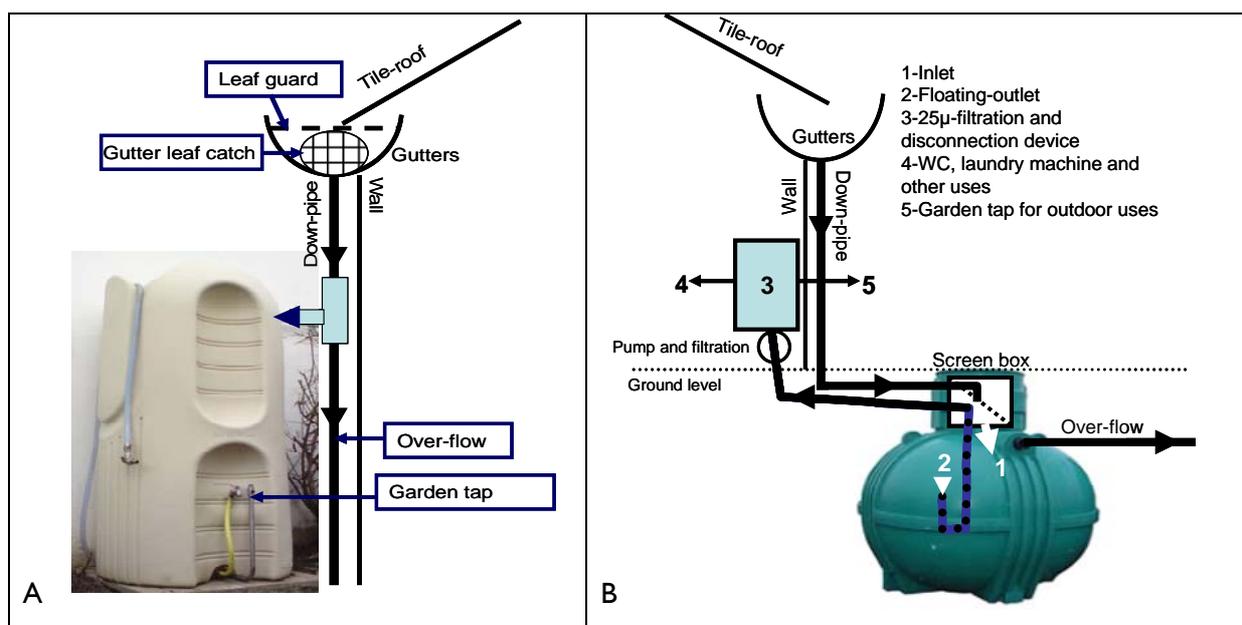


Figure 10: Schémas des installations de systèmes de récupération de l'EPR de toiture avec cuve extérieure (A) ou cuve enterrée (B).

\* Echantillonnage :

Pour la catégorie des cuves extérieures, l'échantillonnage est effectué sur l'année 2011 pendant la période de mars à octobre où l'EPR collectée est utilisée de façon intensive selon une enquête précédente réalisée sur le site (Petrucci *et al.*, 2010). Pour la catégorie des cuves enterrées, l'échantillonnage est effectué pendant les quatre saisons car l'usage de cette eau est réparti sur toute l'année. Ces prélèvements ont été réalisés en fonction de la saison et les échantillons des saisons (printemps, été et automne) ont été pris dans les périodes pour permettre la comparaison de deux types d'installation.

Tableau 7 : Liste des paramètres physico-chimiques et microbiologiques et les méthodes utilisées

Paramètres	Unité	Méthodes utilisées	Remarques
Température	°C	sonde Multi 340i/SET (WTW GmbH)	Mesure <i>in situ</i>
pH		sonde Multi 340i/SET (WTW GmbH)	Mesure <i>in situ</i>
Conductivité	µS/cm	sonde Multi 340i/SET (WTW GmbH)	Mesure <i>in situ</i>
Turbidité	NTU	turbidimètre 2100p (HACH LANGE)	
COD	mg/L	Analyseur de Carbone Organique Total A1010 (O.I. Analytical)	Combustion thermique à 720°C après filtration GF/F (0.7µm)
MES	mg/L	pesée	Filtration sur Membrane GF/F
NO <sub>3</sub>	mg/L	Kit et Photomètre 7000se, (Palintest)	
PO <sub>4</sub>	mg/L	Kit et Photomètre 7000se, (Palintest)	
Chlorophylle	µg/L	Extraction à acétone Photomètre UV/VIS lambda 11 (Perkin ELMER)	Filtration GF/F
Coliformes	UFC/100mL ou gr	ISO 9308-1	Filtration (0.45µm)
Coliformes thermotolérants	UFC/100mL ou gr	ISO 9308-1	Filtration (0.45µm)
Entérocoques	UFC/100mL ou gr	ISO 7899-2	Filtration (0.45µm)
Flore totale 22°C	UFC/1mL ou gr	ISO 6222	Série de dilution
Flore totale 36°C	UFC/1mL ou gr	ISO 6222	Série de dilution
<i>Pseudomonas</i>	UFC/100mL ou gr	ISO 16266	Filtration (0.45µm)
Cellules totales	cellules/mL ou gr	Coloration au DAPI ((Porter et Feig, 1980)	Filtration (0.22µm)
Mycobactéries tuberculeuses non	Présence/absence	PCR en temps réel (Radomski <i>et al.</i> , 2010)	ABI-7500 (sonde TaqMan)
<i>Escherichia coli</i> <i>Campylobacter jejunii</i> , <i>C. coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Salmonella enterica</i>	Présence/absence	PCR en temps réel (Ahmed <i>et al.</i> , 2008)	Rotor-Gene 6000 (analyse de fusion haute résolution-HRM)

Pour les cuves extérieures, l'EPR a été prélevée au robinet du jardin nettoyé 3 fois à l'éthanol 70° et rincé 3 fois à l'eau distillée stérile. Pour les cuves enterrées, l'EPR a été échantillonnée en utilisant le préleveur Sigma SD900 Sampler à l'aide d'un tuyau en plastique stérilisé inséré dans les cuves. Les échantillons d'eau ont été pris dans les bouteilles en verre stériles. Les sédiments ont été aussi

aspirés par le préleveur et recueillis dans des tubes en plastique stériles. Les échantillons ont été conservés et transportés à 4°C dans des glacières iso-thermiques et traités dans les 24h.

\* Méthodes de mesure : Plusieurs paramètres ont été sélectionnés selon leur pertinence rapportée par les études internationales. Divers paramètres physico-chimiques et microbiologiques de l'EPR collectée ont été mesurés (Tableau 2)

\* Traitement des données : Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes, médianes, minimales et maximales de pour chaque par saison par type de cuve. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard de la moyenne qui se calcule en divisant l'écart-type de l'échantillon par la racine carrée de la taille de l'échantillon. Pour la corrélation entre les paramètres, les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel PAST 1.96 (Hammer *et al.* 2001). Pour la corrélation entre la présence/absence de pathogènes étudiés et les indicateurs fécaux, la régression logistique a été utilisée pour les échantillons de l'EPR en utilisant le logiciel JMP 7 (SAS).

### Résultats du screening microbiologique des eaux collectées.

Il n'existe pas de normes pour les paramètres microbiologiques et physico-chimiques pour l'EPR collectée et stockée chez les particuliers. Les paramètres fréquemment utilisés par les études précédentes ont été sélectionnés. Pour certains paramètres physico-chimiques, nous nous basons également sur les recommandations de l'OMS pour les eaux destinées à la consommation humaine afin d'avoir des valeurs de comparaison. Nous avons aussi confronté les résultats obtenus avec les valeurs seuils pour les eaux de différents usages (selon les arrêtés ministériels, directive ou guide de l'EPR).

Les résultats présentés concernent au total 32 échantillons d'eau et 23 échantillons de sédiment (18 échantillons d'EPR et 14 échantillons de sédiment issus de cuves enterrées et 14 échantillons d'EPR et 9 échantillons de sédiments issus de cuves extérieures) prélevés pendant quatre saisons en 2011 (tableau 3).

Tableau 8 : nombre d'échantillons en fonction de types de cuves et de saisons.

Type	Saisons	Hiver	Printemps	Eté	Automne
Cuves enterrées	Eau	5	5	4	4
	Sédiment	5	5	0	4
Cuves extérieures	Eau		5	5	4
	Sédiment		5	0	4

#### I. Paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques de l'EPR issue des cuves enterrées et extérieures sont présentés dans le Tableau 9. Les variations saisonnières et la différence entre les deux types de cuve sont importantes. Il est remarqué que l'exposition au soleil des cuves extérieures joue énormément sur la température de l'eau. Le pH est globalement basique pour les cuves extérieures et plus élevé que celui de cuves enterrées. L'EPR dans deux types de cuves pourrait être classée très douce (<140µS/cm, Hanna instruments), faible dureté favorable à des usages tels que le lavage du linge. Parmi les dix installations étudiées, nous avons observé que la turbidité de l'EPR est faible dans les deux types de cuves et que celle des cuves extérieures est due principalement à la dégradation végétale, à la croissance de micro-organismes (lors des efflorescences algales), à la remise en suspension de sédiment et du biofilm, alors que celle des cuves enterrées est due principalement à la remise en suspension de sédiment (lors de l'entrée de l'EP dans les cuves). Les autres paramètres restent faibles. Les teneurs en nitrates et phosphates pourront supporter la croissance des microorganismes dans l'EPR des cuves.

Tableau 9 : Paramètres physico-chimiques de l'EPR issue des cuves enterrées et extérieures. Les valeurs sont exprimées en moyenne, médiane, minimale et maximale.

Paramètres physico-chimiques	Cuves enterrées			Cuves extérieures		
	Moyenne n=18	Médiane	Min-Max	Moyenne n=14	Médiane	Min-Max
Température (°C)	12,36	12,35	6,60-17,20	18,05	18,55	14,2-21,70
pH	6,37	6,41	5,00-7,48	7,37	7,39	5,86-9,42
Conductivité (µS/cm)	50,78	37,00	20-156	30,57	26,00	17-55
Turbidité (NTU)	1,74	1,62	0,69-3,41	2,99	2,19	0,76-9,97
COD (mg/L)	1,35	1,16	0,52-3,90	2,33	2,48	0,79-4,21
MES (mg/L)	1,82	1,42	0,50-4,90	5,77	3,44	0,93-20,85
NO <sub>3</sub> (mg/L)	3,02	1,70	1,18-11,60	2,87	1,92	0,10-10,80
PO <sub>4</sub> (mg/L)	0,13	0,11	0,03-0,36	0,09	0,07	0,02-0,26

## 2. Paramètres microbiologiques

\* Paramètres microbiens environnementaux et indicateurs de contamination fécale

Le Tableau 10 montre les valeurs moyennes et médianes de chaque indicateur de contamination fécale (coliformes, coliformes thermotolérants et entérocoques intestinaux) et de chlorophylle *a* mesurées dans les deux types de cuve. Ces valeurs des indicateurs fécaux sont comparables avec les valeurs rapportées par les études précédentes (Simmons *et al.*, 2001; Rosillon *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2008; Mendez *et al.*, 2011). Pour la première fois, la qualité microbiologique est étudiée sur le compartiment sédiment. Le niveau élevé de tous ces paramètres dans le sédiment confirme que ce compartiment pourrait être une source de re-contamination de l'EPR. A noter que l'analyse des sédiments a été réalisée dans seulement trois campagnes pour les cuves enterrées et deux campagnes pour les cuves extérieures.

Tableau 10 : Paramètres microbiologiques de l'EPR et de sédiment dans les cuves enterrées et extérieures. Les valeurs sont exprimées en moyenne, médiane, minimale et maximale.

Paramètres microbiologiques	Cuves enterrées			Cuves extérieures		
	Moyenne	Médiane	Min-Max	Moyenne	Médiane	Min-Max
<b>Eau</b>	n=18			n=14		
Cellules totales (cellules/mL)*10 <sup>6</sup>	1,7	1,5	0,5-3,5	1,4	1,4	0,9-2,0
Coliformes (UFC/100mL)	364	211	0-1533	676	275	0-3000
Coliformes thermotolérants (UFC/100mL)	140	6	0-1782	284	12	0-1420
Enterocoques (UFC/100mL)	96	43	0-355	242	8	0-2760
Bactéries hétérotrophes 22°C (UFC/1mL)	3807	281	21-40300	379333	1293	31-3740000
Bactéries hétérotrophes 36°C (UFC/1mL)	4502	620	41-34900	571431	3674	300-5660000
<i>Pseudomonas</i> (UFC/100mL)	6627	1834	11-54000	2087	253	0-10468
Chlorophylle <i>a</i> (µg/L)				46,1	5,2	0,1-268,2
<b>Sédiment</b>	n=14			n=9		
Cellules totales (cellules/g)*10 <sup>9</sup>	45,0	9,5	0,4-186	39,0	4,0	2,3-82,2
Coliformes (UFC/g)	327075	9651	180-4390244	110313	16278	0-803571
Coliformes thermotolérants (UFC/100mL)	13775	1039	0-177526	1160	477	0-6984
Enterocoques (UFC/g)	189	14	0-846	101	2	0-760
Bactéries hétérotrophes 22°C (UFC/g)*10 <sup>3</sup>	12767	5648	4-72897	63971	5682	18-446341
Bactéries hétérotrophes 36°C (UFC/g)*10 <sup>3</sup>	16538	4922	4-98802	45324	8800	25-278049
<i>Pseudomonas</i> (UFC/100mL)*10 <sup>3</sup>	261	58	1,7-2698	756	29	0-4634

A part ces paramètres, nous avons essayé de vérifier la présence d'archées, en se focalisant dans un premier temps sur un nombre restreint d'échantillons. Il s'agit 11 échantillons issus de 5 cuves enterrées et prélevés pendant l'hiver (5 échantillons d'EPR, 1 biofilm et 5 sédiments). La méthode PCR spécifique aux archées mise au point au laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement-INRA

Narbonne permet de quantifier la présence des archées dans deux échantillons de sédiments ( $3,8.10^6$  à  $1,8.10^7$  nombre de copies de génome/gr de sédiment sec). Aucune présence d'archées n'a été trouvée dans les 5 échantillons d'eau. Ces faibles concentrations laissent penser que les comptages directs de cellules totales par microscopie fluorescente correspondent essentiellement à des bactéries, les archées contribuant probablement faiblement aux cellules comptées (tab. 5). La présence d'*E. coli*, détectée par la méthode PCR en temps réel, est positive dans 62% sur 26 échantillons d'EPR et 44% sur 16 échantillons de sédiment. Sa présence est différente entre les saisons ( $p=0,01$ ). Par contre, il n'y a pas de différence de sa présence en fonction de type de cuve. Les tests statistiques n'ont pas montré la corrélation entre la présence d'*E. coli* (détectée par PCR) et les indicateurs bactériens de contamination fécale (par méthode de filtration) dans l'EPR.

\* Présence de phytoplancton dans l'EPR issue de cuves extérieures :

Grâce aux propriétés d'autofluorescence des cellules algales, la sonde immergeable spectrofluorimétrique BBE Fluoroprobe™ fournit des profils de différents groupes d'algues et la concentration de la chlorophylle *a*. De ce fait, cette sonde est un outil parfaitement adapté au monitoring du phytoplancton des eaux douces (Rolland *et al.*, 2010). En fonction des différences de longueurs d'onde des pigments secondaires présents chez les différentes classes algales, la sonde BBE permet de différencier plusieurs grands groupes d'algues et de cyanobactéries avec différentes longueurs d'ondes d'excitation : le groupe des algues vertes (chlorophycées et euglénophycées, à 450 nm), le groupe des algues brunes (diatomées, les chrysophycées et les dinoflagellés à 525 nm), le groupe des cyanobactéries rouges et des cryptophytes (à 570 nm), et le groupe des cyanobactéries bleu-vert (à 590 et 610 nm). Avec cette sonde, nous avons évalué les groupes algaux majeurs présents dans le phytoplancton des cuves extérieures afin d'évaluer si les cyanobactéries sont significativement présentes et si la présence de cyanotoxine doit être recherchée. Le group des algues vertes est dominant dans 4 des cuves extérieures étudiées pendant les trois saisons (fig. 3). Les cyanobactéries et les cryptophytes ne sont présentes que dans deux cuves (1 et 4) qui présentent des concentrations faibles en Chl *a* (0-0,14 µg/L) et (0-0,62 µg/L). Nous n'avons pas observé une corrélation entre la présence de cyanobactéries et la concentration en azote dans ces cuves alors que certaines cyanobactéries peuvent se développer dans les milieux très pauvres en azote car elles sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Les diatomées sont présentes dans toutes les cuves avec une concentration en Chl *a* variant de 0 à 1,04 µg/L.

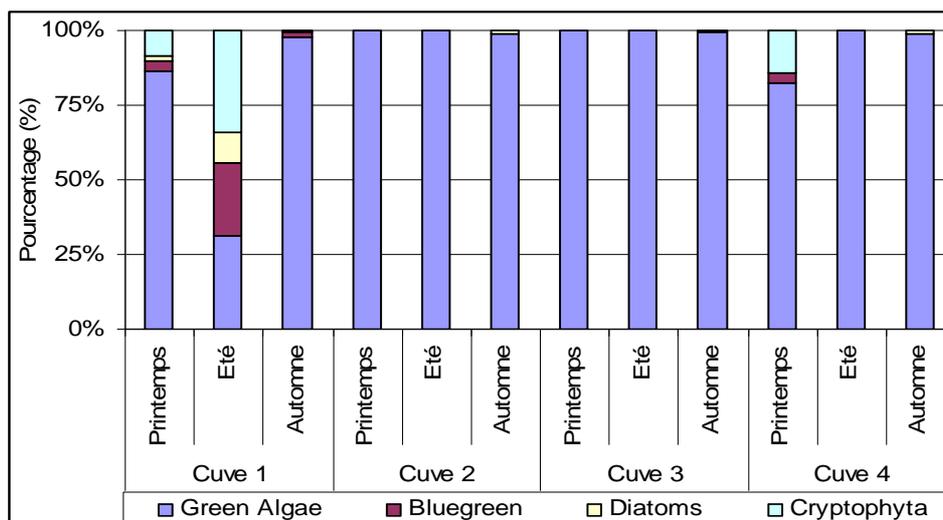


Figure 11 : Variation de concentration en pourcentage de concentration de Chl *a* (µg/L) dans l'EPR issue de cuves extérieures.

Les algues vertes majoritaires observées dans plusieurs échantillons appartiennent aux genres *Monoraphidium* (a) et *Chlorella* (b). Les cyanobactéries observées dans un échantillon appartiennent au genre *Synechococcus* (c) (Figure 12). La présence de ces algues et cyanobactéries dans l'EPR pourrait

être liée à des aérosols déposés par le vent sur le système de récupération de l'EPR et introduits par ruissellement dans les cuves. En effet, (Genitsaris *et al.*, 2011) ont montré que les genres comme *Monoraphidium* spp., *Chlorella* spp. et *Synechococcus* spp. peuvent être trouvés dans les aérosols. La présence de ces microalgues et cyanobactéries pourrait également être liée à des apports par des oiseaux qui se seraient nourris dans les lacs et aurait déposé ces microorganismes sur les toitures mais cela reste à prouver.

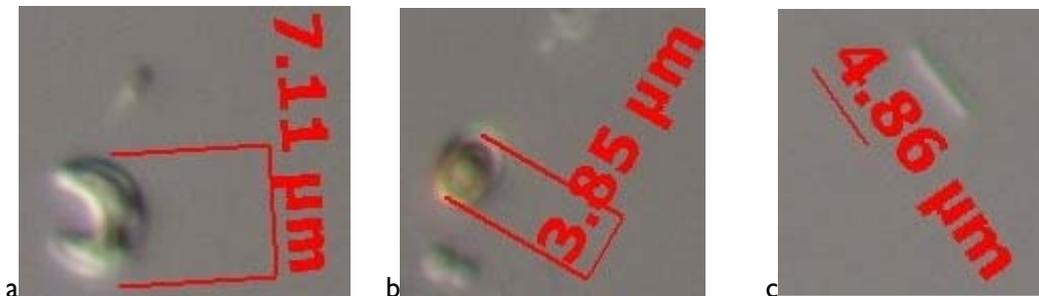


Figure 12 : Principaux genres phytoplanctoniques observées dans les cuves pendant l'automne 2011. a- *Monoraphidium* sp., b-*Chlorella* sp., c- *Synechococcus* sp.

#### \* Présence des pathogènes

La principale limite de l'utilisation des indicateurs de contamination fécale est leur faible corrélation entre leur niveau et la présence de microorganismes pathogènes dans l'EPR (Ahmed *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2008; Mons *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2011). Les récents progrès dans les techniques moléculaires telles que la méthode d'amplification de l'ADN en temps réel (real-time PCR) permettent la détection rapide et sensible des microorganismes pathogènes dans les eaux qui sont difficiles et/ou laborieuses par méthode de culture. La détection PCR en temps réel des agents pathogènes représente quelques avantages. Par exemple, les résultats peuvent être obtenus en moins de 6 h contre quelques jours dans les méthodes conventionnelles (Ahmed *et al.*, 2008). Dans cette étude, nous avons utilisé cette méthode directement sur les extraits d'ADN des échantillons d'EPR et de sédiment provenant de cuves enterrées (hiver, printemps et été) et cuves extérieures (printemps et été). Le tableau 6 montre le pourcentage des échantillons positifs sur un total de 42 échantillons. Malgré les avantages cités ci-dessus, les données obtenues par cette méthode informent simplement sur la présence ou l'absence des pathogènes et ne fournissent aucune information concernant la pathogénicité des pathogènes.

Tableau 11 : La présence des pathogènes dans l'EPR et dans le sédiment de deux types de cuves. Valeurs présentées sont en pourcentage des échantillons positifs.

Pathogènes (n=42)	eau (n=26)	sédiment (n=16)	total (n=42)	Comparaison	
				Espèces id.	Genre
<i>Salmonella enterica</i>	15,38	18,75	17,07		11(27) <sup>a</sup> /0,9(125) <sup>e</sup> /67(6) <sup>f</sup>
<i>Campylobacter jejuni</i>	19,23	6,25	12,74	4(27) <sup>a</sup> /	20(100) <sup>b</sup> /12(17) <sup>c</sup> /
<i>Campylobacter coli</i>	73,08	81,25	77,16	41(27) <sup>a</sup> /	37(24) <sup>d</sup>
<i>Enterococcus faecium</i>	73,08	93,75	83,41		
<i>Enterococcus faecalis</i>	88,46	75,00	81,73		
<i>Legionella pneumophila</i>	65,38	56,25	60,82	26(27) <sup>a</sup> /8(100) <sup>b</sup>	71(7) <sup>c</sup> /80(10) <sup>g</sup>
Mycobactéries non-tuberculeuses*	20,00	20,00	40,00		

<sup>a</sup>(Ahmed *et al.*, 2008)/<sup>b</sup>(Ahmed *et al.*, 2010)/<sup>c</sup>(Albrechtsen, 2002)/<sup>d</sup>(Savill *et al.*, 2001)/<sup>e</sup>(Simmons *et al.*, 2001)/<sup>f</sup>(Uba and Aghogho, 2000)/<sup>g</sup>(Broadhead *et al.*, 1988), \*analyse sur les échantillons du printemps (10 échantillons d'EPR et 10 échantillons de sédiment)

Sur 42 échantillons testés, *E. faecalis* et *E. faecium* sont les plus répandus parmi tous les agents pathogènes potentiels testés dans cette étude avec 34 (80,95%) et 35 (83,33%) échantillons positifs. La prévalence de *Campylobacter coli* est aussi importante avec 32 (76,19%) échantillons positifs tandis que *C. jejuni* présentés 14,29% (6 échantillons positifs). La prévalence des autres bactéries pathogènes est comme suit: 7 échantillons positifs (16,67%) pour *Salmonella enterica* et 26 (61,90%) pour *Legionella pneumophila*. Pour les mycobactéries non-tuberculeuses, seulement les échantillons de la campagne du printemps ont été analysés. La présence de ces mycobactéries non-tuberculeuses est simplement détectée dans les cuves enterrées. Il y a 2 échantillons d'eau positifs sur 10 échantillons d'eau testés. Le même résultat (2 échantillons positifs) est aussi trouvé dans les 10 échantillons de sédiment testés. Dans une cuve, la présence des mycobactéries non-tuberculeuses est détectée à la fois dans l'eau et dans le sédiment.

\* Qualité microbiologique de l'EPR comparée à des normes et valeurs guides existantes

Tableau 12 : Résumé de la qualité microbiologique de l'eau nécessaire pour certains usages

Indicateurs	Eau potable	Eau baignade	Eau usée traitée	Eau de pluie récupérée	Exemple de qualité microbiologique recommandée de l'eau pour la chasse d'eau
	Arrêté ministériel (Jan/11/2007)	Directive européenne (CE/Jul/2006)	Arrêté ministériel (Aug/02/2010)	Guide britannique Code of pratique (BS8515:2009)	
<i>E. coli</i>	0	900*	<250 <sup>d</sup>	1 <sup>e</sup> /250 <sup>f</sup>	O <sup>a*</sup> (US) O <sup>b*</sup> (UK) 10 <sup>b</sup> (Japon) 100 <sup>b</sup> (Allemagne) 200 <sup>c</sup> (Canada)
Entérocoques intestinales	0	330*		1 <sup>e</sup> /100 <sup>f</sup>	
Coliformes totaux	0			10 <sup>e</sup> /1000 <sup>f</sup>	240 <sup>a*</sup> (US) 500 <sup>b</sup> (Allemagne) 10 <sup>b</sup> (Japon)

\* Evaluation à 90e percentile; <sup>a</sup> U-S Environmental Protection Agency, 2004; <sup>b</sup> Birks et al., 2004;

<sup>c</sup> Guide canadienne, 2007; <sup>d</sup> Bonne qualité de l'eau usée traitée pour irrigation

<sup>e</sup> Lavage/arrosage à haute pression; <sup>f</sup> Arrosage de jardin/chasse d'eau

Le Tableau 12 montre quelques réglementations sur la qualité de l'eau en vue de certains usages. Nous avons choisi d'utiliser ces valeurs comme référence pour évaluer la qualité microbiologique des EPR, quand bien même ses réglementations ne sont pas destinées à l'évaluation de l'EPR. Ce choix est motivé par le fait qu'il n'existe quasiment aucune réglementation sur la qualité de l'EPR auxquelles nous pourrions nous référer, par contre ces réglementations que nous avons choisies portent sur des usages communs à ceux de l'EPR. En effet, les guides ou normes concernant l'EPR mettent essentiellement l'accent sur les moyens mis en œuvres (ex. arrêté du 21 août 2008 en France ou normes DIN 2002 en Allemagne). Un seul guide britannique propose un seuil guide de qualité de cette eau pour deux types d'usage : lavage/arrosage à haute pression et arrosage de jardin/chasse d'eau (BS8515:2009). En comparant ces valeurs guides avec nos résultats, nous constatons que les niveaux des indicateurs de la contamination fécale dans les EPR des cuves extérieures et enterrées dépassent les seuils requis pour la qualité de l'eau potable, mais ils sont inférieurs au niveau requis pour la bonne qualité de l'eau usée traitée pour plusieurs types d'irrigation comme cultures maraîchères, arrosage d'espaces verts...(arrêté du 02 août 2010). L'arrêté est assez précis pour le niveau de présence d'*E. coli* mais impose des niveaux d'abattement pour les entérocoques. Autres que ces paramètres, cet arrêté impose aussi des niveaux d'abattement d'autres paramètres comme des phages ARN F-spécifiques et des spores de bactéries anaérobies sulfitoréductrices. Il semble donc difficile de s'y référer pour la qualité de l'EPR. En comparant avec la directive européenne (07/2006), les niveaux de ces indicateurs correspondent au niveau requis pour une qualité suffisante

des eaux de baignade évaluée à 90e percentile. Cependant, le guide britannique (BS8515:2009) est plus strict pour les utilisations de l'EPR avec une machine à haute pression. Cela semble logique puisque l'usage de tel appareil pourrait produire des aérosols de taille très fine qui pourront être inhalés mais ce guide n'a pas expliqué pourquoi et comment ce seuil a été déterminé. En comparaison avec ce guide, la qualité de l'EPR des cuves extérieures et enterrées est le plus souvent adéquate pour l'arrosage du jardin et la chasse d'eau. Toutefois, certains pays sont encore plus exigeants pour la qualité de l'eau de chasse (y compris de l'EPR) (tableau 6) et dans ce cas les EPR mesurées en Ile de France n'aurait pas une qualité suffisante pour être utilisé dans les toilettes si le niveau de contamination est à 0 UFC/100mL pour le paramètre d'*E. coli* et 10 UFC/100mL pour le paramètre coliformes totaux. Le tableau 6 montre que la fourchette de qualité de l'eau peut être très variable en fonction des pays et de son usage. Pour un même usage, différents pays peuvent proposer des seuils différents pour la qualité de l'eau. Ces critères variables rendent difficiles l'évaluation de la qualité de l'EPR. Le manque de clarté sur les critères qui lient le seuil acceptable de la qualité de l'EPR et son usage approprié ne permet pas de qualifier l'EPR échantillonnée à Chaumontel qui est déjà utilisée pour le lave-linge, l'arrosage et la chasse d'eau chez certaines personnes de cette étude. Cela montre une nécessité d'un règlement sur la question de la qualité microbiologique de l'EPR en fonction de son usage.

#### \* Qualité des sédiments collectés

Nous avons également évalué la qualité des sédiments en plus de l'EPR, ce compartiment n'est habituellement jamais pris en compte dans les études sur les cuves de stockage des eaux pluviales qui focalisent sur l'EPR seule. Or il existe des liens évidents entre le sédiment et la colonne d'eau à travers les phénomènes de sédimentation et de remise en suspension qui affectent non seulement les nutriments, les MES mais aussi les microorganismes. Les densités en cellules totales dans le sédiment (par gramme de sédiment sec) varient entre  $4,5 \cdot 10^8$ - $1,9 \cdot 10^{11}$  cellules/gr pour les cuves enterrées et entre  $2 \cdot 10^9$ - $8,2 \cdot 10^{10}$  cellules/gr pour les cuves extérieures. Les valeurs moyennes et médianes sont respectivement de  $4,2 \cdot 10^{10}$  et  $2,7 \cdot 10^{10}$  cellules/gr. Cela montre que le sédiment est aussi chargé en microorganismes que le sol ( $10^6$  à  $10^{10}$  cellules/gr sol sec ; Whitman et al., 1998). Les indicateurs de la contamination fécale sont présents dans le sédiment à des concentrations élevées pour les deux types de cuves (fig. 20). Le ratio de coliformes thermotolérants/entérocoques (73/1) dans les sédiments est beaucoup plus élevé que dans l'EPR (1,5/1). Comme dans la colonne d'eau, le niveau de *Pseudomonas* spp. est très élevé,  $4,7 \cdot 10^5$  UFC/100mL pour la moyenne et  $3,1 \cdot 10^4$  UFC/100mL pour la médiane. En général, les concentrations en microorganismes dans le sédiment sont beaucoup plus élevées que celle de la colonne d'eau. Cela indique que le sédiment pourrait être une source de recolonisation de la colonne d'eau dans les deux types de cuves, et pour les pathogènes un risque de re-contamination de l'eau lors de la remise en suspension des sédiments. En effet, certaines espèces pathogènes d'origine fécale et des pathogènes opportunistes environnementaux tels que certaines espèces de *Pseudomonas* (Burton et al., 1987) peuvent survivre dans les sédiments. Pour certaines mycobactéries non-tuberculeuses, les sédiments constituent également un habitat (Falkinham, 2004).

#### \* Quels sont les paramètres pertinents ?

Dans le cas de l'EPR, un niveau élevé en indicateurs fécaux comme les coliformes thermotolérants et les entérocoques peut laisser supposer une anomalie du système de récupération (trop de contamination provenant de la toiture, du sol pour les cuves enterrées ou une dégradation en cours d'un cadavre d'animal...). De ce fait il est intéressant de suivre certains de ces indicateurs. En général, les corrélations significatives entre les indicateurs de la contamination fécale (coliformes totaux, coliformes thermotolérants et entérocoques) que nous avons observées pour les échantillons d'eau des deux types de cuves, montrent que ces mesures pourraient être redondantes ( $R_s > 0,5$  ;  $p < 0,05$ ). Concernant les coliformes totaux qui comprennent des organismes non pathogènes pouvant croître dans l'eau et présents en l'absence de contamination fécale. Depuis quelques années, les coliformes ne sont plus reconnus comme étant un indicateur approprié de la contamination fécale ou ayant une importance pour la santé. Aujourd'hui, ce paramètre a simplement un intérêt de comparaison avec

les anciennes études où il est toujours présent. Il semble plus approprié d'analyser la présence d'*Escherichia coli* et des entérocoques intestinaux comme c'est actuellement le cas pour la norme d'eau de baignade, même si ces indicateurs sont aussi loin d'être parfaits.

Une corrélation significative peut également être notée entre les densités des *Pseudomonas* spp. et celles des bactéries hétérotrophes ( $R_s > 0,5$  ;  $p < 0,05$ ). L'analyse de *Pseudomonas* spp. semble inutile car ce genre bactérien est ubiquitaire dans l'environnement. Cette mesure ne permet pas de qualifier la qualité sanitaire de l'EPR. Il serait plus intéressant de rechercher certaines espèces appartenant à ce genre qui sont des pathogènes opportunistes, tels que *Pseudomonas aeruginosa* susceptibles d'être présents dans les réservoirs d'EPR. Toutefois *P. aeruginosa* n'est pas considéré comme un pathogène représentant un risque significatif dans les usages normaux de l'eau potable sauf chez les immunodéprimés sévères (OMS 2002). La mesure de bactéries hétérotrophes pourrait être également inutile parce qu'une cuve de stockage de l'EPR étant un écosystème aquatique (Evans et al., 2009; Kim and Han, 2011). De ce fait, un certain niveau de base de bactéries hétérotrophes est dû à un développement normal des germes banaux environnementaux issus de la cuve. La mesure de ces paramètres dans le cas où l'EPR est directement utilisée ne semble pas donc pas pertinente. Par contre cette mesure est utile pour le suivi de qualité d'un système de traitement d'eau pour contrôler l'abattement des microorganismes. Elle serait peut-être intéressante dans le cas où un traitement de l'EPR était appliqué.

Pour les pathogènes, même si la surveillance directe des pathogènes dans l'EPR est une option intéressante car elle fournirait des renseignements précieux au sujet des risques de santé publique, il y a des centaines de différents types d'agents pathogènes (strictes et opportunistes comme des pathogènes environnementaux). Par conséquent, il n'est pas économiquement, technologiquement, et pratiquement possible de contrôler régulièrement la qualité microbiologique de l'eau pour tous les pathogènes. Leur détection dans l'EPR pourrait être nécessaire simplement pour détecter un possible risque lié à une épidémie à un pathogène. La priorité de détection de ces pathogènes dans l'EPR pourrait être liée aux types d'usage. Par exemple, certains pathogènes qui causent des maladies gastro-intestinales (telles que *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Campylobacter* ou *Salmonella*...) pourront être les paramètres intéressants dans le cas où le risque d'ingestion de l'usage de l'EPR est élevé. Pour le risque d'inhalation lié à l'arrosage ou le lavage à haute pression qui peut produire des aérosols de taille très fine et la douche, la recherche des pathogènes causant les maladies pulmonaires, comme les légionelles, les mycobactéries non-tuberculeuses, pourrait être utile. Pour le risque lié au contact avec la peau en utilisant de l'EPR, la détection de certains pathogènes, comme les staphylocoques dorés ou certaines mycobactéries non-tuberculeuses, pourrait être informatif. Cependant, les méthodes de détection de ces pathogènes ne sont pas toujours applicables à l'EPR. Par exemple, la détection des légionelles dans l'EPR par la méthode normée de filtration était impossible du fait du développement très important de flores annexes sur le milieu de culture (et ceci malgré l'étape de décontamination) qui empêchaient la lecture. La technique de détection par PCR en temps réel quand elle présente certains défauts tels que la surestimation des concentrations en légionelles, car cette méthode quantifie à la fois les cellules viables non-cultivables, les cellules mortes et même les ADN libres dans l'eau. Enfin, il n'existe pas de seuil de référence pour ces pathogènes pour les différents types d'usage de l'EPR. Le guide britannique sur l'usage de l'EPR est le seul à proposer un seuil de présence des légionelles de 100 UFC/L dans le cas d'arrosage du jardin avec un équipement à haute pression) mais ce guide n'explique pas sur quels critères ce seuil a été fixé. En France il n'existe pas de valeurs seuils ou guide pour les légionelles dans les EPR. Par contre, pour les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire, l'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles (selon la norme AFNOR NF T90-431 de septembre 2003) fixe un seuil de *Legionella pneumophila* à 1 000 UFC/L au niveau de tous les points d'usage à risque. Cela montre qu'il est nécessaire d'avoir des seuils de référence pour certains pathogènes pour qualifier l'EPR en fonction de son usage.

Pour les paramètres physico-chimiques, le choix de la mesure devrait aussi être basé sur la qualité de l'EPR et son usage principale. Les paramètres comme turbidité, la concentration en MES ou la teneur en chlorophylle pourront permettre de surveiller la qualité esthétique (eau trouble ou verte). Toutefois, la mesure de la chlorophylle ne semble nécessaire que dans les cas où les cuves sont

exposées à une lumière suffisante pour favoriser le développement d'algues, d'autant que les efflorescences algales peuvent provoquer un colmatage des filtres lorsqu'un traitement de filtration est appliqué sur l'EPR. Pour l'EPR utilisée comme l'eau de consommation, les paramètres comme conductivité, pH, les nitrates et les métaux pourront être utiles. La toxicité de l'EPR pourrait être aussi qualifiée par la mesure des cyanotoxines, de certains polluants organiques ou métalliques... Dans notre étude, de façon générale, il n'y a pas de corrélation entre les paramètres physico-chimiques et microbiologiques dans l'eau des deux types de cuves et il n'est donc aucun paramètre physico-chimique pouvant prédire la présence des indicateurs de la contamination fécale ou montrer la liaison entre des conditions physiques ou chimiques dans l'EPR de la cuve et la présence de ces indicateurs. Parmi les paramètres physico-chimiques, la turbidité est positivement corrélée avec la conductivité, la concentration en MES et en COD. Ceci montre que la mesure en parallèle de ces paramètres pourrait être redondante. La mesure de la concentration en MES ou de la turbidité peut être un paramètre important si un traitement UV est appliqué à l'eau, la mesure de la turbidité est importante. En effet, les particules en suspension peuvent agir comme protection pour les virus et les agents pathogènes lors des traitements aux UV. Dans notre étude, les mesures dans L'EPR des deux types de cuve laissent penser que la turbidité pourrait être le paramètre utile car facile à mettre en œuvre. De plus, ce paramètre est systématiquement utilisé dans les études sur la qualité de l'EPR et implicitement recommandé par le guide australien pour le recyclage de l'eau (gestion de risque pour la santé et l'environnement, 2006), d'autant plus que son niveau de référence est bien établi.

Au cours de notre étude, de nombreuses modifications des protocoles standard de mesure des indicateurs microbiologiques pour la qualité de l'eau potable (tels l'effort d'échantillonnage (nombre de cuves, volume d'eau ou de sédiment collecté, volume de l'inoculum ou gamme de dilution) ont été nécessaires pour obtenir des résultats exploitables. A cause de la grande variabilité de la qualité de l'EPR, plusieurs volumes d'échantillons doivent être filtrés pour pouvoir obtenir les résultats lisibles sur milieu de culture. Par exemple, trois volumes de 100, 50 et 10 mL de l'EPR doivent être filtrés pour la détection de coliformes thermotolérants ou 50, 10 et 1 mL pour les coliformes totaux. Pour les bactéries hétérotrophes, un millilitre d'une gamme de dilution allant de  $10^0$  à  $10^{-2}$  doivent être inoculés. Outre les protocoles standards, le choix des paramètres basé sur la qualité de l'eau potable n'est pas toujours adapté à l'utilisation des EPR telles que définies par l'arrêté de 2008. L'arrêté de 2010 pour la qualité de l'eau usée traitée pour l'irrigation et l'arrêté de 2006 pour la qualité des eaux de baignade peuvent donner des indications utiles en ce qui concerne la définition des paramètres de suivi de qualité de l'EPR. Toutefois, les paramètres microbiologiques et les paramètres physico-chimiques requis par ces arrêtés restent incomplets pour être applicables à l'EPR car sa qualité soulève des préoccupations au sujet des agents pathogènes environnementaux, le dépôt atmosphérique et le lessivage de surface qui ne sont pas les mêmes problèmes que pour les autres ressources en eau. En plus de devoir déterminer les paramètres appropriés, il est nécessaire de déterminer également les valeurs indicatives pour ces paramètres et les protocoles d'analyses spécifiques à l'EPR en fonction des différents usages.

Notre étude constitue une première approche qui a permis de mettre en avant des points importants tels que la caractérisation de l'EPR, les protocoles adaptés et d'établir les priorités en matière d'évaluation des risques. Ainsi, afin d'évaluer les risques sanitaires liés à des usages d'EPR, un investissement à long terme devrait être poursuivi.

## **WP5 - Incidence de différents modes d'entretien ou de gestion de la cuve**

### Etude de la diversité microbienne de l'EPR

Nos résultats ont montré que les cuves enterrées et extérieures présentent des communautés microbiennes avec des densités en cellules totales (bactéries et archées) et en microalgues comparables à celles des milieux aquatiques naturels (ex. lacs, étangs). Même si nos résultats montrent que le phytoplancton est peu diversifié (dominance du genre *Monoraphidium*), les données bactériologiques laisse supposer la présence de communautés microbiennes diversifiées. En effet, Evans *et al.* (2009) ont montré que les communautés bactériennes de l'EPR dans les cuves de récupération chez les particuliers présentaient 200 espèces et 80 genres isolés sur milieu de culture. Les cuves de collecte peuvent donc accueillir des écosystèmes microbiens durables et une grande biodiversité qui sont rarement étudiés. De nombreuses questions se posent sur le rôle de la diversité dans le fonctionnement des écosystèmes. L'écologie générale a développé des théories élaborées sur les successions écologiques, la diversité, l'invasion et la stabilité, telle que l'hypothèse qu'un écosystème diversifié est plus stable (Loreau *et al.*, 2001). Ces théories sont supportées par des mesures expérimentales et de terrain à la fois sur les végétaux, les animaux et les microorganismes. Ainsi des expériences d'assemblage de communautés microorganismes ont montré que des communautés plus diverses sont plus productives (Bell *et al.*, 2005) et plus résistantes aux invasions par d'autres espèces (McGrady-Steed *et al.*, 1997). Trois mécanismes qui peuvent être complémentaires sont avancés pour expliquer pourquoi des communautés riches en espèces sont plus résistantes aux invasions. Les communautés diversifiées ont plus de chance de contenir une espèce particulièrement importante pour la résistance à l'arrivée d'une nouvelle espèce (Huston, 1997), elles occupent une plus large gamme de niches écologiques (Tilman *et al.*, 1997) et contiennent des espèces qui facilitent la résistance des autres espèces aux invasions (Bruno *et al.*, 2003).

La plupart de ces théories écologiques peinent à pénétrer les technologies environnementales, cependant une application correcte des concepts théoriques pourrait procurer un cadre intellectuel puissant pour poser les questions cruciales en terme d'opération de systèmes tels que les systèmes de stockage des eaux de pluie. Par exemple, la relation entre diversité et résistance aux invasions pourrait servir de cadre théorique pour comprendre comment un pathogène peut voir sa densité croître ou diminuer dans une cuve.

Dans le cadre de cette étude nous avons cherché à déterminer d'une part les niveaux de diversité des communautés bactériennes dans l'EPR et le sédiment des cuves extérieures et enterrées (rapport de stage de Néjiba BOUKAHLA, INSAT, Tunis). Puis nous avons cherché à évaluer le rôle de la diversité bactérienne sur la survie d'une nouvelle espèce arrivant dans une communauté bactérienne établie. Le rôle des perturbations sur le lien possible entre diversité et résistance à une nouvelle espèce a également été exploré en exposant des communautés de diversité croissante à un biocide couramment utilisé pour traiter les toitures contre la mousse et susceptible d'être lessivé dans les cuves (voir WP3, rapport final du projet de recherche QUALICO). En effet les perturbations physiques ou chimiques (tels que les biocides) ont été impliquées dans la facilitation d'invasion des écosystèmes par de nouvelles espèces (ex, (Hobbs and Huenneke, 1992) ; (Burke and Grime, 1996).

#### \* Diversité microbienne dans l'EPR et le sédiment

Au cours de ce travail, la diversité microbienne a été étudiée pour deux types de cuves (extérieure et enterrée) en utilisant les méthodes d'identification moléculaire. Pour les deux échantillons d'EPR, 30 genres différents, dans 22 familles différentes, 22 ordres, 8 classes et 5 phylums majeurs dans le domaine bactérien ont été identifiés. Pour les deux échantillons de sédiment, 39 genres différents ont été identifiés, 31 familles différentes, 24 ordres, 15 classes et 9 phylums majeurs. Cela montre que la diversité bactérienne est très élevée quel que soit dans la colonne d'eau ou dans le sédiment des cuves.

Les données préliminaires de l'étude de la diversité microbienne de l'eau et du sédiment confirment les hypothèses que les cuves de récupération des eaux pluviales sont considérées comme un écosystème (Evans *et al.*, 2009) qui peut être considéré comme un système relativement isolé avec un flux entrant et un flux sortant d'espèces. Il est probable que dans les cuves de récupération d'EPR la diversité bactérienne dépend de la taille de la cuve, comme il a été montré récemment pour des bioréacteurs de station d'épuration (Van Der Gast *et al.*, 2006). Cette diversité observée dans les deux cuves met donc en évidence la capacité de communautés bactériennes complexes, comparables à celles d'autres systèmes aquatique, à s'établir dans un milieu particulier comme l'EPR.

### Rôle de la diversité bactérienne dans la résistance aux invasions en conditions perturbées

La maintenance du système de récupération de l'EPR peut grandement influencer la composition des communautés microbiennes dans les cuves, créant des conditions plus ou moins favorables au développement et à la survie des pathogènes. La diversité des communautés bactériennes dans l'eau des cuves peut donc varier grandement : être peu diversifiée après une longue période de pluies intenses (effet de dilution) ou après un nettoyage, ou alors être plus diversifiée après une longue période de stagnation sans traitement. Par ailleurs les pratiques d'entretien des toitures utilisant des antimousses (dont la principale molécule est le benzalkonium) peuvent introduire dans les cuves des biocides par lessivage des toitures (voir WP 3) dont l'effet toxique sur les communautés bactériennes est mal connu et qui pourrait diminuer la diversité de ces communautés. Or la diversité bactérienne peut jouer un rôle d'assurance dans les écosystèmes aquatiques, à la fois pour le maintien des processus écosystémiques (e.g. dégradation de la matière organique et recyclage des nutriments) et aussi comme barrière à l'établissement et la colonisation par une nouvelle espèce (Bell *et al.* 2005, Hogdson *et al.* 2002, MacGrady *et al.* 1997). De ce fait la diversité bactérienne pourrait jouer rôle important dans la qualité de l'EPR. Toutefois les cuves sont des écosystèmes artificiels de taille relativement petite (comparé à un lac ou un étang) sujets à de nombreuses perturbations : variation de volume, de température, apport en eau chargée ou non en polluants organiques et métalliques, chargée ou non en microorganismes pathogènes. Ces perturbations pourraient altérer la capacité de résistance aux invasions de la communauté bactérienne dans le cas d'un scénario d'arrivée d'une espèce pathogène très compétitive. Nous avons donc étudié en microcosme le rôle potentiel de résistance aux invasions de la diversité bactérienne dans l'EPR en conditions non perturbées et en conditions perturbées. Pour cela, nous avons utilisé un organisme envahisseur modèle (*E. coli*) dont la dynamique après introduction a été suivie dans des communautés microbiennes de diversité décroissante et décomposition différentes en présence ou non de benzalkonium. Les communautés de diversité décroissante ont été obtenues par dilution de différentes communautés issue de cuves extérieures et enterrées, tout en contrôlant l'effet de la biomasse.

#### I. Protocole expérimental

Tout d'abord le choix de l'organisme envahisseur s'est porté sur une souche génétiquement transformée d'*Escherichia coli*. Cette souche produit une protéine verte fluorescente (Green Fluorescent Protein-GFP) et possède un gène de résistance à la streptomycine. La dynamique en microcosme des populations d'*E. coli* peut donc être suivie par culture sur milieu gélosé amendé en streptomycine. Par ailleurs, les communautés bactériennes qui ont été utilisées pour tester la capacité d'*E. coli* à envahir ou se maintenir dans une EPR proviennent de quatre cuves de récupération d'EPR différentes prélevées à différents moments de l'année afin de contrôler l'effet de la composition. Afin de simuler différents niveaux de diversité, les communautés microbiennes sont diluées en série (jusqu'au 1/1000) avec de l'EPR autoclavée (120°C, 20min). Plusieurs études ont montré que le nombre d'espèces bactériennes diminue avec l'augmentation de dilution jusqu'à extinction (Garland and Lehman, 1999; Franklin *et al.*, 2001; Wertz *et al.*, 2006), il s'agit donc une méthode appropriée pour obtenir des communautés bactériennes de diversité réaliste et décroissante comparée à l'assemblage de souches pures. La biomasse de chaque dilution est normalisée par centrifugation (5000g, 30min, 10°C) et les culots ont été repris dans 3 mL d'EPR stérilisée par filtration (0,22µm)

pour obtenir une concentration d'environ  $10^5$ - $10^6$  cellules/ml correspondant à la densité des cellules totales de l'échantillon d'EPR initiale. Les différentes communautés pour chaque niveau de dilution (diversité décroissante) sont ensuite amendées avec une concentration finale de  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml d'*E. coli* transgénique. Ces densités ont été choisies par rapport à la littérature (Livvable 1- 09/2009) pour avoir des concentrations en *E. coli* réalistes et adaptées à notre limite de détection. Les microcosmes sont incubés en statique pendant 4 semaines à 22°C et la dynamique d'*E. coli* est suivie chaque semaine en ensemençant sur milieu LB (Lysogeny broth ou Milieu Luria-Bertani) additionné de streptomycine à une concentration finale de 50µg/mL. Le nombre de cellules totales est suivi par comptage direct au microscope fluorescent après coloration au DAPI (Porter et Feig, 1980).

## 2. Validation du protocole

Afin de vérifier que la dilution affecte bien la diversité bactérienne dans l'EPR, nous avons amplifié le gène de l'ARNr 16S à l'aide des amorces (341F-40GC: CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG et 535R: ATT ACC GCG GCT GCT GG) selon Muyzer *et al.* (1993) sur une série de dilution d'une communauté bactérienne issue d'une cuve. L'ADN a été extrait par le kit PowerWater® DNA Isolation (MoBio). Les amplicons ont ensuite été séparés par Chromatographie Liquide à Haute Pression en condition dénaturante (dHPLC) afin d'obtenir un profil génétique des communautés testées. Cette méthode a été appliquée avec succès pour l'analyse des communautés bactériennes marines (Barlaan *et al.*, 2005) et des flores intestinales (Goldenberg *et al.*, 2007). Chaque pic de profils obtenus représente un phylotype ou une unité opérative taxonomique bactérienne qui correspond plus ou moins à une espèce bactérienne. A partir de ces profils, la comparaison de la présence ou absence des pics et leur hauteur permet d'évaluer différents indices de diversité (richesse taxonomique, dominance, indice de Shannon-Wiener) et de pouvoir comparer les communautés bactériennes issues des différents niveaux de dilution.

## 3. Résistance aux invasions dans des conditions stables (Livvable 2-09/2011)

Les dilutions de huit communautés bactériennes ont été inoculées avec *E. coli* et la dynamique de la nouvelle espèce introduite a été suivie pendant 4 semaines. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 6. Cette figure montre que la densité d'*E. coli* présentée en log UFC/ml diminue au cours du temps mais différemment entre les dilutions. Nous constatons, que cette tendance s'accroît avec le temps et qu'au 14<sup>ème</sup> jour d'incubation la densité d'*E. coli* diminue de 63% dans des communautés les plus diversifiées (dilution  $10^0$ ) alors qu'elle se maintient dans les communautés de diversité moindre (dilutions  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ). Les concentrations en *E. coli* dans les dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$  ne diffèrent pas de celles d'*E. coli* inoculée dans l'EPR stérile (fig. 6). Ces résultats confirment l'hypothèse de meilleure résistance à l'introduction de nouvelles espèces lorsqu'un écosystème présente des communautés diversifiées. Ceci suggère que dans les cuves où les communautés bactériennes sont établies et peu perturbées (exemple lors d'une stagnation), il serait plus difficile pour un pathogène introduit de se développer ou de se maintenir. Sachant que l'EPR stockée dans une cuve peut avoir une diversité aussi élevée que celle des autres systèmes aquatiques (lac, rivière ...) (Evans *et al.*, 2009; Kim and Han, 2011), notre étude en microcosme suggère qu'une approche écologique laissant les cuves stables pourrait être intéressante à prendre en considération. Toutefois notre étude n'a pas testé l'effet de la concentration et de la fitness de l'espèce introduite. Selon (Evans *et al.*, 2009), le fonctionnement de ces écosystèmes aquatiques peut avoir des répercussions bénéfiques sur la qualité de l'EPR, en recyclant la matière organique et les nutriments, et en servant de barrière à la prolifération des pathogènes. Ainsi la formation de biofilms et le recyclage des nutriments peuvent diminuer les quantités d'oligoéléments et de matière organique, ce qui permet l'exclusion compétitive des pathogènes présents dans l'EPR, car ces derniers sont souvent moins compétitifs lorsque les ressources deviennent limitantes (Krampitz and Holländer, 1999; Evans *et al.*, 2007; Kim and Han, 2011).

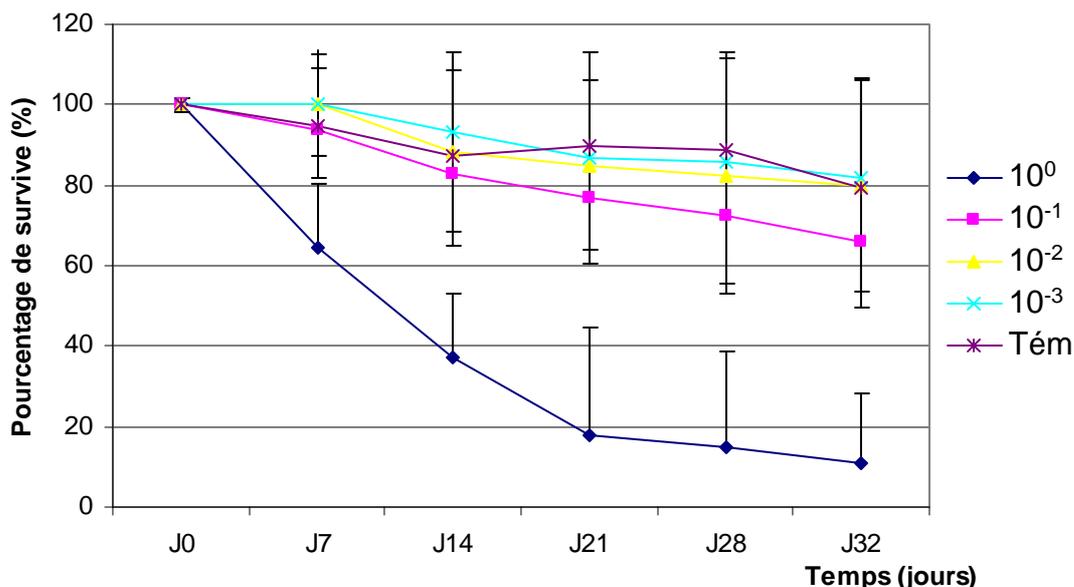


Figure 13 : Effet de diversité bactérienne sur la survie au cours du temps d'*E. coli* introduite (la diversité est manipulée par dilution de  $10^0$  à  $10^{-3}$ , avec de l'EPR stérile par filtration à  $0,22\mu\text{m}$  comme témoin). Les résultats sont présentés en moyenne du pourcentage de survie d'*E. coli* en log (UFC/mL) et l'écart-type de 8 microcosmes différents.

#### 4. Impact d'une perturbation sur la résistance aux invasions (Livrable 3-10/2011)

Nous avons utilisé le même protocole pour étudier l'effet d'une perturbation sur la résistance aux invasions avec un ajout de benzalkonium (BAC). Cette molécule est presque universelle dans les produits de traitement de toiture (antimousses ou antifongiques). Afin de trouver une concentration qui corresponde aux concentrations trouvées dans les traitements de toiture sans éliminer de manière drastique *E. coli*, nous avons réalisé un test dose-réponse de cette molécule sur la survie des *E. coli*. Cette large gamme de BAC a été déterminée grâce à des données obtenues par l'étude de traitement de toiture réalisée en parallèle dans le cadre de projet QUALICO (WP 3, thèse d'Antoine Van de Voorde). Pour 7 prélèvements d'EPR issues de toitures traitées avec du produit antimousse à base de BAC, la concentration en BAC dans l'eau de ruissellement varie de 0 à 3,61 mg/L (communication d'Antoine Van de Voorde). Le test dose-réponse d'*E. coli* avec la présence de BAC montre qu'il y a une inhibition de 60% de la population d'*E. coli* à une concentration de 3 mg/L de BAC (Figure 14). Cette dose dans la fourchette trouvée dans l'EPR issue des toitures traitées au BAC permet aussi de maintenir le suivi des microcosmes pendant quatre semaines à un niveau détectable du nombre d'*E. coli*. Nous avons utilisé cette concentration en BAC pour créer une perturbation.

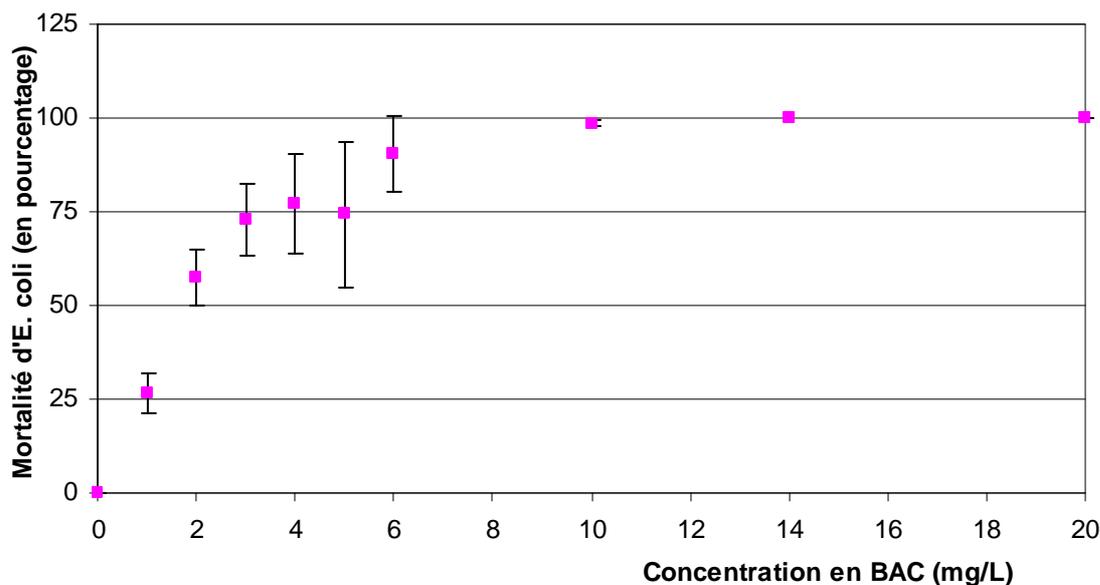


Figure 14 : Mortalité d'*E. coli* en fonction de la concentration en BAC après une semaine d'incubation à 22°C (moyenne et écart-type, n= 3). La réponse d'*E. coli* est exprimée en pourcentage de mortalité d'*E. coli* en UFC/ml.

La survie d'*E. coli* a été estimée au cours du temps en fonction de la diversité de la communauté bactérienne en présence de benzalkonium à 3 mg/L. La Figure 15 montre que la densité d'*E. coli* diminue en fonction du temps. Dans le cas où la diversité bactérienne est élevée (dilution 10<sup>0</sup>), cette diminution semble plus marquée que les autres niveaux de diversité. Toutefois, la Figure 16 montre que la relation négative entre la diversité et la survie de l'espèce introduite est modifiée par rapport aux conditions non-perturbées (Figure 13) mais semble se maintenir.

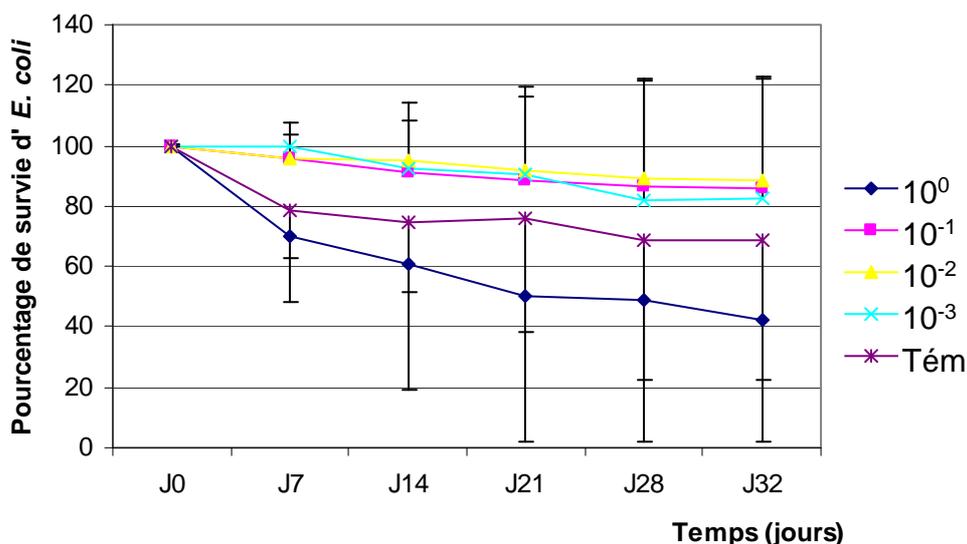


Figure 15 : Effet de perturbation par BAC à 3 mg/L sur la capacité de survie d'*E. coli* en fonction du temps d'incubation et de la diversité de la communauté bactérienne inoculée (la diversité est manipulée par dilution de 10<sup>0</sup> à 10<sup>-3</sup>, avec de l'EPR stérile par filtration à 0,22µm comme témoin). Les résultats sont présentés en moyenne de pourcentage de survie d'*E. coli* en log (UFC/ml) et l'écart-type de 4 microcosmes différents.

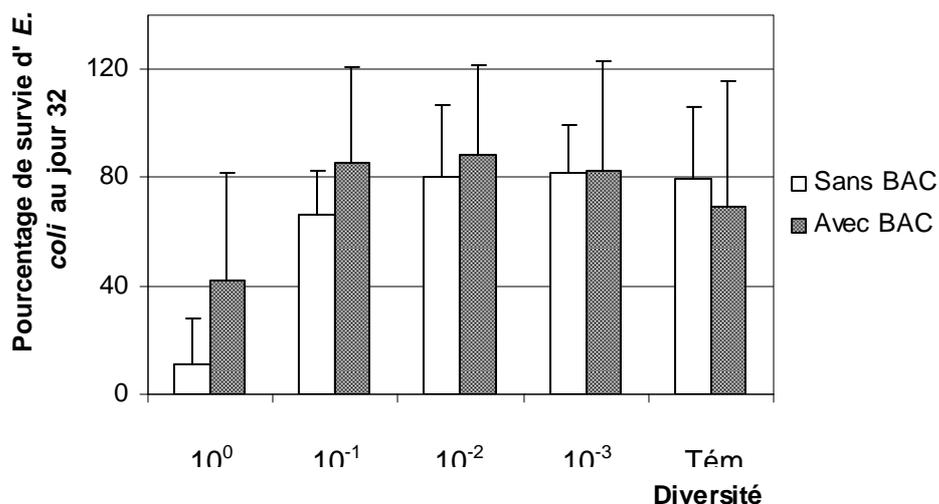


Figure 16 : Pourcentage de la survie d'*E. coli* introduite dans deux conditions avec et sans benzalkonium au jour 32 d'incubation à 22°C (la diversité est manipulée par dilution de 10<sup>0</sup> à 10<sup>-3</sup>, avec de l'EPR stérile par filtration à 0,22µm comme témoin). Les résultats sont présentés en moyenne de pourcentage de survie d'*E. coli* en log (UFC/mL) et l'écart-type de 8 microcosmes différents pour la condition sans BAC et 4 microcosmes pour la condition avec BAC à 3 mg/L.

Le phénomène de perte de résistance à une invasion d'un écosystème suite à une perturbation a aussi été montré par plusieurs études dans différents milieux naturels (Tadashi, 2001; Lake and Leishman, 2004; Zavaleta and Hulvey, 2007). Dans le cas d'une cuve de récupération d'EPR, ceci est particulièrement important, car la taille des écosystèmes influence la diversité et la stabilité, les systèmes de petite taille étant moins diversifiés et plus sensibles aux perturbations que les écosystèmes de grande taille. Cela indique que l'approche écologique pourrait être intéressante pour la pratique et l'entretien du système de récupération de l'EPR. Cette étude montre également que les traitements des toitures peuvent avoir un impact sur la qualité de l'EPR, notamment l'emploi de biocides.

## 5. Conclusions et recommandations

Cette étude a d'abord eu pour objet d'évaluer la qualité microbiologique de l'EPR et d'identifier des paramètres adaptés au suivi de cette qualité. Ensuite, cette étude explore le fonctionnement écologique des cuves de récupération d'EPR, et ouvre des pistes pour intégrer l'écologie microbienne à la gestion et l'entretien des systèmes de collecte et de stockage. Plusieurs conclusions peuvent en être tirées et des recommandations peuvent être faites malgré le nombre limité des sites étudiés.

Premièrement, les résultats obtenus ont montré que l'EPR issue de cuves enterrées ou extérieures est contaminée par les microorganismes pendant différentes saisons mais reste acceptable pour certains usages comme l'arrosage, la chasse d'eau ou le lavage du linge en regard de certaines normes de chasses d'eau et d'arrosage éditées par plusieurs pays pour différents types d'eau. La présence des pathogènes étudiés à des pourcentages différents montre cependant que l'EPR pourrait représenter un risque sanitaire si elle était utilisée comme eau potable. Nous recommandons donc des traitements qui devront être adaptés à différents niveaux d'usage mais la question de traitement reste à éclairer.

Deuxièmement, le sédiment dont les concentrations en microorganismes sont beaucoup plus élevées que celles de la colonne d'eau s'accumule souvent au fond des cuves. En cas de remise en suspension, le sédiment pourrait être une source de re-contamination de la colonne d'eau dans deux types de

cuves. Ce sédiment devrait être éliminé dès que son niveau devient important pour éviter qu'il soit remis en suspension. Un dispositif de mise à l'écart du premier flux de pluie qui est chargé de tous les dépôts de toiture et de gouttières est donc recommandé pour éviter l'accumulation de ce sédiment et pour avoir une meilleure qualité de l'eau.

Troisièmement, l'analyse des corrélations entre les paramètres microbiologiques et entre les paramètres physico-chimiques dans l'eau des deux types de cuves montre que la mesure de certains paramètres pourrait être redondante. Parmi les paramètres microbiologiques, l'estimation des densités d'*E. coli* et d'entérocoques intestinaux semblent plus pertinents que les autres indicateurs pour indiquer la présence de contamination d'origine fécale (coliformes totaux et thermotolérants). Par contre, pour les pathogènes d'origine environnementale (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, légionelles, mycobactéries non-tuberculeuses), il n'existe pas d'indicateurs adéquate. Il serait donc important de rechercher des pathogènes spécifiques selon le risque le plus élevé lié à l'usage de l'eau. Par exemple les légionelles dans le cas de risques importants d'inhalation (exemple, utilisation d'un système à haute pression pour l'arrosage ou le nettoyage), ou bien les staphylocoques dans le cas de risques de contact (exemple, bain), enfin les indicateurs de contamination fécale dans le cas de risques d'ingestion (exemple, bain ou consommation). Concernant les méthodes de suivi de la qualité microbiologique, nous recommandons quelques modifications de certaines étapes de protocoles standards pour la qualité de l'eau potable (tels que la taille de l'inoculum ou la gamme de dilution) pour les rendre adaptés à la qualité de l'EPR de ruissellement de toiture. Le pH et la turbidité représentent également des avantages par rapport aux autres paramètres physico-chimiques si l'EPR est utilisée pour l'arrosage, la chasse d'eau ou le lavage du linge. Par contre, la mesure de conductivité et des nitrates serait intéressante si l'EPR est utilisée comme l'eau de consommation.

Quatrièmement, les microalgues sont souvent présentes dans les cuves extérieures à des concentrations variées et peuvent atteindre une concentration très élevée. Les algues vertes dominaient dans les 4 cuves étudiées pendant trois saisons et les cyanobactéries observées dans ces cuves ne sont pas des espèces toxiques. Toutefois, le risque lié à des toxines produites par les cyanobactéries pourrait être réel si les conditions environnementales leur devenaient favorables (exemple diminution de l'azote). Nous recommandons donc que les cuves extérieures et les accessoires du système d'installation soient fabriqués avec des matières de couleur foncée qui ne permettent pas à la lumière de pénétrer et ne soient pas installées en plein soleil.

Cinquièmement, l'étude de la diversité bactérienne a montré que l'EPR comprend les communautés complexes de bactéries et que cette diversité pourrait jouer des rôles fonctionnels bénéfiques pour la qualité de l'EPR stockée, notamment de barrière au développement de pathogènes. Toutefois, notre étude montre que ce rôle peut être amoindri en présence de perturbations. Afin de préserver des communautés microbiennes diverses, nous recommandons que les cuves ne soient pas vidées trop souvent mais que le curage de sédiment soit réalisé si le risque de remise en suspension devient trop élevé. Si le vidage était nécessaire, la couche fine de biofilm devrait être gardée pour bénéficier de ses avantages pour la qualité de l'eau et la protection contre l'érosion de matière de la cuve. Pour le traitement des toitures, il faut déconnecter les cuves et la toiture pendant le traitement et un certain temps après le traitement pour ne pas accumuler les produits toxiques dans les cuves.

Enfin, les risques microbiologiques associés à l'utilisation de l'EPR restent encore largement méconnus. De plus, les données sont souvent contradictoires et difficiles à interpréter. La combinaison des études épidémiologiques avec les données microbiologiques est la meilleure façon d'évaluer les risques liés à l'usage d'EPR. Ainsi, le manque de valeurs guides et de limites réglementaires sur la qualité microbiologique de l'EPR en fonction des usages reste un problème majeur. Actuellement, il existe de nombreux guides pour l'installation, l'utilisation et le traitement de l'EPR mais des valeurs guides de qualité de l'EPR doivent être proposées pour les usages à l'intérieur des habitations, en vue d'assurer la santé des utilisateurs d'EPR.

## 7. Activités scientifiques :

- les activités de formation
  - o cours dans des formations existantes
    - Cours Master Genie Urbain spécialité Développement Urbain Durable UMLV : « Gestion durable de l'eau dans le bâtiment », (9h, enseignant : B. de Gouvello)
    - Cours Master 2 Systèmes Aquatiques et Gestion de l'Eau: « Mécanique des fluides I », (27h, enseignant : MC Gromaire)
    - Cours Master 2 Systèmes Aquatiques et Gestion de l'Eau: « Hydrologie urbaine », (4.5h, enseignant : MC Gromaire)
    - Cours Master 2 Systèmes Aquatiques et Gestion de l'Eau: « Hydrologie urbaine », (2h, enseignant : A. Van de Voorde)
    - Cours Master 2 Gestion et traitement des Eaux, des Sols et des Déchets: « Assainissement » (21h : enseignant : MC Gromaire)
    - Vacances en Travaux Pratiques à l'IUT de Créteil/Vitry en Chimie Minérale pour les années scolaires 2009/2010 et 2010/2011 (120, enseignant : A. Van de Voorde)
    - Cours, TD, TP à l'Université Paris-Est Créteil et au PRES Paris-Tech en licence CB et SVT, Masters 1 SGE et Masters 2 (SAGE, TES, Bioressources, GTESD), Ingénieurs Ecole des ponts 2<sup>e</sup> année, pour les années scolaires de 2009/2010 et 2010/2011 (192h équivalent TD par an, Maître de Conférence : F. Lucas)
  - o création de nouvelles formations universitaires : 0
  - o séminaires de doctorants / post-doctorants
    - Participation de A. Van de Voorde (doctorant financé par R2DS dans le cadre de Qualico) au 9th WWW-YES, World Wide Workshop for Young Environmental Scientists, « Urban Water resources and Risk », 26-30 octobre 2009, Belo-Horizonte, Brésil
    - Participation de A. Van de Voorde (doctorant financé par R2DS dans le cadre de Qualico) aux Leesuriales (séminaire des doctorants du Leesu), 7 juillet 2010, Champs sur Marne
    - Participation de A. Van de Voorde (doctorant financé par R2DS dans le cadre de Qualico) aux Journées Doctorales en Hydrologie Urbaine, 16 et 17 novembre 2010, Champs sur Marne. Prix de la meilleure présentation orale offert par Safege.
    - Participation de A. Van de Voorde (doctorant financé par R2DS dans le cadre de Qualico) aux Leesuriales (séminaire des doctorants du Leesu), 6 juillet 2011, Champs sur Marne
    - Participation de T.L.N Nguyen-Deroche (post-doctorante financée par R2DS dans le cadre de Qualico) au Séminaire LEESU – 15 décembre 2011, UPEC, Créteil
    - Participation de T.L.N Nguyen-Deroche (post-doctorante financée par R2DS dans le cadre de Qualico) à Journée scientifique OPUR – 8 juin 2011 Substances prioritaires et autres contaminants dans les eaux pluviales, ENPC, Champs sur Marne
    - Participation de T.L.N Nguyen-Deroche (post-doctorante financée par R2DS dans le cadre de Qualico) au Séminaire OPUR thème 1 – 16 décembre 2010, Conseil général de Val-de-Marne (94)
    - Participation de T.L.N Nguyen-Deroche (post-doctorante financée par R2DS dans le cadre de Qualico) au Séminaire «Eaux brutes» - 3 et 4 novembre 2010 à l'APUR, Paris.
  - o autres :

→ Animation par B. de Gouvello d'un groupe de travail spécialisé sur la récupération de l'eau de pluie pour la réalisation et la publication d'une plaquette intitulée : Systèmes d'utilisation de l'eau de pluie dans le bâtiment : règles à l'attention des installateurs.

→ Intervention de MC Gromaire lors d'un séminaire interne de l'Agence de l'Eau Seine Normandie, 24 septembre 2010

→ Intervention de MC Gromaire lors du 3<sup>ème</sup> Forum sur la gestion durable des eaux pluviales, 29-30 septembre 2010, Douais

→ Participation de MC Gromaire a une présentation lors du colloque sur les eaux pluviales organisé par l'association Aquï-Brie en février 2011

→ Accueil d'étudiants en stage dans le cadre du projet Qualico. Le projet a donné lieu à 10 rapports de stage :

- Baptiste Manessi, « Evaluation à l'échelle locale des risques liés au lessivage des produits de traitement de toiture », rapport de stage scientifique de l'Ecole des Ponts ParisTech, avril-juillet 2011.
- Geoffroy Mattoni, « Evaluation de la pollution des eaux pluviales due aux pratiques de démaillage des toitures », rapport de stage scientifique de l'Ecole des Ponts ParisTech, avril-juillet 2011.
- Arnaud Laurent, « Enquête sur les pratiques en matières de traitement de toitures », rapport de stage scientifique de l'Ecole des Ponts ParisTech, avril-juillet 2010.
- Mathilde de la Bigne, « Etude de la réalisation d'un simulateur de pluie », rapport de stage scientifique de l'Ecole des Ponts ParisTech, avril-juillet 2010.
- Camille Bernard, « Les différents usages de l'eau de pluie récupérée : un panorama international », rapport de stage scientifique de l'Ecole des Ponts ParisTech, avril-juillet 2010.
- Gwendoline Sautreuil, « Critères de qualité des eaux de pluie en vue de leur utilisation dans le bâtiment », rapport de stage scientifique de l'Ecole des Ponts ParisTech, avril-juillet 2009.
- Nicolas Planchenault, « Création d'une base de données sur la pollution des eaux de ruissellement de toitures » rapport de stage scientifique de l'Ecole des Ponts ParisTech, avril-juillet 2009.
- Adrien Tchang Minh, « Enquête sur les pratiques en matière de traitement de toiture, dans une perspective de collecte et utilisation de l'eau de pluie », rapport de stage de Master pro Environnement, 1ère année.
- Néjiba BOUKAHLA, « Etude de la qualité microbiologique et la diversité bactérienne de l'eau de pluie de récupération chez les habitants en Île-de-France », Stage de fin d'étude, 5ème année - Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT) de Tunis (Tunisie), septembre-décembre 2011
- Amina FEHRI, « Qualité de l'eau de pluie de récupération chez les habitants en Île-de-France : campagne de prélèvement de printemps », Stage en Licence 3, Université de Paris-Est Créteil (Biologie Générale et Science de la Vie, avril-mai 2011.
- Guillaume DE LAGARDE, « Qualité de l'eau de pluie de récupération chez les habitants en Île-de-France : campagne de prélèvement d'été », Stage en Licence 3, Université de Pierre et Marie Curie (Science de la Vie), juillet 2011.

- les résultats des thèses

- nombre de thèses publiées sur des projets financés par la région : 1 (la soutenance de la thèse engagée dans Qualico est prévue en avril 2012)

- publications

- titre et nombre de publications associées à des projets proches du projet développé dans le cadre du réseau : 9
1. Gromaire M.C., Robert-Sainte P., Bressy A., Saad M., de Gouvello B., Chebbo G. (accepté). « Zn and Pb emissions from roofing materials – modelling and mass balance attempt at the scale of a small urban catchment ». *Water Science and Technology*.
  2. Bressy A., Gromaire M.C., Lorgeoux C., Chebbo G. (2011). « Alkylphenols in atmospheric deposition and urban runoff ». *Water Science and Technology*, vol. 63, n°4, p. 671-679.
  3. Robert-Sainte P., Gromaire M.C., de Gouvello B., Saad M., Chebbo G. (2011). « Quantification et modélisation des émissions de métaux par les matériaux de couverture des bâtiments ». *Techniques Sciences et Méthodes*, n°5.
  4. Bressy A., Gromaire M.C., Lorgeoux C., Saad M., Leroy F., Chebbo G. (2011). « Contamination des eaux pluviales d'un bassin résidentiel dense amont ». *Techniques Sciences et Méthodes*, n°4, p. 28-36.
  5. Bressy A., Gromaire M.C., Lorgeoux C., Saad M., Leroy F., Chebbo G. (2011). « Incidence des modes alternatifs de gestion des eaux de ruissellement sur les flux d'eau et de contaminants ». *Techniques Sciences et Méthodes*, n°4, p. 37-49.
  6. Gires A, de Gouvello B (2009). "Consequences to water suppliers of collecting rainwater on housing estates" *WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY*, Vol. 60, N°3, p.543-553
  7. Robert-Sainte P, Gromaire MC, De Gouvello B, Chebbo G. (2009) « Annual Metallic Flows in Roof Runoff from Different Materials: Test-Bed Scale in Paris Conurbation" *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, Volume: 43, Issue: 15, Pages: 5612-5618
  8. de Gouvello B. & Deutsch J.-Cl., 2009, La récupération et l'utilisation de l'eau de pluie en ville : vers une modification de la gestion urbaine de l'eau ?, *FLUX n°76/77* – septembre 2009, pp. 14-25.
  9. Carré C. & Deroubaix J.-F., 2009, L'utilisation domestique de l'eau de pluie révélatrice d'un modèle de service d'eau et d'assainissement en mutation ?, *FLUX n°76/77* – septembre 2009, pp. 14-25.
- titre et nombre de publications sur des projets financés par la région :

Publications : 5

- 1) Van de Voorde A., Lorgeoux C., Gromaire M.C., Chebbo G. (accepté). Analysis of quaternary ammonium compounds in urban stormwater samples. *Environmental Pollution*.
- 2) Van de Voorde A., Lorgeoux C., Gromaire M.C., Chebbo G. Impacts Roof maintenance impacts on roof runoff quality in France. *Proceedings de l'International Conference on Urban Drainage*
- 3) Nguyen-Deroche N., Saad M., Gromaire M.C., Moulin L., Lucas F. (soumis). Quality of roof harvested rainwater from houses in Île-de-France area, France. *International Journal of Rainwater Catchment Systems*.
- 4) de Gouvello B. (soumis). The rainwater harvesting (RWH) in French urban areas: factors of development and impacts on urban water management, France. *International Journal of Rainwater Catchment Systems*.
- 5) Van de Voorde A., Lorgeoux C., Chebbo G., Gromaire M.C. (accepté) « Impact des pratiques d'entretien des toitures sur la qualité des eaux de ruissellement », *Techniques Sciences et Méthodes*.
- 6) Van de Voorde A., Tchang-Minh A., de Gouvello B., Carré C., Chebbo G. & Gromaire M.C. (2009). "Stockage/utilisation des eaux de pluie: quelle(s) incidence(s) des pratiques d'entretien des toitures sur la qualité et le potentiel d'usage des eaux de ruissellement?" *Les Cahiers de l'ASEES*, Volume 14, Numéro 1, Page(s) 45 – 53, DOI 10.1051/asees/2009007

- 7) de Gouvello B. et Moreau de Bellaing C. (2009), « Les mécanismes d'incitation à l'utilisation de l'eau de pluie en France : entre réglementation nationale et initiatives locales. » Les Cahiers de l'ASEES, Volume 14, Numéro 1, Page(s) 85-91, DOI: 10.1051/asees/2009010

Communications à un colloque : 14

- 1) Van de Voorde A., Lorgeoux C., Gromaire M.C., Chebbo G. (2011), *Impacts des pratiques d'entretien des toitures sur la qualité des eaux de ruissellement*. 22<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques de l'Environnement, Créteil 1 - 2 février 2011.
- 2) Van de Voorde A., Lorgeoux C., Gromaire M.C., Chebbo G. (2011), *Impacts des pratiques d'entretien des toitures sur la qualité des eaux de ruissellement*. Journées Scientifiques OPUR : Substances prioritaires et autres micropolluants dans les eaux pluviales, Champs sur Marne 8 juin 2011.
- 3) Van de Voorde A., Lorgeoux C., Gromaire M.C., Chebbo G. (2011), *Roof maintenance impacts on roof runoff quality in France*. 12<sup>th</sup> International Conference on Urban Drainage, Porto Alegre (Brésil) 11 – 16 september 2011.
- 4) T. L. N. Nguyen-Deroche, B. de Gouvello, M. Saad, F. Lucas, L. Moulin and M.-C. Gromaire. (2011), *Rainwater harvesting in dwelling-houses in France: current regulatory context and quality issues*, 12<sup>th</sup> International Conference on Urban Drainage, Porto Alegre/Brazil, 10-16 septembre 2011.
- 5) de Gouvello B. (2011), *The rainwater harvesting (RWH) in French urban areas: factors of development and impacts on urban water management*. 15<sup>th</sup> International Conference on Rainwater Harvesting Systems, Taiwan 29 march – 4 april 2011.
- 6) Nguyen-Deroche N., Saad M., Gromaire M.C., Moulin L., Lucas F. (2011), « Quality of roof harvested rainwater from houses in Ile de France area, France ». 15<sup>th</sup> International Conference on Rainwater Harvesting Systems, Taiwan 29 march – 4 april 2011.
- 7) Van de Voorde A. (2011) « Impact des pratiques d'entretien des toitures sur la qualité des eaux de ruissellement ». 22<sup>ème</sup> Journées Scientifiques de l'Environnement, Créteil, 1-3 février 2011.
- 8) Belmeziti A, de Gouvello B, 2010, « Une approche prospective de la diffusion des pratiques d'utilisation de l'eau de pluie en Ile-de-France ». 7<sup>ème</sup> conférence internationale Novatech : *Techniques et Stratégies durables pour la gestion des eaux urbaines par temps de pluie*, 27 juin -1er juillet 2010
- 9) de Gouvello B., Gires A. (2010) « Impact de l'utilisation de l'eau de pluie sur les réseaux d'assainissement d'un lotissement en France ». 7<sup>ème</sup> conférence internationale Novatech : *Techniques et Stratégies durables pour la gestion des eaux urbaines par temps de pluie*, 27 juin -1er juillet 2010
- 10) de Gouvello B., de Longvilliers S., Rivron C., Muller C., Lenoir P. (2010) « Elaboration d'un outil d'aide au dimensionnement de cuves de récupération adapté au contexte méditerranéen ». 7<sup>ème</sup> conférence internationale Novatech : *Techniques et Stratégies durables pour la gestion des eaux urbaines par temps de pluie*, 27 juin -1er juillet 2010
- 11) Belmeziti A, de Gouvello B, 2009. « Elaboration d'un modèle prévisionnel de développement de la récupération d'eau de pluie dans le contexte de l'Ile-de-France ». 8<sup>ème</sup> Congrès International Gruttee. Nancy du 26 au 28 octobre 2009.
- 12) de Gouvello B., Moreau de Bellaing C. (2009). "Le développement de la récupération et utilisation de l'eau de pluie en France : le rôle des mécanismes d'incitation" Colloque ASEES "Réutilisation des eaux de pluie, grises ou usées - Impacts sanitaires et Environnementaux", Aix en Provence, France
- 13) Van de Voorde A., Tchang-Minh A., de Gouvello B., Carré C., Chebbo G. & Gromaire M.C. (2009). "Stockage/utilisation des eaux de pluie: quelle(s) incidence(s) des pratiques d'entretien des toitures sur la qualité et le potentiel d'usage des eaux de ruissellement?" Colloque ASEES "Réutilisation des eaux de pluie, grises ou usées - Impacts sanitaires et Environnementaux", Aix en Provence, France

14) T. L. N. Nguyen-Deroche, F. Lucas, M. Danger, G. Lacroix (2009), *Effet de la structure du réseau trophique sur la communauté bactérienne*, 4<sup>ème</sup> Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM), Lyon, France.

- les manifestations scientifiques organisées :
  - o nombre : 2
  - o objectifs et impacts
    - Journée Doctoriales en Hydrologie Urbaine (JDHU 2010), 16-17 novembre 2010 : journées de rencontre et d'échange entre les doctorants de la communauté française de l'hydrologie urbaine et les acteurs scientifiques et professionnels du domaine – participation de 22 doctorants.
    - Observatoire des Polluants Urbains – séminaire du thème 1 (16 décembre 2010) et séminaire de thème 2 (25 novembre 2010): séminaire de présentation des résultats et de discussion avec les partenaires du projet OPUR.

### **8. Retombées scientifiques :**

- les brevets déposés par la structure ou par un organisme dans le cadre des activités du projet du réseau
- les doctorants ou post-doctorants ayant trouvé un emploi
- les entreprises créées dans le prolongement du projet
- les activités menées en collaboration avec des directions fonctionnelles et des élus de la région :
  - Participation de N. Nguyen-Deroche (post doctorante financée par R2DS dans le cadre de Qualico) en tant qu'experte en eau de ruissellement de toiture à l'Atelier d'Eau non-potable, Atelier Parisien d'Urbanisme (APUR), novembre, 2010.

### **9. Visibilité internationale :**

- Accueil de chercheurs étrangers
- Nouveaux doctorants/post-doctorants accueillis
- Nombre de chercheurs du projet/réseau invités à des manifestations internationales
- Coopération scientifique internationale : séjour de recherche de N. Nguyen-Deroche (post doctorante financée par R2DS dans le cadre de Qualico) d'1 mois en août 2011 au laboratoire Genetic Analysis lab., Queensland University of Technology (QUT). Cet échange scientifique est assuré avec l'accord de Mme Flavia Huygens, chercheur à QUT, et portera sur la présence de pathogènes par la méthode de détection PCR en temps réel
- Coopération scientifique nationale : La recherche des archées, dans le cadre du post doctorat de N. Nguyen-Deroche (post doctorante financée par R2DS dans le cadre de Qualico) sera effectuée au laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) de l'INRA de Narbonne avec la coopération de Mme Nathalie Wéry.

### **10. Diffusion vers le grand public**

- activités vers la société civile
  - nombre de débats organisés avec la société civile
  - nombre d'expositions
  - nombre de salons
  - nombre total de personnes ayant assisté aux évènements

|

## Références bibliographiques

- Ahmed, W., Goonetilleke, A., and Gardner, T.** (2010). Implications of faecal indicator bacteria for the microbiological assessment of roof-harvested rainwater quality in southeast Queensland, Australia. *Canadian Journal of Microbiology* **56**, 471-479.
- Ahmed, W., Huygens, F., Goonetilleke, A., and Gardner, T.** (2008). Real-time PCR detection of pathogenic microorganisms in roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia. *Appl Environ Microbiol.* **74**, 5490-5496.
- Ahmed, W., Hodgers, L., Masters, N., Sidhu, J.P.S., Katouli, M., and Toze, S.** (2011). Occurrence of Intestinal and Extraintestinal Virulence Genes in *Escherichia coli* Isolates from Rainwater Tanks in Southeast Queensland, Australia. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 7394-7400.
- Albrechtsen, H.J.** (2002). Microbiological investigations of rainwater and graywater collected for toilet flushing. *Water Science and Technology* **46**, 311-316.
- Barlaan, E.A., Sugimori, M., Furukawa, S., and Takeuchi, K.** (2005). Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods* **61**, 399-412.
- Bell, T., Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L., and Lilley, A.K.** (2005). The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* **436**.
- Broadhead, A.N., Negron-Alvira, A., Baez, A., Hazen, T.C., and Canoy, M.J.** (1988). Occurrence of *Legionella* species in tropical rainwater cisterns. *Caribbean Journal of Science* **24**, 71-73.
- Bruno, J.F., Stachowicz, J.J., and Bertness, M.D.** (2003). Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 119-125.
- Burke, M.J.W., and Grime, J.P.** (1996). An Experimental Study of Plant Community Invasibility. *Ecology* **77**, 776-790.
- Burton, G.A., Gunnison, D., and Lanza, G.R.** (1987). Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. *Applied and environmental microbiology* **53**, 633-638.
- Evans, C.A., Coombes, P.J., Dunstan, R.H., and Harrison, T.** (2007). Identifying the major influences on the microbial composition of roof harvested rainwater and the implications for water quality. *Water science and technology* **55**, 245-253.
- Evans, C.A., Coombes, P.J., Dunstan, R.H., and Harrison, T.** (2009). Extensive bacterial diversity indicates the potential operation of a dynamic micro-ecology within domestic rainwater storage systems. *Science of The Total Environment* **407**, 5206-5215.
- Evans, C.A., Coombes, P., Dunstan, H., Harrison, T., Martin, A., and Morrow, A.** (2008). Rainwater tanks and microbial water quality: Are the indications clear? *Australian Journal of Water Resources* **12**, 143-151.
- Falkinham, J.O.** (2004). *Environmental sources of Mycobacterium avium linked to routes of exposure*. In *Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management.*, P.S.e. al., ed (London, UK: World Health Organization, IWA Publishing), pp. 26-38.
- Franklin, R.B., Garland, J.L., Bolster, C.H., and Mills, A.L.** (2001). Impact of Dilution on Microbial Community Structure and Functional Potential: Comparison of Numerical Simulations and Batch Culture Experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 702-712.

- Garland, J., L., and Lehman, R.M.** (1999). Dilution/extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities. *FEMS Microbiology Ecology* **30**, 333-343.
- Genitsaris, S., Kormas, K.A., and Moustaka-Gouni, M.** (2011). Airborne algae and cyanobacteria: occurrence and related health effects. *Front Biosci (Elite Ed)* **3**, 772-787.
- Goldenberg, O., Herrmann, S., Marjoram, G., Noyer-Weidner, M., Hong, G., Bereswill, S., and Göbel, U.B.** (2007). Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods* **68**, 94-105.
- Hobbs, R.J., and Huenneke, L.F.** (1992). Disturbance, Diversity, and Invasion: Implications for Conservation. *Conservation Biology* **6**, 324-337.
- Huston, M.A.** (1997). Hidden treatments in ecological experiments: re-evaluating the ecosystem function of biodiversity. *Oecologia* **110**, 449-460.
- Kim, M., and Han, M.** (2011). Composition and distribution of bacteria in an operating rainwater harvesting tank. *Water Science and Technology* **63**, 1524-1530.
- Krampitz, E.S., and Holländer, R.** (1999). Longevity of pathogenic bacteria especially Salmonella in cistern water. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **202**, 389-397.
- Lake, J.C., and Leishman, M.R.** (2004). Invasion success of exotic plants in natural ecosystems: the role of disturbance, plant attributes and freedom from herbivores. *Biological Conservation* **117**, 215-226.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J.P., Hector, A., Hooper, D.U., Huston, M.A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., and Wardle, D.A.** (2001). Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. *Science* **294**, 804-808.
- McGrady-Steed, J., Harris, P., M., and Morin, P., J.,** (1997). Biodiversity regulates ecosystem predictability. *Nature* **390**.
- Mons, C., Dumètre, A., Gosselin, S., Galliot, C., and Moulin, L.** (2009). Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Water Research* **43**, 211-217.
- Radomski, N., Lucas, F.S., Moilleron, R., Cambau, E., Haenn, S., and Moulin, L.** (2010). Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface water. *Applied and environmental microbiology* **76**, 7348-7351.
- Rolland, A., Rimet, F., and Jacquet, S.** (2010). A 2-year survey of phytoplankton in the Marne Reservoir (France): A case study to validate the use of an in situ spectrofluorometer by comparison with algal taxonomy and chlorophyll a measurements. *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst.*
- Savill, M.G., Hudson, J.A., Ball, A., Klena, J.D., Scholes, P., Whyte, R.J., McCormick, R.E., and Jankovic, D.** (2001). Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 38-46.
- Simmons, G., Hope, V., Lewis, G., Whitmore, J., and Gao, W.** (2001). Contamination of potable roof-collected rainwater in Auckland, New Zealand. *Water Research* **35**, 1518-1524.
- Tadashi, F.** (2001). Sequence effects of disturbance on community structure. *Oikos* **92**, 215-224.
- Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M., and Siemann, E.** (1997). The Influence of Functional Diversity and Composition on Ecosystem Processes. *Science* **277**, 1300-1302.
- Uba, B.N., and Aghogho, O.** (2000). Rainwater quality from different roof catchments in the Port Harcourt district, Rivers State, Nigeria. *Journal Water Supply Research Technology* **49**, 281-288.

- Van Der Gast, C.J., Jefferson, B., Reid, E., Robinson, T., Bailey, M.J., Judd, S.J., and Thompson, I.P.** (2006). Bacterial diversity is determined by volume in membrane bioreactors. *Environmental Microbiology* **8**, 1048-1055.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., and Freitag, T.** (2006). Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environ Microbiol* **8**, 2162-2169.
- Zavaleta, E.S., and Hulvey, K.B.** (2007). Realistic Variation in Species Composition Affects Grassland Production, Resource Use and Invasion Resistance. *Plant Ecology* **188**, 39-51.