

# Programme Gestion du Patrimoine Sol GESSOL

# Pratiques pastorales et qualité microbiologique des eaux :

rôle des facteurs édaphiques et hydrométéorologiques dans la survie et le transfert à l'échelle bassin versant, de populations de bactéries fécales bovines.

Résumé opérationnel 2 Décembre 2008











## Equipe de recherche

#### UMR CARRTEL INRA/Université de Savoie

- INRA Station d'Hydrobiologie Lacustre

74203 THONON-LES-BAINS CEDEX. Tél. 04. 50. 26. 78. 01 - Fax 04. 50. 26. 07. 60

- Université de Savoie - CISM Laboratoire des sols

73376 Le Bourget du Lac Cedex. Tel: 04 79 75 88 62 Fax: 04 79 75 88 80

DORIOZ J.M. (DR INRA, responsable scientifique), directeur de l'UMR Carrtel <a href="mailto:dorioz@thonon.inra.fr">dorioz@thonon.inra.fr</a>; TREVISAN D. (IR INRA, responsable de la partie bassin versant), <a href="mailto:trevisan@thonon.inra.fr">trevisan@thonon.inra.fr</a>; QUETIN P. (IE INRA) <a href="mailto:quetin@thonon.inra.fr">quetin@thonon.inra.fr</a>; GOURDON M. H. (CDD) <a href="mailto:gourdon@thonon.inra.fr">gourdon@thonon.inra.fr</a>; LAZZAROTTO J. (AI) <a href="mailto:lazzarotto@thonon.inra.fr">lazzarotto@thonon.inra.fr</a>; POULENARD J. (MC Univ. Savoie) <a href="mailto:Jerome.Poulenard@univ-savoie.fr">Jerome.Poulenard@univ-savoie.fr</a>; FAIVRE P. (Pr Univ. Savoie) <a href="mailto:Pierre.Faivre@univ-savoie.fr">Pierre.Faivre@univ-savoie.fr</a>

# **UMR Sol-Agronomie-Spatialisation**

#### **INRA Rennes**

65 rue de Saint-Brieuc CS 84215 35042 Rennes Cedex (France). Tél. 02 23 48 52 28

MEROT Ph. (DR INRA) merot@roazhon. inra. fr

#### UMR CNRS 5557, Ecologie microbienne Lyon

**Université Claude Bernard – CNRS** Ecologie Microbienne, Lyon 1. Campus de la Doua, bâtiment Gregor Mendel, 16 rue Dubois, 69622 Villeurbanne Cedex. Tél. 04 72 44 58 89, Fax: 04 72 43 12 23

PRIGENT COMBARET C. (CR CNRS, responsable pour la partie Ecologie Microbienne) prigent@biomserv.univ-lyon1.fr; JOCTEUR MONROZIER L. (CR CNRS) <u>lucile.jocteur-monrozier@univ-lyon1.fr</u>; MOËNNE LOCOZ Y., Pr. Université Lyon 1 <u>moenne@biomserv.univ-lyon1.fr</u>; POIRIER Marie Andrée, (TCE CNRS) <u>poirier@biomserv.univ-lyon1.fr</u>

#### ECOLE VETERINAIRE DE LYON

1, Avenue Bourgelat- BP 83, 69280 Marcy L'Etoile. Tel 04 78 87 25 53, Fax 04 78 87 25 54

Pr. VERNOZY-ROZAND C, DVM, Expert au Comité Microbiologie de l'AFSSA, Responsable de l'Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle <u>c.vernozy@mail.vet-lyon.fr</u>

## **DOCTORANTS**

S. TEXIER (Université de Savoie-INRA), *co-direction Prigent-Combaret – Trévisan*. (Prof P Faivre). B. FREMAUX, (Ecole Vétérinaire de Lyon, Université Lyon 1). Participation au projet PASTOR sur le suivi des populations d'*E. coli* pathogènes. (Prof C Vernozy-Rozand)

## 1 INTRODUCTION

L'ambition scientifique générale du projet « Pastor » est d'apporter des connaissances concernant le transfert et le comportement dans les sols et les eaux, de contaminants bactériens introduits par l'élevage. Dans ce cadre, notre objectif spécifique est de comprendre la survie et de modéliser la dynamique de transfert des sols aux eaux, d'un contaminant type, Escherichia coli (E. coli), apporté par des troupeaux pâturant un bassin versant de montagne. Les questions et enjeux scientifiques se rapportent à la fois à la problématique de l'introduction de micro-organismes d'origine fécale dans l'environnement et à celle des transferts diffus des contaminants dans les bassins versants. Le rôle du sol est central dans ce questionnement, les disciplines concernées sont l'agronomie, l'écologie microbienne, l'hydrodynamique et l'hydrologie.

Quelques caractéristiques générales de la dynamique des populations microbiennes introduites sont bien connues : (i) l'existence d'une « co-introduction » simultanée d'un milieu nutritif auquel les populations introduites sont adaptées est un élément favorable à la survie<sup>1</sup>,<sup>2</sup> ; (ii) les sols présentent une capacité d'hébergement (« capacité biotique ») qui régit l'optimum de densité microbienne dans un volume (ou une masse) donné de sol<sup>3</sup>. Ces connaissances, souvent acquises à l'échelle de l'échantillon de sol, sont difficiles à extrapoler à l'échelle à laquelle les problèmes relatifs à la gestion de qualité microbiologique de l'eau sont posés, c'est à dire pour des mailles de territoire plus vastes, correspondant à des bassins hydrologiques souvent complexes.

Les questions scientifiques traitées dans ce projet se réfèrent en outre à la thématique générale du transfert diffus de polluants dans les bassins versants<sup>4,5</sup>. Il s'agit, dans ce contexte, de comprendre les mécanismes qui régissent les transferts sols-aquifères de ces colloïdes biologiques que sont les bactéries fécales. Par ailleurs, en lien avec la nécessaire adaptation que suppose la persistance dans l'environnement d'une population entérique, on s'interroge sur la sélection de souches spécifiques pendant les phases de stockage et sur la possibilité de différencier, à l'exutoire, la contamination par des bactéries récemment entrantes et la contamination par les bactéries ayant séjournées dans le sol.

Bien évidemment le projet d'étudier la dynamique de contaminants fécaux en zone pastorale de montagne et à l'échelle bassin versant répond aussi à des **enjeux sociétaux.** Les contaminations microbiologiques des eaux sont une problématique mondiale pour la santé humaine<sup>6</sup>. Dans le contexte particulier de la montagne alpine, les problèmes créés par la contamination microbiologique de l'eau sont d'une ampleur particulière. La mauvaise situation sanitaire actuelle des eaux n'est évidemment pas en accord avec l'image largement répandue de l'eau pure des montagnes ; elle n'est pas non plus compatible avec les fonctions portées par cet espace, celle de château d'eau de l'Europe, celle d'une politique agricole basée sur la haute qualité des produits<sup>7</sup>. Un point particulièrement préoccupant est la présence chez les bovins (porteurs sains) de souches d'*E. coli* potentiellement pathogènes pour l'homme tels que les *E. coli* producteurs de shigatoxines (désignées sous le terme de STEC pour *Shiga toxin-producing E. coli*). La dissémination de cette souche liée au parcours des troupeaux n'a jamais été envisagée, alors qu'elle a déjà fait l'objet d'investigation dans les cas d'apport ponctuel de fumure organique en conditions contrôlées<sup>8,9</sup>.

Au delà du cas alpin, c'est l'ensemble des surfaces pour lesquelles l'extensification du pâturage est pressentie comme une alternative adaptée aux enjeux territoriaux et environnementaux qui serait concerné<sup>10</sup>. Pour aborder ces questions, les unités pastorales de type alpage ou estive sont des objets modèles conjuguant diversité des conditions de milieux et de sols, avec une relative unité d'utilisation.

## **2** OBJECTIFS DETAILLES

Notre objectif est d'apporter des connaissances et des références sur trois volets complémentaires :

- déterminer et caractériser les **lieux de stockage et la survie des** *E. coli* dispersés par les activités pastorales sur les divers types de sols du territoire étudié ;
- comprendre la **dynamique des** *E. coli* à l'échelle sols et bassin versant afin d'établir un **modèle** reliant le fonctionnement du système de transfert (hydrologie, dispersion pastorale, stockages) avec la variabilité de la qualité microbiologique des eaux à l'exutoire.
- évaluer dans quelle mesure l'introduction des bactéries fécales dans l'environnement peut représenter un stress pour les bactéries ; estimer notamment comment cela peut conduire à la sélection de certaines populations adaptées et/ou à la modification de leur état physiologique.
- reconnaître et localiser les **zones sources critiques**, c'est-à-dire les portions d'espace du bassin versant qui contribuent de façon substantielle aux exportations bactériennes

Il s'agit aussi **d'intégrer les connaissances** théoriques acquises par le projet dans un cadre plus opérationnel, à destination des gestionnaires de l'eau et des exploitations agricoles et ceci à une échelle correspondante à celle où sont posés et résolus les problèmes de qualité microbiologique de l'eau : l'échelle bassin versant. Ceci suppose de replacer l'ensemble des informations obtenues dans une perspective d'analyse globale du système, c'est-à-dire dans le contexte des relations milieux-végétations-troupeaux.

# 3 ETAT DES CONNAISSANCES

Diverses informations sont disponibles dans la littérature concernant la contamination des eaux de surface en relation avec le fonctionnement hydrologique et agropastoral des sols. Une analyse succincte de ces références permet d'identifier divers objets d'étude structurants dans la problématique du transfert bactérien, à partir desquels la démarche expérimentale du programme Pastor a été construite : les relations sols - végétation - troupeau, les mouvements de matière à l'échelle bassin versant et enfin le comportement environnemental des micro-organismes.

Les interactions **sols-végétations-troupeaux** s'avèrent toujours déterminantes au plan agronomique et écologique. La disponibilité et l'appétence de l'herbe orientent le parcours des troupeaux et les choix des bergers. Elles dépendent de la topographie (accessibilité, phénologie et topoclimat) et des sols. En retour, l'intensité et le mode de pâturage modifient profondément le fonctionnement et la dynamique du couvert végétal à moyen et court terme (exemple: refus dus aux déjections). Selon la position dans l'alpage, le rôle des diverses interactions et la hiérarchie des facteurs changent. Cette diversité et les gradients spatiaux qui en résultent déterminent un nombre limité de « **faciès pastoraux** », unités agroécologiques caractérisées par une végétation type (composition, productivité, phénologie), un sol type et traduisant un équilibre sur le moyen terme (quelques années), entre mode de fréquentation par les animaux (intensité relative du prélèvement et des restitutions, piétinement) et un état trophique du sol (S/T, C/N...).

L'étude des pollutions hydriques à l'échelle d'un vaste territoire se heurte à deux difficultés: 1) la variabilité spatiale (des mécanismes, des états, des apports); 2) l'émergence de processus nouveaux lors des changements d'échelle. Les difficultés à extrapoler sur de grands espaces, les informations recueillies à l'échelle du système plante-sol, expliquent le succès de l'« approche bassin versant » en matière de recherche et de mesure de la pollution, notamment de pollution diffuse agricole<sup>11,12,13</sup>. Les représentations de l'objet bassin versant en tant que « système de transfert » de la pollution traitent souvent le bassin comme un ensemble qui produit, consomme, transforme, stocke, en bref « métabolise » avant de transférer, en différé, à l'exutoire<sup>14</sup>. Des concepts équivalents peuvent être en théorie appliqués au cas de la pollution par les bactéries fécales: la compréhension du transfert suppose alors d'identifier comment s'élaborent des stocks dans l'espace du bassin versant, quels sont les lieux privilégiés de stockage, de mettre en évidence les conditions de

rétention, de considérer les connections permises par l'état hydrique des sols et l'état des écosystèmes aquatiques transporteurs.

Les facteurs susceptibles de contrôler la survie et le transfert des bactéries fécales dans et à partir des sols, ont fait l'objet d'études expérimentales de laboratoire ou de suivis de plein champ<sup>15,16</sup>. Ces approches donnent une première connaissance du comportement des bactéries fécales dans l'environnement. Les potentiels de survie s'avèrent très variables, en relation avec les facteurs biotiques et abiotiques du sol. Les travaux antérieurs montrent également que l'optimum de densité de E. coli se situe dans les premiers centimètres du sol, au niveau du mat racinaire. Des conclusions équivalentes peuvent être tirées des études sur le comportement de la souche pathogène E. coli O157 : H7. Les pratiques agricoles semblent avoir une incidence forte sur le devenir des micro-organismes, soit indirectement par leurs effets sur la biomasse végétale ou sur les propriétés structurales, physicochimiques et biologiques des sols (matière organique, nutriments), soit plus directement, en relation avec la distribution, l'épaisseur et la nature des amas organiques à la surface des sols. L'état des micro-organismes fécaux dans le sol est très variable. Il existe en fait des bactéries viables non cultivables (« VBNC »). Dans les conditions naturelles, les bactéries doivent en effet s'adapter constamment à des changements de disponibilité en éléments nutritifs ou à des conditions de stress. Le développement de méthodes enzymatiques permettant la détection de bactéries non cultivables 17,18,19 représente une alternative encore peu employée bien qu'adaptée à l'énumération des bactéries fécales dans les milieux riches en particules. Il y a cependant des besoins de méthodes pour évaluer d'une façon plus fine l'état physiologique (état de division ou dormance) dans lequel se trouvent les populations microbiennes dans les sols. Dans cet objectif, le suivi du niveau d'expression de gènes indicateurs, soit d'un état de division ou au contraire d'un état stationnaire, peut fournir une alternative intéressante. Les mécanismes adaptatifs ont par ailleurs conduit à une structure complexe des populations d'E. coli dans les matières fécales et dans l'environnement<sup>20,21,22</sup>. Cette structure génétique varie en fonction de l'espèce animale hôte, de son âge, de son régime alimentaire ou de son origine géographique<sup>23</sup>. L'introduction de matières fécales dans le sol ou l'eau peut aussi amener une sélection de certaines sous-populations d'E. coli adaptées à la croissance dans des milieux plus oligotrophes que les matières fécales. L'étude de la typologie du peuplement microbien nous semble donc fournir un outil incontournable pour caractériser un apport, un milieu, un stade fonctionnel.

# 4 CADRE CONCEPTUEL: système étudié, modèles biologiques, hypothèses et démarche de travail.

Le tour d'horizon réalisé dans le chapitre précèdent souligne d'une part, la grande diversité des objets d'étude, des échelles et des concepts utilisables pour les recherches sur la contamination fécale des eaux, et d'autre part, le potentiel d'innovation lié aux outils moléculaires actuellement disponibles. Dans un tel contexte, nous définissons des choix méthodologiques et représentations communes.

Deux **modèles biologiques** sont choisis : *E. coli* est au centre de ce projet ; sa dynamique est comparée dans la mesure du possible à celle de bactéries telluriques hétérotrophes de référence, les *Pseudomonas* fluorescents; la prise en compte de souches de *E. coli* pathogènes, les STEC, complètant le dispositif.

L'équipe de recherche partage aussi des **représentations conceptuelles du « système étudié** » construites progressivement aux différents niveaux et échelles où sont organisées les investigations et/ou les synthèses, avec à l'échelle stationelle le système sol-végétation-bouse intégrant le niveau élémentaire de la rhizosphère et à un niveau plus intégrateur, le système bassin versant.

- Le système sol – végétation - bouse est déterminé par une chaîne de phénomènes relatifs à la survie et au transfert bactérien (Fig.1). La contamination débute à l'échelle stationnelle par une chaîne de phénomènes qui met en jeu une série de mécanismes élémentaires de différente nature (exemple : microbiologique /fonctionnement de sols et de la rhizosphère), à différents pas de temps (exemple :

écoulements / dynamique de population microbienne). La **station** est une unité sol-végétation-pratiques et présente un faciès pastoral donné. Les **entrées** dans le sous-système ainsi défini (figure 1) résultent d'apports d'*E. coli* sur le sol et sa végétation sous forme de bouses ; il s'agit d'apports très localisés et très concentrés (10<sup>7</sup> *E. coli*. g<sup>-1</sup>) associés à un « milieu » organique riche auquel les microorganismes saprophytes introduits sont adaptés. Cette « co-introduction » est un élément favorable à la survie en milieu tellurique<sup>24,25</sup>. Dans cette organisation associant différents stocks et flux de bactérie, **la rhizosphère** semble essentielle. Elle correspond à une couche de sol de l'ordre de 1 mm d'épaisseur. Dans la rhizosphère, la plante libère une partie des photosynthétats sous la forme de rhizodépôts organiques<sup>26</sup>, la disponibilité de ces nutriments conduisant à une stimulation des microorganismes associés à la plante. Pour certains pathogènes de l'homme ou l'animal, ces composés sont un facteur favorable à la survie, et la rhizosphère de certaines plantes pourrait correspondre à un réservoir environnemental pour ces pathogènes<sup>27</sup>.

- Au **niveau bassin versant**, il faut considérer un territoire où se superposent deux fonctionnements : celui du système pastoral qui détermine le déplacement des troupeaux et donc la dispersion et la répartition des polluants biologiques dans l'espace et dans le temps, et celui du bassin versant où les circulations d'eau ont pour effet de transférer ces polluants et finalement, de les exporter à son exutoire, en relation avec l'hydrologie (figure 2).

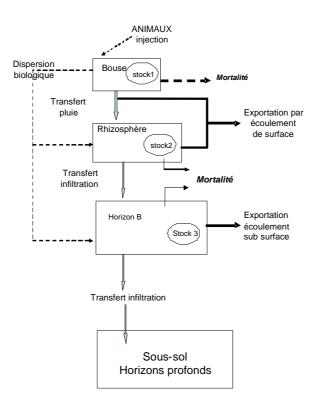


Figure 1. Le système étudié au niveau station

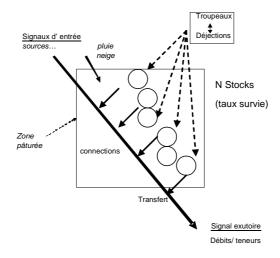


Figure 2. Le système étudié au niveau bassin versant

La **modélisation** est intégrée dans notre démarche, pour rendre compte des couplages entre hydrologie, agronomie et microbiologie, avec une référence particulière pour les périodes de crue dont on sait qu'elles déterminent l'essentiel des flux annuels bactériens<sup>28</sup>. L'évolution de l'état physique des bouses est pris en compte dans cette analyse, car il est déterminant vis-à-vis du potentiel de transfert bactérien<sup>29</sup>.

## 5 MATERIEL ET METHODES

# 5.1 Site d'étude.

Le bassin versant étudié (170 ha) est inclus dans l'alpage des Cornettes de Bise. Il est situé en Haute Savoie, dans le massif des Préalpes du Chablais (figure 3). Le contexte hydrogéologique a fait l'objet d'une étude spécifique<sup>30</sup> qui révèle que le bassin topographique ne correspond pas exactement au bassin hydrologique, ce qui n'est pas surprenant dans un contexte fortement fragmenté et restructuré par le tectonisme. Les sols et végétations ont été étudiés par Legros et al<sup>31</sup>, les auteurs décrivant plusieurs unités agro-pédologiques, avec des références en termes de phytosociologie et de potentiel agropastoral.

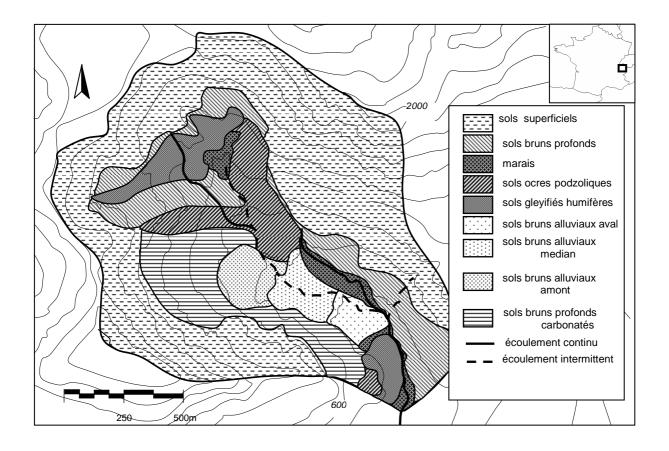


Fig. 3 Carte des sols du bassin étudié

Partant de ces connaissances préalables, on a identifié un certain nombre de faciès pastoraux représentatifs des relations sols- végétation- troupeaux et significatifs vis à vis de la survie des bactéries fécales dans l'environnement. Parmi cette diversité, quatre façiès majeurs ont été retenus pour l'étude stationelle du système sols – végétations – bouses :

- gazon à pâturin, marqué par une exploitation intensive et une forte pression de déjections animale, sur sol drainant ;
  - nardaie, peu visitée par les animaux, avec des sols acidifiés ;
- formation à Rumex, correspondant à des reposoirs où l'introduction de bouse est très intense; les sols sont imperméables mais avec des niveaux de confinement et des fonctionnements assez distincts (gleys et sols pélosoliques)
- *marais*, où l'entrée de bouse peut être localement forte en relation avec des besoins d'abreuvement et l'excès d'eau liée à une concentration topographique des écoulements.

# 5.2 Objets d'étude, échelles, méthodes et dispositifs expériementaux

Les objets étudiés se rapportent aux entrées, aux stockages et aux transferts d'eau et de germes (tableau 1).

objets		objectifs	méthode et dispositifs	Echelle
		Régimes pluviométriques et évaporatoires	Station météorologique	
Entrées	Eau	Qualité de l'eau de surface et de sources entrant dans le bassin	Analyses physico chimiques et dénombrement <i>E. coli</i>	Bassin versant
	Déjections (bouses)	Suivi de l'intensité et de la distribution des restitutions au pâturage	Dénombrement des effectifs de bouses dans divers stations représentatives des faciès pastoraux types	Bassin versant
		cinétiques de survie des <i>E.</i> coli dont les STECS	Dénombrement dans différentes stations pastorales, à diverses dates durant la saison de pâturage	Station
	Escherichia coli	Caractériser l'activité des populations.	Activité enzymatique d'E. coli	Microcosme
	Pseudomonas fluorescents	Evolution de la structure des populations d' <i>E. coli</i>	Extraction ADN Typologie des populations d' <i>E. coli</i>	Station
Stocks		Mises au point méthodologiques	Suivi de l'expression de gènes marqueurs de l'état physiologique	Microcosme
	Eau	Connaissance de l'état hydrique des sols et des connexions hydrologiques	Suivi d'humidité TDR en continu dans diverses unités géomorphologiques Cartographie du réseau hydrologique	Station
	Interaction stocks – écoulement	Mesure de la labilité du stock de bactéries	Echantillonnage de ruissellements contrôlés sur des déjections	Station
Sorties		Détermination de la qualité bactériologique et chimique de l'eau	- dénombrement <i>E. coli</i> -physico-chimie	
	Escherichia coli	Concentrations et flux de bactéries	Mesures ponctuelles aux exutoires de sous-bassins A l'exutoire général, mesure des débits et concentrations en continu pour la chimie, en intégré journalier pour la bactériologie.	Bassin versant
		Evolution des populations bactériennes	Typologie des populations à l'exutoire	
	Eau	Connaissances des régimes hydrologiques	A l'exutoire général, mesure des débits en continu durant la période printemps automne	Bassin versant

Tableau 1. Dispositif d'étude et d'échantillonnage

Le dispositif expérimental concerne deux échelles d'étude complémentaires :

- A l'échelle de la **station** (fig 1), des mesures sont réalisées pour : (i) étudier la variabilité des effectifs bactériens dans les différents compartiments du système bouse – sol ; (ii) analyser la structure génétique des populations ; (iii) étudier et modéliser l'hydrodynamique des sols ; (iv) étudier par le biais de pluies simulées l'émission de bactéries depuis divers états de bouses ; (v) évaluer et modéliser la dynamique d'apport de bouse par le troupeau.

- Au niveau du **bassin versant** (fig.2), les travaux portent sur des enregistrements relatifs au bilan hydrologique et à la qualité chimique et microbiologique des eaux, ainsi qu'au paramétrage d'un modèle de transfert des bactéries fécales (fig.4). Des **expérimentations en microcosmes** complètent ce travail, avec l'étude de cinétiques enzymatiques et une réflexion méthodologique sur l'activité physiologique des populations bactériennes.

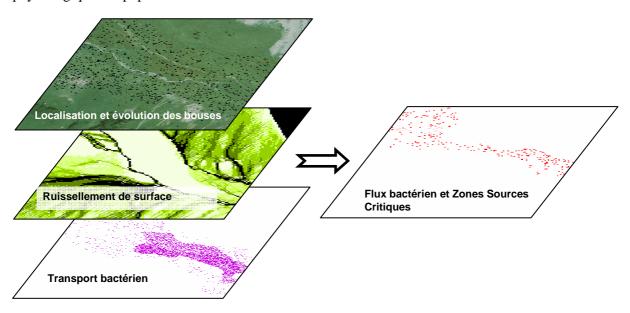


Figure 4. Modèle de transfert bactérien. Bases conceptuelles

Les méthodes relèvent de plusieurs champs disciplinaires :

- Les effectifs de *E. coli et Pseudomonas sp* dans les bouses et les sols sont issus de dénombrements en microplaques, basés sur la détection d'activités enzymatiques microbiennes (*E. coli* non pathogènes) ou de gènes (*E. coli* O157 : H7), ce qui permet de rendre compte de l'existence d'organismes actifs mais non cultivables sur milieu gélosés. *Pseudomonas sp* est en outre détecté par le moyen d'un milieu électif enrichi en antibiotiques.
- L'activité  $\beta$ -D-glucuronidase d'*E. coli* est étudiée via la modélisation de manière à évaluer les propriétés physiologiques des populations bactériennes dans différentes situations de sols et de bouses.
- La structure des populations d'*E. coli* dans les différents compartiments du bassin versant a été étudiée par DGGE ciblant le gène *uidA*<sup>32</sup>. Etant donné les faibles concentrations bactériennes des échantillons de sols, l'extraction et la purification d'ADN sont réalisées après des étapes d'enrichissement préalables (cultures en milieu). Pour comparer entre elles des populations issues de différents types d'échantillons, on étudie les *E. coli* cultivables (i. e. après enrichissement). Enfin, une approche complémentaire par clonage/séquençage est développée afin d'étudier le polymorphisme du gène *uidA* dans les populations des différents compartiments du bassin versant. En ce qui concerne les STEC, la diversité des isolats collectés au cours des 2 saisons de pâturage est analysée par électrophorèse en champ pulsé (PFGE).
- **Modélisation**. Les efforts ont porté sur le transport bactérien lors des périodes de ruissellement. L'espace est discrétisé sous forme de cartes « raster » pixellisées (cf fig.4). Le comportement de chaque bouse est évalué individuellement, ce qui permet de rendre compte de la complexité des phénomènes en termes de localisation et de vieillissement des bouses. Le modèle calcule chaque jour *j* la quantité totale *NTj* de bactéries transmises à l'exutoire selon :

$$NTj = \sum_{1}^{k} \sum_{1}^{i=nk} Sj_{ik} \overline{E_k} Gj_i$$

où i est le nombre de pixels qui ruissellent et sur lesquels une bouse est déposée ; k le nombre de classes de bouses homogènes en terme d'âge de dépôt et de stock de bactéries mobilisables, S la

quantité de bouse,  $\overline{E}$  la teneur moyenne en bactérie mobilisables des bouses et G une fonction de transfert bactérien rendant compte des phénomènes de mobilisation des bactéries et de leur interception lors de leur trajet vers le réseau hydrographique. La mise en œuvre du modèle demande de définir des fonctions relatives à la localisation et à l'évolution des bouses, à l'émergence du ruissellement et au transport bactérien. Le ruissellement est déduit d'une modélisation du fonctionnement hydrique de la couverture pédologique sous SMDR<sup>33</sup> (Soil Moisture Distribution and Routing model). Le transport bactérien est évalué à partir d'équations différentielles rendant compte des phénomènes d'émission de bactéries à partir les bouses et de leur rétention ultérieure le long des pentes depuis les pixels émetteurs jusqu'à l'exutoire du bassin.

## **6 RESULTATS COMMENTES**

Toutes les eaux de la zone d'alpage étudiée (ruisseaux, sources, ruissellements) sont, quelque soit l'époque de l'année, très pauvres en nutriments. Teneurs et flux se situent dans la gamme du bruit de fond naturel. Les activités pastorales, bien que concentrées dans le temps et dans le territoire, n'affectent donc pas significativement la qualité physique et chimique des eaux. La situation est toute autre au plan microbiologique: la présence de troupeaux sur le bassin versant est associée à une nette contamination fécale des eaux de surface. Ainsi au cours de la saison pastorale, les teneurs en *E. coli* sont largement au-delà des standards (avec un niveau de base autour de 20 UFC 100 ml<sup>-1</sup> et des pics atteignant 5. 10<sup>3</sup> UFC 100 ml<sup>-1</sup>). Par contraste et hors territoire exploité par les bovins, le bruit de fond est toujours très bas (<1 UFC 100 ml<sup>-1</sup>) (figure 5). Le troupeau est donc l'agent principal d'introduction et de dispersion des bactéries fécales dans le territoire pastoral.

# 6.1 <u>Distribution des bouses et introduction d'E. coli dans</u> <u>l'environnement du bassin versant</u>

Les entrées s'effectuent via les déjections du troupeau qui sont émises soit directement dans l'eau de surface, soit sur les sols et la végétation. Les apports directs s'effectuent en des lieux précis, ceux où le troupeau traverse les ruisseaux (sous la conduite du berger) et où il s'abreuve. Ce mode de contamination des eaux de surface est souvent considéré empiriquement comme significatif<sup>34</sup>. Dans le contexte étudié, les apports directs ne sont pas prédominants; en période d'étiage (20 L.s<sup>-1</sup>), ils contribuent à un bruit de fond de 20 à 30 UFC 100 ml<sup>-1</sup>, ce qui correspond au contenu bactérien de quelques centièmes de bouse. La situation est tout autre en période de crue, car les teneurs bactériennes augmentent fortement (jusqu'à 100 fois), notamment durant la phase de montée de crue, révélant une entrée bactérienne déterminée par le ruissellement de l'eau à la surface des sols du territoire pastoral (figure 5). Les surfaces en cause sont vastes et diversifiées et les modalités d'apport et la distribution des déjections sur les sols et les végétations sont des phénomènes déterminants, des facteurs clés de la variabilité de l'intensité de la contamination des eaux en période de crue.

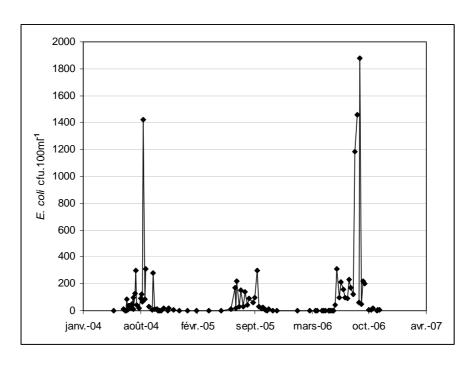


Figure 5. Concentration en *E. coli* (prélèvements manuels) à l'exutoire du bassin versant. Les teneurs bactériennes sont élevées durant la saison pastorale, notamment durant les périodes pluvieuses.

Toute modélisation déterministe des transferts de contaminants fécaux des troupeaux aux sols et aux eaux implique de définir la variable d'entrée « déjections ». La simplification retenue consiste classiquement à définir un stock de bactérie uniforme et homogène sur la surface pastorale en relation avec la charge à l'hectare <sup>49</sup>. Dans cette approche des phénomènes, la dispersion et la diversité des interactions locales entre bouses et écoulements ne sont pas prises en considération, alors qu'il s'agit de facteurs importants (Trevisan et al<sup>35</sup>) contrôlant l'extraction des bactéries par le ruissellement (état physique des bouses, perméabilité des sols) et leur transfert ultérieur (connexion hydraulique et effets tampons lors du transport).

Nos observations confirment que la distribution des déjections est hétérogène et évolutive avec un patron spatial et temporel bien entendu lié aux parcours des troupeaux. Dans un système extensif, ceux-ci répondent à la fois à des choix en terme de planning global de pâturage et dans ce cadre, au comportement local des animaux, dicté par des besoins d'abreuvement et d'alimentation fourragère. Les préférences sont variables selon la nature et l'état de la végétation, paramètres qui dépendent en retour des taux de déjections antérieurs (figure 6).

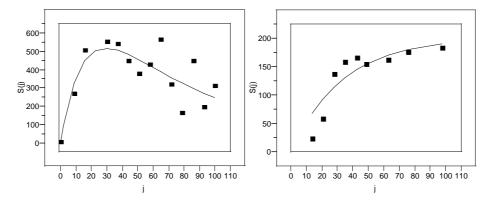


Figure 6. Modèles d'évolution du stock de bouse et ajustement aux données expérimentales (j : nombre de jours depuis la mise en pâture ; S(j) : nombre de bouses. ha<sup>-1</sup>). Gauche : réduction de la pression d'entrée de bouse avec l'avancement dans la saison pastorale ; Droite : constance de la pression d'entrée.

Concrètement on observe un semis de bouse uniforme et homogène organisé à l'échelle de l'alpage selon les faciès pastoraux. Partant des modèles développés pour rendre compte de cette double variabilité dans la distribution des déjections (Trévisan et al<sup>35</sup>), il est possible de simuler à l'échelle de l'alpage la distribution et l'état de vieillissement de l'ensemble des déjections (figure 7).

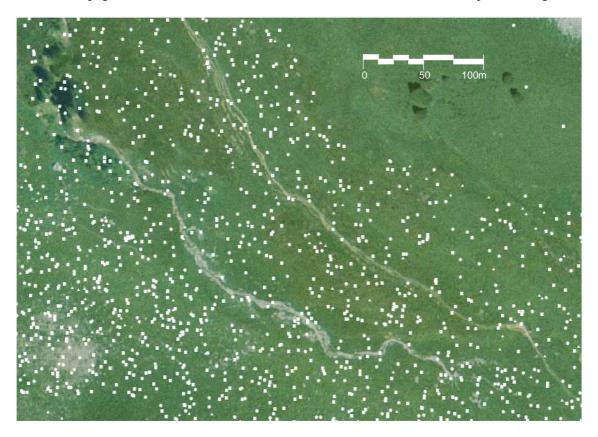


Figure 7. Modèle de répartition de différentes classes de bouses à la mi saison sur différentes unités pastorales (triangles : bouses <15 jours, carrés : bouses >15 et <30 jours ; ronds : bouses > 30 jours).

Quelques soient les stades d'évolution des déjections, elles constituent des points d'entrée de bactéries fécales à l'origine de plusieurs types de réservoirs environnementaux.

# 6.2 Les réservoirs environnementaux d'E. coli

Nos suivis permettent de reconnaître en vraie grandeur et en conditions de plein champ, les lieux de stockage clés d'*E. coli* et des souches STEC. Deux types de situations différentes représentent un réservoir assurant une survie et un stockage significatif: sur le sol, il existe des **stocks primaires** constitués dans les amas organiques des déjections, et des **stocks secondaires** dans la matrice des sols. Ces 2 types de stocks se différencient par leurs effectifs (teneurs mais surtout quantités totales), leurs dynamiques (évolution au cours du temps), leur structure génétique et leurs potentiels de contamination des eaux (extractibilité par des écoulements).

# 6.2.1 <u>Les déjections: un stockage primaire transitoire mais significatif en terme de risque de</u> contamination.

Les déjections, dans l'environnement de l'étude, sont des lieux de survie et de stockage significatif mais transitoire d'*E. coli* (1 à 2 mois l'été) avec une persistance hivernale sous le manteau neigeux, jusqu'au printemps (soit 5 à 6 mois).

L'état physique joue un rôle clé dans la persistance des E coli dans les déjections. En effet, les teneurs en E coli des bouses restent élevées ( $10^7$  cellules  $g^{-1}$  matières sèches) - quasiment aussi élevées

que dans le rectum des animaux - tant que l'amas organique qui les contient, persiste et se dessèche. La dessiccation des bouses s'accompagne d'une diminution de leur masse et des quantités de bactéries stockées. L'évolution de l'état physique des déjections avec le temps, sous l'effet des remaniements par les insectes coprophages, du dessèchement ou de leur dispersion lors des averses, sont des phénomènes déterminants. Ainsi en été, l'évolution physique conduit en quelques semaines à une réduction du volume des bouses de 90% et à un matériau résiduel sec, plus ou moins hydrophobe, dont la surface est peu émissive de bactéries, comme le démontrent les essais de pluies simulées (figure 8).

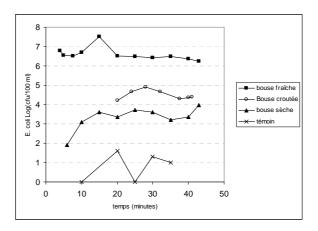


Figure 8 Teneurs en E. coli du ruissellement sous pluie artificielle.

Les résidus organiques peuvent être recouverts en hiver par le manteau neigeux. Ils persistent et lors de la fonte sont même abondants localement. Leur surface demeure cependant peu émissive et les eaux qui ruissellent sont très peu contaminées (quelques UFC 100ml<sup>-1</sup>).

A la surface des déjections, la dessiccation et les effets des UV jouent probablement un rôle important, se traduisant par une forte réduction du potentiel contaminant des bouses. Dans la masse de la matière fécale, la situation est tout autre, puisque les teneurs demeurent assez stables (10 UFC g<sup>-1</sup> MS), tant que la bouse ne disparaît pas. Ce comportement est observé pour les *E. coli*, les STEC et pour les *Pseudomonas* fluorescents: les populations se maintiennent à des teneurs constantes tout au long de la saison. L'abondance systématique de *Pseudomonas* fluorescents, espèce réputée tellurique, à des teneurs élevées dans les bouses (ainsi que dans le rectum des animaux) est une observation inattendue.

L'importance de l'état physique des apports organiques sur la survie des bactéries fécales est signalée par Vansteelant<sup>36</sup> à propos du lisier et des boues de station d'épuration après épandage sur prairies: la structuration d'amas organiques de taille centimétrique sous l'effet de la dessiccation, s'avère un facteur favorable à la survie des entérobactéries à la surface des sols. Les conditions sont encore plus favorables pour les bactéries en cas d'apports par le pâturage car les déjections constituent des amas organiques d'un volume local bien plus important.

La stabilité des teneurs bactériennes a aussi des conséquences sur les aspects sanitaires : au sein de la matière fécale, les souches STEC se maintiennent sur des durées assez longues (2 mois). Ceci laisse envisager, une fois la bouse desséchée et fragmentée, le risque d'un retour au troupeau par ingestion involontaire de débris organiques. Cette stabilité des n'est pas pour autant synonyme d'absence d'évolution des caractéristiques génétiques des micro-organismes, puiqu'on observe bien au contraire, avec le vieillissement des bouses, une certaine réduction de la diversité génétique des populations d'*E. coli*.

Au final, nous retenons donc l'hypothèse de conditions primaires favorables à la survie d'*E. coli* cultivables dans les bouses, à la surface du sol. La suite du travail a consisté à s'intéresser aux stocks

secondaires, issus d'une introduction depuis les bouses vers les horizons de sol sous jacents, d'évaluer les conséquences de la survie primaire sur le devenir environnemental des bactéries.

# 6.2.2 <u>Les sols : des réservoirs secondaires supports de populations naturalisées, en équilibre avec la capacité biotique du milieu</u>

La mise en évidence de la persistance et de la stabilité relative de populations d'*E. coli* cultivables dans les sols étudiés va à l'encontre des connaissances acquises et des hypothèses initiales. Nous observons en fait une véritable « naturalisation » de populations d'*E. coli* dans les sols étudiés au niveau : 1) des cinq premiers centimètres des sols et ceci indépendamment de leur état trophique ; 2) d'horizons plus profonds, lorsqu'il s'agit de sols argileux et confinés (à circulation d'eau lente et temporairement anoxiques). A l'inverse, dans les horizons profonds et filtrants la présence d'*E. coli* est sporadique, liée à des déjections récentes, contrôlée par les conditions édaphiques et notamment l'accès à l'eau et aux nutriments (fig. 10).

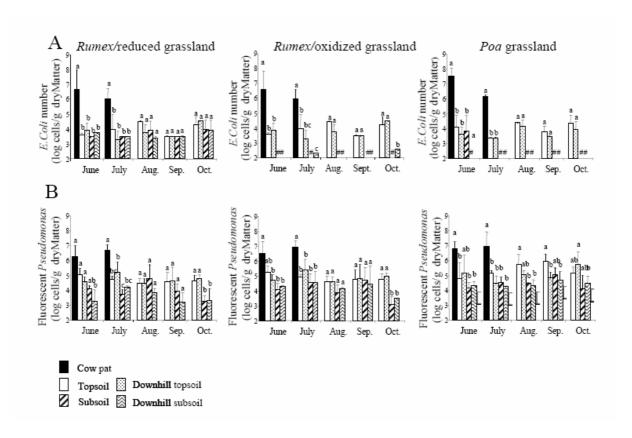


Figure 9. Suivi diachronique 2005. Evolution des teneurs en *E. coli* (A) et *Pseudomonas* fluorescents (B). a, b et c identifient des classes de valeurs significativement équivalentes.

La survie temporaire (souvent quelques semaines) de contaminants fécaux dans les sols à l'issu d'épandages de lisier ou autre produit organique est bien connue, y compris dans les sols de la région<sup>36</sup>. Elle est très dépendante des conditions d'humidité des sols, des textures et favorisée dans les matériaux à fortes teneurs en matières organiques<sup>37</sup> du fait d'un meilleur état trophique. Avery et al. dans une des rares études -à notre connaissance- consacrée à la survie de bactéries fécales en zone pâturée, enregistre une persistance d'*E. coli* dans le sol pouvant atteindre 5 mois. Il est également bien établi que, d'une façon générale, la présence de racines a un impact majeur sur l'écologie des bactéries du sol<sup>39</sup>, la rhizosphère représentant un habitat microbien spécifique favorable, parfois aussi pour la survie de certains pathogènes de l'homme ou de l'animal. D'autres propriétés de la rhizosphère semblent au contraire pouvoir limiter cette survie: divers auteurs mentionnent la production d'antibiotiques bactériens (tels que les phloroglucinols) qui affecterait la survie des entérobactéries notamment d'*E. coli*<sup>40</sup>.

Le résultat inattendu n'est donc pas la survie préférentielle d'*E. coli* dans la zone de surface riche en racines et matières organiques et dans les horizons de sub-surface argileux, mais la stabilité des teneurs enregistrées (autour de  $10^4$  cellules  $g^{-1}$  MS sol) et donc des stocks, tout au long de la saison, hiver compris, indépendamment des entrées et de leurs variabilités stationelles et saisonnières, indépendamment du type de sol et de végétation, de la proximité géographique de déjections récentes. La structure génétique de ces populations s'avère spécifique et bien différente de celles des populations des bouses, avec notamment dans les stations les moins pâturées, l'existence d'un profil dominant (fig.9). Tout ceci permet de proposer l'idée que les stocks secondaires sont constitués de *E. coli* naturalisés (Texier<sup>41</sup> et al 2008). Cette possibilité pour *E. coli* de s'installer durablement dans l'environnement est encore peu décrite dans la littérature<sup>43</sup>.

Le concept de **capacité biotique** semble convenir pour rendre compte de cet état de quasistabilité observé durant les 2 années consécutives du programme Pastor. La capacité biotique rend compte de l'existence pour certains types de microorganismes d'un équilibre dynamique associé à une capacité d'accueil limitée : une inoculation supérieure à la capacité d'accueil limite la survie des populations nouvellement introduites en raison de contraintes d'accès aux nutriments, ainsi que d'un déplacement des populations vers les macropores où elles sont plus exposées aux lessivages et à la prédation. Inversement au dessous d'une certaine densité la population peut se développer si les ressources nutritives et hydriques sont satisfaisantes, d'où la stabilité des teneurs dans les milieux correspondants. Un tel comportement contraste avec celui de *Pseudomonas* fluorescents dont les effectifs, toujours 10 à 1000 plus élevés que ceux d'*E. coli* dans les même situations de milieu, sont très fluctuants, signe d'une stratégie totalement différente, de type « opportuniste » car inféodés à l'activité du système racinaire.

La capacité biotique associée à la naturalisation des *E. coli* semble dépendre de caractéristiques bien différenciées des horizons concernés (fortes teneurs organiques indépendamment de l'acidité, ou texture très argileuse). Ceci suggère une combinaison de conditions biotiques favorables mais aussi de facteurs structuraux favorables, avec des microsites « refuges » permettant aux bactéries d'échapper à la prédation reconnue comme prépondérante dans le contrôle des populations introduites <sup>16</sup>.

L'absence de relation observable, dans le cadre des suivis disponibles, entre ce stock naturalisé et la proximité ou l'abondance de déjections, l'extension de ce stock de surface à l'ensemble des cinq premiers centimètres des sols de l'ensemble du territoire pastoral suggèrent des transferts peu intenses et répétés sur le long terme. La dispersion des déjections vers la matrice du sol pourrait en particulier résulter non seulement de l'activité de la faune aussi de certains transferts hydriques particulièrement actifs en montagne, notamment en période d'imprégnation générale des sols par l'eau de fonte des neiges.

Il existe donc une contamination assez homogène, généralisée et pérenne de l'horizon de surface des sols de la zone pâturée, **qui ne s'observe pas hors de cette zone** et ne **s'estompe pas pendant l'hiver**. Le stock ainsi constitué est quantitativement largement supérieur à celui des déjections.

Les **populations STEC** sont beaucoup moins rémanentes qu'*E.coli*. Elles ne sont en effet détectées dans les sols de l'alpage que lorsque des matières fécales contaminées par ces populations sont présentes à la surface des sols.

# 6.2.3 <u>Analyse de la structure génétique des populations d'E. coli</u>: mise en évidence de populations d'E. coli présentant des comportements écologiques différents dans les réservoirs primaires et secondaires

L'étude de la structure génétique des populations d'*E.coli dans* les différents compartiments étudiés confirme la complexité généralement reportée des populations naturelles d'*E. coli* (22 allèles *uidA* différents observés par PCR DGGE). Une **diversité** importante des populations pathogènes d'*E. coli* est également observée puisque, sur 75 isolats STEC, 8 clones différents appartenant à 6 sérotypes distincts sont obtenus.

La structure génétique évolue selon les conditions et lieux de survie des populations d'*E.coli* (figure 10). Ainsi, comme signaler précédemment, la diversité intra spécifique des populations fécales cultivables d'*E coli* diminue légèrement au cours du vieillissement de la bouse, suggérant un premier niveau de sélection conduisant au déclin de certains clones et/ou leur entrée dans un état viable mais non cultivable (VBNC). La diversité est plus faible dans les matières fécales d'animaux sauvages (bouquetins, marmottes, renards) *coli*. Tous les allèles *uidA* observés chez ces animaux sauvages sont présents chez les bovins ce qui suggère l'échange probable de populations d'*E. coli* entre les animaux dans l'alpage via l'ingestion accidentelle de matières fécales. La hiérarchie des profils DGGE-*uidA*, , permet de confirmer l'existence de transferts verticaux des *E. col*, des bouses vers les sols. Elle montre aussi que les principales sources de contamination de la rivière sont les bouses et les sols drainants. Enfin, ces résultats confirment l'hypothèse de l'existence de populations d'*E. coli* naturalisées dans des sols, comme cela a été récemment suggéré par divers auteurs 43,44,45.

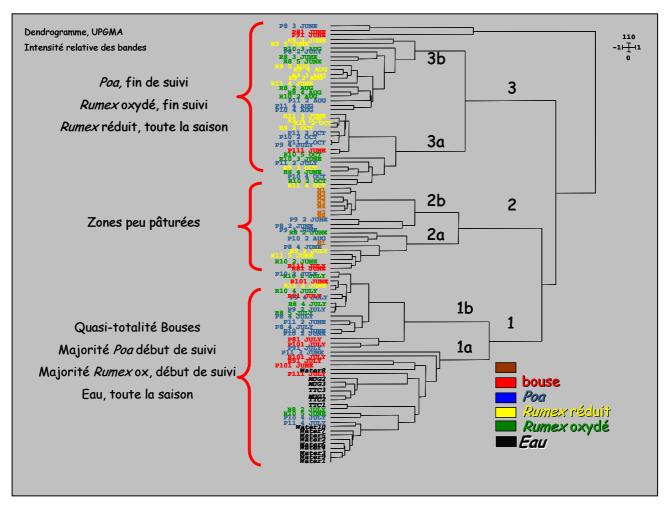


Figure 10. Analyse hiérarchisée des profils DGGE obtenus dans différents types d'échantillons

# 6.3 Acquisition de la charge en E. coli des eaux de surface : réservoirs environnementaux (stocks) – eaux – exutoire.

Des mouvements d'eau latéraux et verticaux sont impliqués dans le transfert d'*E. coli* depuis les stocks, déjections ou sols, jusqu'à l'exutoire. Ils diffèrent en termes de volumes d'eau et de flux saisonniers de bactéries transférées. Ainsi, à Bise durant la saison pastorale, l'écoulement de base du bassin, alimenté par les mouvements verticaux, représente environ 80% du volume d'eau acheminé à l'exutoire, alors que sa contribution au transfert de bactéries n'est que de 5%.

#### 6.3.1 Flux verticaux

Dans les situations d'horizons profonds à fonctionnement ouvert (sols drainants), tels les matériaux à forte porosité d'assemblage de certaines formations superficielles tapissant le fond du bassin versant (cônes de déjection, éboulis, ...) ou encore les horizons de sols acidifiés et perméables, les stocks d'*E. coli* sont transitoires et ne s'observent que lorsque les bouses sont présentes à la surface des sols.

Les populations bactériennes qui sont détectées dans de telles conditions de sol ont des caractéristiques phylogénétiques semblables à celles des matières fécales fraîches (cf figure 10). A l'identique, elles présentent des dynamiques enzymatiques pour la β-D glucuronidase voisines de celles des déjections (fig 11). Certaines d'entre elles montrent en outre des filiations avec des souches pathogènes telles que la souche *E. coli* O157:H7 EDL933. Enfin, les *E. coli* STEC, utilisées comme traceur des mouvements bactériens, sont clairement mises en évidence dans ces situations particulières d'horizons connectés à la surface par les mouvements d'eau, tant que des matières fécales sont présentes à la surface des sols. Tout ceci atteste l'existence de mouvements verticaux attribuables à un transfert hydrique à partir des déjections vers un horizon à capacité d'accueil faible, inférieure au seuil de détection. Dans ces horizons profonds, les conditions de survie sont moins bonnes que dans les milieux confinés (substrats carbonés plus limités, stress hydriques et/ou toxicité aluminique). Les colonies bactériennes introduites en profondeur par les lames d'eau de drainage, ne peuvent donc probablement pas y persister.

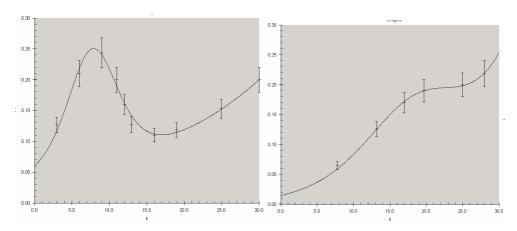


Fig. 11. Production de méthylumbelliferone en fonction du temps. Courbe de gauche : évolution typique observée dans le cas de déjections et en profondeur sur sols drainants. Courbe de droite : contaminations anciennes. Le modèle développé pour rendre compte de ces dynamiques permet d'émettre l'hypothèse que le pic observé (courbe à gauche) traduirait l'activité d'espèces bactériennes différentes de E coli.

A une autre échelle, des « pics » significatifs de teneurs en *E coli* sont enregistrés à l'exutoire du bassin versant en fin de tarissements post averses estivales, survenant avec retard sur la crue compris entre 7 à 10 jours. Ces pics représentent 10% du flux total de la période estivale environ. Leur dynamique est assez similaire à celle de restitutions bactériennes observées en conditions de laboratoire en sortie de lysimètres ou colonnes de sols<sup>46</sup>. Elle est assez typique de phénomènes de transfert colloïdaux par advection-dispersion, avec une phase de croissance progressive des teneurs faisant place à un retour graduel vers des teneurs moyennes de l'écoulement de base. Ces phénomènes sont assez bien décrits<sup>47</sup> et correspondent à des transferts nécessitant une macro-porosité importante pour permettre le libre passage des cellules bactériennes et limiter ainsi les phénomènes de rétention bactérienne<sup>48</sup>. On peut raisonnablement penser que les secteurs contribuant à ces transferts correspondent aux terrains les plus perméables (formations superficielles à forte porosité d'assemblage), correspondant aux situations de sols où la structure génétique est identique entre surface et profondeur et révèle justement des mouvements verticaux (cf figure 10).

#### 6.3.2 Flux latéraux

#### 6.3.2.1 Effets du ruissellement sur les divers types de stocks et relation flux-stocks

Les mouvements latéraux de l'eau sont à l'origine de l'essentiel du flux bactérien à l'exutoire. Ils correspondent majoritairement à des transferts associés au ruissellement de surface, situation assez typique des contextes de prairie<sup>49</sup>.

L'importance du ruissellement est clairement mise en évidence par le suivi et le traçage géochimique de l'écoulement à l'exutoire en période de crue. Les flux de bactéries résultant sont cependant quantitativement très différents selon l'origine du ruissellement et la saison.

Dans le cas des masses d'eau transférées lors de la **fonte des neiges**, les concentrations sont faibles, de 1 à 10 / 100ml, un ordre de grandeur 1000 à 10000 fois inférieurs à celui des crues de la période pastorale et ceci bien qu'il subsiste à la surface du bassin un nombre non négligeable de bouses résiduelles, déposées en fin de saison puis conservées sous la neige. Ces faibles valeurs ne sont pas liées à un effet dilution car :1) les teneurs sont basses depuis la fin de l'automne précédent ; 2) le débit en période de fonte a en général un ordre de grandeur inférieur à celui des crues estivales. En fait, les faibles teneurs sont dues à la faible labilité des stocks existants : les stocks rémanents et naturalisés de bactéries de l'horizon rhizosphérique de surface des stations pastorales ou des résidus de bouse sont peu mobilisables, malgré leur importance quantitative et l'imprégnation générale d'eau et la généralisation du ruissellement qui marquent la fonte des neiges. Notons que pour des surfaces de sols exemptes de déjections, le ruissellement expérimental obtenu sous pluie simulée, s'est révélé lui aussi très peu chargé en *E. coli*, avec seulement quelques cellules pour 100ml. Ces essais confirment bien que seule une fraction infime du stock situé dans les premiers centimètres de sol est susceptible d'être remobilisée par le ruissellement.

La modélisation permet de bien reproduire les flux de l'exutoire en période de crue estivale (figure 12). Les carcatéristiques du transfert sont les suivantes : (i) une origine des bactéries dans les premiers mètres qui jouxtent le réseau hydrographique, c'est-à-dire dans des situations topographiques de bas de versant, là où les flux d'eau latéraux sont concentrés ; (ii) en cohérence avec nos essais de simulation de pluie, une labilité significativement supérieure des bactéries lorsqu'il s'agit de bouses fraîches (on montre notamment par simulation que ces dernières contribuent pour plus de 90% du flux total de bactéries à l'exutoire du bassin versant) ; (iii) une rétention non négligeable de bactéries à la surface des sols (selon les averses, 80 à 95% des bactéries ne parviennent pas à l'exutoire) durant les trajets reliant bouses et réseau hydrographique. Ce dernier point pourrait très bien expliquer l'existence d'un fond bactérien fécal constant (10<sup>4</sup> cfu. g<sup>-1</sup> de sol), généralisé dans les premiers centimètres du sol, résultant d'introductions et de rétentions répétées de bactéries mobilisées depuis les bouses par des lames d'eau ruisselant à la surface des sols.

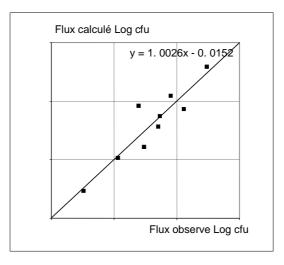


Fig. 12. Flux bactérien calculé et observé lors de neuf averses durant la saison pastorale

## 6.3.2.2 Zones sources critiques

L'analyse met en évidence, dans le contexte étudié, l'existence d'au moins deux types de zones contributives impliquées dans les exportations du bassin. Celles situées dans l'environnement proche (quelques dizaines de mètres) des berges du cours d'eau, de faible période de retour, plutôt concentrées dans les secteurs avals du bassin versant, et celles associées aux exutoires des talwegs amont, de période de retour plus forte.

Il est possible d'évaluer que la quantité de bactéries mises en suspension dans les lames de ruissellement et par la suite exportées à l'exutoire, ne représente en fait qu'une part infime du total des bactéries de la masse de l'ensemble des bouses, de l'ordre de quelque % à ‰. La surface active, c'està-dire les zones sources critiques, sont en fait très restreintes ; elles ne correspondent qu'à quelques dizaines à centaines de bouses, situées selon la période de retour des averses soit aux franges du réseau hydrographique, marais y compris, soit dans les zones de fonds de talwegs saturées par des apports d'eau du versant (figure 13).

Les résultats obtenus mettent par ailleurs en évidence deux éléments remarquables pour la variabilité de l'intensité du transfert bactérien : la forte évolution dans le temps et dans l'espace, du stock bactérien associé à l'ensemble des bouses. La quantité totale de bactéries susceptibles d'être extraites par les écoulements demeure très élevée pendant toute la période estivale en relation avec un apport quotidien en bouses fraîches mais elle décroît rapidement dès le départ du troupeau, avec le croûtage des bouses. On peut mettre ces dynamiques en relation avec la forte réponse du bassin à la présence ou absence du troupeau, en l'occurrence avec l'accentuation des exportations à l'exutoire de bactéries fécales dès la mise en pâture des surfaces et à l'inverse un retour rapide à des teneurs faibles dans la quinzaine qui suit le départ des troupeaux.

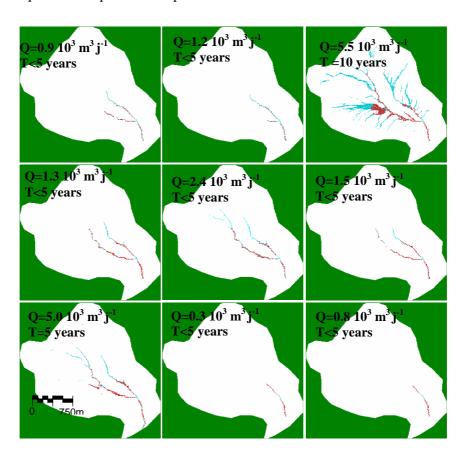


Fig. 13. Zones sources critiques pour différentes conditions d'averses. Pixels rouges : bouses responsable de 95% du flux total de bactéries ; pixels bleus : réseau hydrographique (Q : débit journalier, T : période de retour).

## 7 PORTEE OPERATIONNELLE DES RESULTATS OBTENUS.

Le travail réalisé apporte des éléments de réflexion pour des développements opérationnels relatifs à : (1) l'analyse de la valeur indicatrice d'*E. coli* en tant que traceur environnemental des contaminations fécales ; (2) l'importance des systèmes pastoraux dans l'exposition humaine aux STEC ; (3) la définition des moyens de lutte et de prévention des contaminations microbiologiques associées au pâturage. Sur ce dernier point, dans l'état actuel d'avancement du travail réalisé, notre présentation se limite à un premier cadrage sur la détermination des périodes à risques, la délimitation des zones contributives et les indicateurs de diagnostic.

# 7.1 <u>Valeur indicatrice d'E. coli en tant qu'indicateur de contamination fécale.</u>

L'aptitude des populations d'*E. coli* à survivre durablement dans les conditions spécifiques des premiers centimètres de la surface des sols est bien établie. Dans les conditions étudiées à Bise, les populations de *E. coli* sont naturalisées dans le sol et de ce fait, stables et peu extractibles par les ruissellements de surface. Il est aussi assez probable que ces colonies bactériennes pérennes en surface du sol soient peu sensibles aux flux verticaux de percolation de l'eau; nos observations et plusieurs essais sur colonnes de sol<sup>50</sup> démontrent l'efficacité de la rétention. En conséquence, les bactéries stabilisées dans le sol ont une faible probabilité d'être transférées vers les nappes ou eaux de surface, si bien que ce stock environnemental, malgré son importance quantitative, n'affecte pas vraiment la valeur indicatrice d'*E. coli*.

Dans nos conditions de transfert d'eau, qui sont assez représentatives des conditions usuelles des prairies (écoulements de surface non érosifs, ruissellement sur sols saturés), les propriétés physiologiques et génétiques des populations d'*E. coli* sont similaires à celles des bouses. Ceci confirme que *E. coli* rend bien compte d'une présence probable et potentielle d'agents infectieux, y compris des sérotypes pathogènes.

Un dernier cas est cependant à envisager. Il s'agit des évènements plus exceptionnels marqués par une forte turbidité due en partie à l'érosion de surface des sols prairiaux dégradés par un surpiétinement (chargement excessif). Pour de tels évènements, des populations naturalisées sont probablement exportées en association avec les agrégats et particules de terre mais ces transferts s'accompagnent en général également de cellules d'*E. coli* primaires provenant du délavage des matières fécales qui recouvrent ces zones piétinées contributives. Finalement la valeur indicatrice d'*E. coli* nous semble donc assez robuste dans la plupart des circonstances, et sa détection informe bien sur le risque d'une présence potentielle de pathogènes fécaux.

# 7.2 <u>Principaux modes de transmission des STEC et rôle des systèmes pastoraux dans l'exposition humaine STEC</u>

Les connaissances sur les modes de transmission et les sources de contamination à STEC reposent principalement sur des études d'épidémiologie analytique et des investigations d'épidémie<sup>51</sup>; A l'heure actuelle, les 4 principales voies d'infection sont : l'ingestion d'aliments, la transmission hydrique (eau de boisson ou de baignade), la transmission interhumaine, et le contact avec les animaux de ferme et leur environnement.

Nos résultats apportent un point de vue et des données complémentaires. Complétés par la bibliographie disponible ils aident à construire une **analyse de risque** spécifique des systèmes pastoraux de type alpage (figure 14). Les principaux flux de STEC entre le réservoir animal et l'homme représentés sur cette figure sont des potentiels qui n'ont pas fait l'objet de mesures particulières dans notre site d'étude.

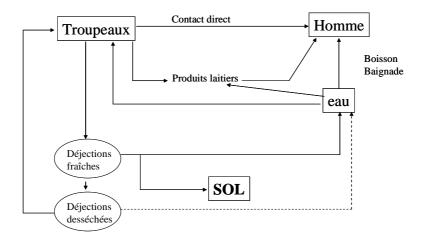


Figure 14 : Flux potentiels de STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels de STEC entre le réservoir animal que peuvent représenter les animaux d'élevages et l'homme

En période estivale, les eaux recueillies à l'exutoire du bassin versant ont présenté, à chaque temps de prélèvements (tous les 15 jours sur une période de 3 mois), un signal positif par PCR sur les gènes *stx* suggérant une contamination permanente de l'eau par des STEC. Au sein de l'alpage, une prévalence de la contamination des bouses par des STEC d'environ 24% a d'ailleurs été observée chaque année. Notons l'exposition des troupeaux à l'auto-contamination notamment à partir de l'eau de boisson mais peut être aussi de la consommation involontaire de fragments de déjections desséchés (survie assez longue des STEC dans les déjections). Dans ce contexte, un contrôle au niveau des ruminants sauvages serait pertinent ; la présence de nombreuses souches communes de *E. coli* entre bovins et herbivores sauvages suggère l'existence de tels échanges.

Bien que les niveaux de populations en STEC sont toujours inférieurs à 200 UFC par g de sol sec ou par ml d'eau, la qualité microbiologique des eaux de montagne, dans des zones pâturées, est fortement remise en question par nos travaux et les risques sanitaires associés à leur consommation sont réels, car les doses infectieuses pour ce type de pathogènes sont faibles (inférieurs à 10 pour les *E. coli* 0157:H7). Ainsi, **il serait important de suggérer aux pouvoirs publics que les contrôles de qualité microbiologique de l'eau complètent les dénombrements des coliformes fécaux par une détection moléculaire des gènes de virulence stx.** Dans l'ensemble la maîtrise de ces risques ne semble, ni hors d'atteinte ni nécessiter des mesures exceptionnelles. Une information raisonnable du public, même si elle remet en cause l'image d'eau pure en montagne, parait faisable et souhaitable car de nombreux usagers ne prennent pas suffisamment en considération les risques liés aux troupeaux. Les actions au niveau exploitation agricole sont déjà partiellement en cours ; elles relèvent du contrôle qualité au niveau des productions et de la protection des captages d'eau à usage agricoles.

# 7.3 <u>Caractériser des périodes à risques</u>

L'altération de la qualité des ressources en eau lors des périodes pluvieuses<sup>52</sup> est une tendance générale marquée par une élévation de l'ensemble des indicateurs de contamination fécale. Pour les techniciens hygiénistes chargés de la maintenance des unités de distribution d'eau, ces périodes sont donc considérées comme critiques et font l'objet d'une attention particulière.

Notre site d'étude est typique de ce point de vue : plus de 95% des exportations annuelles de bactéries sont associées à des évènements pluvieux estivaux. L'essentiel se manifeste lors des crues en relation avec le ruissellement sur des surfaces récemment pâturée. Mais il existe aussi un transfert secondaire dû à des infiltrations et des transferts profonds et qui gagne l'exutoire après le tarissement des crues. Ces transferts « retardés » sont probablement liés au fonctionnement hydrologique des formations superficielles à forte porosité d'assemblage (éboulis, cônes, moraines latérales), lesquelles sont assez fréquentes dans les contextes de montagne. Dans un contexte d'alimentation en eau potable, la détection de ces contaminations retardées est plus difficile, dans la mesure où elles ne sont pas

accompagnées de variations de régime hydrologique. Il importe donc probablement de considérer que la période critique associée aux évènements pluvieux est plus longue que la simple période de crue. Les situations où des transferts profonds retardés sont susceptibles d'être générés sont encore mal connues et des études supplémentaires sur les dynamiques en cause et facteurs en jeu devraient être menées pour apporter des éléments de contrôle (traceurs chimiques?) et de surveillance spécifiques.

# 7.4 Délimitation des zones contributives, conséquence en terme de maîtrise

Dans le site étudié, les zones contributives apportant de forts niveaux de contamination à l'exutoire sont variables dans la saison (localisation, extension) mais toujours de superficies relativement restreintes. Elles coïncident partiellement avec des espaces qui supportent des fonctions essentielles vis-à-vis du troupeau car permettant son alimentation en eau et fournissant des ressources fourragères importantes à certains stades de la saison pastorale. Du fait de leur valeur pastorale, les stations concernées correspondent souvent à des parcelles dont l'appétence se maintien tout au long de (pas de contraintes sur le régime hydrique et trophique des sols, coupe fréquente dès le début de la saison). La présence de déjections récentes est en conséquence continue sur toute la saison dans ces zones pouvant contribuer au ruissellement lors des pluies estivales. Cette situation est probablement assez courante puisqu'il existe un lien assez général dans les Alpes entre valeur pastorale et régime hydrique. Dans le contexte d'une exploitation extensive ou semi-extensive qui, comme à Bise, laisse une large part au choix du troupeau, il existe probablement fréquemment une contradiction entre utilisations des ressources fourragères et risque pour la qualité microbiologique des eaux. La mise en œuvre de modalités de gestion du pâturage compatible avec une utilisation durable des ressources en eau peut en conséquence soulever de réels problèmes.

Un premier type de mesure repose sur des **aménagements ciblés** du pourtour du cours d'eau. Il s'agit de zones sources critiques correspondant à des secteurs où le dépôt des bouses relève ; à la fois de déplacements individuels des animaux pour l'abreuvement ; et de déplacements collectifs pour la traite ou l'accès aux quartiers supérieurs. Compte tenu des longueurs de rive concernées, du caractère collectif des déplacements et de la hauteur des moyens à mettre en œuvre pour empêcher les contacts troupeau – cours d'eau, il n'est pas envisageable de protéger ces types de zones critiques par des fils de ceinture. Les seules exceptions envisageables, sont les zones humides de type bas marais tourbeux (aucune valeur fourragère). Dans la pratique, c'est l'installation d'abreuvoirs, dont on a par ailleurs mesuré l'efficacité<sup>53</sup>, qui devrait permettre de contrôler une partie des problèmes. On peut aussi envisager d'organiser avec des passerelles le franchissement des sections du réseau hydrographique clés vis-à-vis du circuit de pâturage<sup>54</sup>.

Dans les talwegs critiques amont où la période de retour du risque est plus faible, et où les déjections sont d'avantage associées aux déplacements individuels des animaux pour le pâturage, des dispositifs de ceinturage peuvent être suggérés, si toutefois les surfaces concernées sont restreintes et leur isolement n'affecte pas substantiellement les ressources fourragères. Si tel n'est pas le cas, une modification globale des itinéraires de parcours est l'alternative à envisager pour limiter les risques. Il s'agit d'éloigner au maximum les animaux des zones contributives lors de la période d'étiage sévère (août) tout en maintenant un bon potentiel fourrager global. Ceci suppose de compléter les ressources fourragères attenantes au réseau hydrographique en valorisant lorsque cela est possible les faciès pastoraux à haute valeur pastorale situés hors des zones contributives estivales. Une autre alternative consiste à créer ou re-créer de telles ressources. Ceci est théoriquement envisageable et nécessiterait de modifier les parcours de début de saison pour obtenir une coupe précoce sur les versants, puis d'apporter une fertilisation (le recours aux engrais chimiques peut être envisagé, mais il existe aussi des solutions d'épandage d'effluents d'élevage adaptées aux conditions de pente, tels les canons à lisier ou les canaux de fert - irrigation). Bien entendu de tels scénarios sont à étudier au cas par cas. Ils sont toutefois difficiles à mettre en œuvre car ils supposent de profondes modifications des pratiques de gardiennage. La réflexion en cours est donc théorique mais elle constitue un support précieux pour raisonner, sur la base de cas concrets, des indicateurs clés de gestion. Le tableau 2 présente un état de ces réflexions.

Les mesures de protection sont au total très dépendantes de l'organisation et des conditions d'utilisation des surfaces pastorales. Elles demandent à être déduites de diagnostics portant non seulement sur la localisation des zones contributives mais aussi d'éléments relatifs aux différents niveaux d'organisation du système pastoral (main d'oeuvre disponible, répartition des ressources fourragères, aménagement des secteurs concernés).

Le travail réalisé apporte des outils dans cet objectif, avec notamment l'interface SMDR développée sous VB (fig. 15) qui permet d'éditer des cartes de hauteurs de ruissellement et de les transférer sous système d'information géographique pour leur analyse. Dans la mesure où ces cartes permettent d'identifier les secteurs les plus fréquemment soumis aux excès d'eau, elles donnent des éléments de diagnostics déterminants pour la localisation des zones sources critiques.

Composantes du système		Variables clés	Paramètre du diagnostique
Eau	Eau à l'exutoire (sortie)	Régime hydrique Débits d'étiages	Dilution moyenne des contaminations :         - durant la période d'étiage sévère         - durant la saison pastorale en période de crue ;         - durant la saison pastorale post crue ;         - durant la période post saison pastorale ;
			Disponibilité des ressources Niveau de traitement prévisible
Bactéries	E. coli et STEC	Teneur-Doses infectantes Types	Dénombrement et Profils génétiques en relation avec l'hydrologie
Bassin versant pâturé	Zones contributives  Parcours des troupeaux (itinéraire et plan de pâturage)	Détermination des zones de ruissellement estival (zones saturées)  Relation parcours réseau hydrographique	Risque de contamination en période de crue Localisation des interventions prioritaires
Utilisation	Distribution spatiale et saisonnière des ressources fourragères	Charge animale Date de première coupe	Contraintes pastorales (cf outils du diagnostic pastoral)

Tableau 2 : les composantes du diagnostic

•

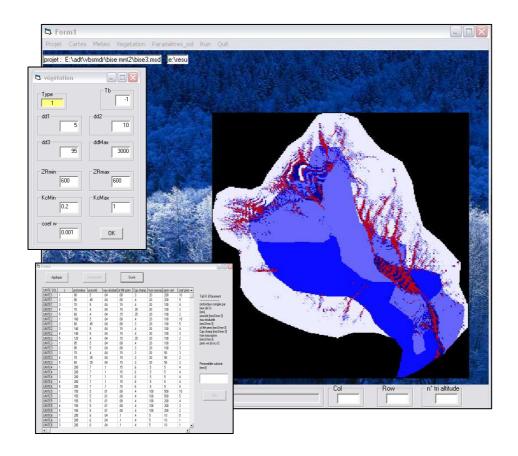


Figure 15. SMDR-VB Une interface pour l'étude des sources variables de ruissellement sous prairies naturelles permanentes

## **8 CONCLUSIONS**

Les recherches réalisées dans « Pastor » portent sur :

- 1) la dynamique et l'évolution des structures génétiques des populations de *E. coli*, y compris les souches pathogènes STEC,
- 2) la nature et le fonctionnement des zones contributives aux contaminations fécales des eaux de surface du bassin versant pâturé.

Les résultats obtenus mettent en évidence des fonctionnements inattendus. En premier lieu, il existe un stockage à long terme d'*E. coli* dans les premiers centimètres organiques de la surface des divers sols sous pâturage, avec des effectifs constants quels que soient, la saison, la proximité d'une bouse, l'intensité du pâturage ou le contexte bioclimatique. Cette dynamique correspond à celle d'une population naturalisée; elle est expliquée par référence au concept de capacité d'accueil. Les *Pseudomonas* fluorescents prises comme « bactérie tellurique type », présentent dans les mêmes contextes une dynamique totalement différente marquée par une forte variabilité, représentative de stratégies opportunistes.

Plus en profondeur, la présence durable de populations naturalisées ne s'observe que dans les situations de sols particuliers, peu drainants (confinés) et de ce fait riches en matière organique. Dans le cas des sols drainants, les effectifs bactériens sont fugaces ; ils semblent résulter de transferts

advectifs et dispersifs ; les temps de résidence sont faibles ; les populations répondent à des contrôles biotiques et abiotiques (exportations par l'eau, oligotrophie, pH).

Les déjections constituent d'autres lieux de stockage. Elles sont susceptibles d'inclure des souches potentiellement pathogènes porteuses de facteurs de toxicité (telles que des shigatoxines). Le stockage des *E. coli* y est limité pendant la saison pastorale, par l'évolution physique (dessiccation), surtout par la disparition physique et biologique des bouses (pluie, coprophages) ; en fin de saison un stock non néglieable se maintient sous la couverture neigeuse.

Les variations de la structure génétique des populations d'*E. coli* dans les différents réservoirs environnementaux du bassin versant expriment des dynamiques adaptatives. Les populations naturalisées de la rhizosphère de surface ou des milieux confinés s'avèrent spécifiques et très différentes de celles des dépôts fécaux. Ces dernières présentent, à l'inverse des précédentes, un fort degré de similarité avec les populations isolées du rectum des bovins ou retrouvées en profondeur dans les sols drainants. Les stocks diffèrent aussi en terme de propriétés et notamment de susceptibilité visà-vis de l'extraction par les écoulements, ruissellement ou infiltration. Les déjections récentes sont les stocks les plus extractibles. La dessiccation des bouses se traduit pas une baisse de ce potentiel de contamination des eaux, alors que la teneur en *E. coli* reste stable. Les stocks d'*E. coli* naturalisés des sols, bien qu'assez élevés, sont eux aussi peu mobilisables par le ruissellement.

« Pastor » propose aussi une analyse du fonctionnement du bassin versant pâturé en tant que système de transfert de contaminants fécaux et une modélisation de ces flux bactériens. Les connaissances acquises concernent les régimes d'exportation à l'exutoire, les facteurs de transfert et les zones contributives.

Le traitement des données bassin versant, montre que le milieu étudié présente un très fort potentiel tampon vis-à-vis des pollutions microbiologiques de l'eau puisque c'est une part infime et momentanée, de quelques ‰ à quelques % du stock total de bactéries fécales des bouses, qui est transférée à l'exutoire. Les écoulements de surface lors des crues estivales représentent le mécanisme dominant de contamination des eaux à l'exutoire. La présence de bouses fraîches est déterminante, ce qui explique les évolutions rapides des niveaux de contamination des eaux de surface, avec l'arrivée ou le départ des troupeaux. En étiage et en fonte des neiges, les teneurs restent faibles en tout point du bassin, exutoire compris.

Les secteurs contributifs actifs, critiques en terme de contamination, sont restreints et localisés au niveau des zones de production de ruissellement, c'est-à-dire dans l'environnement immédiat des berges des cours d'eau, ou les fonds de talwegs, où se concentrent les écoulements latéraux et la pression pastorale. Les sols drainants alimentant des nappes profondes (complexes alluviaux à forte porosité de constitution) sont à l'origine de pics d'exportations post crues, mais de faible ampleur comparativement à ce qui est généré par le ruissellement des versants. Dans notre contexte, les apports directs dans le réseau semblent négligeables. La signature génétique des bactéries retrouvées à l'exutoire est en général celle de populations ayant une structure proche de celles des déjections récentes, situation révélatrice de courtes durées de passage dans le bassin versant et ses zones contributives. Le fonctionnement global du système de transfert à l'échelle du bassin versant se traduit donc par une spécialisation des populations d'*E. coli* stockées avec, d'une part des populations naturalisées, peu mobilisables par les flux d'eau, à transfert lent voire nul et d'autre part, une population primaire, non ou peu modifiée par son passage dans l'environnement, caractérisée par des cheminements courts et rapides et finalement impliquée dans la contamination des ressources en eau.

Les conséquences opérationnelles de « Pastor » concernent la prévention des pollutions fécales des eaux de surface, les risques associés à la présence de STEC, et l'utilisation d'*E. coli* comme indicateur. Il s'agit pour l'essentiel de mesures lourdes à mettre en œuvre et qui font ressortir le caractère paradoxal des pollutions microbiologiques diffuses: une proportion très réduite de contaminants transmise aux aquifères, ayant des conséquences lourdes tant en terme de santé humaine et animale, et dont la maîtrise (partielle) suppose des moyens financiers relativement élevés.

## 9 REFERENCES

Kivi

<sup>2</sup> Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg J., Mahillon J., 2003. The hidden lifestyles of Bacillus cereus and relatives. <u>Environmental Microbiology.</u> 5(8): 631-640.

- <sup>4</sup> Dupray G et P Servais, 1999-Bilan des sources de contamination fécale et premiers essais de modélisation ; Rapport Piren-Seine , Paris 14p -
- <sup>5</sup> Campbell et al, 2004. Input-ouput budgets of inorganic nitrogenfor 24 forestswatersheeds in N.E USA a review Water Air Soil Pollution Springer, New York, NY, 151:373-396, (2004).
- <sup>6</sup> Egli T., Kostler W., Meile L., 2002. Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. FEM microbiology reviews 26: 11-112.
- <sup>7</sup> Fleury P et al., 1999. Activité agricole et qualité de l'environnement dans les Alpes du Nord. In "recherche, Agriculture et développement régional", <u>convention INRA Rhône-Alpes</u>. 26 octobre 1999, Lyon, INRA éditions, Paris: 79-108.
- <sup>8</sup> Bolton Dj, Byrne Cm, Sheridan Jj, Mcdowell Da, Blair Is. (1999) The survival characteristics of a non-toxigenic strain of Escherichia coli O157:H7. J Appl Microbiol. 86(3):407-11.
- <sup>9</sup> Jiang X, Morgan J, Doyle Mp, 2002. Fate of Escherichia coli O157:H7 in manure-amended soil. Appl Environ Microbiol. 68 (5): 2605-9.
- <sup>10</sup> Duru M., B. Hubert, 2003. Management of grazing systems: from decision and biophysical models to principles for action. Agronomie, 23: 689-703.
- <sup>11</sup> Leite L. A., 1990. Réflexions sur l'utilité des modèles mathématiques dans la gestion de la pollution diffuse d'origine agricole. Thèse doctorat, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 342 p + annexes.
- <sup>12</sup> Gril J.-J., Dorioz J.-M., 2002 Des bassins versants de recherches aux bassins opérationnels : quels bassins versants pour connaître et maîtriser les pollutions diffuses ? Ingénieries, 39 p. 3-16. (843)
- <sup>13</sup> AQUAE 2004. Effets de la gestion des bassins versants sur les transferts particulaires et dissous et sur la qualité biologique des eaux de surface en zone d'élevage action structurante Inra cemagref « aquae » : Rapport Coord. Dorioz J.M. et Ombredanne D. 28 p.
- <sup>14</sup> Cassell A., Kort R.. L, Meals D. W., Aschman S. G., Anderson D. P, Rosen Bh And Dorioz J. M., 2002 Use of mass balance modelling to estimate phosphorus and bacteria dynamics in watersheds. Water Sciences and Technology vol 45, N°9 pp157-168
- <sup>15</sup> Smith M. S., Thomas G. W., White R. E., Ritonga D., 1985. Transport of Escherichia coli trough intact and disturbed soil columns. J. Env. Qual. 14:1, 87-91.
- <sup>16</sup> Trevisan D., J. Y. Vansteelant, J. M. Dorioz, 2002. Survival and leaching of fecal microorganisms after slurry spreding on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. Water research, 36: 275-283.
- <sup>17</sup> Fiksdal L., M. Pommepuy, M. P. Caprais, I. Midttun, 1994. Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of raid enzymatic techniques. App. Env. Microbiol., 60:5, 1581-1584.
- <sup>18</sup> George I., M. Petit, P. Servais, 2000. Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. J. Applied Microbiol., 88: 404-413.
- <sup>19</sup> George I., P. Crop, P. Servais, 2001. Use of B-D- galactosidase and B-D-glucuronidase activities for quantitative detection of total and fecal coliforms in wastewaters, Can. J. Microbiol., 47: 670-675.

  <sup>20</sup> Johnson, L. K., M. B. Brown, E. A. Carruthers, J. A. Ferguson, P. E. Dombek & M. J. Sadowsky, 2004.
- <sup>20</sup> Johnson, L. K., M. B. Brown, E. A. Carruthers, J. A. Ferguson, P. E. Dombek & M. J. Sadowsky, 2004. Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy ofdetermining sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4478-4485
- <sup>21</sup> Ishii, S., W. B. Ksoll, R. E. Hicks & M. J. Sadowsky, 2006. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior Watersheds. *Appl.Environ. Microbiol.* **72**: 612-621.
- <sup>22</sup> Byappanahalli, M. N., R. L.Whitman, D.A.Shively, M. J.Sadowsky & S.Ishii, 2006. Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environmental Microbiology* **8**: 504-513
- <sup>23</sup> Yang, H.-H., R. T. Vinopal, D. Grasso & B. F. Smets, 2004. High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1528-1536.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Kivisaar M., 2003. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. [Review]. Environmental Microbiology. 5(10): 814-827.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Dejonghe W., Boon N., Seghers D., Top E. M. And Verstraete W., 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. <u>Environmental Microbiology</u> 3 (10): 649-657.

- <sup>24</sup> Kivisaar, M. 2003. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. [Review]. Environmental Microbiology. 5(10):814-827.
- <sup>25</sup> Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg J., Mahillon, J. 2003 The hidden lifestyles of Bacillus cereus and relatives. Environmental Microbiology. 5(8):631-640.
- <sup>26</sup> Nguyen C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie 23: 375-396.
- <sup>27</sup> Berg G., Eberl L., Hartmann A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. Environmental Microbiology 7 (11) 1673–1685.
- <sup>28</sup> Jamieson R., R. Gordon, D. Joy, H. LEE, 2004. Assessing microbial pollution of rural surface waters. A review of current watershed scale modelling approaches. Agricultural Water Management 70, 1-17.
- <sup>29</sup> Kress, M., G. F. Gifford, 1984. Fecal coliform release from cattle fecal deposits. Water Resour. Bull. 20: 61-
- Collins R., Elliott S., Adams R., 2005. Overland flow delivery of faecal bacteria to a headwater pastoral stream, J. Applied Microbiol. 99,126-132.
- <sup>30</sup> Drevet J, 2004. Etude hydrogéologique du bassin versant de la montagne de Bise. Mem IUT Montagne, Univ Chambéry, 56p.
- <sup>31</sup> Legros J. -P., Party J. -P., Dorioz J. M., 1987 Répartition des milieux calcaires, calciques et acidifiés en haute montagne calcaire humide conséquences agronomiques et écologiques. Doc. cartogr. Ecol., 30, p. 137-157.
- <sup>32</sup> Sigler W. V. and L. Pasutti. 2006. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to differentiate *E. coli* communities in secondary environments. Environ. Microbiol. 8: 1703-1711.
- SMDR, 2003. Soil Moisture Distribution and routing Model, version 2. 0. Documentation, Cornell University, 88p. http://www.aben.cornell.edu/swlab/SoilWaterWeb/Research/smdr/index.html
- <sup>34</sup> USEPA (U.S. Environmental Protectin Agency), 2001. Protocol for developing Pathogen TMDLs. EPA 841-R-00-002. Office of Water (4503F), United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 132p
- <sup>35</sup> Trevisan D., Quetin P., Prigent Combaret C., Poulenard J., Merot P., Dorioz J.M., 2008. Mapping of critical source areas for diffuse fecal bacterial pollution in extensively grazed watersheds by inverse analysis, soumis à Environmental Modelling & software
- <sup>36</sup> Vansteelant, J.Y. 2004. Evaluation des risques de contaminatino microbiologiques liés aux épandages de matières organiques sur prairie de montagne, Thèse Doc. Univ. Savoie, Chambéry, 171p.
- <sup>37</sup> Crane S. R., J. A. Moore, M. E. Grismer, and J. R. Miner. 1983. Bacterial pollution from agricultural sources: A review. Trans. A. S. A. E. 26:858-866.
- <sup>38</sup> Avery S. M., A. Moore, and M. L. Hutchison. 2004. Fate of Escherichia coli originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. Lett. Appl. Microbiol. 38:355-359.
- <sup>39</sup> Troxler, J., M. Zala, A. Natsch, Y. Moënne-Loccoz, and G. Défago. 1997. Autecology of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the rhizosphere and inside roots at later stages of plant development. FEMS Microbiol. Ecol. 23:119-130.
- <sup>40</sup> Keel C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville, and U. Burger. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. Mol. Plant-Microbe Interact. 5:4-13.
- <sup>41</sup> S. Texier1, C. Prigent-Combaret, M.-H. Gourdon, M.-A. Poirier, P. Faivre, J.-M. Dorioz, J. Poulenard, L. Jocteur-Monrozier, Y. Moënne-Loccoz, D. Trevisan. Persistence of Culturable *Escherichia coli* Fecal Contaminants in Dairy 1 Alpine Grassland. J. Environ. Qual., 37:2299-2310
- <sup>42</sup> Gobat J., M. Aragno, and W. Matthey. 1998. Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes, CH-1015 Lausanne..
- <sup>43</sup> Byappanahalli M., and R. Fujioka. 2004. Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. Water Sci. Technol. 50: 27-32.
- <sup>44</sup> Byappanahalli, M. N., R. L.Whitman, D.A.Shively, M. J.Sadowsky, and S. Ishii. 2006. Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. Environ. Microbiol. 8: 504-513
- <sup>45</sup> Ishii, S., W. B. Ksoll, R. E. Hicks, and M. J. Sadowsky. 2006. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. Appl. Environ. Microbiol. 72: 612-621.
- <sup>46</sup> S. -B. Kim, M. Y. Corapcioglu, 2002. Contaminant transport in dual-porosity media with dissolved organic matter and bacteria present as mobile colloids Journal of Contaminant Hydrology 59 267–289.
- <sup>47</sup> Hendry, M. J., Lawrence, J. R., Maloszewski, P., 1999. Effects of velocity on the transport of two bacteria through saturated sand. Ground Water 37 (1), 103–112.
- <sup>48</sup> Coats, K. H., Smith, B. D., 1964. Dead-end pore volume and dispersion in porous media. Soc. Pet. Eng. J. 4, 73–84.

<sup>51</sup> AFSSA. 2003. Bilan des connaissances relatives aux Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC).

 $<sup>^{\</sup>rm 49}$  Collins R. , 2003. Fecal contamination of pastoral wetlands. J. Environ. Qual. , 33:1912-1918.

<sup>&</sup>lt;sup>50</sup> Harvey R. W., 1991. Parameters involved in modeling movement of bacteria in groundwater. In. Modelling the environmental fate of microorganisms, J. Hurst Ed, Am. Soc. for Microbiol., 89-114.

<sup>&</sup>lt;sup>52</sup> DRASS Rhône Alpes, 2007. Rapport 2005. L'alimentation en eau potable des bassins rhône – méditerrannée et corse, DRASS Rhône Alpes, Lyon, 27p.

Solution of the potential of off-stream livestock watering to reduce waterquality

impacts. Bioresour. Technol. 58:285-290.

<sup>&</sup>lt;sup>54</sup> Meals D. W., D.C.Braun (2006). Demonstration of methods to reduce E. coli runoff from dairy manure application sites. J. Environ. Qual. 35:1088-1100.