



Echantillonnage pour l'analyse microbiologique des rejets de temps de pluie et des eaux de surface: enjeux et bonnes pratiques

Françoise Lucas



laboratoire eau environnement systèmes urbains



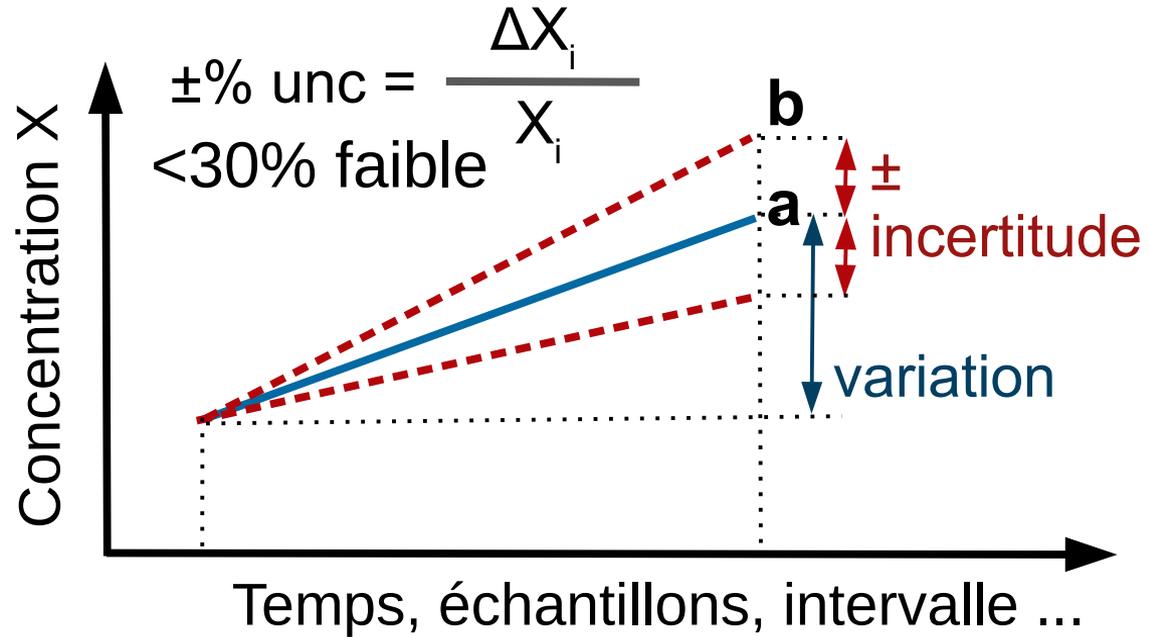
FACULTÉ DES SCIENCES
ET TECHNOLOGIE



Incertitude et variabilité de la concentration en microorganismes

Variabilité: hétérogénéité qui ne diminue pas avec des mesures additionnelles

Incertitude: manque partiel de connaissance, peut être réduite par plus de mesures



Si $a =$ vraie valeur $\Rightarrow \pm\% \text{ unc} = \frac{(a_i - b_i)}{a_i} \quad \text{Eq(1)}$

Si vraie valeur inconnue $\Rightarrow \pm\% \text{ unc} = \frac{|a_i - b_i|}{\text{moy}(a_i, b_i)} \quad \text{Eq(2)}$

Sources et propagation de l'incertitude

Concentration en *Escherichia coli* dans un échantillon

Incertainitude [*E. coli*]
dans l'échantillon

Échantillonnage
+
Stockage
+
Analyse

[*E. coli*] ± 33%
(15-67%)

(McCarthy et al., 2008)

$$\left(\frac{\Delta E. coli}{E. coli}\right)_{\text{Total}}^2 = \left(\frac{\Delta E. coli}{E. coli}\right)_{\text{Sampling}}^2 + \left(\frac{\Delta E. coli}{E. coli}\right)_{\text{Storage}}^2 + \left(\frac{\Delta E. coli}{E. coli}\right)_{\text{Analytical}}^2 \quad \text{Eq(3)}$$

(McCarthy et al., 2008)

- incertitude sur la mesure:
=> contrôlée, rapportée

- incertitude sur l'échantillonnage:
=> peu décrite, sous-estimée

³
(Guigues et al. 2020)

Echantillonnage: une variété de techniques, équipements

Manuel:

ponctuel dans le temps et l'espace



Automatique:

- point fixe,
- Prise inféodée au débit ou pas de temps
- intervalles de temps entre multiples échantillon discrets
- Échantillon moyen



Incertitude sur l'échantillonnage

Spatiale :

Verticale:

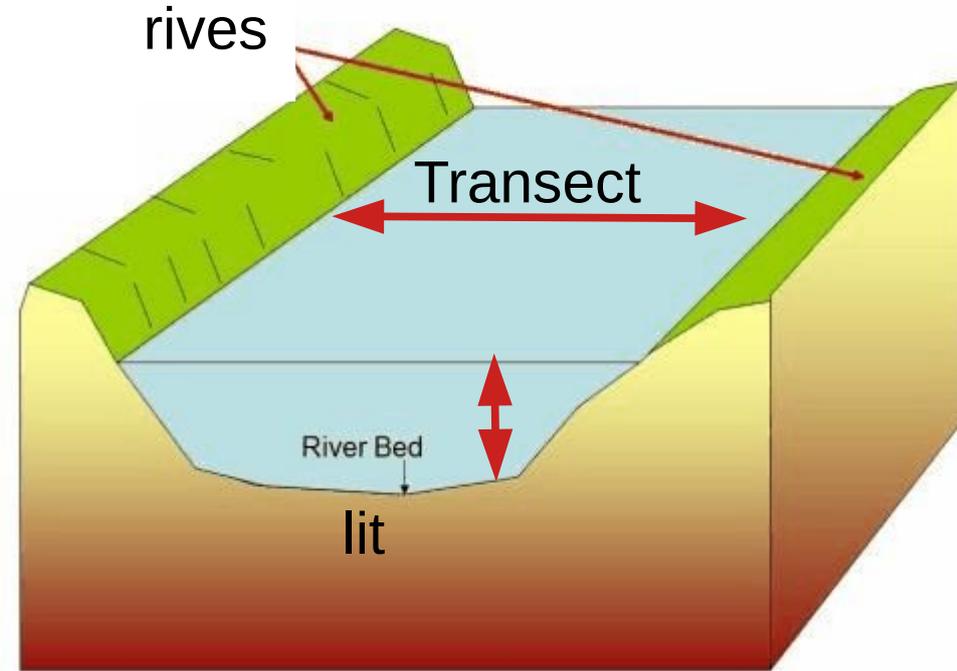
Canalisation
et petite rivière

$\Delta[E. coli]$
Différence
non significative

=> mélange par
la turbulence



(McCarthy et al., 2008;
Quillian et al., 2011)



Horizontale:

$$U_{[E. coli]} = 62 \pm 30 \%$$

(Quillian et al., 2011)

Prélèvement manuel: incertitude liée à l'équipement

Equipement



Becher



Pompe



Seau

5 campagnes de temps sec

- *E. coli*,
- Entérocoques intestinaux (EI)

Sites 1 vs 2
Différence ~ 1 Log

2 sites au lac de Créteil



1-Contaminé

E. coli : 853 ± 1070
NPP/100ml

2- Peu contaminé

E. coli : 164 ± 102 NPP/100ml

Répétabilité de la mesure selon l'équipement



2 Échantillons
répétés

X1 X2

Concentrations

Incertitude d'échantillonnage :

$$\pm\% \text{ unc} = \frac{|X1-X2|}{\text{moy}(X1,X2)} \quad Eq(2)$$

(Harmel et al., 2016)

Incertitude :

E.coli : $25 \pm 12 \%$

EI : $67 \pm 59 \%$

E. coli : $34 \pm 30 \%$

EI : $65 \pm 68 \%$



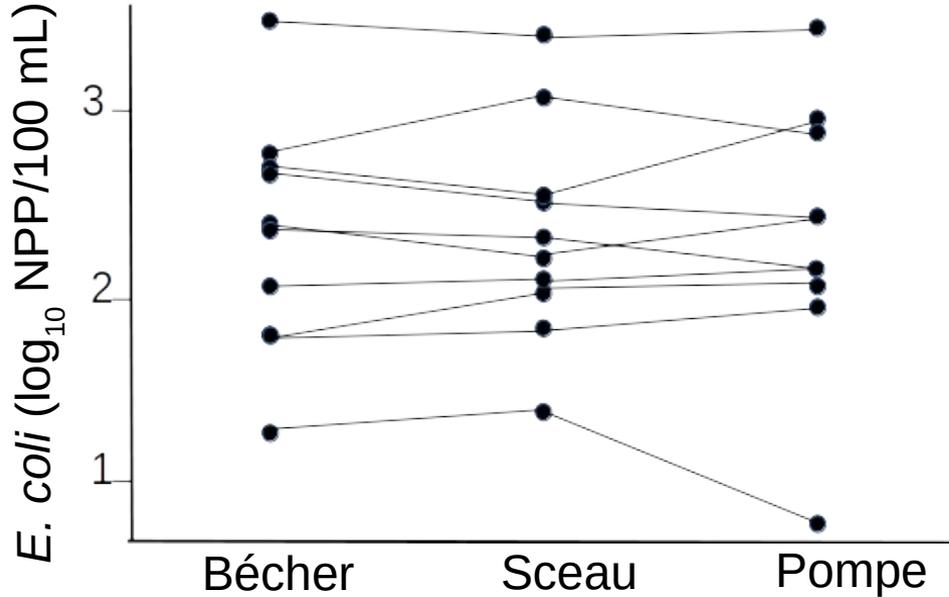
=> Plus d'incertitude sur les Entérocoques

Comparable à la littérature:

Échantillonnage répété (1 min) :

E. coli : $23 \pm 16 \%$ *(Pendergrass et al., 2015)*

Comparaison des équipements



Analyse statistique pour *E. coli* et EI
Tests de Wilcoxon appariés
(N=30, $p > 0.6$)

$$\% \text{ unc} = \frac{\Delta X_i}{X_i} \frac{2 \cdot \text{sd}(X_i)}{\text{moy}(X_i)} \quad \text{Eq(4)}$$

X_i : Concentration d'un échantillon

Incertitude d'échantillonnage
entre les 3 équipements

E.coli : $57 \pm 30 \%$

EI : $99 \pm 70 \%$

⇒ **Les 3 systèmes sont comparables**

Incertitude liée aux contaminations résiduelle

1- Prélèvement manuel:

Contaminations croisées d'un site contaminé vers site faiblement contaminé?

Nettoyage :

Rincer, stériliser ou rien ?



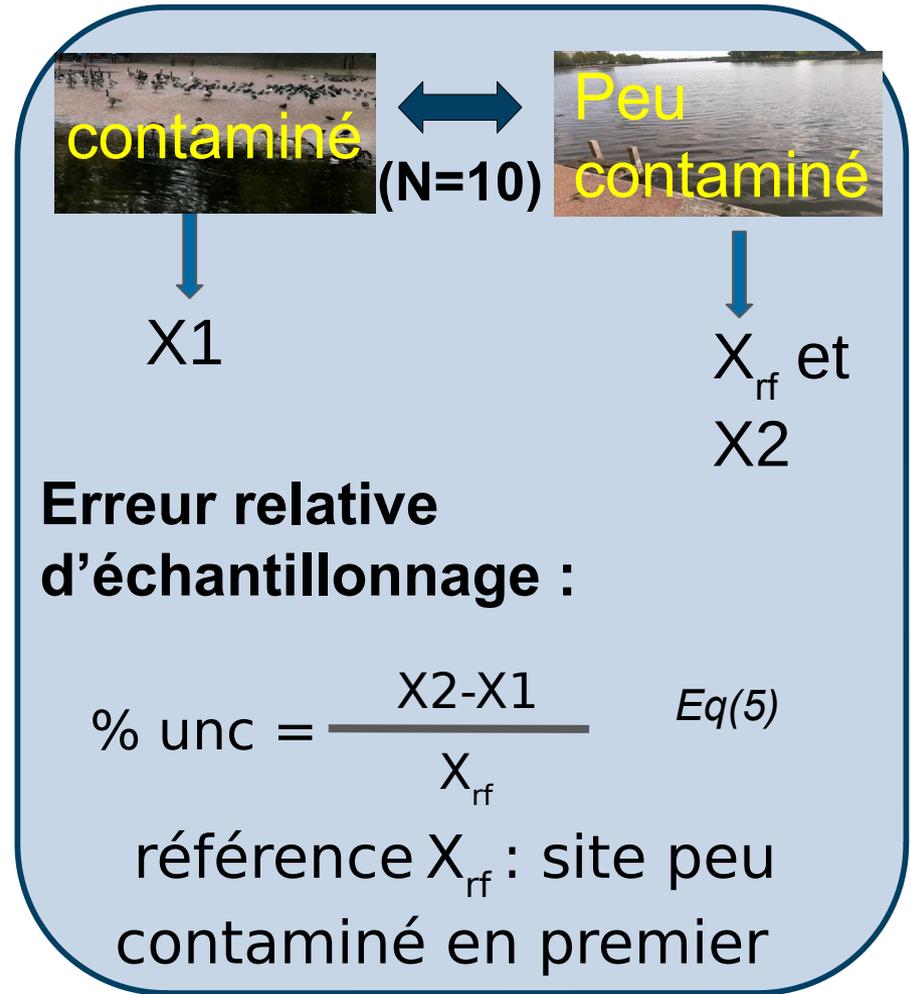
+



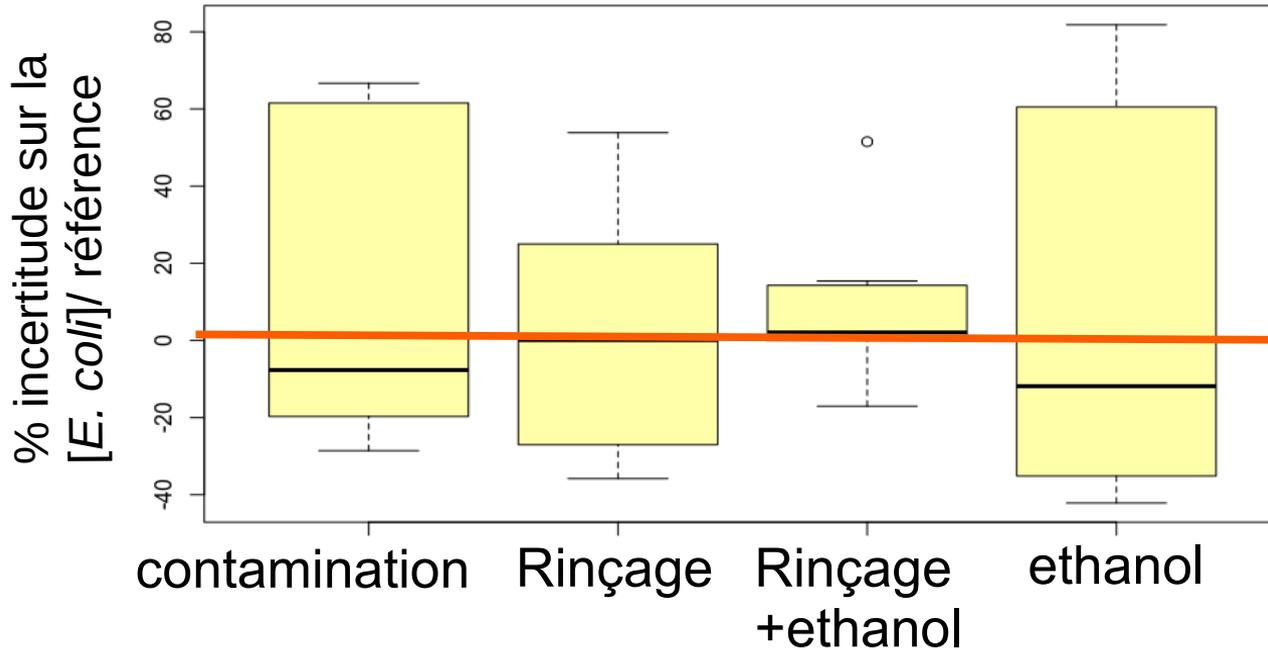
Lac de Créteil
Sites 1 et 2

10-15 min entre les prélèvements

(Esbensen et Wagner, 2014)



Estimation de l'incertitude (erreur relative d'échantillonnage)



3 traitements:

- rincé à l'eau du site 3 fois
- Rinçé à l'eau du site 3 fois puis stérilisation à l'éthanol
- Stérilisation à l'éthanol

Entre sites avec $1 \log_{10}$ d'écart

=> contamination possible d'un site pollué vers un site moins pollué

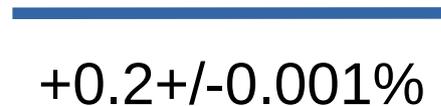
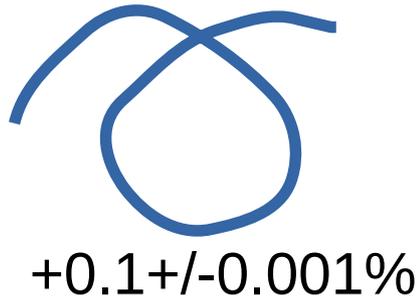
=> Rincer 3 fois à l'eau du site suffit

Incertitude liée aux contaminations résiduelles



2- Prélèveur automatique:

- Contamination entre les échantillons successifs très faible (*Galfi et al. 2014*)
 $\pm 7-8\%$ entre échantillons successifs lors d'une pluie (*McCarthy et al 2008*)
- Contamination $< 1\%$ dans la tubulure entre 2 pluies après 7 jours secs (*Hathaway et al 2014*)



(*Hathaway et al 2014*)

- Enlever la tubulure, rincer à l'eau sterile désionisée, autoclaver et réinstaller
- Rien, négligeable (*Hathaway et al. 2010; McCarthy et al 2008*)

Sites et procédures

Eaux de surface

La Villette - Pont de Crimée
Saint Maur - Quai de la pie



Référence:
Prélevement
manuel direct

Eaux de rejet pluvial

DO du Centre Urbain (Noisy-le-Grand)
Bassin de rétention des eaux pluviales
(Sucy-en-Brie)



Référence:
Prélevement
Ponctuel direct

Blancs : prélevement d'eau du robinet stérile

Nettoyage du
bol et du tuyau

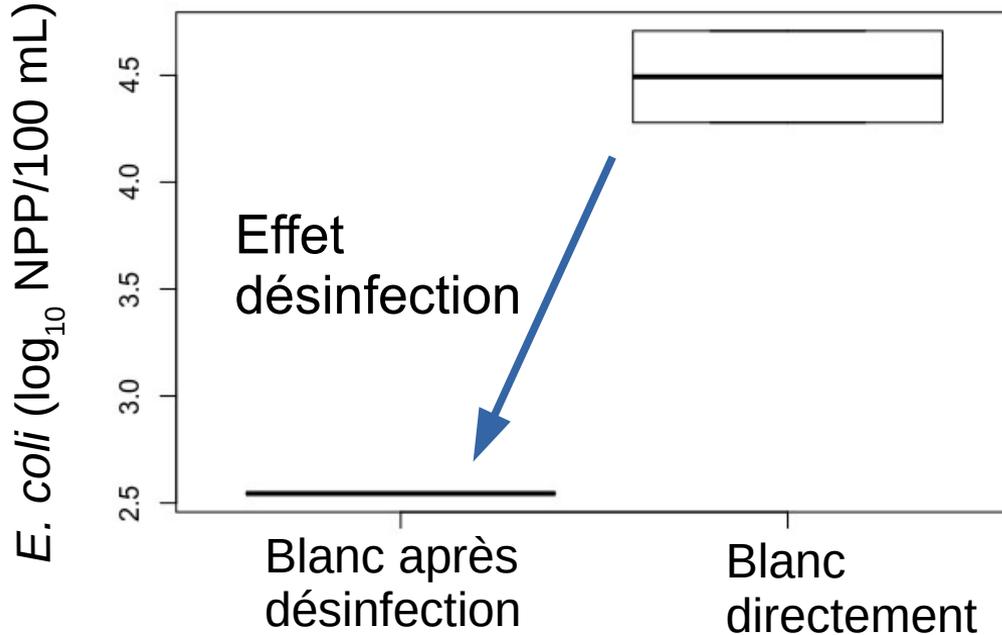


Rinçage : eau du robinet stérile

Désinfection : Javel 2 % +

Rinçage à l'eau du robinet stérile

Blancs : eau du robinet autoclavée et désinfection à la javel



Bassin de rétention des eaux pluviales de Sucy-en-Brie en temps sec:

$$[E. coli] = 5 \cdot 10^6 \text{ NPP/100 mL}$$

Contamination résiduelle en *E. coli*:

- élevée pour les eaux fortement contaminées

=> DO du Centre Urbain (77)

=> Bassin de Sucy-en-Brie

- Aucune pour les eaux de surface $< 2 \log_{10}$ NPP/100 ml

=> Bassin de la Villette

=> Quai de la Pie (St Maur-des-fossés)

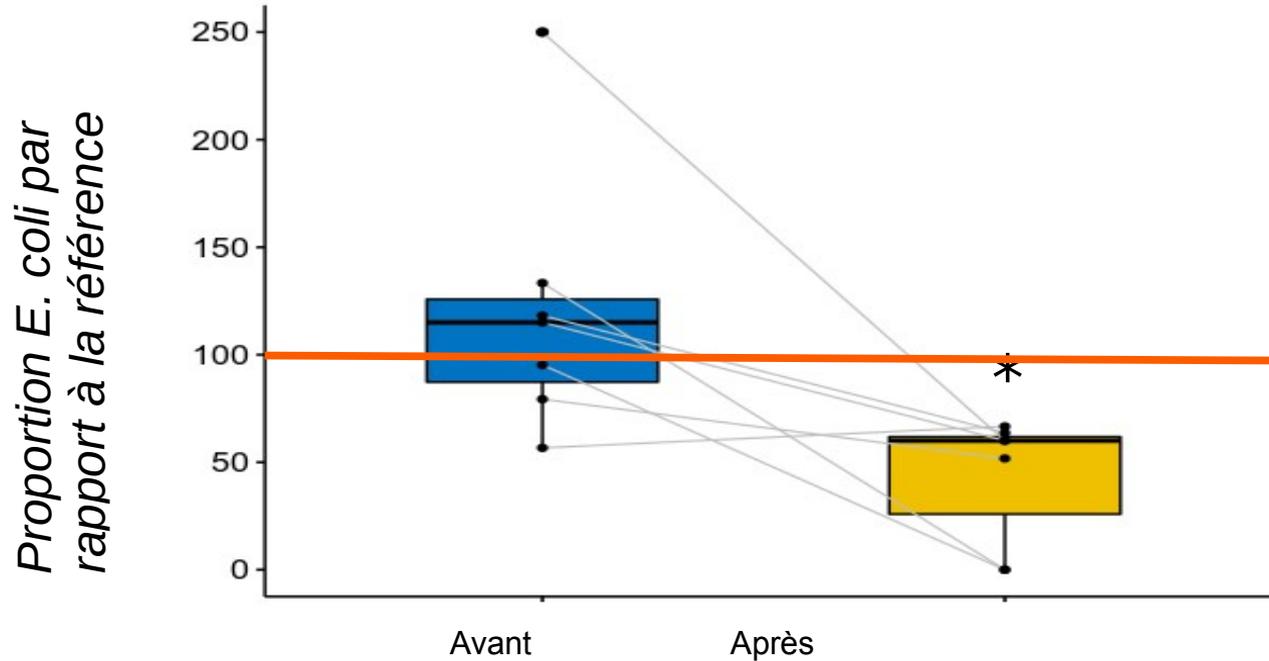
Blancs après nettoyage à l'eau du robinet autoclavée



Le rinçage est:
- suffisant pour les eaux de surface testées

- insuffisant pour les eaux de rejet pluvial en temps sec

Nettoyage : javel 2 % et rinçage eau du robinet stérile



Eaux de surface
Bassin de la
Villette
Wilcoxon apparié
N=6, $p < 0.05$

Attention à bien rincer si utilisation de javel!

Incertitude liée au transport et stockage de l'échantillon

**Effet
Transport,
Stockage ?**

Température
(5°C, ambiante)



Recommandation:

24h max à 10°C, si possible > 8h
Attention l'échantillon ne doit pas congeler

- Stockage 24h dans un préleveur non-réfrigéré : diminution légère des *E. coli* dans 2 sites/6
+13% jusqu'à 8h puis -22% à 24h

(McCarthy et al., 2008)

- >8h à température ambiante est possible

(Pope et al. 2003)

Effet Transport, Stockage?

Température
4°C, ambiante



Prélèvement par la meilleure technique
(becher ou pompe)

Froid durant le
transport?

Temps de stockage?

Prélèvement 1: OUI
glaciaire

➔ *Stockage
au frigo*

➔ 0.5h
6h
24h

Prélèvement 2: NON

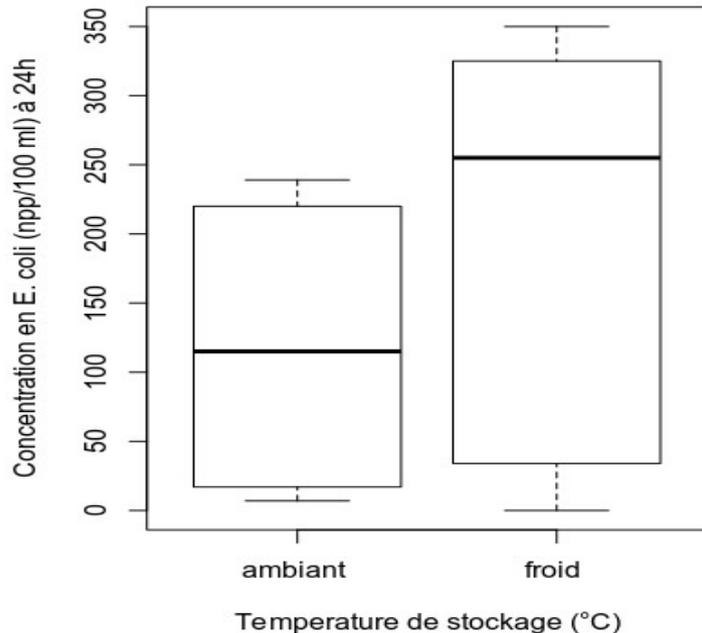
T°C ambiante 0.5h
6h

➔ *Stockage
au frigo*

➔ 24h



Température de stockage avant analyse



Après 0.5 h de transport
Et 6 h à température ambiante

Pas de différence significative

Pour *E. coli* et EI :

Test t et Wilcoxon apparié
(N=36 ; p=0.4; p=0.26)

=> En cas de nécessité il est possible
de transporter l'échantillon non réfrigéré

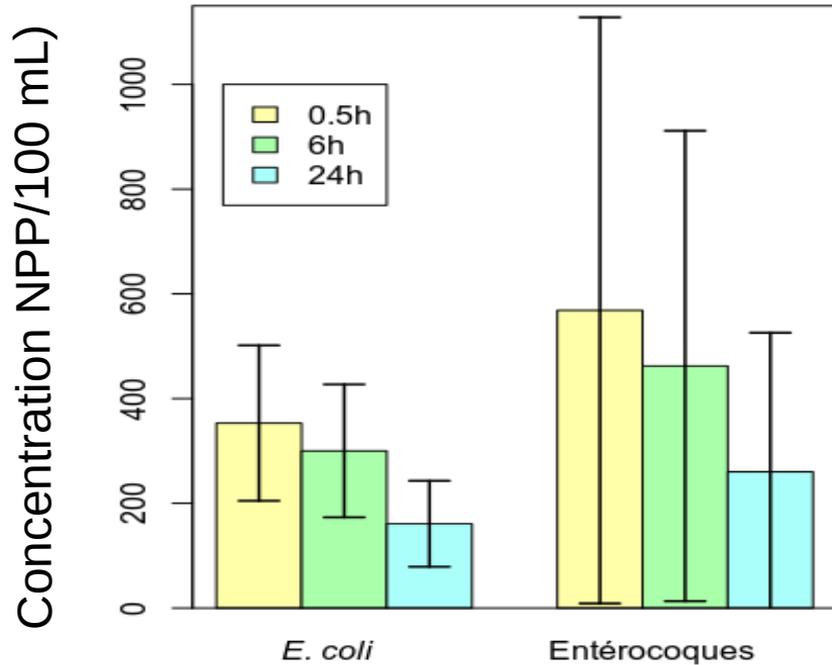
T° transport : $7.59 \pm 0.97^\circ\text{C}$

T° stockage : $5.03 \pm 0.61^\circ\text{C}$

T° amb extérieur : $16.84 \pm 2.33^\circ\text{C}$

T° amb laboratoire : $22.91 \pm 0.63^\circ\text{C}$

Temps de stockage au réfrigérateur avant analyse



Conclusion :
Analyser dans les 6 à 8 h

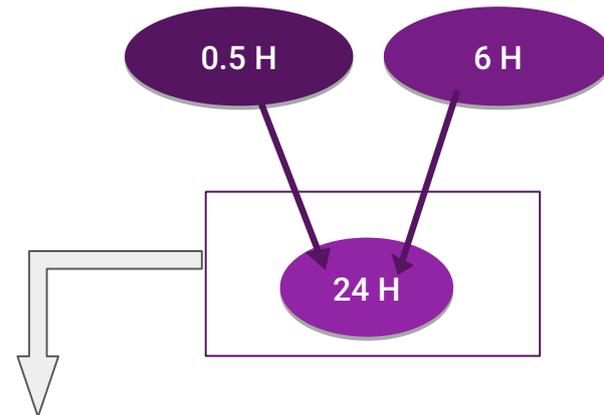
Analyse statistique :

E. coli et EI :

Test t et Wilcoxon apparié

(correction Bonferroni)

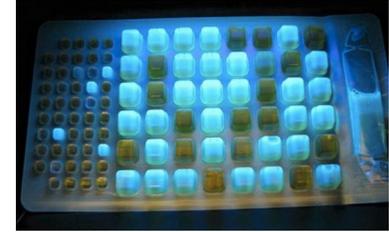
(N=36 ; p=0.007; p=0.006)



E. coli Décroissance significative
(N=24; p<0.05)

incertitude liée à l'analyse

- méthode d'ensemencement
microplaques MUG/MUD
Quantitray Colilert (IDEXX)



erreurs liées au:

=> volume de la prise d'essai

=> dilutions en série

=> au mélange

=> Norme pour préparer les dilutions pas toujours suivie (ISO 6887-1)

(Garre et al. 2019)

Incertaince liée à l'analyse: dépend des laboratoires => essais inter-labo
méthode Colilert

9 à 12% *(Noble et al. 2010)*

27 % *(IDEXX, 2004)*

22 ± 15% *(McCarthy et al. 2008)*

Temps d'incubation avant la lecture?

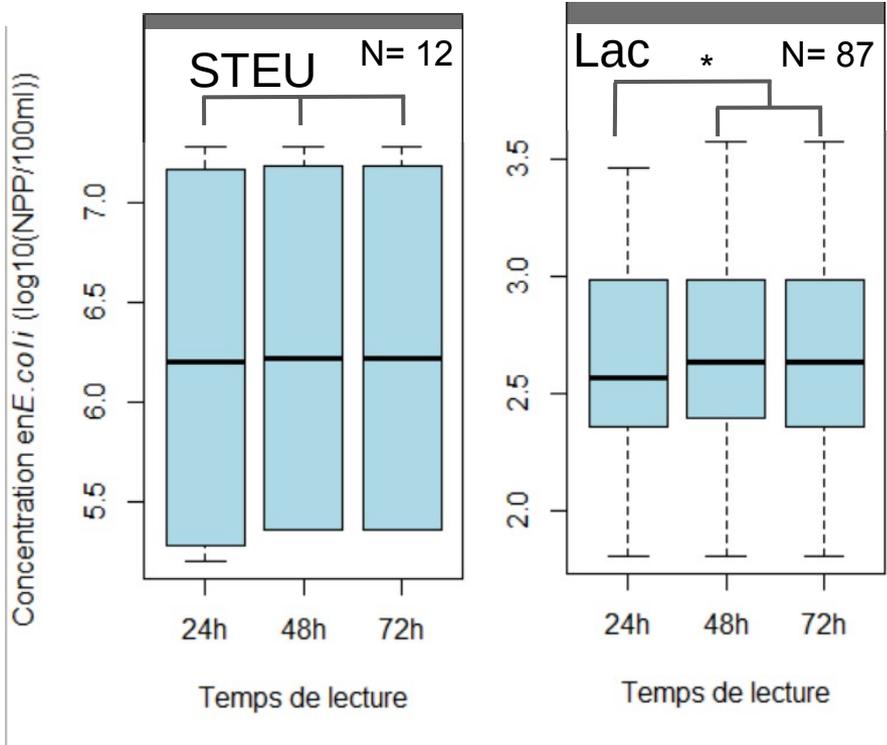
Norme :

36 à 72 heures
(ISO 9308-3 et ISO 7899-1)



Conclusion:

- Lecture à 48h
- Possible après 48h



(4 sites,
 $n=333$,
Wilcoxon et
test t
apparié)

- Pas de différence significative entre 48h et 72h
- Différence significative entre 24 et 48h pour les faibles concentrations

Conclusion

- L'échantillonnage, le transport et le stockage, l'analyse sont des sources d'incertitudes mais $<30\%$ pour *E. coli*
- La désinfection de l'équipement ne semble utile que pour les eaux résiduaires
- Un rinçage à l'eau du robinet stérile suffit pour les eaux de surfaces
=> à vérifier sur un site plus contaminé
- Pour les entérocoques:
=> Contamination résiduelle peut être plus longue

Réglementation sur l'échantillonnage => diminuer l'incertitude?

Directive 2006/7/CE

Normes:

NF EN ISO 19458: échantillonnage

FD T 90-521 (piscine et baignade)

FD T 90-523-1 (rivières et canaux)

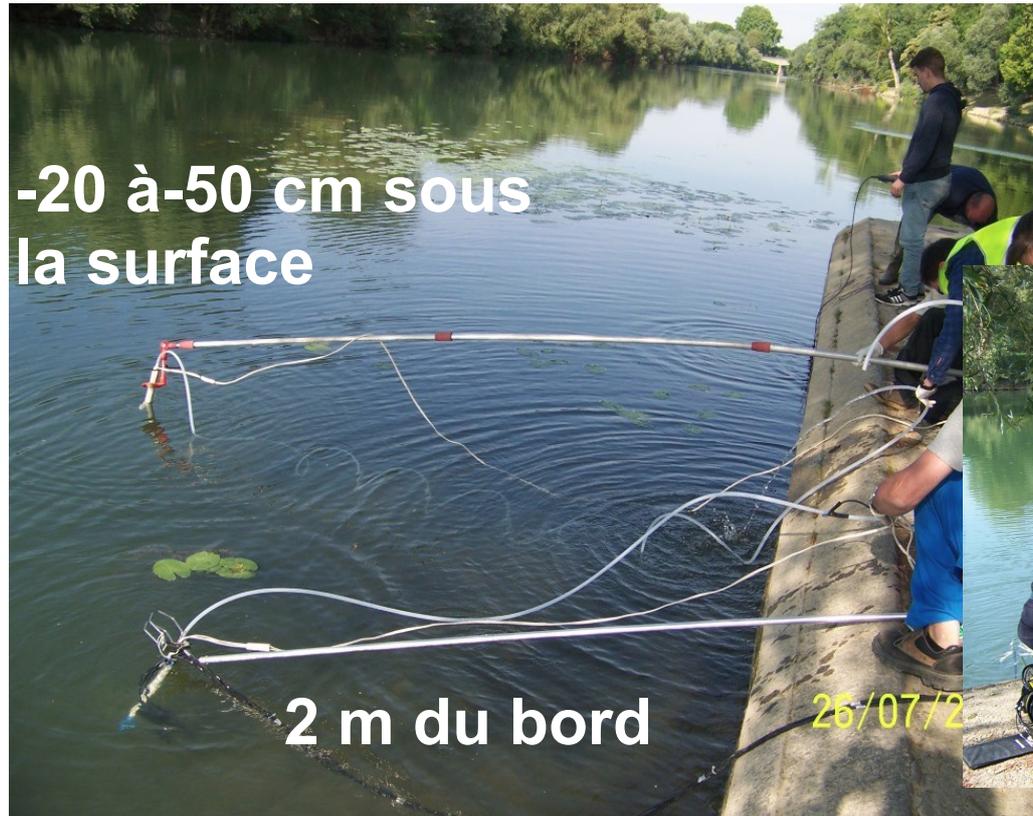
Guides: Agences de l'Eau

Loire Bretagne (AELB)

**=> des instructions précises et une certaine liberté
d'interprétation et d'adaptation**



Procédures variées mais des règles de base



Flaconnage minimum 250 ml stérile ou rincé 3 fois, équipement/tuyau propre



Transport et stockage:
~8h (max 24h) à 4-5°C

Retour d'expérience

Intercalibration entre les acteurs de suivi sur la Marne

Au site SMV1 (Chelles)

Du 26 juillet au 7 septembre 2017 à 10h,

5 campagnes coordonnées par les

Syndicat Marne Vive

- Syndicat Marne Vive

*Laboratoire départemental des eaux du
Val de Marne*

- **DSEA**, Conseil Départemental 94

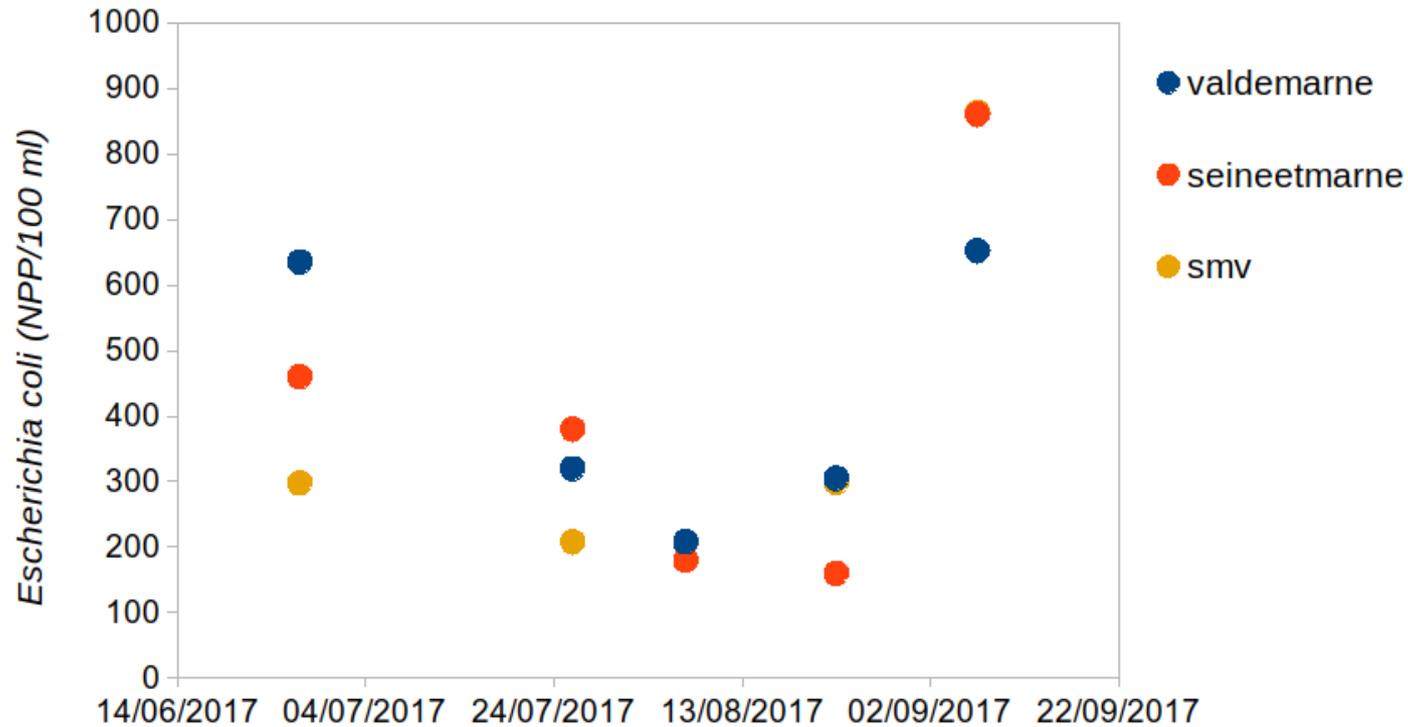
- **DEA**, Conseil Départemental 93

Eurofins

- **DGAA**, Conseil Départemental 77

*Laboratoire départemental d'analyse de
la Seine et Marne*





- *Escherichia coli*
- Entérocoques intestinaux
- NH_4^+
- MES

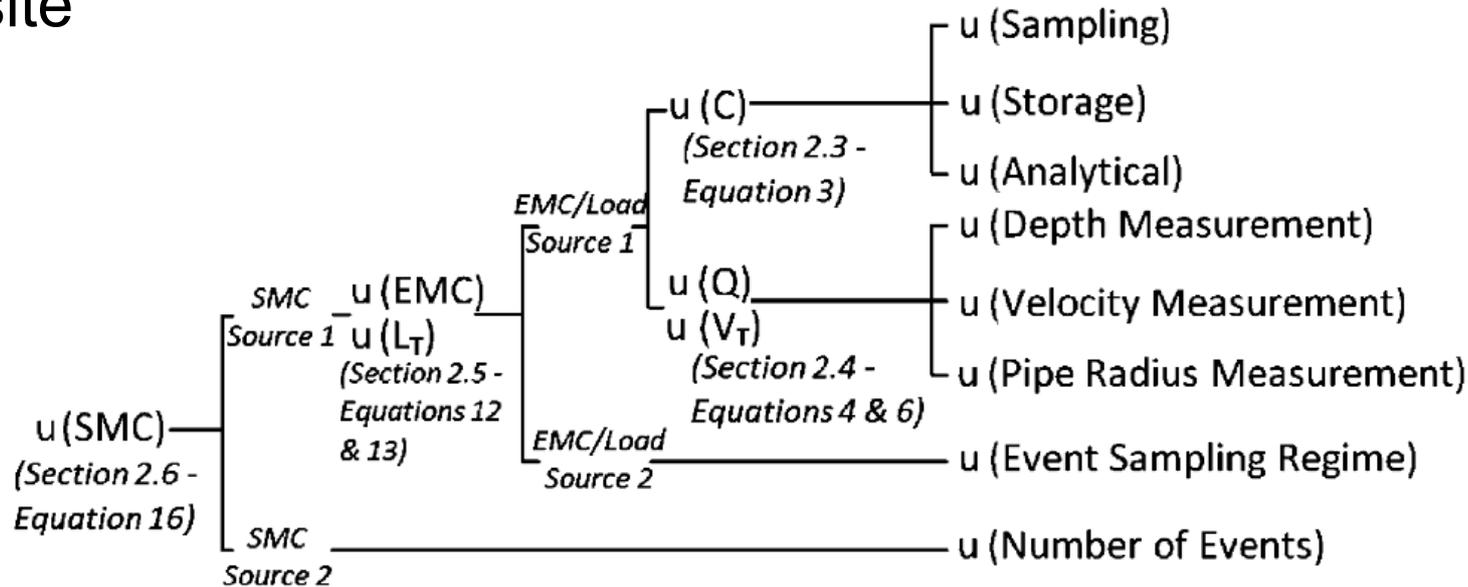
Des différences de protocole

Pas de différence significative entre les résultats des équipes

(Anova à mesures répétées, $p > 0.05$ pour l'effet manipulateur, modèle significatif et validé)

Sources et propagation de l'incertitude

Concentration en *Escherichia coli* dans un évènement pluvieux pour un site



Incertainitude sur l'échantillon contribue à 8% à l'évaluation de la concentration du site

=> incertitudes fortes sur la mesure du débit, du volume, intervalles de prélèvement, nombre d'évènements

(McCarthy et al., 2008)



C. Therial, M. Saad, M. Naloufi

Remerciements: dream team Leesu et collègues du Lissi qui donnent des coups de main

AFFAIRE A SUIVRE....

Remerciements:

Les équipes des CD-94, 93, et 77 : B. Adam, C. Langlais, P. Bouyer, E. Lopes Moco, C. Bouedo, J. Fournier, JM Nichols, R. Pouvreau, M. Gabet, V. Barnek, D. Ladsous, F. Courbe, MA Robert, A. Abbassi, T. Baudoux, Y. Pasquier, R. Dubois, G. Chamayou-Machet, E. Karleskind, F. Vandelannoote, J Paupardin, G. Belhomme, Z. Briec, P. Bompard, B. Rotstein, H. Gilet

Le syndicat Marne Vive: A. Janne

Le service des Canaux : T. Mareschal, O. Lalouette

Eau de Paris: Marion Goulet, S. Wurtzer, L. Moulin

Leesu: C. Paddirane, N. Rodrigues, M. Toutain

