

BACTERIOLOGIE

BACTERIOLOGY

CAMPAGNE 1998 – 2015

PAR

Stéphan RAMSEIER

SERVICES INDUSTRIELS DE GENÈVE – Pôle Environnement, CP 2777, CH-1211 GENEVE 2

RÉSUMÉ

Le programme de surveillance de base des eaux du Léman comprend également l'analyse de paramètres microbiologiques. Germes indicateurs de contaminations fécales (E. coli, entérocoques), flore hétérotrophe ainsi que coliformes totaux et spores de clostridies sulfite-réducteurs sont investigués le long de la colonne d'eau (à 15 profondeurs différentes) lors de deux campagnes annuelles : en fin de période hivernale, après homogénéisation (partielle ou totale) des eaux ainsi qu'en fin de période de stratification estivale. Les résultats obtenus pour les campagnes de 1998 à 2015 sont représentés et indiquent que la stratification thermique des eaux ralentit fortement la diffusion des matières fécales en-dessous (30 m) de la thermocline. Il n'en va pas de même pour les spores de bactéries (anaérobies) dont la survie est bien plus longue ; celles-ci sont mises en évidence à toutes les profondeurs. Après homogénéisation hivernale, les germes « indicateurs fécaux » sont également mis en évidence en profondeur. La flore hétérotrophe (germes totaux) par contre, semble obéir à une autre dynamique puisqu'elle est beaucoup plus représentée aux grandes profondeurs jusqu'à 300 m. Les analyses réalisées dans l'eau brute d'une installation de potabilisation sont présentées à fin de comparaisons et montrent l'importance de pouvoir disposer d'une eau provenant des couches situées en-dessous de la thermocline ainsi que d'un traitement désinfectant pour pallier aux épisodes de pompage d'eaux contaminées par des matières fécales. Devant la variabilité des résultats acquis pendant ces 18 ans, des tests statistiques ont été appliqués afin de corrélérer les résultats de certaines familles de bactéries (indicateurs fécaux, coliformes totaux).

ABSTRACT

The basic monitoring programme for Lake Geneva includes bacteriological parameters too. Fecal indicators (E. coli, enterococci), heterotrophic plate counts, total coliforms and sulfite-reducing bacteria spores were investigated at 15 different depths twice a year: at the end of the winter season after partial or total water homogeneity and at the end of summer when stratification of water layers is still effective. Results obtained from many campaigns (from 1998 to 2015) show that water thermal stratification strongly minimises the fecal matter dispersion below a depth of 30 m. On the other hand, the thermocline barrier is not effective against anaerobic clostridia spores detected all year round at all depths; an effect due to their long-lived vegetative form. After the water homogenization, fecal indicators bacteria were also detected at depth. Heterotrophic plate counts exhibit a different behaviour: they are mainly detected at great depth (going down to 300 m). Comparative analyses with untreated water abstracted from the lake by a drinking water treatment plant are also represented. They highlight the importance of abstracting water below the thermocline as well as disinfecting the water in order to avoid fecal contamination events. Faced with the high variability of microbiological results, statistical tests were used to correlate some bacteria families (e.g. fecal indicators, total coliforms).

1. INTRODUCTION

Dans le cadre de l'auscultation du Léman, des prélèvements destinés à des analyses microbiologiques ont lieu deux fois par an au point SHL2 dans le but de maintenir une surveillance de la qualité hygiénique de la zone pélagique du lac en complément des investigations physico-chimiques réalisées à ces mêmes occasions. Ces mesures représentent donc un volet différent de celles réalisées pour la qualité des eaux de baignade. Le présent rapport fait état des résultats obtenus lors des campagnes menées de 1998 à 2015 incluses. De précédents rapports (REVACLIÉ *et al.*, 1996, REVACLIÉ, 1984) traitaient des campagnes antérieures soit de 1957 à 1995.

2. ÉCHANTILLONNAGE

2.1. PRÉLÈVEMENTS

Tout au long de ces campagnes, les prélèvements ont été réalisés à SHL2 deux fois par an. La première fois dans le courant des mois de mars-avril, c'est-à-dire après le brassage hivernal éventuel et la seconde en automne à la fin de la période de stratification thermique soit dans le courant des mois de septembre-octobre. Ils ont été réalisés à 15 profondeurs différentes :

0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 275 et 300 mètres de profondeur.

La technique de prélèvement consiste à échantillonner l'eau aux différentes profondeurs à l'aide d'un appareil de type « Van Dorn ». L'échantillon d'un volume de 7 L est ensuite incorporé dans des flacons stériles dédiés aux analyses microbiologiques. Des détails sont donnés dans (REVACLIÉ, 1996). Les échantillons d'eau sont recueillis en flacons stériles et conservés en glacière, à l'obscurité jusqu'au moment de l'analyse. Les analyses ont été réalisées par le Service de la consommation et des affaires vétérinaires (SCAV) du canton de Vaud à Epalinges.

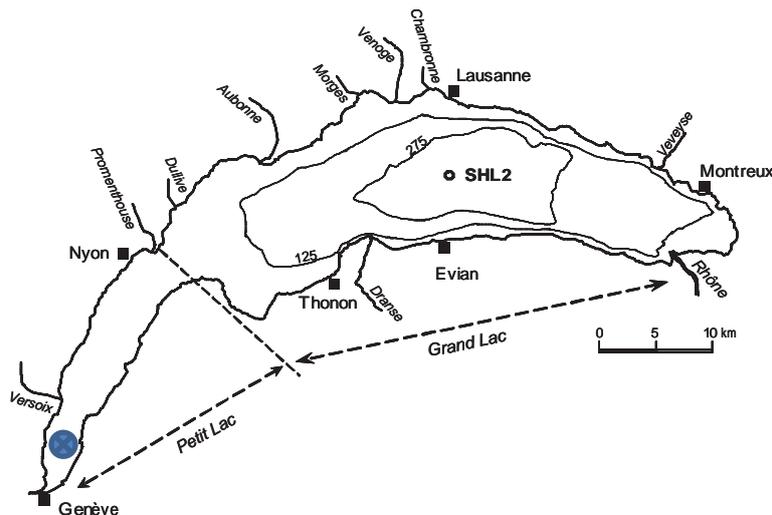


Figure 1 : Situation des points de prélèvement : station SHL2 et crépine

Figure 1 : Location of the sampling sites : SHL2 and strainer head

2.2. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Les méthodes d'analyse des bactéries sont indiquées ci-dessous. Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant des colonies par unité de volume: habituellement le mL pour les germes aérobies mésophiles (UFC/mL) ou le litre pour les autres bactéries étudiées (UFC/L).

Germes aérobies mésophiles (dénommés aussi germes totaux)

Incorporation dans la masse au moyen d'une pipette jaugée de 1 mL ou 0.1 mL de l'échantillon au sein d'une gélose nutritive additionnée de glucose (PCA : Plate Count Agar) permettant la croissance de tous les germes aérobies sans sélection. Incubation à 30 °C durant 10 jours puis comptage des colonies visibles à l'œil nu. Résultats rapportés pour être exprimés en UFC/mL avec une limite inférieure fixée à 1 UFC/mL.

Les bactéries mises en évidence par ce mode opératoire sont considérés comme des germes parfois appelés aussi « flore hétérotrophe » flore qui nécessite une température moyenne et des conditions aérobies pour croître ; la température d'incubation permet de favoriser les micro-organismes provenant de l'homme et des homéothermes. Il est indispensable de ne considérer les résultats acquis qu'en regard des conditions de culture précitées. Ces dernières influencent d'ailleurs fortement les résultats suivant le mode d'incorporation de l'échantillon, le contenu et la richesse nutritive du milieu de culture ainsi que la température et la durée d'incubation, facteurs qui varient d'une procédure (et des normes) à l'autre. De surcroît, ces germes, dénommés parfois sous l'appellation erronée de « germes totaux » ne représentent qu'une faible fraction de la flore réellement présente (de l'ordre de 1 % voire inférieure). Il n'existe aucune relation entre leur énumération et le nombre de pathogènes susceptibles d'être rencontrés. Toutefois, on suppose que l'incidence des pathogènes est proportionnelle à la population bactérienne en général.

Escherichia coli (E. coli)

Méthode des membranes filtrantes : filtration dans des conditions stériles d'un volume de 10 mL de l'échantillon au travers d'une membrane de porosité 0.45 µm. Reviviscence des germes au moyen d'une pré-incubation durant 2 à 4 heures à 37 °C de la membrane sur un milieu TSA (Tryptose Soja Agar). Enfin sélection par transfert de la membrane sur un milieu gélose TBX à 44 °C durant 10-20 h. Après comptage les résultats sont exprimés en UFC/L. Le résultat est reporté comme étant zéro si aucune colonie n'a poussé sur la membrane (< 100 UFC/L).

E. coli fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* et est une bactérie présente en grand nombre chez tous les animaux homéothermes ainsi que dans les matières fécales humaines (de l'ordre de 10⁷ à 10⁹ unités par gramme de selle, poids sec). Sa mise en évidence - en nombre élevé, elle détermine une contamination récente - indique que l'échantillon est contaminé par des matières fécales car cette bactérie ne se multiplie pas dans l'environnement et son origine est univoque. C'est l'un des meilleurs indicateurs de routine à l'échelon international dont la présence indique la présomption de pathogènes transmissibles par la voie féco-orale.

Entérocoques (Streptocoques fécaux)

Méthode des membranes filtrantes : filtration dans des conditions stériles d'un volume de 100 mL de l'échantillon au travers d'une membrane de porosité 0.45 µm. Reviviscence des germes au moyen d'une incubation durant 24 à 48 heures à 37 °C de la membrane sur un milieu sélectif Compass m-Enterooccus agar. Après comptage les résultats sont exprimés en UFC/L. Le résultat est reporté comme étant zéro si aucune colonie n'a poussé sur la membrane (< 10 UFC/L).

Les entérocoques regroupent des germes du genre *Enterococcus* ainsi que quelques espèces du genre *Streptococcus*. Pour être qualifiés de fécaux, ils doivent être porteurs de l'antigène du groupe D de la classification de Lancefield (BERGEY, 1974). De forme sphérique (coques), disposés en chaînettes, ils ont également une origine liée aux matières fécales mais sont présents en moins grand nombre (de l'ordre de 10⁵ à 10⁷ unités par gramme de selle, poids sec) ; en contrepartie, les entérocoques résistent mieux aux agressions environnementales (dessiccation par exemple) et leur survie dans les eaux douces est supérieure à celle des coliformes (BOEHM & SASSOUBRE, 2014) bien qu'ils soient excrétés en nombre plus faible que ceux-ci. Leur présence unique trahit une contamination fécale ancienne et ce sont alors souvent les seuls indicateurs décelables quand on s'éloigne de la source de pollution.

Coliformes totaux

Méthode des membranes filtrantes : filtration dans des conditions stériles d'un volume de 1 mL de l'échantillon au travers d'une membrane de porosité 0.45 µm. Reviviscence des germes au moyen d'une incubation durant 24 heures à 37 °C de la membrane sur le milieu d'Endo. Après comptage les résultats sont exprimés en UFC/L. Le résultat est reporté comme étant zéro si aucune colonie n'a poussé sur la membrane (< 100 UFC/L).

Les coliformes totaux sont un groupe hétérogène de bactéries telluriques gram négatif aérobies ou anaérobies qui se rencontrent non seulement dans les matières fécales (en majorité) mais également dans l'environnement. Dès lors, ce ne sont pas des indicateurs fécaux au sens strict puisque ce groupe renferme également des bactéries d'autres provenances. S'ils sont capables de se multiplier dans l'environnement, un dénombrement important est presque toujours le signe d'une contamination fécale, contamination qu'il est préférable de confirmer par la mesure des coliformes dits « fécaux ».

Clostridium sulfito-réducteur

Méthode des membranes filtrantes : filtration dans des conditions stériles d'un volume de 100 mL de l'échantillon au travers d'une membrane de porosité 0.45 µm. Reviviscence des germes au moyen d'une incubation en milieu anaérobie durant 48 heures à 37 °C de la membrane sur milieu TSC Agar Base. Après comptage les résultats sont exprimés en UFC/L. Le résultat est reporté comme étant zéro si aucune colonie n'a poussé sur la membrane (< 10 UFC/L).

Ces clostridies sont caractéristiques des bactéries anaérobies telluriques appartenant à la famille des *Bacillaceae* et au genre *Clostridium*. Gram positif, elles produisent des spores de résistance, forme sous laquelle on les trouve dans l'eau ou en milieu aérobie. Elles se rencontrent fréquemment dans les sols, les sédiments et le tractus intestinal de l'homme (et des animaux à sang chaud), même en bonne santé. Elles sont utiles pour diagnostiquer l'influence d'eaux usées mais peuvent donner lieu à de fausses interprétations du fait de leur résistance dans l'environnement. La germination des spores n'intervient du reste qu'en milieu anaérobie strict.

2.3. CALCUL DES MOYENNES PONDÉRÉES

Les moyennes annuelles pondérées sont calculées de façon identique que pour les paramètres physico-chimiques (BLANC *et al.*, 1996) et conformément à ce qui avait déjà été réalisé antérieurement (REVACLIÉ *et al.*, 1996) à savoir que celles-ci tiennent compte du volume de chaque couche d'eau où la mesure microbiologique a été réalisée ainsi que des deux campagnes annuelles. Certaines années cependant, une unique campagne a eu lieu (ces années sont soulignées dans le tableau 1).

2.4. TEST STATISTIQUE

Afin de comparer les résultats entre indicateurs différents ou entre les prélèvements réalisés à différentes périodes, il a été fait usage du test des rangs signés de Wilcoxon. La raison de l'utilisation de ce test est que les données ne remplissaient pas souvent les conditions de tests paramétriques : données disparates et offrant des contrastes marqués, inhomogénéité des variances des deux périodes étudiées, distribution des résultats non symétriques. Le test des rangs signés de Wilcoxon a été réalisé au seuil de signification de 5% de façon unilatérale sauf indication contraire. A noter qu'avec le test de Wilcoxon et contrairement à bien d'autres, l'hypothèse nulle (H0) n'est rejetée que si la valeur calculée est inférieure à la valeur critique des tables.

3. RESULTATS

3.1. FLORE AÉROBIE MÉSOPHILE

Le précédent article (REVACLIÉ *et al.*, 1996) se basait sur une fréquence mensuelle de mesures et permettait ainsi de calculer une moyenne annuelle pondérée par les volumes des différentes couches aux profondeurs investiguées. Pour la série 1998-2015, nous ne disposons que de deux prélèvements par année, réalisés de surcroît au printemps et en début d'automne. La figure 2 montre les résultats annuels (moyennes pondérées par les volumes des différentes profondeurs). La richesse de la flore est, en moyenne, de l'ordre de quelques centaines de micro-organismes par mL.

L'année 2009 (campagne du 9 septembre) se distingue des autres par une flore bien plus abondante au sein des couches d'eau de 30 à 300 m. Bien que plus de 2'300 UFC/mL ont été dénombrés en moyenne (15'000 UFC/mL à la profondeur de 100 m) par exemple, des valeurs supérieures avaient déjà été mise en évidence lors de l'étude précédente : par exemple, 4'800 UFC/mL en 1968. Cependant, les conditions d'incubation n'étaient pas identiques (20 °C durant 10 jours) et donc les anciennes mesures ne sont malheureusement pas comparables.

Il n'a pas été possible d'établir une explication plausible pour ces résultats du 9 septembre 2009. Aucune corrélation n'a pu être établie avec l'efficacité et la profondeur des brassages hivernaux. Le brassage de l'hiver 2008-2009 n'a atteint qu'une profondeur de 150 m alors que les brassages des hivers 2004-2005 et 2005-2006 étaient complets dans l'intégralité de la couche d'eau tout comme en 2011-2012 ; ceux-ci ne génèrent pas une flore plus riche que les autres années. Aussi, ces valeurs élevées en 2009 sont peut-être à mettre sur le compte d'une manipulation non exempte de contaminations. La flore aérobie mésophile est présente en grand nombre sur la plupart des objets de la vie courante ainsi que sur les mains des opérateurs ; l'expérience montre qu'il est malheureusement facile d'obtenir de faux positifs ne serait-ce que dans le cas où les dispositifs d'échantillonnage ne sont pas stériles par exemple.

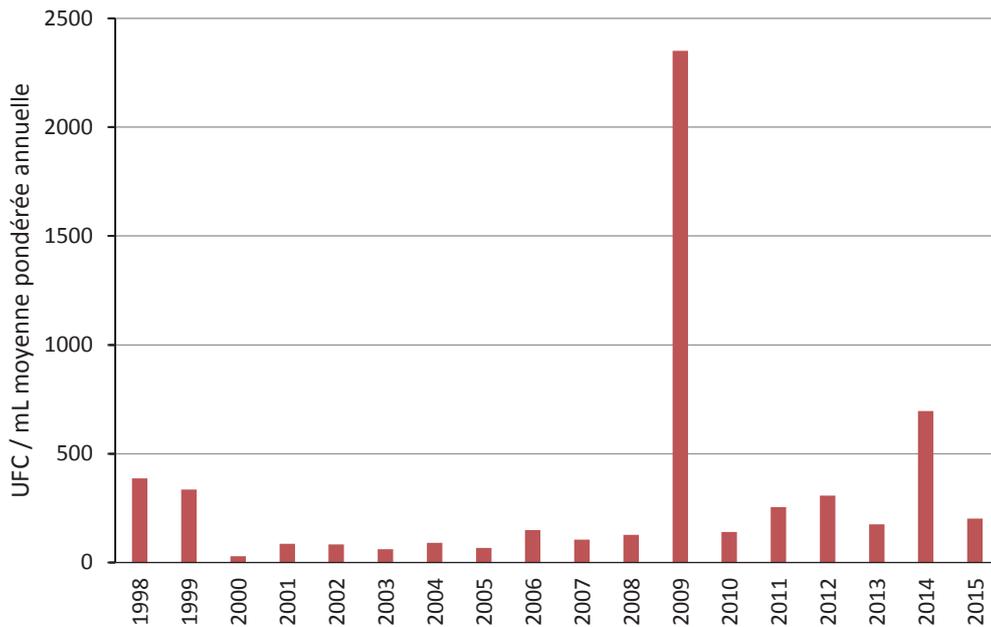


Figure 2 : Moyenne annuelle pondérée pour 15 profondeurs des germes aérobies mésophiles (30 oC – 10 jours) dénombrés au centre du Léman (SHL2) de 1998 à 2015.

Figure 2 : Weighted average (15 depths) in heterotrophic plate counts (30 oC – 10 days) investigated in the center of Geneva Lake (SHL2) from 1998 to 2015.

Il est dès lors plus intéressant de s'intéresser aux éventuels contrastes entre le lac présentant des couches plus ou moins homogénéisées (mars) avec les résultats obtenus en fin d'été quand la stratification thermique est encore établie. La figure 3 permet de constater que la flore hétérotrophe est peu nombreuse et homogène jusqu'à une profondeur de 50 m et qu'en deçà, la reviviscence bactérienne est nettement plus élevée, notamment en automne.

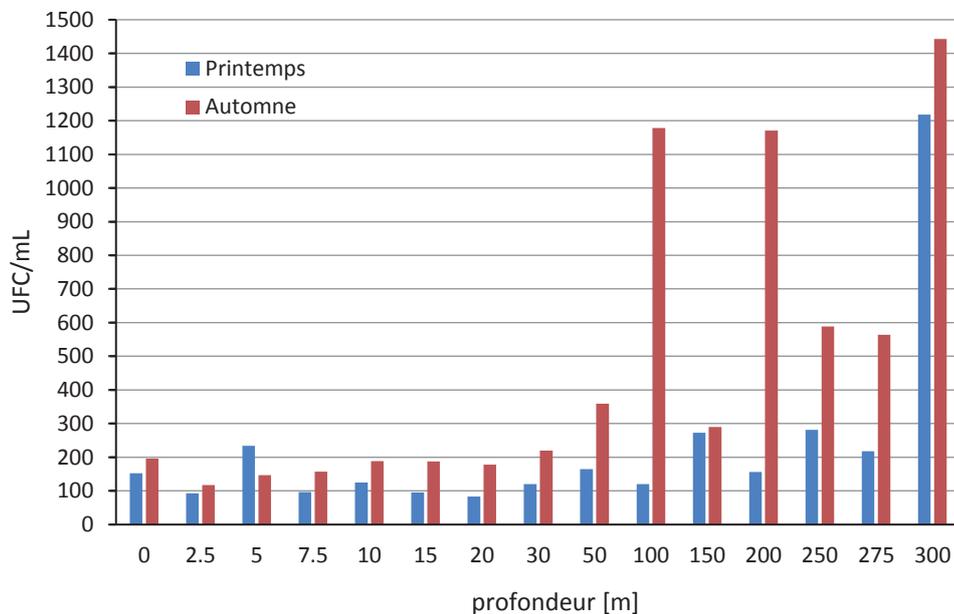


Figure 3 : Moyennes saisonnières des germes aérobies mésophiles (30 oC – 10 jours) dénombrés au centre du Léman (SHL2) de 1998 à 2015 pour 15 profondeurs lors du printemps et de l'automne.

Figure 3 : Seasonal averages in heterotrophic plate counts (30 oC – 10 days) investigated in the center of lake Geneva (SHL2) from 1998 to 2015 at 15 depths during spring and fall.

La conclusion du test statistique avec comme hypothèse alternative : « énumération supérieure en automne par rapport au printemps » indique qu'il faut accepter celle-ci: la valeur obtenue $W=6$ est plus basse que la valeur critique $W(15)=30$, $p < 0.05$. La raison qui peut être invoquée pour ce comportement saisonnier est que la flore hétérotrophe – dont les nutriments sont exclusivement constitués de matières organiques – trouve évidemment plus de carbone pour son accroissement dans les profondeurs. La température de l'eau (plus chaude dans et au-dessus de la thermocline) est également un facteur qui a une influence positive sur la multiplication de cette flore bactérienne dont la température de croissance en laboratoire est de 30 °C, cependant, il n'y a pas la mise en évidence d'une richesse supérieure en germes dans les couches peu profondes ni en surface.

3.2. ESCHERICHIA COLI ET COLIFORMES TOTAUX

Les figures 4 et 5 montrent les résultats pour *E. coli* et pour la famille mère (coliformes totaux) à laquelle cette espèce indicatrice de contamination fécale appartient. Il est donc logique de penser que les résultats affichent systématiquement un nombre supérieur de coliformes totaux que d'*E. coli* ce qui est le cas pour la quasi-totalité des résultats obtenus (excepté l'année 1998). Les analyses des coliformes totaux se sont interrompues dès 2004 (cet indicateur n'étant pas strictement corrélé aux pollutions fécales peut donner lieu à des interprétations erronées), aussi la figure 5 ne reflète qu'un nombre limité à 10 campagnes ; une unique campagne ayant même eu lieu certaines années !

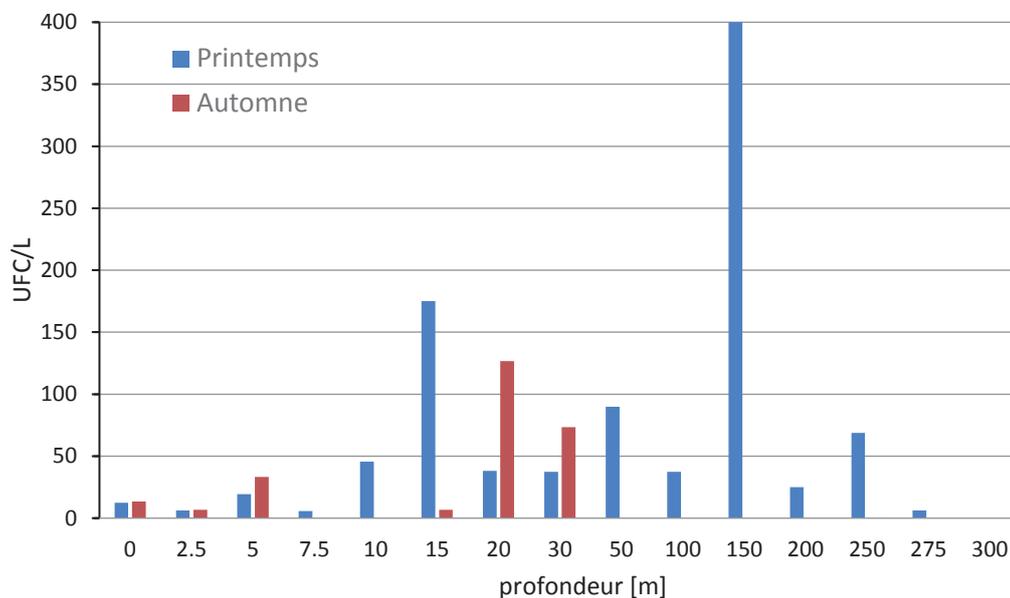


Figure 4 : Moyennes saisonnières des Escherichia coli dénombrés au centre du Léman (SHL2) de 1998 à 2015 pour 15 profondeurs lors du printemps et de l'automne.

Figure 4 : Seasonal averages in Escherichia coli investigated in the center of lake Geneva (SHL2) from 1998 to 2015 at 15 depths during spring and fall.

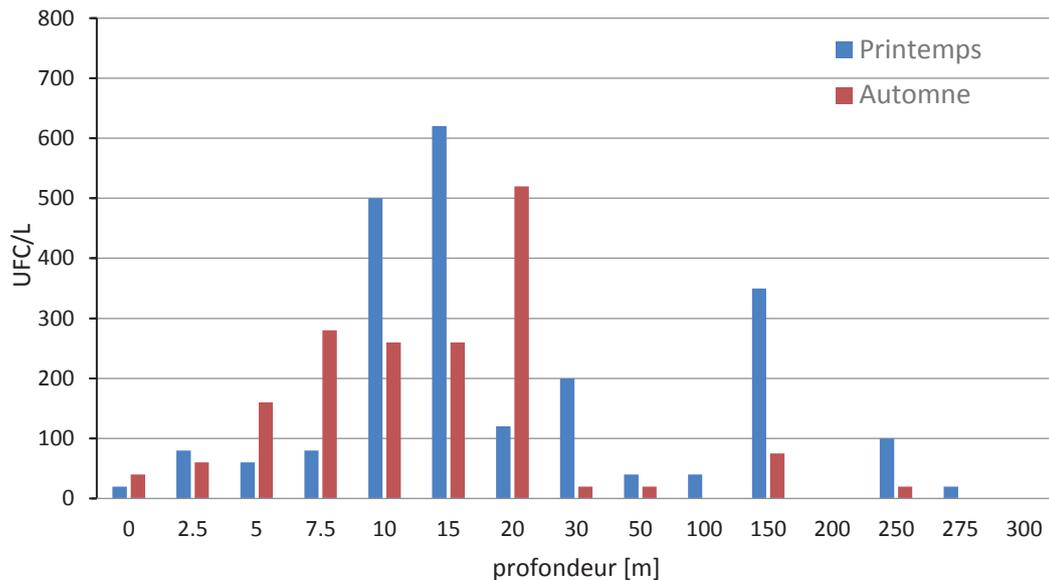


Figure 5 : Moyennes saisonnières des coliformes totaux dénombrés au centre du Léman (SHL2) de 1998 à 2004 pour 15 profondeurs lors du printemps et de l’automne.

Figure 5 : Seasonal averages in total coliforms investigated in the center of lake Geneva (SHL2) from 1998 to 2004 at 15 depths during spring and fall.

Les figures 4 et 5 mettent clairement en évidence que lors de la stratification estivale du lac, les deux indicateurs ne sont présents que dans la couche allant de la surface à 20-30 m uniquement et non pas dans les couches plus profondes (en dessous de la thermocline). Les coliformes totaux n’étant pas indubitablement liés qu’à la présence de contaminants fécaux, leur timide apparition au-delà de 30 m est peut-être à mettre sur le compte d’une source naturelle.

En revanche, lors de l’homogénéisation hivernale du lac, on note la présence de ces deux indicateurs bactériens à presque toutes les profondeurs hormis le fond du lac où ils ne sont pas décelés.

Les constats précédents sont étayés par les tests statistiques. En ce qui concerne l’espèce *E. coli*, la conclusion du test avec pour hypothèse alternative : « plus grande richesse au printemps qu’en automne » indique qu’il faut accepter celle-ci : la valeur obtenue $W=23$ est plus basse que la valeur critique $W(14)=25$, $p < 0.05$. Il n’en va pas de même avec la famille des coliformes totaux où l’hypothèse nulle ne peut être rejetée puisque la valeur obtenue $W=31.5$ est supérieure à la valeur critique $W(13)=21$, $p < 0.05$ montrant ici que les deux distributions ne peuvent être distinguées car cette « large famille » de bactéries n’est pas exclusivement l’apanage d’apports de matières fécales. De surcroît, la statistique n’est basée que sur un nombre restreint de campagnes (10 au total) alors qu’il ascende à 31 pour les autres germes étudiés.

Enfin nous avons voulu corréliser la présence d’*E. coli* avec les autres micro-organismes de sa famille en tenant compte des moyennes annuelles pondérées pour ces deux indicateurs. Afin de disposer d’un échantillon de données plus étendu, nous avons comparé les mesures pour une période allant de 1986 à 2004 (1996, 1997, 1998 exceptés car il n’y a pas de résultats pour les deux premières et en 1998, la numération des coliformes fut inférieure à celle de *E. coli* !). La figure 6 qui permet une comparaison visuelle fait état toutefois de toutes les mesures disponibles entre 1986 et 2015. Le test réalisé montre que l’on peut conserver l’hypothèse nulle : valeur W obtenue=135, $W(16)=35$, $p < 0.05$. Il n’y a pas de différence significative entre les distributions de coliformes totaux et d’*E. coli* au seuil considéré (5%). L’analyse statistique - réalisée sur un échantillon suffisant - démontre bien un lien entre la présence de coliformes (totaux) et *E. coli* et ce lien est leur introduction simultanée par le biais de matières fécales.

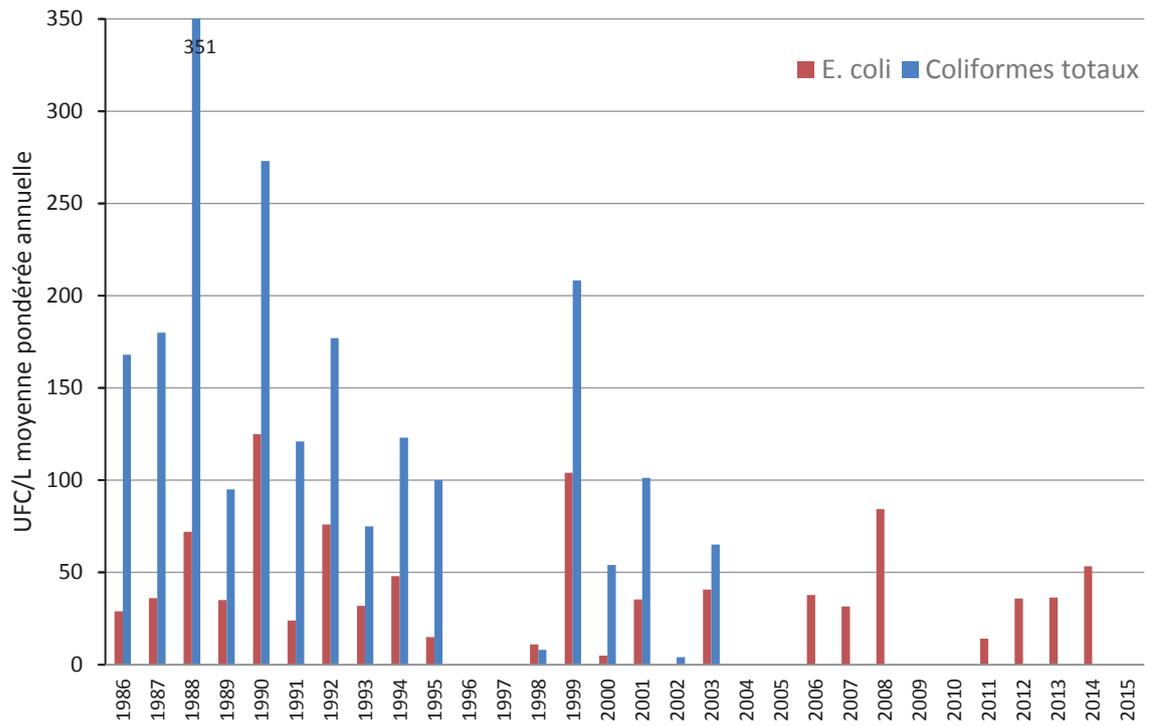


Figure 6 : Comparaison du nombre de coliformes totaux et d'E. coli (moyennes pondérées annuelles pour 15 profondeurs) dénombrés au centre du Léman (SHL2) de 1986 à 2015. Plus de suivi des coliformes totaux dès 2005.

Figure 6 : Comparison between total coliforms with E. coli (annual weighted averages at 15 depths) investigated in the center of Geneva lake (SHL2) from 1986 to 2015. No more total coliforms investigations since 2005.

3.3. ENTÉROCOQUES

La figure 7 montre les résultats du dénombrement des entérocoques lors des deux saisons étudiées.

A l'instar des observations faites pour les coliformes totaux et *E. coli*, on note une densité plus élevée de cet indicateur de contamination fécale au printemps. Il est pourtant d'une sensibilité plus faible que les précédents puisque le dénombrement d'entérocoques est systématiquement inférieur. Durant la phase où les eaux sont homogénéisées, les entérocoques colonisent toutes les profondeurs alors que des mesures plus contrastées apparaissent quand le lac est stratifié. Le nombre maximum d'entérocoques étant observé pour la couche d'eau qui se situe entre 20 et 30 m tout comme c'est le cas pour les deux indicateurs précédents. La conclusion du test statistique avec comme hypothèse alternative : « plus grande richesse en automne qu'au printemps » indique qu'il faut accepter celle-ci : la valeur obtenue $W=22$ est plus basse que la valeur critique $W(14)=25$, $p < 0.05$.

Enfin tout comme pour le binôme [*E. coli* vs. coliformes totaux] nous avons voulu corrélérer la présence des entérocoques avec *E. coli*, tous deux étant des indicateurs stricts de contamination fécale. La figure 8 permet une comparaison visuelle. Le test réalisé montre que l'on doit rejeter l'hypothèse nulle : valeur obtenue $W=10$, $W(17)=34$, $p < 0.05$ et donc qu'il n'y a pas de lien entre ces deux indicateurs. La différence tient au fait que pour plusieurs années (2001, 2003, 2006, 2008, 2013), les entérocoques sont tout de même détectés (car plus résistants) bien que rejetés en quantités plus faibles contrairement à *E. coli* qui n'est pas mis en évidence et ce à toute profondeur.

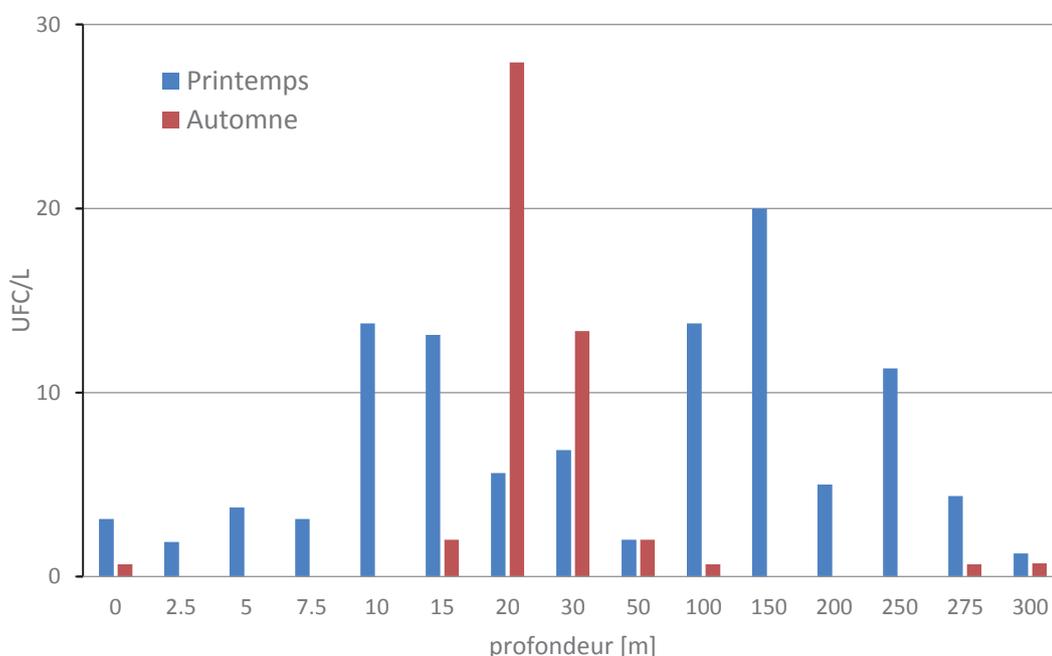


Figure 7 : Moyennes saisonnières des entérocoques dénombrés au centre du Léman (SHL2) de 1998 à 2015 pour 15 profondeurs lors du printemps et de l'automne.

Figure 7 : Seasonal averages in enterococci investigated in the center of lake Geneva (SHL2) from 1998 to 2015 at 15 depths during spring and fall.

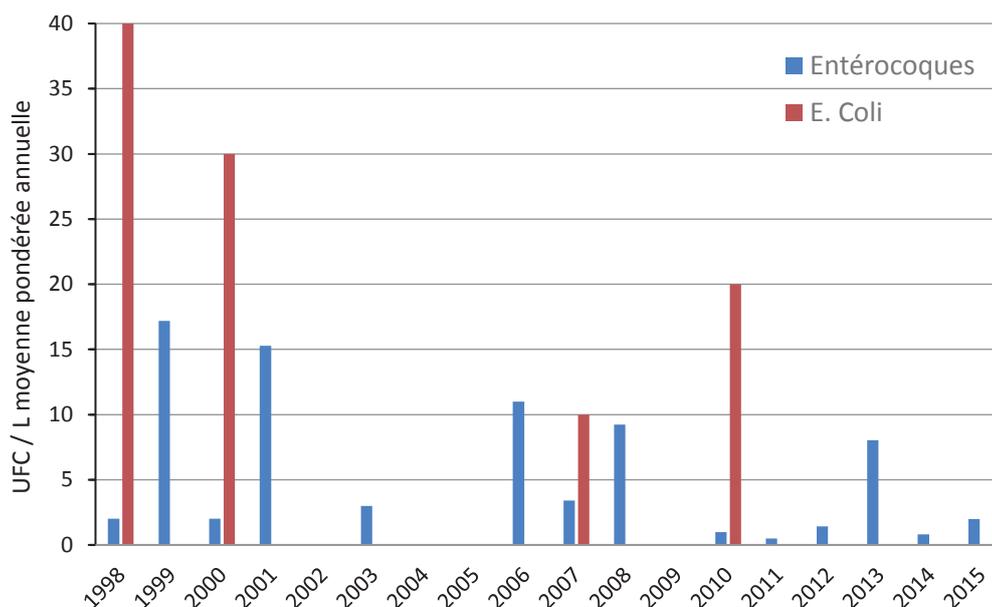


Figure 8 : Comparaison du dénombrement d'entérocoques et d'E. coli (moyennes pondérées annuelles pour 15 profondeurs) au centre du Léman (SHL2) de 1998 à 2015.

Figure 8 : Comparison between enterococci with E. coli (annual weighted average at 15 depths) investigated in the center of lake Geneva (SHL2) from 1998 to 2015.

La précédente étude (REVACLIÉ et al., 1996) avait calculé le rapport moyen E. coli (UFC/L) : Entérocoques (UFC/L) afin de préciser la provenance éventuelle des matières fécales considérant que la valeur de 2.2 trouvée alors indiquait une provenance humaine prépondérante. Ce rapport est de 0.6 pour les animaux à sang chaud voire même inférieur chez certains mammifères ; il vaut à peu près 4 pour une origine de nature humaine.

Cette conclusion devrait toutefois tenir compte de limitations imposées par les spécificités des germes étudiés. E. coli voit, comme indiqué plus haut, sa population diminuer bien plus vite que ce n'est le cas pour les entérocoques. Aussi pour un jugement valable, la contamination en matières fécales doit avoir eu lieu moins de 24 heures avant le prélèvement des échantillons ! De surcroît, pour obtenir une précision (confiance) dans le rapport calculé, il est nécessaire que le nombre d'entérocoques mesurés soit au moins supérieur à 25 UFC/100 mL ce qui n'a jamais été observé depuis les premières analyses en 1970 à SHL2 (REVACLIÉ et al., 1996). Dans le présent rapport, nous avons tout de même retenu les 4 échantillons - les plus riches - où le dénombrement en entérocoques dépassait 100 UFC/L soit ceux des années 2001, 2003, 2007 ; tous ces échantillons provenant des couches comprises entre 10 et 20 m de profondeur. Le rapport moyen obtenu pour ces quatre analyses est de 5.6 (proche de 4) ce qui attesterait, encore une fois, d'une prépondérance humaine des contaminations fécales.

3.4. CLOSTRIDIUM SULFITO-RÉDUCTEUR

La figure 9 montre les résultats du dénombrement des clostridies sulfito-réducteurs lors des deux saisons étudiées. Il ne semble, visuellement pas y avoir de différence marquée entre les périodes, les spores sont mises en évidence, dans toutes les couches d'eau et de façon spécialement homogène dans l'échantillon printanier. Le test statistique confirme que la valeur obtenue : $W=25.5$, $W(15)=25$, $p < 0.05$ nécessite de devoir conserver l'hypothèse nulle avec un test bilatéral pour ce cas de figure où aucun motif, *a priori*, permettait de poser une hypothèse alternative (H1) plus précise que « différence de distribution des germes entre printemps et automne ».

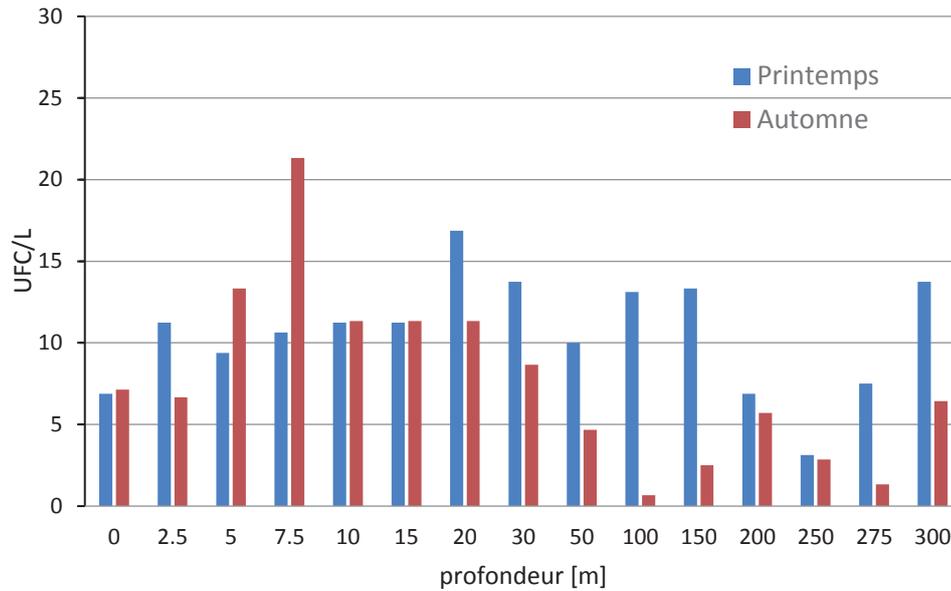


Figure 9 : Moyennes saisonnières des clostridies sulfito-réducteurs dénombrés au centre du Léman (SHL2) de 1998 à 2015 pour 15 profondeurs lors du printemps et de l'automne.

Figure 9 : Seasonal averages in sulfite-reducing clostridia investigated in the center of lake Geneva (SHL2) from 1998 to 2015 at 15 depths during spring and fall.

La plus grande homogénéité des divers résultats acquis pour les clostridies est sans doute due à une mesure qui se réfère non pas à la forme végétative de la bactérie mais à sa forme sporulée. Cette forme particulière confère une résistance élevée aux conditions adverses et permet également une meilleure dispersion environnementale du « micro-organisme » avant sa germination. Dès lors, ces spores ont eu la possibilité d'être disséminées dans l'intégralité des couches d'eau. On notera également, au tableau 1, que les clostridies sont la seule famille pour laquelle l'écart-type est inférieur à la moyenne pluriannuelle ; leur variabilité globale est donc plus faible.

	Germes aérobies mésophiles	E. coli	Coliformes totaux	Entérocoques	Clostridium sulfito- réducteur
	UFC/mL	UFC/L	UFC/L	UFC/L	UFC/L
<u>1998</u>	386	11	8	2	0
<u>1999</u>	336	104	209	17	14
<u>2000</u>	29	5	54	2	8
<u>2001</u>	86	35	87	15	4
<u>2002</u>	83	0	4	0	0
<u>2003</u>	61	41	67	3	12
<u>2004</u>	90	0	0	0	17
<u>2005</u>	67	0		0	9
<u>2006</u>	149	38		11	16
<u>2007</u>	106	32		3	2
<u>2008</u>	127	84		9	10
<u>2009</u>	2351	0		0	4
<u>2010</u>	141	0		1	5
<u>2011</u>	255	14		0	6
<u>2012</u>	307	36		1	1
<u>2013</u>	175	36		8	3
<u>2014</u>	695	53		1	7
<u>2015</u>	202	0		2	6
médiane	145	23	54	2	6
moyenne	314	27	61	4	7
écart type	533	31	74	5.5	5.2

Tableau 1 : Moyennes annuelles pondérées des germes aérobies mésophiles, E. coli, coliformes totaux, entérocoques et clostridies sulfito-réducteurs au centre du Léman (SHL2) de 1998 à 2015. Les moyennes, médianes pluriannuelles et l'écart type sont indiqués au bas du tableau. Les années en souligné sont celles où une seule campagne a eu lieu.

Table 1 : Annual weighted averages of heterotrophic plate count, E. coli, total coliforms, enterococci, sulfito-reducing clostridia investigated in the center of lake Geneva (SHL2) from 1998 to 2015. Multiannual means, medians and standard deviations are reported at the bottom of the table.

4. COMPARAISON AVEC LES MESURES RÉALISÉES DANS UNE INSTALLATION DE POTABILISATION

L'intégralité des analyses microbiologiques de l'eau brute de la station du Prieuré (SIG Genève) a été compulsé afin d'éventuellement pouvoir tirer des enseignements entre les mesures réalisées à 30 m de profondeur à la station SHL2 et les eaux pompées à la profondeur d'environ 30 m dans le petit lac à une distance de 3 km de l'installation de potabilisation située dans le quartier des Pâquis, station qui est exploitée par les Services Industriels de Genève (SIG). L'échelle indiquée à la figure 1 permet de se représenter approximativement la position de la crépine d'aspiration.

Des prélèvements de cette eau qualifiée de « brute » étant réalisés quotidiennement par le laboratoire des SIG, ce sont plus de 3'300 analyses d'entérocoques et d'E. coli ainsi que plus de 2'000 résultats de coliformes totaux qui ont pu être consultés (tableau 2) pour la période couvrant 1998 à 2015.

Il faut souligner ici que l'eau brute est traitée au chlore (javel) dès son aspiration à la crépine. Même si ce réactif - destiné à empêcher les larves de moules zébrées de coloniser la conduite - est rapidement consommé par les matières organiques, il a tout de même un effet certain sur la flore bactérienne que ce soit sous sa forme libre (acide hypochloreux et ion hypochlorite) ou sous sa forme combinée (chloramines). Le temps de transit de l'eau au sein cette conduite d'aspiration dure de une à deux heures selon le débit de pompage appliqué à la station.

	<i>Escherichia coli</i>		Coliformes totaux		Entérocoques	
	UFC/L		UFC/L		UFC/L	
	SHL2	Prieuré	SHL2	Prieuré	SHL2	Prieuré
1998	100	1	0	30	0	5
1999	300	8	300	33	30	4
2000	0	1	0	0	0	0
2001	50	2	250	5	20	2
2002	0	6	0	7	0	3
2003	0	2	0	3	0	1
2004	0	0	0	0	10	0
2005	0	0		0	0	0
2006	0	0		0	0	0
2007	0	0		0	0	5
2008	0	13		1	0	5
2009	0	37			0	21
2010	0	1			0	0
2011	0	0			0	0
2012	0	1			0	0
2013	450	13			90	4
2014	0	10			10	10
2015	0	1			0	1
Moyenne	50	5	79	7	9	3
Maximum	450	37	300	33	90	21
Nb mesures	31	3357	10	2208	31	3337
> 0 UFC/L	5	178	3	119	5	112
Proportion positifs %	16.1	5.3	30.0	5.4	16.1	3.4

Tableau 2 : Moyennes annuelles des teneurs en *E. coli*, coliformes totaux et entérocoques au centre du Léman (SHL2) à 30 m. de profondeur ainsi qu'à la station du Prieuré (eau brute) de 1998 à 2015. La moyenne pluriannuelle, les maxima, le nombre d'analyses et la proportion de celles-ci où les germes ont été mis en évidence sont indiqués au bas du tableau.

Table 2 : Annual averages in *E. coli*, total coliforms and enterococci investigated in the center of lake Geneva (SHL2) at 30 m. depth and in raw water abstracted from Le Prieuré drinking water treatment plant from 1998 to 2015. Multiannual averages, maxima, sample numbers and ratios where bacteria were detected are reported at the bottom of the table.

A la vue des résultats, on notera qu'il y a, en moyenne pluriannuelle, une flore dix fois plus riche dans les échantillons prélevés au centre du lac à SHL2 que ceux récoltés à la station du Prieuré ; ce constat est valable pour les valeurs extrêmes (moins marqué pour les entérocoques toutefois). De plus, la proportion de comptages où des germes fécaux sont mis en évidence est de l'ordre de 16 à 30 % à SHL2 alors que celle-là oscille de 3 à 5 % pour les très nombreux prélèvements réalisés à la station du Prieuré. Ces résultats - bien plus faibles - sont évidemment la conséquence du dosage de chlore à la crépine. Il existe tout de même des années (2008, 2009) où les flores de *E. coli* et d'entérocoques étaient présentes dans l'eau brute de la station du Prieuré mais absentes à SHL2 ; conséquence sans doute de la forte variabilité spatiale (horizontale, profondeur) et temporelle (les germes finissent par disparaître) de la flore microbiologique. A cet égard, il n'est pas rare de constater, parmi les données à SHL2, des rapports de densité de micro-organismes d'un facteur 1'000 le long d'une colonne d'eau pour une même campagne.

Ces divers constats montrent donc qu'en dépit d'une « désinfection » à la crépine d'aspiration, les eaux brutes collectées dans le petit lac peuvent être sujettes à des apports notables de matières fécales. Il est vraisemblable que, sans chloration à la crépine, l'eau collectée drainerait plus fréquemment et à plus forte concentration des matières fécales issues de l'activité humaine.

L'expérience montre que lors d'épisodes de bise d'intensité suffisante, la température de l'eau brute accuse des variations importantes et brusques (par exemple + 10 °C en 20 heures le 22 juillet 2012) signe d'un apport d'eau de surface de moins bonne qualité tous égards confondus (matières en suspension, algues, micro-organismes).

5. OCCURRENCE DES GERMES INDICATEURS FECAUX

Toutes profondeurs confondues et pour toutes les campagnes réalisées (soit l'équivalent de 437 échantillons prélevés à SHL2 entre 1998 et 2015) on a constaté la prévalence de *E. coli* à raison de 9.6 % et celle des entérocoques à une fréquence un peu supérieure soit 13 %. Seuls 5.5 % des échantillons, exhibent simultanément les deux indicateurs bactériens de contamination fécale. Dès lors, on peut facilement calculer les probabilités - conditionnelles - de rencontrer :

- *E. coli* sachant que des entérocoques ont été mis en évidence soit 42 %
- des entérocoques sachant que *E. coli* a été mis en évidence soit 57 %

Ces calculs illustrent et confirment bien ce qui a été relaté ci-avant. La résistance accrue des entérocoques, quand ils sont détectés, se solde près de 6 fois sur 10 par une absence (plus exactement non mise en évidence) d'*Escherichia coli* alors que cette dernière espèce est plus massivement excrétée mais décline aussi plus vite. Par contre, c'est avec un rapport identique que les entérocoques accompagnent « leur cousin » en cas de contamination avérée par *E. coli*. Aussi, les entérocoques jouent, selon les circonstances, le rôle d'unique indicateur de contamination fécale ou alors d'indicateur de confirmation.

6. CONCLUSIONS

Les résultats acquis tout au long de ces 18 campagnes annuelles montrent que la stratification thermique des eaux du Léman joue un rôle dans la dissémination et la répartition des germes tests de contamination fécale. Une fois la stratification établie, ces germes fécaux (ainsi que l'éventail large de pathogènes, virus, protozoaires etc. qui leur sont associés) ont un accès réduit aux profondeurs situées sous la thermocline (LEPINARD *et al.*, 2015).

La barrière stratigraphique ne s'applique cependant plus durant la période froide où la thermocline s'estompe et où le brassage hivernal mélange le contenu tant physico-chimique que biologique des différentes couches. Cette barrière est de surcroît contournée par les germes plus résistants tels ceux capable de former des spores. Leur résistance avérée aux pressions du milieu leur confère une survie allongée et donc une meilleure dissémination et répartition au sein des profondeurs et ce jusqu'au fond du lac. Aussi, la dispersion d'un micro-organisme sera d'autant plus homogène que sa survie sera longue !

On comprend pourquoi les distributeurs d'eau potable qui s'approvisionnent de ressources lacustres cherchent à pomper celles-ci au plus profond. D'une part elles jouissent d'une concentration en matières organiques (planctons divers, pollens, résidus d'algues, larves de moule zébrée etc.) plus faible ce qui facilite grandement leur traitement ultérieur (RAMSEIER *et al.*, 2003), d'autre part elles offrent une température plus fraîche tout au long de l'année (entravant ainsi la reviviscence bactérienne le long du réseau de distribution d'eau potable) et sont également à l'abri des aléas météorologiques qui peuvent brusquement perturber la qualité de l'eau pompée.

Pour la flore hétérotrophe, la répartition de cette population (qui regroupe de nombreux types de germes) suit un autre schéma ; ces bactéries dites « totales » semblent être présentes en plus grand nombre dans les couches profondes du lac qu'en surface. La décantation amène les déchets vers les eaux profondes et la flore hétérotrophe consomme ces nutriments (source de carbone) pour son métabolisme.

Enfin la grande variabilité spatiale et temporelle de la flore microbiologique ne permet pas de tirer des corrélations entre les mesures réalisées à SHL2 et celles obtenues par la société distributrice d'eau potable dont la crépine d'aspiration est très éloignée du centre du grand lac. Cependant, les résultats acquis à SHL2 soulignent bien l'importance de prélever l'eau en dessous de la thermocline, de façon à pouvoir s'affranchir d'une multitude d'éléments (chimiques, biologiques) indésirables pour l'élaboration d'une eau potable de bonne qualité.

D'autre part, durant la période considérée, les eaux pélagiques prélevées au point SHL2 satisfont largement aux critères pour des eaux de baignade d'excellentes qualité, tels que définis par l'Agence européenne de l'environnement : moins de 5'000 *E. coli*/L et moins de 2'000 entérocoques/L (DIRECTIVE 2006/7 CE).

BIBLIOGRAPHIE

- BERGEY (1974) in : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8^{ème} éd. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- BLANC, P., CORVI, C., NIREL, P., REVACLIER, R., RAPIN, F. (1996) : Evolution physico-chimique des eaux du Léman. Rapp. Comm. int. prot. eaux Léman contre pollut., Campagne 1995, 37-80.
- BOEHM, A., B., SASSOUBRE, L., M. (2014) : Enterococci as indicators of environmental fecal contamination. in Enterococci, from commensals to leading causes of drug resistant infection. Gilmore, Clewell, Ike, Shankar editors.
- DIRECTIVE 2006/7 CE du Parlement européen et du Conseil du 15 février 2006 concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade, Annexe I, 46
- LEPINARD, C., RAMSEIER, S., MICHAL, P. (2015) : L'eau des lacs est-elle utilisée pour la consommation humaine. in : Le tour des grands lacs alpins naturels en 80 questions. Ouvrage collectif. Groupe de recherche Rhône-Alpes sur les infrastructures et l'eau. 106-109.
- RAMSEIER, S., MANTEGAZZI, D., BERSIER, Y. (2003) : Qualité des eaux potables produites à partir du Léman. Rapp. Comm. int. prot. eaux Léman contre pollut., Campagne 2002, 123-138.
- REVACLIER, R. (1984) : Bactériologie. Le Léman. Rapp. Comm. int. prot. eaux Léman contre pollut., Synthèse 1957-1982, 241-257
- REVACLIER, R., RAPIN, F., ZUMSTEIN, J. (1996) : Bactériologie. Rapp. Comm. int. prot. eaux Léman contre pollut., Campagne 1995, 153-165.