

**UBO**

université de bretagne  
occidentale



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : Biologie marine*

**École Doctorale des Sciences de la Mer**

présentée par

**Sophie Mieszkin**

Laboratoire EMP/MIC Ifremer centre de Brest

**Thèse soutenue le 28 Octobre 2010**

devant le jury composé de :

**Diagnostic moléculaire de  
l'origine des contaminations  
fécales dans l'environnement  
littoral - Développement de  
marqueurs *Bacteroidales*  
spécifiques de l'hôte**

- **Rapporteur : Mr. Anicet Blanch, Professeur,** Université de Barcelone, Espagne
- **Rapporteur : Mr. Benoît Cournoyer,** Directeur de recherche, CNRS, Université de Lyon I
- **Examineur : Mr. Daniel Prieur, Professeur émérite,** Institut Universitaire Européen de la Mer-UBO, Plouzané
- **Examineur : Mr. Tom Edge, Chercheur,** Environment Canada, National Water Research Institute, Canada
- **Examineur : Mr. Mohamed Jebbar, Professeur,** Institut Universitaire Européen de la Mer-UBO, Plouzané
- **Directeur de thèse : Mr. Gérard Corthier,** Directeur de recherche, INRA, Jouy-en-Josas
- **Co-directrice de thèse : Mme. Dominique Hervio-Heath,** Chercheur, Ifremer centre de Brest, Plouzané
- **Responsable scientifique : Mme. Michèle Gourmelon,** Chercheur, Ifremer centre de Brest, Plouzané



## REMERCIEMENTS

J'ai réalisé mes trois années de thèse au Laboratoire MIC de l'Ifremer de Brest, au sein du département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines avec le soutien financier de la région Bretagne et de l'Ifremer. Je tiens donc à remercier Monique Pommepuy, Philippe Hess et Soizick Le Guyader pour leur accueil dans leur Département et Laboratoire ainsi que la région Bretagne et l'Ifremer.

Je tiens tout d'abord à remercier Mme. Michèle Gourmelon, responsable scientifique de ce travail de thèse. Merci Michèle de m'avoir fait confiance dès notre première entrevue pour mon stage de Master II il y a déjà presque quatre années ainsi que pour la poursuite de ce travail en thèse. J'ai réellement découvert avec toi le monde de la recherche, passionnant et riche mais intransigeant. Tu m'as aussi transmis de grandes qualités dont la persévérance, la rigueur scientifique et toujours donner le meilleur de soi même.

Je tiens sincèrement à remercier Mr. Gérard Corthier pour avoir accepté d'être directeur de cette thèse et également pour m'avoir fait partager d'un point de vue extérieur ses remarques et idées pertinentes.

Je remercie également Mme. Dominique Hervio-Heath, co-Directrice de cette thèse. Merci Dominique pour tes remarques toujours constructives, ta disponibilité, ta bonne humeur et pour les corrections de ce manuscrit, la nuit et le week-end ! J'ai appris beaucoup tout au long de ma thèse à tes côtés et tout particulièrement lors de ces dernières semaines.

Je remercie vivement Mr. Jean Pierre Furet de l'INRA de Jouy-en-Josas. Jean-Pierre tu m'as apporté beaucoup tout au long de ma thèse, rigueur scientifique et pédagogie tant lors de mes 2 stages sous ta direction qu'à distance par téléphone. Merci également pour tes nombreux encouragements, ils m'ont été très précieux. Et enfin, merci pour le temps que tu as accordé à lecture et relecture de ce manuscrit.

J'adresse mes remerciements à Mr. Anicet Blanch, Professeur à l'Université de Barcelone et Mr. Benoît Cournoyer, Directeur de recherche au CNRS de l'Université de Lyon I pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse ainsi qu'aux examinateurs, Mr. Daniel Prieur et Mr. Mohamed Jebbar, Professeurs à l'IUEM ainsi que Mr. Tom Edge, Chercheur au National Water Research Institute, Canada, pour avoir accepté d'évaluer ce travail scientifique.

Ce sujet de thèse a été réalisé principalement dans le cadre des projets nationaux Traces 1 - 2 et du projet franco-anglais AquaManche. Les rencontres avec l'ensemble des partenaires de ces projets m'ont permis de confronter mes idées et d'étoffer mon travail, c'est pourquoi je tiens vivement à tous les remercier.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire EMP/MIC de Brest pour leur aide, leur soutien et leur bonne humeur tout au long de ces trois années.

Tout d'abord l'équipe 'conta fécales' : Cécile, mon coach, c'est dommage pour le concours l'Oréal on avait nos chances... ; Marie-Paule et nos passions communes pour le jardinage et nos compagnons à quatre pattes ; Cha, pour ton caractère unique, ta franchise, nos bavardages et surtout bon anniversaire ! C'est une date que l'on a en commun maintenant. Arrivée cette année au labo, je tiens très sincèrement à te remercier Aourell, car en 6 mois, tes anecdotes, ton soutien et tes encouragements m'ont permis d'avancer et d'arriver au bout, encore merci.

Puis l'équipe 'Vibrio', tout d'abord Amadou, pour tous tes coups de pouces et pour nos points de vue parfois très divergents sur le 7<sup>ème</sup> art ! Merci également à Solen, Anna et Margot pour leur aide au labo et sur le terrain et à Garrett pour les corrections de mon anglais à parfaire, obviously !

Enfin, l'équipe 'modélisation', merci Monique, pour tes conseils et encouragements, Jean-Claude et Morgane pour votre aide concernant la connaissance du terrain et votre dynamisme. Merci aussi à Véronique, depuis que tu es là tout est plus simple pour moi du côté administratif, les commandes ne sont plus un casse-tête !

Et puis, merci également à l'équipe de Virologie de Nantes. Les réunions de Laboratoire et de Département ont toujours été une bonne occasion pour échanger nos points de vue sur nos sujets souvent complémentaires.

Jean-Pierre, merci de m'avoir accordé de nombreuses heures pour la reconnaissance du terrain et la mise en place de mes poches d'huîtres sur l'estuaire de l'Elorn. Merci de m'avoir fait partager toutes tes connaissances du terrain, des oiseaux et de la bonne cuisine bio. Ce fût un vrai plaisir ! Merci également Pierre pour ton aide, sans toi mes graphiques et mes cartes seraient moins agréables à regarder...

Maria et ses bouquets de fleurs qui ont tant égayé mon bureau. Ton arrivée tous les jours dans le labo signifiait que la fin de la journée approchait et que je n'avais pas encore tout terminé ! Merci pour tous tes mots d'encouragement.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Anne-Marie Pourcher et Romain Marti du Cemagref de Rennes, pour nos échanges et notre collaboration. Jonathan Porter et son équipe de l'Environment Agency de Starcross pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je garde un très bon souvenir de la sortie terrain sous des trombes d'eau ! Et Claire Geslin de l'IUEM, pour le suivi annuel de mon travail lors des réunions de mon comité de thèse.

Je remercie également Julien, Stanislas et Chantal du laboratoire UEPSD de l'INRA de Jouy-en-Josas pour leur aide précieuse concernant l'analyse de mes séquences et pour tous les conseils sur la culture anaérobie des *Bacteroidales*.

Un grand merci également à la dizaine d'éleveurs porcins pour m'avoir permis de collecter, avec leur aide (ouf !), des petits échantillons de fèces ou d'effluents, car sans eux je n'aurais pas pu réaliser une partie du travail présenté dans ce manuscrit. Tout particulièrement je remercie Mr. et Mme Kerbrat de Milizac ainsi que Mr. Conq de Plouguin chez qui j'ai réalisé plusieurs séries de prélèvements.

Plus près de la mer, je remercie Mr. Coïc et son fils, producteurs de coquillages à Logonna-Daoulas. Toutes vos huîtres (plus d'un millier) ont été contaminées artificiellement ou naturellement puis sacrifiées pour la science et non dégustées pour nos papilles !

Je remercie vivement la joyeuse équipe du club de plongée de l'Ifremer de Brest : Marc, Francis, Laure, Claude, Thierry, Arnaud, Eric, Christine, Mathilde, Philippe, Eva, Jean-Michel, Xavier C., Pierre et Xavier P. En trois années à vos côtés, j'ai développé des compétences que je sous-estimais et j'ai aussi passé des super moments sous et sur l'eau.

Je tiens aussi à remercier mes deux meilleures amies : Nolwenn la Bretonne et Virginie la Lorraine. Toutes les deux, vous m'avez toujours encouragé, vous y avez toujours cru ! Les vrais amis se comptent sur les doigts d'une main.

Tout simplement merci à toute ma famille. Je tiens d'abord à remercier énormément mes parents et leur soutien de tous les instants depuis plus de 27 années, et cela même à 1 200 Km de distance. Et non papa, je n'ai pas trouvé de moules savantes, désolée ! Ce sera pour la prochaine fois. Je remercie tout aussi fortement mes mamies, mon papi et ma tante, merci de vous déplacer de si loin pour la soutenance, vous me faites tellement plaisir. Egalement un grand merci à mon frère, Arnaud, toujours là si j'ai besoin ! Mais fait attention cette fois-ci d'être à l'heure à l'aéroport !

Comment te remercier Raphaël ? Les mots couchés sur cette page ne sont qu'un début. Tu as toujours été présent dans les bons comme les moins bons moments et c'est toi qui as toujours su me redonner confiance pour avancer et aller au bout de cette belle mais difficile aventure. Pour tout cela mille fois merci !

Merci aussi à Marie-Thérèse et Alain qui ont patiemment accepté mes absences répétées les dimanches en fin de journée. Je n'ai pas pu partager avec vous tous l'heure du thé, des tartines (nutella, confiture ou pâté !), des crêpes et des gâteaux...mais je vais me rattraper !

Une pensée aussi à mon Moumoute, qui, de longues heures passées sur mes genoux, m'a aussi encouragé à sa façon de vieux matou.

Et, sans oublier, la météo Bretonne, car sans tous ces nuages gris et cette fine bruine, j'aurais eu beaucoup plus de difficultés à rédiger consciencieusement ce présent manuscrit pendant la saison estivale ! Ah la Provence...et tes cigales !!!



## TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS .....	9
LISTE DES FIGURES .....	10
LISTE DES TABLEAUX .....	13
INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS DE LA THESE .....	17
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	23
I Le risque sanitaire associé aux eaux et aux coquillages .....	25
1.1 Les eaux de baignade .....	25
1.2 Les eaux destinées à la consommation humaine .....	26
1.3 Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives liées aux coquillages .....	27
II La réglementation sanitaire en application .....	30
2.1 Les indicateurs de contamination fécale .....	30
2.2 La réglementation concernant les eaux de baignade .....	30
2.3 La réglementation concernant les eaux conchylicoles .....	32
2.4 La réglementation concernant les zones de pêche à pied .....	33
2.5 La réglementation concernant les eaux destinées à la consommation humaine.....	33
III Les sources de contaminations fécales dans l'environnement .....	35
3.1 Les sources d'origine urbaine .....	35
3.2 Les sources d'origine agricole.....	38
3.3 Les sources par les animaux sauvages .....	40
IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales .....	42
4.1 Les cibles .....	42
4.2 Les méthodes microbiologiques TSM.....	48
4.3 Les marqueurs de PCR .....	55
V Les <i>Bacteroidales</i> .....	64
5.1 Les <i>Bacteroidales</i> au sein du microbiote intestinal.....	64
5.2 Activité commensale et pouvoir pathogène des <i>Bacteroidales</i> .....	66
5.3 Les <i>Bacteroidales</i> au sein de la flore fécale .....	68
5.4 Les marqueurs <i>Bacteroidales</i> de PCR.....	76
5.5 Persistance des marqueurs <i>Bacteroidales</i> dans l'environnement.....	87
AXES DE RECHERCHE .....	91
PLAN DES CHAPITRES DU MANUSCRIT DE THESE .....	95
CHAPITRE I - Analyse phylogénétique des séquences de gènes codant l'ARNr 16S des <i>Bacteroidales</i> issues d'effluents et de fèces d'origine humaine et animale et développement d'un marqueur de PCR quantitative en temps réel ciblant les contaminations fécales par les ruminants.....	101
CHAPITRE II - Estimation des contaminations fécales d'origine porcine dans des eaux de rivière d'un bassin versant en utilisant deux marqueurs <i>Bacteroidales</i> de contaminations porcines par PCR quantitative en temps réel .....	125

CHAPITRE III - Effet de l'oxygène dissous et de la température sur la persistance de marqueurs spécifiques d'une contamination fécale porcine en microcosmes d'eau de rivière et étude de la dynamique des populations bactériennes dominantes d'un échantillon de lisier.	151
CHAPITRE IV - Transfert des marqueurs microbiens et chimiques dans des eaux de ruissellement impactées par des effluents d'origine animale.....	177
CHAPITRE V - Discrimination des contaminations fécales d'origine humaine, porcine et ruminant dans des eaux de rivière d'un bassin versant par PCR quantitative en temps réel en utilisant des marqueurs hôte-spécifiques.....	205
CHAPITRE VI - Développement de marqueurs microbiens et chimiques pour identifier l'origine des pollutions fécales dans les eaux de baignades et les eaux conchylicoles en France .....	221
CHAPITRE VII - Application des marqueurs <i>Bacteroidales</i> spécifiques de l'hôte pour identifier l'origine des contaminations fécales dans les huîtres .....	249
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	285
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	303
ANNEXES .....	321

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism
<b>ARA</b>	Antibiotic Resistance Analysis
<b>ARNr 16S</b>	Acide ribonucléique ribosomique 16S
<b>ARS</b>	Agences Régionales de la Santé
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>CE</b>	Communauté Européenne
<b>CE-SSCP</b>	Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polymorphism
<b>CLI</b>	Chair et Liquide Intervalvaire
<b>Ct</b>	Cycle seuil
<b>CUP</b>	Carbon Utilization Profiling
<b>DCE</b>	Directive Cadre sur l'Eau
<b>DGGE</b>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
<b>EH</b>	Equivalent Habitant
<b>FISH</b>	Hybridation <i>In Situ</i> par fluorescence
<b>LH-PCR</b>	Length Heterogeneity- Polymerase Chain Reaction
<b>LI</b>	Liquides intervalvaires
<b>MAR</b>	Multiple Antibiotic Resistance
<b>MOD</b>	Matière Organique Dissoute
<b>MST</b>	Microbial Source Tracking
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnological Information
<b>NPP</b>	Nombre le Plus Probable
<b>OTU</b>	Operational Taxonomic Unit
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PFGE</b>	Pulse Field Gel Electrophoresis
<b>qPCR</b>	Quantitative PCR
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>RDP</b>	Ribosomal Database Project
<b>REMI</b>	Réseau de contrôle microbiologique de l'Ifremer
<b>Rep-PCR</b>	PCR répétitive
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
<b>STEP</b>	Station d'épuration
<b>STP</b>	Sewage Treatment Plant
<b>TCEP</b>	diphenhydramine tri(2-chloroethyl)phosphate
<b>TD</b>	Tissus digestifs
<b>TDCP</b>	tri(dichloroisopropyl)phosphate
<b>TIAC</b>	Toxi Infections Alimentaires Collectives
<b>TSM</b>	Traceurs de Sources Microbiennes
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>UFP</b>	Unité Formant Plaque
<b>USEPA</b>	United States Environmental Protection Agency
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>WWTP</b>	Waste Water Treatment Plant



## LISTE DES FIGURES

### Etude bibliographique :

- Figure 1** Evolution du nombre de TIAC déclarées en France de 1996 à 2008. La distinction a été réalisée entre les TIAC tous aliments confondus et les TIAC coquillages et crustacés..... 28
- Figure 2** Représentation schématique des différentes méthodes microbiologiques actuellement disponibles permettant de différencier l'origine des contaminations fécales..... 48
- Figure 3** Photographie de microscopie photonique, résolution  $\times 1\ 000$  de *Bacteroides vulgatus* et de *Prevotella buccae* et de microscopie électronique de *Bacteroides fragilis* ..... 65
- Figure 4** Concentrations des groupes bactériens dominants composant le microbiote de l'Homme, des bovins et des porcs par analyse des gènes codant les ARNr 16S..... 71
- Figure 5** Composition des groupes dominants du microbiote intestinal de l'Homme, des bovins et des porcs par analyse des gènes codant les ARNr 16S..... 73

### Chapitre I :

- Figure 1** Phylogenetic relationships of 185 operational taxonomic units from partial *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences isolated from effluent samples and faeces..... 116

### Chapitre II :

- Figure 1** Location of water sampling sites, pig farms and sewage treatment plants on the catchment and estuary of the Daoulas river, Brittany, France..... 133
- Figure 2** Phylogenetic relationships of 51 OTUs obtained from partial 16S rRNA gene sequences from pig fecal and pig slurry samples using Bac32F and Bac708R..... 138
- Figure 3** Concentrations of all-Bacteria, all-*Bacteroidales*, Pig-1-Bac, and Pig-2-Bac markers and *E. coli* bacteria in different target samples from three farms, obtained throughout the slurry treatment process..... 141
- Figure 4** Relation between concentrations of pig-specific *Bacteroidales* markers (Pig-1-Bac and Pig-2-Bac) and *E. coli* bacteria throughout the slurry treatment process. ....142

### Chapitre III :

- Figure 1** CE-SSCP profiles of *Bacteroides-Prevotella* group and BSL at day 0 and at day 43 in the river water..... 163
- Figure 2** CE-SSCP profiles of *Bacteroides-Prevotella* group and BSL group at day 0 and at day 43 in microaerophilic conditions at 4°C and 20°C, and in aerobic conditions at 4°C and 20°C..... 164
- Figure 3** Persistence of All-Bacteria, All-*Bacteroidales*, total lactobacilli, Pig-1-Bac, Pig-2-Bac and *L. amylovorus* markers in microcosms under microaerophilic conditions at 4°C, microaerophilic conditions at 20°C, aerobic conditions at 4°C, and aerobic conditions at 20°C..... 166
- Figure 4** Survival of the fecal indicators *E. coli* and enterococci in filtered river water microcosms incubated under aerobic conditions at 4°C, aerobic conditions at 20°C, microaerophilic conditions at 4°C and microaerophilic conditions at 20°C..... 167

## Chapitre IV :

<b>Figure 1</b>	Schematic diagram of the rainfall experiment.....	186
<b>Figure 2</b>	3-D fluorescence regions.....	190
<b>Figure 3</b>	Faecal indicators and chemical parameters in the runoff water.....	193

## Chapitre V :

<b>Figure 1</b>	Location of water sampling sites, pig and cattle farms and sewage treatment plants on the catchment of the Daoulas river estuary, Brittany, France.....	212
-----------------	---	-----

## Chapitre VI :

<b>Figure 1</b>	Dendrogram showing clustered water samples contaminated by waste water, bovine manure or bovine pasture, porcine manure and by undetermined pollution.....	239
-----------------	--	-----

## Chapitre VII :

<b>Figure 1</b>	Dispositif expérimental des contaminations artificielles d'huîtres en microcosmes d'eau de mer avec des fèces de porcs, ainsi que les différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien testés à partir de TD et de LI des huîtres contaminées.....	257
<b>Figure 2</b>	Dispositif expérimental des contaminations artificielles d'huîtres en microcosmes d'eau de mer avec la souche de <i>B. vulgatus</i> à deux niveaux de contamination, $10^6$ et $10^4$ <i>B. vulgatus</i> /100 ml d'eau de mer, ainsi que les différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien testés à partir de TD et de LI des huîtres contaminées.....	259
<b>Figure 3</b>	Localisation des six sites de prélèvement situés sur l'estuaire de l'Elorn (Finistère, Bretagne), des zones urbanisées et des STEP, des élevages porcins, bovins et de volailles et des zones conchylicoles et de baignade.....	261
<b>Figure 4</b>	Concentrations des marqueurs AllBac et Pig-2-Bac dans les échantillons d'ADN bactérien issus de TD d'huîtres artificiellement contaminés avec des fèces de porcs en fonction de différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien.....	265
<b>Figure 5</b>	Concentrations des marqueurs AllBac et Pig-2-Bac dans les échantillons d'ADN bactérien issus des LI d'huîtres artificiellement contaminées avec des fèces de porcs, en fonction de différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien.....	266
<b>Figure 6</b>	Concentrations du marqueur AllBac dans les échantillons d'ADN bactérien issus de TD d'huîtres où ont été ajoutés $10^8$ <i>B. vulgatus</i> /200 mg de TD ou de TD provenant d'huîtres artificiellement contaminés (bioaccumulation) avec $10^8$ et $10^6$ <i>B. vulgatus</i> /100 ml d'eau de mer en fonction de deux protocoles d'extraction d'ADN bactérien.....	267
<b>Figure 7</b>	Concentrations du marqueur AllBac dans les échantillons d'ADN bactérien issus des LI d'huîtres où a été ajouté $10^8$ <i>B. vulgatus</i> ou des LI provenant d'huîtres artificiellement contaminées avec $10^8$ et $10^6$ <i>B. vulgatus</i> /100 ml d'eau de mer en fonction de différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien.....	268
<b>Figure 8</b>	Concentrations du marqueur AllBac dans les échantillons d'ADN bactérien issus des LI d'huîtres artificiellement contaminées avec $10^8$ et $10^6$ <i>B. vulgatus</i> /100 ml d'eau de mer et dans les échantillons témoins non contaminés, en fonction de 2 méthodes de préparations des LI avant extraction d'ADN bactérien avec le protocole du kit Fast DNA spin kit for soil.....	269
<b>Figure 9</b>	Représentation graphique de corrélations entre variables microbiologiques et physico-chimiques par Analyse en Composantes Principales.....	275

## LISTE DES TABLEAUX

### Etude bibliographique :

<b>Tableau 1</b>	Nombre de déclarations et de cas d'infections par contact avec des eaux de baignade déclarés aux Etats-Unis de 1985 à 1998..... 25
<b>Tableau 2</b>	Nombre de déclarations et de cas d'infections par contact avec des eaux destinées à la consommation humaine déclarés aux Etats-Unis de 1971 à 2006..... 26
<b>Tableau 3</b>	Réglementation sanitaire microbiologique des eaux de baignade selon la directive européenne 76/160/CE..... 31
<b>Tableau 4</b>	Réglementation sanitaire microbiologique des eaux intérieures et des eaux côtières et de transition selon la directive européenne 2006/7/CE..... 31
<b>Tableau 5</b>	Réglementation sanitaire des zones de production conchylicole et usages associés selon la directive européenne 854/2004/CE..... 33
<b>Tableau 6</b>	Traitements secondaires biologiques et performance d'abattement bactérien..... 36
<b>Tableau 7</b>	Concentrations en <i>E. coli</i> dans les effluents urbains..... 36
<b>Tableau 8</b>	Concentrations en <i>E. coli</i> dans les selles de l'Homme et les fèces des animaux ainsi que les flux en <i>E. coli</i> ..... 38
<b>Tableau 9</b>	Concentrations en <i>E. coli</i> dans les effluents porcins..... 39
<b>Tableau 10</b>	Concentrations en <i>E. coli</i> dans les effluents bovins..... 39
<b>Tableau 11</b>	Principales cibles microbiologiques et chimiques utilisées pour identifier l'origine des contaminations fécales ainsi que leurs avantages et inconvénients..... 46-47
<b>Tableau 12</b>	Principales méthodes culturales et moléculaires, ainsi que les cibles associées permettant d'identifier l'origine des contaminations fécales..... 50
<b>Tableau 13</b>	Principaux avantages et inconvénients des méthodes culturales et non culturales utilisées pour identifier l'origine des contaminations..... 53
<b>Tableau 14</b>	Principaux marqueurs de PCR, autres que les marqueurs <i>Bacteroidales</i> , pour identifier les contaminations fécales humaines et animales ainsi que leur sensibilité et spécificité..... 60-61
<b>Tableau 15</b>	Familles et genres composant l'ordre des <i>Bacteroidales</i> ..... 64
<b>Tableau 16</b>	Proportions des principaux groupes de bactéries entériques dans les selles humaines obtenues par deux méthodes moléculaires : l'Hybridation par dot-blot et la FISH couplée à la cytométrie de flux..... 70
<b>Tableau 17</b>	Principaux marqueurs <i>Bacteroidales</i> de PCR conventionnelle pour identifier les contaminations fécales d'origine humaine ainsi que leur sensibilité et spécificité... 77
<b>Tableau 18</b>	Principaux marqueurs <i>Bacteroidales</i> de PCR conventionnelle pour identifier les contaminations fécales d'origine animale ainsi que leur sensibilité et spécificité..... 80-81
<b>Tableau 19</b>	Fréquence de détection des marqueurs <i>Bacteroidales</i> d'origine humaine (HF183 et HF134), ruminant (CF128 et CF193) et porcine (PF163) dans des eaux de l'environnement..... 82
<b>Tableau 20</b>	Principaux marqueurs <i>Bacteroidales</i> de PCR quantitative en temps réel pour identifier les contaminations fécales d'origine humaine ainsi que l'évaluation de leur sensibilité et spécificité..... 84
<b>Tableau 21</b>	Principaux marqueurs <i>Bacteroidales</i> de PCR quantitative en temps réel pour identifier les contaminations fécales d'origine animale ainsi que leur sensibilité et spécificité..... 86
<b>Tableau 22</b>	Persistance, en microcosme d'eau de rivière, des marqueurs <i>Bacteroidales</i> selon différentes conditions de températures..... 88

## **Chapitre I :**

<b>Table 1</b>	Oligonucleotide sequences and amplification conditions for conventional and real-time PCR assays.....	111
<b>Table 2</b>	Distribution and characterization of <i>Bacteroidales</i> operational taxonomic units (OTUs) from French samples of faeces and effluents.....	114
<b>Table 3</b>	Quantification of All- <i>Bacteroidales</i> (AllBac) and ruminant-specific markers in faecal and effluent samples; percentage of positive samples and concentrations.....	117

## **Chapitre II :**

<b>Table 1</b>	Oligonucleotide sequences for conventional and real-time PCR assays with the annealing temperature, the final concentration and the expected size for each amplified product.....	135
<b>Table 2</b>	All- <i>Bacteria</i> and <i>Bacteroidales</i> markers tested with different fecal and effluent samples from human, pig and other animal sources.....	140
<b>Table 3</b>	<i>Bacteria</i> and <i>Bacteroidales</i> marker results from water samples taken from the catchment of the Daoulas river estuary.....	144

## **Chapitre III :**

<b>Table 1</b>	Oligonucleotide sequences for real-time PCR assays with the annealing temperature, the final concentration and the expected size for each amplified product.....	161
<b>Table 2</b>	Decay rates for All- <i>Bacteria</i> , All- <i>Bacteroidales</i> , total lactobacilli, pig markers, <i>E. coli</i> and enterococci.....	168

## **Chapitre IV :**

<b>Table 1</b>	Hydrological characteristics of rainfall simulation events. Average and Standard error of three replicates are reported.....	187
<b>Table 2</b>	Faecal indicators, microbiological and chemical markers in swine slurry and cattle manure.....	191
<b>Table 3</b>	Cumulative amounts of faecal indicators and F-specific coliphages transferred into the runoff water during the rainfall experiments.....	195
<b>Table 4</b>	Results of the faecal markers for the runoff samples.....	196

## **Chapitre V :**

<b>Table 1</b>	Percentage of sensitivity and specificity of host-specific <i>Bacteroidales</i> markers and their quantification in faecal and effluent samples; percentage of positive results and concentrations.....	215
<b>Table 2</b>	Concentration medians and ranges of general and host-specific <i>Bacteroidales</i> markers and <i>E. coli</i> in river waters samples taken from the catchment of the Daoulas river estuary.....	217

## **Chapitre VI :**

<b>Table 1</b>	Primer and probe sequences for real-time PCR for detection of bacterial markers and of four F-specific RNA phage genogroups.....	230
<b>Table 2</b>	Description of 17 microbial and chemical parameters tested during the <i>in situ</i> application of MST markers.....	233
<b>Table 3</b>	Steroid ratios for animal manures and WWTP effluents.....	235
<b>Table 4</b>	Concentrations of human faecal chemical pollution markers in WWTP effluents during the two sampling campaigns.....	236
<b>Table 5</b>	Percentages of the four genogroups of FRNAPH in human and animal faeces and effluents.....	236
<b>Table 6</b>	Specificity of the phylotype 'SFA41' related to <i>Bifidobacterium adolescentis</i> ...	237
<b>Table 7</b>	Average concentrations of faecal indicators and steroid, ratios of steroids, percentage of FRNAPH genogroups and average concentrations of chemical markers, of microbial markers in WWPT effluent, runoff water and river water samples.....	240

## **Chapitre VII :**

<b>Tableau 1</b>	Quantification des marqueurs <i>Bacteroidales</i> général (AllBac) et <i>Bacteroidales</i> spécifiques des contaminations fécales humaines (Hum-1-Bac), par les ruminants (Rum-2-Bac) et porcines (Pig-2-Bac) dans les LI d'huîtres naturellement contaminées provenant de l'estuaire de l'Elorn.....	270
<b>Tableau 2</b>	Quantification des marqueurs <i>Bacteroidales</i> général (AllBac) et <i>Bacteroidales</i> spécifiques des contaminations fécales humaines (Hum-1-Bac), par les ruminants (Rum-2-Bac) et porcines (Pig-2-Bac) dans les eaux estuariennes de l'Elorn et dans eaux de rivière impactant les sites de Pouldu et Camfrout.....	273
<b>Tableau 3</b>	Etendue et moyenne des valeurs ou concentrations des paramètres physico-chimiques : température, oxygène dissous, salinité, pH et turbidité dans les eaux estuariennes des 6 sites de l'Elorn.....	276
<b>Tableau 4</b>	Matrice de corrélations de Pearson.....	276



# **INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS DE LA THESE**

---



Les déjections d'animaux d'élevage ainsi que les effluents urbains ou agricoles peuvent engendrer une contamination microbiologique et chimique qui participe à la dégradation de la qualité des eaux continentales, des eaux littorales et des coquillages.

En France, les contaminations d'origine urbaine sont principalement représentées par les eaux en sortie de station d'épuration (STEP) et les eaux usées des habitats dispersés qui ne possèdent pas d'assainissement autonome ou dont l'assainissement n'est pas conforme. Les élevages peuvent être également une source importante de contamination dans l'environnement. La France est le premier producteur de bovins (19,5 millions) et le troisième producteur de porcs (14,8 millions) en Europe (Agreste Scees, 2007), avec une part importante de la production en Bretagne. Cette région représente pour les élevages bovins et porcins plus de 10,5 et 56 % de la production nationale sur seulement 6 % du territoire. A titre d'exemple, on estime qu'annuellement, l'élevage de porcs génère entre huit et 10 millions de tonnes de lisiers en France dont plus de quatre millions en Bretagne.

L'apport de microorganismes d'origine entérique et notamment de pathogènes *via* ces sources de contamination a pour conséquence des problèmes sanitaires et économiques importants tels que : (i) des Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) lors de la consommation des coquillages (Le Guyader *et al.*, 2010), (ii) des maladies intestinales, cutanées, oto-rhino-laryngologiques ou pulmonaires par contact ou ingestion d'eau (Yoder *et al.*, 2008a ; Yoder *et al.*, 2008b), et (iii) des fermetures ou déclassements de zones conchylicoles et de baignade (Amouroux, 2009).

Afin de limiter le risque sanitaire lié à ces apports, il existe des mesures de prévention et des réglementations. Dans ce contexte, la Directive Européenne Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/CE) astreint l'ensemble des pays européens à atteindre un bon état écologique et chimique de leurs eaux continentales et littorales pour 2015. Les nouvelles directives concernant la qualité microbiologique des eaux conchylicoles et de baignade (852-854/2004/CE et 2006/7/CE), plus sévères que les précédentes, devraient permettre d'atteindre cet objectif. Il est probable que ces normes plus strictes conduisent à une augmentation des déclassements et des fermetures des zones conchylicoles et de baignade. De plus, la nouvelle directive concernant les eaux de baignade, impose aux communes de définir des profils de vulnérabilité pour chaque site de baignade pour début 2011. Ces profils consistent en un recensement et une hiérarchisation des sources potentielles de contaminations fécales des eaux.

La maîtrise du risque sanitaire des eaux continentales et littorales représente donc un enjeu majeur pour les collectivités en terme de développements économiques liés aux activités du

littoral et de tourisme. La discrimination et la hiérarchisation des sources de contamination fécale d'origine humaine et animale sont ainsi devenues prioritaires. Il semble donc important de posséder des marqueurs de l'origine humaine et animale des contaminations fécales et tout particulièrement de l'origine porcine et bovine. Ces marqueurs doivent être sensibles et spécifiques et persister dans l'environnement suffisamment longtemps pour permettre leur détection et l'identification de l'origine de la pollution au niveau des eaux continentales et littorales et des coquillages.

Les indicateurs classiques de contamination fécale, tels que *Escherichia coli* (*E. coli*) et les entérocoques intestinaux, recherchés par méthode culturale, permettent de mettre en évidence une contamination dans l'environnement. Toutefois, le fait qu'ils soient, à la fois, présents dans les selles humaines et les fèces des animaux, ne permet pas d'en identifier l'origine. Des méthodes alternatives telles que les méthodes recherchant des « Traceurs de Sources Microbiennes » ou TSM dont le but est d'identifier l'origine humaine ou animale des contaminations ont été développées ou sont en cours de développement (Glassmeyer *et al.*, 2005 ; U.S. Environmental Protection Agency, 2005). Ces méthodes sont principalement basées sur la recherche de cibles présentes dans les rejets fécaux tels que : (i) les microorganismes (bactéries, virus et archaebactéries), (ii) les composés chimiques naturels (stérols et stanols fécaux), (iii) les composés chimiques destinés à la consommation humaine (caféine et dérivés du tabac), (iv) les composés chimiques de synthèse (parfums et produits lessiviels), et enfin (iv) les ADN des mitochondries des cellules eucaryotes.

Le Laboratoire de Microbiologie du Département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines (EMP) travaille sur la thématique TSM depuis plusieurs années. Un de ses objectifs est de disposer de marqueurs pertinents pour identifier l'origine des contaminations dans l'environnement littoral. Dans ce laboratoire, deux types d'approches sont utilisées, soit des marqueurs bactériens ciblant des bactéries anaérobies, les *Bacteroidales*, soit des marqueurs viraux, ciblant les génogroupes de bactériophages F-ARN spécifiques.

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'approfondir la première approche concernant les marqueurs de *Bacteroidales* en répondant à quatre questions majeures :

- La cible *Bacteroidales*, recherchée par Polymerase Chain Reaction (PCR) quantitative en temps réel, est-elle pertinente pour identifier une contamination fécale et déterminer son origine dans l'environnement ?
- Quel est le devenir des marqueurs *Bacteroidales* dans l'environnement ?

- Est-il possible de différencier l'origine des contaminations en zone littorale et tout particulièrement dans des coquillages naturellement contaminés ?

- Existe-t-il une relation entre les indicateurs classiques de contamination et les marqueurs *Bacteroidales* ?



# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---



## **I Le risque sanitaire associé aux eaux et aux coquillages**

La qualité microbiologique des eaux de baignade et de consommation humaine et des coquillages représente un enjeu de santé publique majeur. En effet, les eaux et les coquillages peuvent contenir des microorganismes pathogènes apportés par les rejets fécaux (fèces et effluents) d'origine humaine ou animale. Cette contamination peut être à l'origine, chez les baigneurs et les consommateurs, de troubles de la santé aux conséquences plus ou moins graves (Kay *et al.*, 1994 ; Pruss, 1998 ; Given *et al.*, 2006 ; DePaola *et al.*, 2010).

### **1.1 Les eaux de baignade**

Les études épidémiologiques évaluant le risque sanitaire lié aux eaux de baignade ont montré le lien entre la contamination des eaux par des pathogènes d'origine entérique et l'apparition de pathologies tels que des troubles respiratoires et des infections des yeux, du conduit auditif ou de la peau (Seyfried *et al.*, 1985a ; Seyfried *et al.*, 1985b ; Fleisher *et al.*, 1998). A titre d'illustration, le tableau 1 présente le nombre de déclarations (symptômes survenus chez au moins deux cas groupés) et de cas d'infection par contact avec des eaux de baignade et les pathogènes associés, aux Etats-Unis de 1985 à 1998. Dans plus de 31 % des déclarations, l'agent pathogène identifié était la bactérie *Shigella* spp., cependant, il faut noter que dans plus de 32,8 % des déclarations, l'agent pathogène n'a pas été identifié.

**Tableau 1 : Nombre de déclarations et de cas d'infection par contact avec des eaux de baignade déclarés aux Etats-Unis de 1985 à 1998 (WHO, 2001)**

<b>Agents pathogènes identifiés dans les cas d'infection lors de baignade</b>	<b>Nombre de déclarations</b>	<b>Nombre de cas d'infection</b>
<i>Shigella</i> spp.	20	1 780
<i>E. coli</i> 0157 :H7	9	234
<i>Leptospira</i> spp.	3	389
<i>Giardia lamblia</i>	4	65
<i>Cryptosporidium parvum</i>	3	429
Norovirus	3	89
Adenovirus 3	1	595
<b>Agent pathogène non identifié</b>	21	1 984
<b>Tous pathogènes confondus</b>	64	5 565

Plus récemment, sur la période 2005 à 2006, une augmentation du nombre d'infections déclarées suite à un contact avec des eaux de baignade a été observée dans ce même pays. Le centre de contrôle et de prévention des maladies des Etats-Unis (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) a ainsi rapporté 78 déclarations sur deux années, concernant plus de 4 400 personnes, alors que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, World Health Organization, WHO) en avait comptabilisé 64 sur 14 années. Les contrôles plus fréquents et

les méthodes d'identification plus élaborées des agents pathogènes responsables de ces infections expliquent en grande partie cette augmentation des déclarations. En effet, pendant ces deux années, l'agent pathogène a été confirmé dans 79,5 % des déclarations et suspecté dans 15,4 %. Les agents pathogènes étaient des parasites (essentiellement *Cryptosporidium* spp.) dans 43,6 % des déclarations, des bactéries dans 28,2 % des déclarations (dont 10 % de *Legionella* spp.) et des virus dans 5 % des déclarations. Dans plus de 60 % des déclarations, la transmission s'est faite par ingestion, dans 15,4 % par contact et dans 14 % par inhalation. Les symptômes majeurs étaient des gastroentérites aiguës (61,5 % des déclarations), des infections de la peau (14, 1 %) et des problèmes respiratoires (14, 1 %) (Yoder *et al.*, 2008a).

### 1.2 Les eaux destinées à la consommation humaine

Les voies de contamination des eaux destinées à la consommation humaine sont, pour le cas le plus fréquent, le contact accidentel des eaux destinées à la distribution avec des eaux usées. Il existe également un risque lors des remises en service des canalisations, après arrêt de plusieurs semaines, car les eaux stagnantes favorisent la formation d'un biofilm propice aux contaminations.

Le tableau 2 présente le nombre de déclarations et de cas d'infection par contact avec des eaux destinées à la consommation humaine, aux Etats-Unis, de 1971 à 2006.

**Tableau 2 : Nombre de déclarations et de cas d'infection par contact avec des eaux destinées à la consommation humaine déclarés aux Etats-Unis de 1971 à 2006 (Craun *et al.*, 2010)**

Agents pathogènes identifiés dans les cas d'infection lors de baignade	Nombre de déclarations	Nombre de cas d'infection
Bactéries (sauf <i>Legionella</i> )	105	22 446
<i>Legionella</i> <sup>a</sup>	24	126
Parasites	143	449 959
Virus	64	12 728
Plus de 2 agents pathogènes	6	1 755
Agent pathogène non identifié	348	82 179
Composés chimiques	90	3 901
<b>Tous pathogènes confondus</b>	<b>780</b>	<b>577 094</b>

<sup>a</sup> Les déclarations liées à *Legionella* ont été répertoriées à partir de 2001

Les déclarations d'infections ont été associées à des eaux issues du système public de distribution, du système individuel de distribution et à des eaux en bouteille dans respectivement 87,2 %, 10,5 % et 1,4 % des cas. L'agent pathogène a été identifié dans seulement la moitié des déclarations (49,6 %). Il était majoritairement représenté par des parasites (18,3 % des déclarations) tels que *Giardia intestinalis* et *Cryptosporidium* spp. et des bactéries (13,5 % des déclarations) telles que *Shigella* spp. et *Salmonella* spp., avec

comme symptôme majeur des gastroentérites aiguës (87,8 % des déclarations). Dans cette étude, contrairement aux eaux de baignade, les déclarations ont diminué depuis les années 1980. Cette diminution est probablement liée à l'amélioration de la qualité de l'eau par une surveillance et une détection accrues et une réglementation plus stricte.

En France, de 1998 à 2008, dix déclarations liées à une contamination du réseau d'eau potable ont été déclarées. Elles ont entraîné plus de 9 000 cas d'infection conduisant à 70 hospitalisations. Les symptômes majeurs étaient pour la plupart des cas, ceux des gastroentérites aiguës, mettant en cause le plus souvent des norovirus et *Cryptosporidium* spp. (Therre *et al.*, 2009).

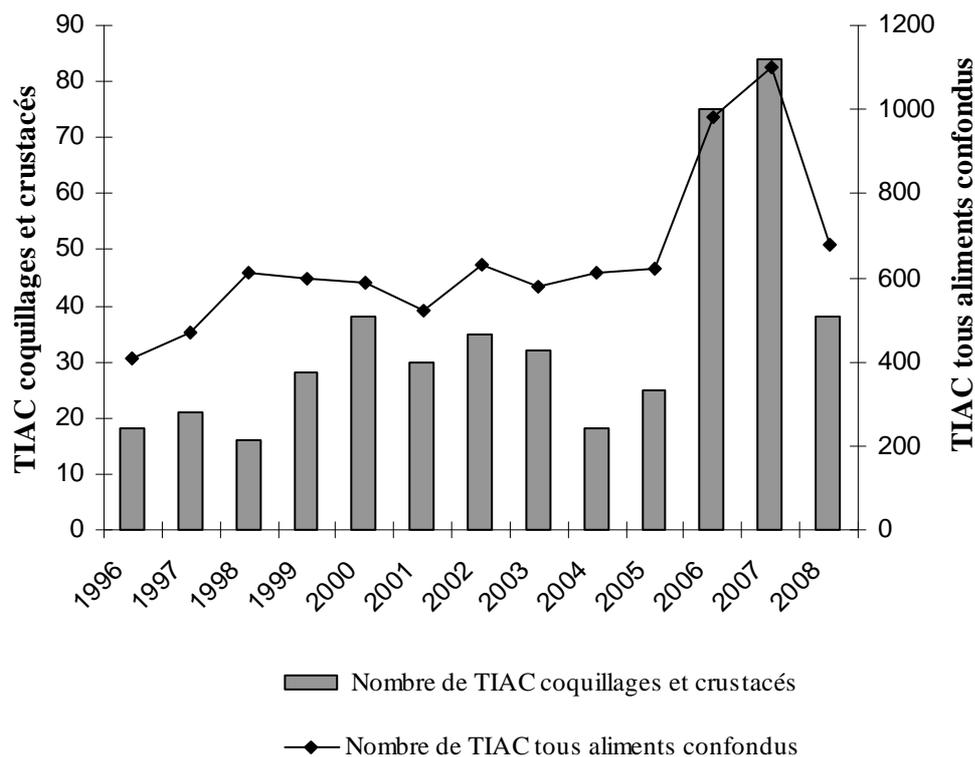
### **1.3 Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives liées aux coquillages**

La consommation d'aliments crus ou peu cuits tels que les coquillages peut être à l'origine d'une Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC). On parle de TIAC lorsqu'une symptomatologie similaire, souvent de nature digestive, survient dans au moins deux cas groupés dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

#### *1.3.1 Evolution du nombre de TIAC*

En France, sur la période 1996 à 2008, plus de 400 TIAC étaient liées à la consommation de coquillages alors que, le nombre de TIAC, tous aliments confondus, a été estimé à plus de 8 000 (Fig. 1).

Les données sur une année révèlent que le nombre de foyers de TIAC est plus élevé en hiver et en été (en moyenne de 20 à 70 foyers) et implique préférentiellement des moules en été et des huîtres en hiver (Delmas, 2010). Les coquillages incriminés dans des TIAC proviennent soit de zones conchylicoles, soit de zones récréatives (Guillois-Bécel *et al.*, 2009 ; Le Guyader *et al.*, 2010).



**Figure 1 : Evolution du nombre de TIAC déclarées en France de 1996 à 2008. La distinction a été réalisée entre les TIAC tous aliments confondus et les TIAC coquillages et crustacés (Delmas, 2010)**

### 1.3.2 Les agents responsables

Si l'on regarde les chiffres publiés pour la période 1996 à 2005 en France, les principaux agents responsables de TIAC liées aux coquillages étaient des microorganismes d'origine fécale (<http://invs.sante.fr/surveillance/tiac/donnees.htm>). Elles ont été attribuées pour 37 % à des virus tels que les norovirus, les sapovirus, les aïchivirus ou les astrovirus, pour 18 % à des phycotoxines et pour 11 % à des bactéries telles que les salmonelles. Il est important de noter que des espèces de *Vibrio* spp. pathogènes pour l'Homme (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, et *V. vulnificus*), bactéries marines non associées aux contaminations fécales, ont également été fréquemment impliquées dans des TIAC aux Etats-Unis, en Inde, au Japon et en Asie du sud (Feldhusen, 2000 ; McLaughlin *et al.*, 2005).

Sur cette même période, 64 % des TIAC, tous aliments confondus, étaient dues à *Salmonella* dont le sérotype *enteritidis* était prédominant. Plus de 22 % des foyers étaient attribués à la consommation d'œufs ou de produits à base d'œufs (Delmas *et al.*, 2006).

### *1.3.3 Les risques pour la santé*

En France, 5 % des TIAC liées aux coquillages, ont entraîné une hospitalisation et seul un décès qui a semblé être imputable à la présence de *Vibrio parahaemolyticus* dans des huîtres a été rapporté (Delmas, 2010).

De 1996 à 2009, les TIAC, tous aliments confondus, ont engendrées 9 % des cas d'hospitalisation et 65 décès, principalement dus à la présence de salmonelles et de virus (Delmas, 2010).

Conclusion partie I: Les eaux et les coquillages sont susceptibles de contenir des microorganismes pathogènes entériques lors d'une contamination par des fèces ou des effluents d'origine humaine ou animale. La mise en contact ou leur consommation peut alors entraîner un risque sanitaire pour les baigneurs et les consommateurs. Il est donc important de contrôler et de diminuer la présence de ces microorganismes, au niveau des zones de baignade et des zones conchylicoles, par la mise en place de mesures de prévention et d'une réglementation plus stricte. En Europe, la réglementation repose sur la recherche d'indicateurs classiques de contamination fécale principalement représentés par *E. coli* et les entérocoques intestinaux.

## **II La réglementation sanitaire en application**

A partir des années 1970, une réglementation a été mise en place pour évaluer les risques sanitaires, liés à la présence de microorganismes pathogènes d'origine fécale dans les eaux et dans les coquillages. Ces réglementations sont basées sur la notion d'indicateurs de contamination fécale.

### **2.1 Les indicateurs de contamination fécale**

Les premiers indicateurs de contamination fécale étaient représentés par les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants et les streptocoques fécaux, et devaient répondre à des critères stricts tels que : (i) être cultivables au laboratoire par des méthodes simples, (ii) ne pas être présents ou relativement peu présents dans des milieux non contaminés, (iii) avoir des concentrations pouvant être corrélées avec l'importance de la contamination, et enfin (iv) avoir un temps de survie similaire à celui des pathogènes.

La recherche des coliformes totaux a été abandonnée et celle des coliformes thermotolérants a progressivement été remplacée par celle d'*E. coli* qui, à lui seul, représente la majorité des coliformes thermotolérants (95 à 98 %) et dont l'origine fécale est certaine. De même, la recherche des streptocoques fécaux a été progressivement remplacée par celle des entérocoques intestinaux. *E. coli* et les entérocoques intestinaux sont aujourd'hui encore considérés comme les principaux indicateurs classiques de contamination fécale. Ces indicateurs sont recherchés dans les eaux de baignade, les eaux destinées à la consommation humaine et les coquillages pour évaluer leur qualité microbiologique.

### **2.2 La réglementation concernant les eaux de baignade**

Selon la réglementation européenne, les eaux de baignade sont constituées de l'ensemble des eaux intérieures de surface, courantes ou stagnantes, des eaux de transition et des eaux côtières pour lesquelles la baignade n'est pas interdite et est habituellement pratiquée par un nombre important de baigneurs. En France, la surveillance est effectuée pendant la période estivale par les Agences Régionales de la Santé (ARS, anciennement Directions Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales).

La première directive européenne du 8 décembre 1975 (76/160/CE) est progressivement abrogée par la directive du 15 février 2006 (2006/7/CE) qui prendra effet au plus tard le 31 décembre 2014 (Tab. 3 et 4).

**Tableau 3 : Réglementation sanitaire microbiologique des eaux de baignade selon la directive européenne 76/160/CE**

Paramètres (UFC/100 ml)	A - Bonne Qualité	B - Qualité Moyenne	C - Momentanément Polluée	D - Mauvaise Qualité
<b>Coliformes totaux</b>	80 % < 500 <sup>a</sup> 95 % < 10 000 <sup>b</sup>	95 % < 10 000 <sup>b</sup>	5 - 33 % > 10 000 <sup>b</sup>	33 % > 10 000 <sup>b</sup>
<b><i>E. coli</i></b>	80 % < 100 <sup>a</sup> 95 % < 2000 <sup>b</sup>	95 % < 2000 <sup>b</sup>	5 - 33 % > 2000 <sup>b</sup>	33 % > 2000 <sup>b</sup>
<b>Entérocoques intestinaux</b>	90 % < 100			
<b>Qualité de l'eau</b>	Excellente	Bonne	Suffisante	Insuffisante

<sup>a</sup> Valeur guide : caractérise une eau de bonne qualité pour la baignade, <sup>b</sup> Valeur impérative : constitue la limite supérieure au-delà de laquelle l'eau de baignade est considérée comme de mauvaise qualité

Cette nouvelle directive est une directive fille de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/CE) où un cadre communautaire européen a été établi pour la protection et la gestion des eaux. La DCE fixe des objectifs pour la préservation et la restauration de l'état des eaux superficielles (eaux douces et eaux côtières) et pour les eaux souterraines ; l'objectif général étant d'atteindre, d'ici 2015, le bon état écologique et chimique des milieux aquatiques et des bassins versants sur tout le territoire européen.

**Tableau 4 : Réglementation sanitaire microbiologique des eaux intérieures et des eaux côtières et de transition selon la directive européenne 2006/7/CE**

Paramètres (UFC/100 ml)	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante	Méthodes de référence pour l'analyse
<b><i>E. coli</i></b>	500 <sup>a,c</sup> /250 <sup>a,d</sup>	1 000 <sup>a,c</sup> /500 <sup>a,d</sup>	900 <sup>b,c</sup> /500 <sup>b,d</sup>	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1
<b>Entérocoques intestinaux</b>	200 <sup>a,c</sup> /100 <sup>a,d</sup>	400 <sup>a,c</sup> /200 <sup>a,d</sup>	330 <sup>b,c</sup> /185 <sup>b,d</sup>	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2

<sup>a</sup> Evaluation au 95<sup>ème</sup> percentile, <sup>b</sup> Evaluation au 90<sup>ème</sup> percentile, <sup>c</sup> Eaux intérieures, <sup>d</sup> Eaux côtières et de transition

Cette nouvelle directive ne contient plus que deux paramètres microbiologiques (*E. coli* et les entérocoques intestinaux) avec un durcissement des valeurs limites. Cette directive dissocie également les eaux intérieures des eaux côtières et de transition (Tab. 4). Parmi les trois niveaux de qualité : suffisante, bonne ou excellente, la catégorie « suffisante » est le seuil minimal de qualité auquel tous les états membres doivent parvenir d'ici la fin de la saison 2015 au plus tard. Lorsque les valeurs dépassent le seuil de la catégorie « suffisante », les états membres doivent prendre des mesures de gestion tels que l'interdiction de la baignade ou un avis la déconseillant, l'information du public et les mesures correctives appropriées. A titre d'exemple, si la directive 2006/7/CE était appliquée sur les données en *E. coli* et en entérocoques intestinaux de 2005 à 2008, concernant 1 974 plages françaises, 152 plages (7,7 %) seraient de qualité suffisante et 169 plages (8,6 %) seraient interdites à la baignade

contre respectivement 55 (2,8 %) et sept plages (0,4 %) sous la directive actuelle (Templier et Barriere, 2009).

Cette directive renforce également le principe de gestion des eaux de baignade qui présentent un risque pour la santé des baigneurs en imposant l'établissement d'un profil de vulnérabilité des eaux de baignade pour chaque site. **Ce type de profil comprend : (i) une description de la zone concernée, (ii) une identification et une étude des sources de pollution fécale et, (iii) une action sur ces sources pour améliorer la qualité des eaux. Ces profils doivent être déterminés pour la première fois au plus tard début 2011 et sont consultables sur le site : [http://ec.europa.eu/environment/water/water-bathing/pdf/profiles\\_dec\\_2009.pdf](http://ec.europa.eu/environment/water/water-bathing/pdf/profiles_dec_2009.pdf)**

### 2.3 La réglementation concernant les eaux conchylicoles

Depuis 1991, les zones de production conchylicole sont soumises à une réglementation sanitaire européenne (91/492/CE) qui fixe les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants.

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2006, cette réglementation est devenue plus contraignante par l'application du « paquet hygiène » (852-853-854/2004/CE) dont l'objectif est de mettre en place une politique unique et transparente en matière d'hygiène des denrées alimentaires. Ainsi, les obligations de moyens doivent faire place à une obligation de résultats du professionnel qui doit mettre sur le marché des coquillages propres à la consommation.

Le classement des zones de production conchylicole distingue trois classes suivant les niveaux de contamination microbiologique et chimique. L'importance de la contamination microbiologique dans les coquillages (huîtres, moules, palourdes...) est évaluée par l'indicateur *E. coli* tandis que l'évaluation de la contamination chimique prend en compte les taux de cadmium, mercure et plomb. En fonction des niveaux de contamination rencontrés, les usages sont réglementés. Le tableau 5 présente pour chaque classe, le seuil de détection d'*E. coli* et la réglementation associée. **En plus de la classification, il est requis d'étudier les sources de contamination fécale pouvant atteindre les zones conchylicoles.**

**Tableau 5 : Réglementation sanitaire des zones de production conchylicole et usages associés selon le règlement 854/2004/CE du parlement européen et du conseil**

<b>Classes</b>	<b>Seuil (<i>E. coli</i>/100 g CLI<sup>a</sup>)</b>	<b>Usage professionnel</b>	<b>Usage récréatif</b>
<b>A</b>	100 % des résultats < 230 <i>E. coli</i>	Elevage et pêche autorisés, possibilité vente directe (sans traitement)	Pêche autorisée
<b>B</b>	90 % des résultats < 4 600 <i>E. coli</i> 10 % des résultats > 4 600 et < 46 000 <i>E. coli</i>	Elevage et pêche autorisés, mais traitement de purification avant commercialisation	Pêche tolérée <sup>b</sup>
<b>C</b>	100 % des résultats < 46 000 <i>E. coli</i>	Elevage et pêche interdits excepté dérogation préfectorale	Pêche interdite

<sup>a</sup> Chair et Liquide Intervalvaire, <sup>b</sup> Cuisson fortement conseillée avant consommation

En France, la surveillance est assurée toute l'année par le réseau REMI (Réseau de contrôle microbiologique) d'Ifremer. Sur la période 2006 à 2008, la qualité a été évaluée pour 238 zones classées (Amouroux, 2009). Seulement quatre zones ont été classées en A, 201 zones ont été classées en B et 23 zones ont été classées en C. Plus de 10 zones avaient des seuils en *E. coli* supérieurs à la classe C et ont donc été considérées comme insalubres. Pour la période 1999 - 2008, 24 zones (sur 191 suivies) présentaient une dégradation de leur qualité microbiologique, dont 14 (58,3 %) étaient situées en Bretagne et six en Normandie (25 %).

#### **2.4 La réglementation concernant les zones de pêche à pied**

La consommation de coquillages issus des gisements naturels n'est pas soumise à une réglementation européenne. Toutefois, en France, par analogie au classement sanitaire des zones conchylicoles, les ARS élaborent des niveaux de contamination (Tab. 5).

Depuis 1997, environ 65 sites bretons de pêche à pied et de loisirs en dehors des zones conchylicoles classées ont été contrôlés annuellement et ont permis de mettre en évidence une tendance générale à la dégradation des gisements naturels de coquillages. En effet, en 1997, 11,5 % des sites étaient interdits à la pêche à pied contre plus de 26 % en 2008 (<http://www.bretagne-environnement.org>).

#### **2.5 La réglementation concernant les eaux destinées à la consommation humaine**

La directive 98/83/CE vise à protéger la santé des personnes en établissant des exigences de salubrité et de propreté auxquelles doit satisfaire l'eau destinée à la consommation humaine, à l'exception des eaux minérales naturelles et des eaux médicinales. L'eau ne doit pas contenir de microorganismes, de parasites et toute autre substance constituant un danger potentiel pour la santé. Cette directive comporte 48 paramètres

microbiologiques et chimiques à surveiller régulièrement. En France, le ministère de la santé contrôle la qualité des eaux potables à travers la surveillance effectuée par les ARS tout au long de l'année.

Conclusion partie II : Malgré l'application des réglementations sanitaires, il existe toujours un risque associé à la présence de microorganismes pathogènes dans les eaux ou les coquillages. Devant les exigences de l'Union Européenne, il devient de plus en plus important d'identifier les sources de contamination fécale dans les eaux continentales et littorales et au niveau des zones conchylicoles afin de mettre en place des actions préventives et/ou correctives.

### **III Les sources de contaminations fécales dans l'environnement**

Parmi les sources de contaminations fécales, trois origines se distinguent : (i) urbaine avec principalement le rejet des eaux résiduaires, (ii) agricole avec les épandages des lisiers et fumiers et le pâturage, et (iii) dans une moindre mesure, environnementale par la faune sauvage.

#### **3.1 Les sources d'origine urbaine**

Les sources d'origine urbaine sont essentiellement représentées par les effluents tels que les eaux de stations d'épuration (STEP), traitées ou non, et les eaux usées issues des habitats dispersés.

##### *3.1.1 Les selles humaines*

L'Homme excrète par jour, *via* les selles, d'importantes concentrations en *E. coli* comprises entre 4,4 et 9,2 Unité (U.)  $\text{Log}_{10}$  Unités Formant Colonies (UFC)/g de selle, correspondant à un flux journalier variant de 6,6 à 11,4 U.  $\text{Log}_{10}$  *E. coli*/24 h (Tab. 8).

Ces microorganismes sont ensuite retrouvés majoritairement dans les effluents de STEP *via* les fosses septiques et les réseaux d'assainissement.

##### *3.1.2 L'assainissement*

L'assainissement, collectif ou autonome, des eaux usées avant leur rejet dans les eaux de l'environnement est une étape importante pour la diminution des risques.

##### - L'assainissement collectif

Les STEP qui collectent et traitent les eaux usées permettent de diminuer les concentrations en microorganismes. Toutefois, leurs rejets constituent encore une source importante de contamination dans l'environnement. La France comptait en 2007 plus de 13 300 STEP pour une capacité totale de 70 millions d'Equivalent Habitant<sup>1</sup> (EH). Les STEP permettent l'élimination des composés carbonés tels que les graisses, les sucres et les protéines ainsi que l'azote et le phosphore. Suivant les traitements appliqués, elles permettent également, plus ou moins efficacement, l'élimination des microorganismes entériques.

Le traitement des eaux usées dans la plupart des STEP se divise en trois principales étapes, (i) les prétraitements, qui permettent d'éliminer les éléments solides ou particuliers les plus

---

<sup>1</sup> Estimation de la quantité de pollution émise par personne et par jour

## Etude bibliographique : III Les sources de contaminations fécales dans l'environnement

grossiers (ii) les traitements primaires physico-chimiques, qui ne portent que sur les matières particulaires décantables présentes à l'issue des prétraitements et qui permettent d'agglomérer ces particules par adjonction d'agents coagulants et flocculants, et (iii) les traitements secondaires biologiques qui permettent de dégrader la matière organique et, par conséquence, d'éliminer les bactéries. Les eaux usées peuvent aussi subir, mais plus rarement, des traitements tertiaires utilisant le rayonnement UV, la chloration ou l'ozone, plus efficaces vis-à-vis des microorganismes mais plus onéreux.

Parmi les traitements secondaires biologiques, il existe plusieurs procédés : (i) les boues activées (50 % des STEP de plus de 10 000 EH), (ii) le lagunage naturel, et (iii) les biofiltres et les lits bactériens. Les boues activées peuvent aussi être associées à des membranes filtrantes. L'abattement bactérien est variable selon les traitements, de 1 U. Log<sub>10</sub> pour les lits bactériens à 6 U. Log<sub>10</sub> pour les boues activées et les membranes filtrantes (Tab. 6).

**Tableau 6 : Traitements secondaires biologiques et performance d'abattement bactérien (Monfort, 2006)**

Type de traitement secondaire biologique	Abattement bactérien (U. Log <sub>10</sub> )
Boues activées	2 à 3
Lagunage naturel	3 à 4
Boues activées + membranes filtrantes	6
Lits bactériens	1

Ces traitements entraînent une réduction variable des concentrations en *E. coli* dans les eaux traitées par rapport aux eaux usées brutes (Tab. 7). A titre d'exemples, pour les eaux usées d'une ville d'un million d'EH, le flux journalier en *E. coli* peut varier de 16,9 à 17,9 U. Log<sub>10</sub> UFC/24 h et pour les eaux traitées d'une ville de 30 000 EH, après l'application d'un traitement secondaire biologique, le flux journalier en *E. coli* peut varier de 13,1 à 14,1 U. Log<sub>10</sub> UFC/24 h (Salomon et Pompepuy, 1990 ; Roberts et Williams, 1992).

**Tableau 7 : Concentrations en *E. coli* dans les effluents urbains**

Type d'échantillons	Concentrations en <i>E. coli</i>	Références
<b>Eaux usées</b>	7,3 - 9 U. Log <sub>10</sub> UFC/g	Pourcher (1991a)
	6,4 U. Log <sub>10</sub> UFC/100 ml	Silkie et Nelson (2009)
	7 - 7,4 U. Log <sub>10</sub> cellules/100 ml	Wéry <i>et al.</i> (2008)
<b>Eaux traitées</b>	0,1 - 5,1 U. Log <sub>10</sub> UFC/100 ml	Marti <i>et al.</i> (2010)
	3,7 - 3,9 U. Log <sub>10</sub> cellules/100 ml	Wéry <i>et al.</i> (2008)
<b>Boues de STEP</b>	5- 6,4 U. Log <sub>10</sub> UFC/g	Lang <i>et al.</i> (2007)
	5,9 U. Log <sub>10</sub> UFC/g	Pourcher <i>et al.</i> (2007)
<b>Composts avant fermentation</b>	>5,2 U. Log <sub>10</sub> cellules/g	Wéry <i>et al.</i> (2008)
<b>Composts en fin de stockage</b>	<2 U. Log <sub>10</sub> cellules/g	Wéry <i>et al.</i> (2008)
	<0,3 - 2,5 U. Log <sub>10</sub> NPP <sup>a</sup> /g	Lang <i>et al.</i> (2007)

<sup>a</sup> Nombre le Plus Probable

## **Etude bibliographique : III Les sources de contaminations fécales dans l'environnement**

Il existe également un risque de contamination lié à l'épandage ou au compostage des boues de STEP (Tab. 7). Cependant, le compostage qui permet une réduction des indicateurs classiques de 2 à 5 U. Log<sub>10</sub>, représente un moyen performant de valorisation des boues (Pourcher *et al.*, 2005).

### **- L'assainissement autonome**

Les habitations trop dispersées pour être raccordées au réseau d'assainissement collectif doivent disposer d'un système d'assainissement autonome qui permet l'infiltration des eaux usées dans le sol après une épuration partielle grâce à l'action de microorganismes au niveau des fosses septiques. Si la conformité de l'installation n'est pas respectée ou si il n'y a pas un bon fonctionnement, ce type d'installation peut être une source de pollution.

#### ***3.1.3 Les points critiques***

Même si les eaux usées urbaines sont de mieux en mieux traitées, l'insuffisance des traitements et une capacité de stockage non appropriée de certaines STEP, des erreurs de branchement des canalisations ou une absence de STEP peuvent entraîner une contamination de l'environnement. Le manque d'assainissement autonome performant peut être également une autre cause de contamination.

On peut aussi noter que des pollutions peuvent survenir suite à des problèmes techniques au niveau des réseaux d'assainissement dont le but est le transfert des eaux usées du domicile à la station d'épuration, et tout particulièrement au niveau des postes de relèvement ou de conduites vétustes.

Les risques de pollution de l'environnement sont également accrus par temps de pluie. Lors d'événements pluvieux intenses, les réseaux « unitaires », qui ne séparent pas les eaux pluviales des eaux résiduaires jusqu'à la STEP, voient leur volume d'eau circulant augmenter rapidement et fortement, la cause étant que les eaux pluviales s'ajoutent aux eaux résiduaires. A l'arrivée à la STEP, le débit trop important entraîne, généralement au niveau des déversoirs d'orage, un rejet des eaux usées/pluviales vers le milieu naturel (Barataud *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2005).

Les réseaux « séparatifs », séparant les eaux usées des eaux pluviales, rejettent directement les eaux pluviales dans le milieu naturel. Or, lors d'événements pluvieux intenses, le ruissellement sur des surfaces imperméables (toitures, routes...) est à l'origine de l'apport d'une forte charge en microorganismes. Par exemple, les eaux de ruissellement peuvent contenir jusqu'à 6,1 U. Log<sub>10</sub> *E. coli* UFC/100 ml (Kim *et al.*, 2005). De plus, ces eaux

## Etude bibliographique : III Les sources de contaminations fécales dans l'environnement

peuvent être également contaminées par des apports d'origine animale, tout particulièrement par les animaux domestiques et les oiseaux, conduisant à une pollution d'origine mixte.

### 3.2 Les sources d'origine agricole

Avec l'intensification de l'élevage et plus particulièrement l'augmentation de la taille et la concentration géographique des exploitations, les sources potentielles d'origine agricole de contamination des eaux et des coquillages sont essentiellement représentées par les épandages des effluents et le pâturage.

#### 3.2.1 Les fèces

Le cheptel français comptait en 2008 plus de 223 millions d'individus, volaille incluse ([www.insee.fr/fr/themes/](http://www.insee.fr/fr/themes/)). Ces animaux génèrent une quantité importante de fèces avec des concentrations en *E. coli* comprises entre 3,8 et 9,8 U. Log<sub>10</sub> UFC/g de fèces correspondant à un flux journalier variant de 7,3 à 12,1 U. Log<sub>10</sub> *E. coli*/24 h (Tab. 8). Une fois rapportée en EH, l'excrétion en *E. coli* par les porcs, les bovins et les ovins peut être supérieure à celle de l'Homme. Par exemple, on estime qu'un porc représente pour les apports en microorganismes l'équivalent d'un rejet de 30 habitants, un bovin de 5 habitants et une volaille de 0,06 habitant (Geldreich, 1966 ; Pommeypuy *et al.*, 2005).

**Tableau 8 : Concentrations en *E. coli* dans les selles de l'Homme et les fèces des animaux ainsi que les flux en *E. coli* en France (Pourcher, 1991a ; Martel, 1996 ; Marti *et al.*, 2010)**

	Nombre d'individus (Millions)	Excrétion (g/24 h) <sup>a</sup>	Concentrations U. Log <sub>10</sub> <i>E. coli</i> /g (Min - Max)	Flux U. Log <sub>10</sub> <i>E. coli</i> /24 h (Min - Max)
<b>Humain</b>	62	150	4,4 - 9,2	6,6 - 11,4
<b>Porcin</b>	14,8	2 700	4,9 - 8,7	8,3- 12,1
<b>Bovin</b>	19,3	23 600	3,8 - 7,8	8,2 - 12,1
<b>Ovin</b>	7,7	4 500	5,1 - 6,3	8,8 - 9
<b>Volaille</b>	182	182	5,1 - 9,8	7,3 - 12,1

<sup>a</sup> Moyenne entre des individus jeunes et âgés

Les fèces sont ensuite mélangées soit aux eaux de nettoyage et à l'urine pour former les lisiers soit avec de la litière (paille ou sciure) pour former les fumiers. Ces effluents d'élevage sont ensuite éliminés par traitement, exportation dans d'autres régions ou par épandage sur les terres agricoles.

## **Etude bibliographique : III Les sources de contaminations fécales dans l'environnement**

### *3.2.2 Les effluents*

Les effluents porcins et bovins non traités peuvent contenir de fortes concentrations en *E. coli* comprises entre 4,3 et 8,6 U. Log<sub>10</sub> UFC/100 ml de lisier de porcs et entre 4,2 et 8,5 U. Log<sub>10</sub> UFC/g de fumier de bovins (Tab. 9 et 10).

**Tableau 9 : Concentrations en *E. coli* dans les effluents porcins**

Type d'échantillons	Concentrations <i>E. coli</i> (U. Log <sub>10</sub> UFC/100 ml)	Références
<b>Lisiers bruts</b>	6 - 8	Chinivasagam <i>et al.</i> (2004)
	7 - 8	Unc et Goss (2004)
<b>Lisiers stockés en cuve</b>	6,2	Vanotti <i>et al.</i> (2005)
	4,3 - 8,6	Marti <i>et al.</i> (2010)
<b>Lisiers traités</b>	2,1 - 7,6	Chinivasagam <i>et al.</i> (2004)
	3,8 - 5,8	Hill et Sobsey (2003)
	3,6 - 5	Marti <i>et al.</i> (2010)
<b>Eaux de lagunage</b>	1 - 3	Marti <i>et al.</i> (2010)

Un traitement des effluents est, de plus en plus, souvent réalisé au niveau des exploitations avec des étapes de traitements par boues activées, par centrifugation, par compostage ou par lagunage. Ces traitements permettent ainsi de diminuer les concentrations en microorganismes (Tab. 9 et 10).

**Tableau 10 : Concentrations en *E. coli* dans les effluents bovins**

Type d'échantillons	Concentrations <i>E. coli</i> (U. Log <sub>10</sub> UFC/g)	Références
<b>Fumiers et lisiers frais</b>	4,2- 4,5	Johannessen <i>et al.</i> (2004)
	5,6	Soupir <i>et al.</i> (2006)
<b>Fumiers + urine</b>	8,5	Oliver <i>et al.</i> (2006)
<b>Fumiers de 6 mois</b>	2,5 - 2,8	Johannessen <i>et al.</i> (2004)
<b>Composts</b>	0,8- 2,8	Johannessen <i>et al.</i> (2004)
<b>1<sup>er</sup> jour de compostage</b>	7 - 7 ,6	Larney <i>et al.</i> (2003)
<b>14<sup>ème</sup> jour de compostage</b>	0,7 - 1,2	Larney <i>et al.</i> (2003)

Concernant les effluents aviaires, peu de données sont disponibles, seule l'étude de Soupir *et al.* (2006) a montré une concentration moyenne en *E. coli* de 3,5 U. Log<sub>10</sub> UFC/g de litière de dindes.

### *3.2.3 Le pâturage*

Le pâturage des bovins et des ovins sur les terres en pâture ou des ovins dans les près salés est également une source de contamination (Crowther *et al.*, 2002 ; Hubbard *et al.*,

2004). Cette contamination est aggravée également par le ruissellement en temps de pluie et aussi par l'accès libre des animaux aux rivières utilisées directement comme points d'eau.

### *3.2.4 Les points critiques*

Le non respect des bonnes pratiques d'épandage, décrites dans le cadre des arrêtés préfectoraux, représente une source de pollution. Il s'agit de (i) l'épandage pendant la période d'interdiction, par exemple, en période pluvieuse (ii) du dépassement des taux d'application et de la capacité d'accueil (terres en zones d'excédent structurel), et (iii) du non respect des distances minimales d'épandage par rapport au point d'eau.

Comme pour les sources de contamination urbaine, les risques, sont également augmentés par temps de pluie. Ils peuvent survenir au niveau des sièges d'exploitation par le débordement des fosses entraînant une partie des déjections animales ou des eaux de nettoyage vers le milieu naturel. Par fortes pluies, le ruissellement peut provoquer également un risque juste après épandage ou lorsque les effluents bruts sont stockés dans les champs (Thurston-Enriquez *et al.*, 2005 ; Soupir *et al.*, 2006 ; Pappas *et al.*, 2008 ; Sistani *et al.*, 2010). De telles conditions, juste après épandage sur une parcelle de fumiers de bovins, ont conduit à des concentrations en *E. coli* dans les eaux de ruissellement de 3,9 U. Log<sub>10</sub> UFC/100 ml d'eau (Mishra *et al.*, 2008).

### **3.3 Les sources par les animaux sauvages**

La faune sauvage, représentée par les rongeurs, les oiseaux et les animaux forestiers (cerfs, sangliers...), peut être également à l'origine d'une contamination du milieu (Somarelli *et al.*, 2007). Par exemple, Perra *et al.* (2002) ont relié la survenue de cas groupé de leptospirose chez l'Homme à la présence de rongeurs vivant à proximité d'un site de baignade. La contamination des eaux par les oiseaux tels que les canards, les goélands et les mouettes a été à plusieurs reprises mise en évidence (Levesque *et al.*, 1993 ; Edge et Hill, 2007 ; Wright *et al.*, 2009).

### **Etude bibliographique : III Les sources de contaminations fécales dans l'environnement**

Conclusion partie III : Les sources de contamination fécale urbaine, agricole et par les animaux sauvages sont actuellement bien identifiées. Les apports de contaminants les plus importants, responsables de la dégradation de la qualité microbiologique des eaux de l'environnement et des zones conchylicoles, sont principalement d'origine humaine, bovine, ovine et porcine. Des méthodes permettant l'identification des principales sources de contaminations existent mais elles peuvent encore être améliorées afin d'identifier l'origine des pollutions avec certitude lorsqu'elles sont multiples.

## **IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

Les indicateurs classiques de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques) utilisés dans la réglementation ne permettent pas d'identifier l'origine des contaminations dans l'environnement car ils sont présents à la fois dans les selles humaines et les fèces des animaux à sang chaud (Dick et Field, 2004). Les méthodes alternatives regroupées sous le terme Traceurs de Sources Microbiennes (TSM ou Microbial Source Tracking, MST) sont actuellement en cours de développement. Elles doivent à terme permettre de répondre à cette problématique (U.S. Environmental Protection Agency, 2005).

Les principales étapes pour identifier l'origine des contaminations consistent à identifier et déterminer la cible à rechercher, puis choisir la méthode pour la mettre en évidence dans des échantillons de l'environnement. Les cibles actuellement privilégiées sont représentées par des microorganismes, des composés chimiques ou les mitochondries des cellules eucaryotes. Ces méthodes et leurs cibles associées doivent conduire à des marqueurs sensibles (marqueur détecté dans des fèces et des effluents cibles) et spécifiques (marqueur non détecté dans des fèces et des effluents non cibles) et détectables dans les eaux de l'environnement.

### **4.1 Les cibles**

La cible sélectionnée pour identifier l'origine des contaminations fécales dans l'environnement doit répondre à plusieurs critères : (i) posséder un pouvoir discriminant pour mettre en évidence le type de contamination, humaine ou animale, mais également le type de contamination animale, (ii) posséder une bonne corrélation avec les indicateurs de contamination fécale, (iii) être présente à des concentrations suffisantes pour être détectée, (iv) avoir une stabilité géographique et temporelle et, (v) avoir une persistance similaire à celle des indicateurs de contamination fécale et des pathogènes (U.S. Environmental Protection Agency, 2005).

#### *4.1.1 Les microorganismes*

Les cibles sélectionnées pour détecter une pollution fécale ont été recherchées chez les bactéries, les virus, les protozoaires et les archaebactéries. (Tab. 11).

Les principales cibles bactériennes sont représentées par *E. coli* et les entérocoques, et par les bactéries anaérobies strictes telles que les *Bacteroidales* et les bifidobactéries.

Les principales cibles virales sont représentées par les bactériophages F-ARN spécifiques, les bactériophages de *Bacteroides fragilis* et les virus entériques humains.

Chez les archaebactéries, ce sont les archaebactéries méthanogènes qui représentent les principales cibles tandis que chez les protozoaires, ce sont les oocystes du genre *Cryptosporidium* spp. Toutefois, ces derniers sont très peu utilisés car ils sont faiblement représentés dans l'environnement (Xiao *et al.*, 2000, 2001).

Parmi ces cibles, les *Bacteroidales*, les archaebactéries et certains virus permettent de différencier l'origine des contaminations humaines de l'origine des contaminations animales mais également l'origine des contaminations animales entre elles (bovins, ovins, porcins) tandis que les bifidobactéries cibleront préférentiellement des contaminations d'origine humaine. Cependant, peu de données concernant leur persistance dans l'environnement sont actuellement disponibles et certaines cibles, à l'exemple des virus, peuvent être présentes en faible concentration dans l'environnement (Tab. 11).

L'utilisation de ces cibles sera plus longuement développée dans la partie 4.3.

#### *4.1.2 Les composés chimiques*

Les composés chimiques sont principalement représentés par : (i) les stéroïdes fécaux : les stérols et les stanols, (ii) les acides biliaires, (iii) les molécules de consommation humaine, et (iv) les molécules de synthèse (Tab. 11).

##### - Les stérols et stanols et les acides biliaires

Les stérols et les stanols, stéroïdes présents dans le règne animal et végétal, sont des molécules ciblées pour l'identification des contaminations fécales humaine et animale dans l'environnement (Leeming *et al.*, 1996). La dégradation des stérols en stanols est assurée par les microorganismes du tractus digestif. Le coprostanol (5 $\beta$ -stanol), produit spécifique de la dégradation du cholestérol dans les selles humaines, est un indicateur largement utilisé pour mettre en évidence les contaminations fécales humaines tandis que le 24-ethyl-cholestanol, un phytostanol, est utilisé comme marqueur d'une contamination fécale par les ruminants (Leeming *et al.*, 1996 ; Bull *et al.*, 2002). Plusieurs études ont retenu certains stérols et stanols, puis proposé des ratios pour différencier l'origine humaine et animale (Bull *et al.*, 2002 ; Jardé *et al.*, 2007a). Jardé *et al.* (2007b) ont ensuite confirmé que sur la base de ces ratios, il était possible de différencier les origines des effluents porcins, aviaires et bovins.

L'étude de Bull *et al.*, en 2002, a également associé aux stérols et stanols les acides biliaires (acide lithocolique, deoxycolique, hyodeoxycolique et hycolique) pour identifier les contaminations fécales d'origine humaine, porcine, canine et bovine. Les mesures des stanols ont permis de différencier les contaminations fécales humaines, canines et des ruminants. La

## **Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

---

distinction humain/porcin n'était pas évidente par ces marqueurs. L'utilisation des acides biliaries a ensuite permis de différencier ces deux origines. En effet, la dominance des acides lithocoliques et deoxycoliques par rapport aux acides hyodeoxycoliques et hycoliques a permis de confirmer la présence d'une contamination d'origine humaine.

### - Les molécules de consommation humaine

La caféine, alcaloïde de la famille des méthylxanthines, est une substance psychoactive présente dans de nombreux aliments tels que le café, le thé, certains sodas et boissons énergisantes. Largement répandue et consommée au monde, c'est le composé chimique le plus souvent utilisé pour identifier les contaminations fécales d'origine humaine (Buerge *et al.*, 2003 ; Glassmeyer *et al.*, 2005).

Deux autres composés, issus de la consommation de tabac, ont également été proposés comme indicateur de contamination fécale humaine : la cotinine (métabolite du tabac) et l'éthyle citrate (additif du tabac) (Glassmeyer *et al.*, 2005).

### - Les molécules de synthèse

Les produits pharmaceutiques sont utilisés comme indicateurs de contamination fécale d'origine humaine. Parmi les neuf catégories définies en fonction de leur usage par Herbert *et al.* (2002), seulement quatre : les analgésiques (acide acétylsalicylique), les anti-inflammatoires (diclofenac, l'ibuprofen, l'acétaminofen), les  $\beta$ -bloquants/antiépileptiques (atenolol, betoxolol, carbamazépine) et les régulateurs lipidiques sanguins ont été retenus car ils étaient présents dans les eaux de l'environnement mais à des valeurs proches de leur limite de détection (Ternes, 1998 ; Glassmeyer *et al.*, 2005).

Les molécules de synthèse utilisés par l'Homme tels que : (i) les détergents, (ii) les agents blanchissants fluorescents (iii) les parfums, et (iv) les retardateurs de flamme peuvent être également recherchées comme indicateur de contamination fécale humaine (Gilpin *et al.*, 2002 ; Gilpin *et al.*, 2003 ; Glassmeyer *et al.*, 2005).

Ces composés chimiques sont donc des cibles généralement recherchées pour identifier les contaminations fécales d'origine humaine. La recherche des stérols et stanols fécaux, tels que les phytostérols par exemple, permet en plus, de mettre en évidence des contaminations fécales d'origine animale. Cependant, ces cibles présentent deux limites importantes : une forte persistance dans l'environnement supérieure à celle des indicateurs

bactériens et une absence ou une faible présence dans l'environnement conduisant à des résultats souvent proches de la limite de quantification (Tab. 11).

#### *4.1.3 Autres cibles*

Les récents développements, en spectrophotométrie de fluorescence, ont participé à la caractérisation de la matière organique dissoute (MOD) dans les eaux dont les deux principaux groupes de composés qui fluorescent sont les substances humiques (acides fulviques et humiques) et les fractions organiques comportant les acides aminés (tyrosine et tryptophane) (Hudson *et al.*, 2007). Les longueurs d'onde de ces signaux sont utilisées pour indiquer la présence des différentes sources de MOD et plus généralement l'apport de contamination fécale d'origine humaine ou animale dans des eaux fortement contaminées (Baker, 2002 ; Baker et Spencer, 2004 ; Naden *et al.*, 2010).

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN présent au niveau des mitochondries peut présenter des différences importantes selon l'hôte ; aussi, il a été recherché pour différencier des contaminations fécales humaines, porcines et par les ruminants (Tab. 11). L'utilisation de cette cible sera plus largement développée dans la partie 4.3.4

## Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales

**Tableau 11 : Principales cibles microbiologiques et chimiques utilisées pour identifier l'origine des contaminations fécales ainsi que leurs avantages et inconvénients**

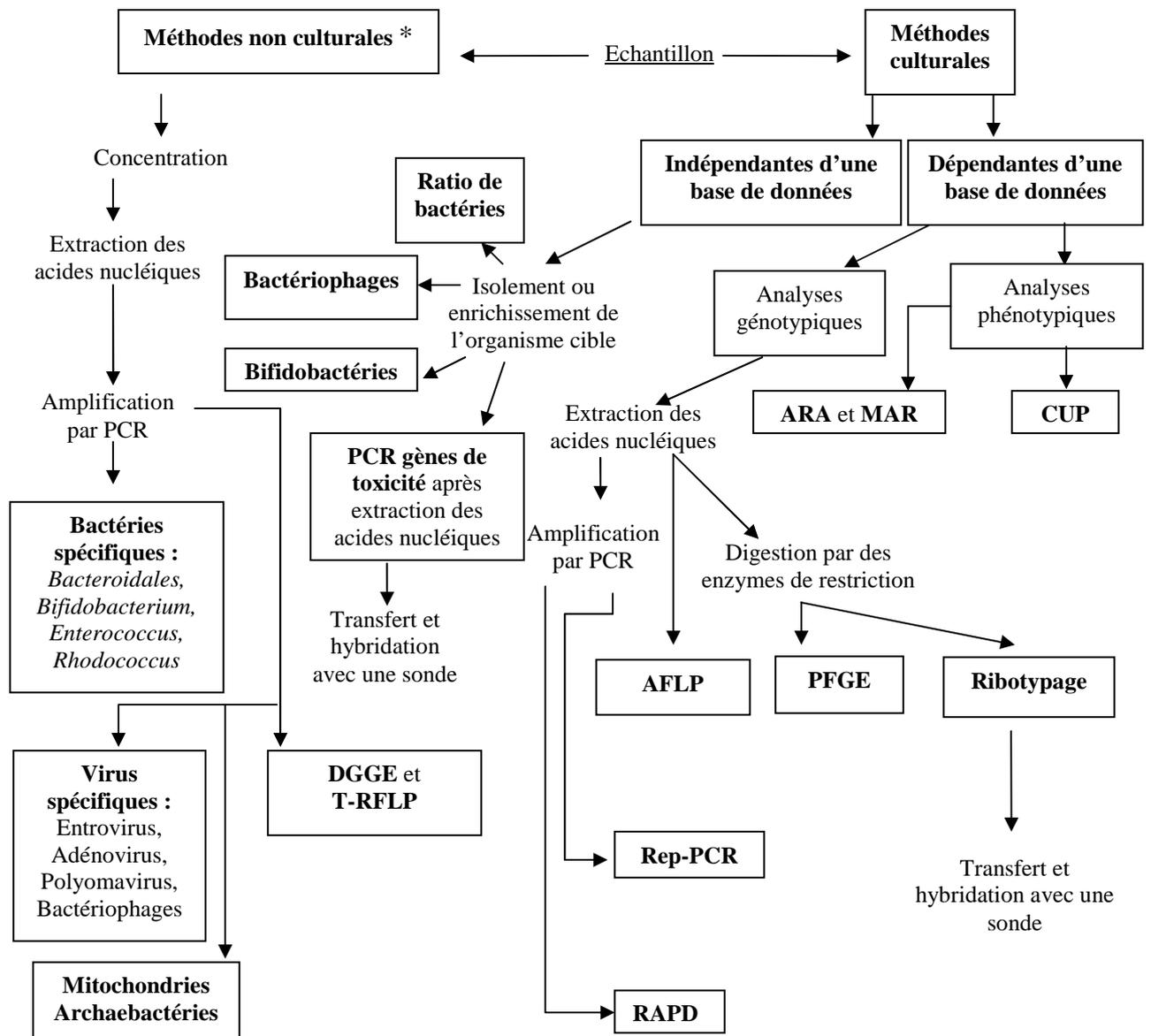
Cibles	Origine des contaminations	Avantages	Inconvénients
<b>• BACTERIES :</b>			
<b>Coliformes totaux et thermotolérants</b>	Humaine ou animale	Indicateurs de contamination fécale Concentrations supérieures à celle des pathogènes	Ecologie, prévalence et résistance au stress différentes de celles des pathogènes
<i>E. coli</i>	Humaine ou animale	Indicateurs de contamination fécale Concentrations supérieures à celle des pathogènes	Pas assez discriminant dans les environnements tropicaux et subtropicaux Possibilité de Viables Non Cultivables (VNC)
<b>Entérocoques</b>	Humaine ou animale	Indicateurs de contamination fécale Application satisfaisante dans le milieu marin et les eaux de baignade	Réservoir Possibilité de VNC
<i>Bacteroidales</i>	Humaine, bovine, porcine, équine, canine, aviaire	Mise en évidence d'une contamination fécale récente Espèces spécifiques de l'hôte	Culture difficile Persistance encore peu déterminée
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Humaine	Isolats humains fermentant le sorbitol Mise en évidence d'une contamination fécale récente	Culture difficile Persistance variable dans l'environnement
<b>• VIRUS :</b>			
<b>Bactériophages de <i>Bacteroides fragilis</i></b>	Humaine	Abondants dans les selles humaines Pas de croissance dans l'environnement Présence corrélée avec la présence de virus entériques humains	Peuvent être absents dans des environnements fortement pollués
<b>Bactériophage F-ARN spécifiques</b>	Humaine ou animale	Détection rapide et méthode simple	Méthode pas assez sensible Peu de phages sont retrouvés dans les fèces

## Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales

<b>Virus entériques humains</b>	Humaine	Pas besoin de détecter des indicateurs	Forte diversité Faiblement présents dans l'environnement
<b>• PROTOZOAIRES :</b>			
<b><i>Cryptosporidium spp.</i></b>	Humaine ou animale	Génotypes spécifiques de l'hôte	Faible abondance dans l'environnement
<b>• ARCHAEBACTERIES :</b>			
<b>Archaeobactéries méthanogènes</b>	Humaine, porcine et bovine	Espèces spécifiques de l'hôte	Persistance variable dans l'environnement Faible sensibilité
<b>• COMPOSES CHIMIQUES :</b>			
<b>Stérols et stanols</b>	Humaine ou animale	Molécules spécifiques des contaminations fécales humaines Ratios permettent d'identifier les sources Seuil de détection faible Détection temporelle et géographique	Sources naturelles ou molécules proches des stanols dans le sol et les sédiments Persistance variable, parfois longue
<b>Acides biliaires</b>	Humaine, porcine, bovine, canine	Associés aux stérols/stanols permettent de différencier l'origine humaine et animale	Pas de données sur la persistance
<b>Caféine</b>	Humaine	Seuil de détection faible Détection temporelle et géographique	Taux de dégradation variable
<b>Produits pharmaceutiques et lessiviels</b>	Humaine	Seuil de détection faible Détection temporelle et géographique	Taux de dégradation variable
<b>Retardateurs de flamme</b>	Humaine	Seuil de détection faible Détection temporelle et géographique	Taux de dégradation variable
<b>• AUTRES</b>			
<b>Fluorescence</b>	Humaine ou animale	Corrélation satisfaisante avec les indicateurs fécaux	Résultats souvent sous le seuil de détection pour des échantillons d'eaux Possibilité d'interférence avec d'autres composés Taux de dégradation variable
<b>Mitochondries des cellules eucaryotes</b>	Humaine, porcine, bovine, ovine, aviaire	Cellules spécifiques de l'hôte	Faible seuil de détection Dépendant de l'alimentation

**4.2 Les méthodes TSM microbiologiques**

Les méthodes utilisées pour identifier l'origine des contaminations dans le cadre de ce travail de thèse sont des méthodes microbiologiques. Aussi, les méthodes chimiques ne seront pas abordées. Les méthodes microbiologiques sont divisées en deux classes : les méthodes culturales et non culturales, dépendantes ou non d'une base de données (Scott *et al.*, 2002 ; Simpson *et al.*, 2002 ; U.S. Environmental Protection Agency, 2005 ; Field et Samadpour, 2007 ; Hagedorn et Weisberg, 2009) (Fig. 2).



**Figure 2 : Représentation schématique des différentes techniques microbiologiques actuellement disponibles permettant de différencier l'origine des contaminations fécales d'après U.S. Environmental Protection Agency (2005)**

\* La méthode T-RFLP est une méthode non culturale qui peut être associée à une base de données

#### 4.2.1 Les méthodes culturales

##### - Indépendantes d'une base de données

Les méthodes culturales indépendantes d'une base de données sont basées sur la recherche de cibles bactériennes et virales telles que les coliformes thermotolérants, les streptocoques fécaux, les bifidobactéries, les *E. coli* et entérocoques intestinaux pathogènes et les bactériophages (Fig. 2 et Tab. 12).

Dès les années 70, une des premières méthodes TSM a consisté à évaluer le ratio [nombre de coliformes thermotolérants/nombre de streptocoques fécaux] pour différencier les contaminations fécales d'origine humaine des contaminations fécales d'origine animale (Geldreich et Kenner, 1969). Cette méthode a ensuite été abandonnée car elle possède de nombreuses limites tels que (i) des variations de concentrations des streptocoques en fonction des individus, liées aux différents régimes alimentaires, (ii) des valeurs intermédiaires difficilement interprétables et, (iii) un ratio qui peut évoluer avec la survie des coliformes et des streptocoques dans l'environnement (Pourcher *et al.*, 1991b).

Resnick et Levin (1981) ont proposé l'utilisation des bifidobactéries comme indicateurs potentiels de contaminations humaines. La sélection de milieux de culture permettant de mettre exclusivement en évidence les bifidobactéries fermentant le sorbitol a permis de retenir deux espèces, *Bifidobacterium adolescentis* et *B. breve* pour identifier les contaminations fécales humaines (Resnick et Levin, 1981 ; Mara et Oragui, 1983).

Plus récemment, Lynch *et al.* (2002) ont mis en évidence que seul le milieu *Bifidobacterium* Medium, développé par Nebra et Blanch (1999), associé à l'application d'une sonde d'hybridation spécifique du genre *B. adolescentis* permettait de rechercher cette bactérie dans des échantillons impactés par des contaminations humaines (selles, eaux usées et traitées).

Les bactériophages, initialement recherchés pour mettre en évidence une contamination virale d'origine fécale, permettent également de discriminer l'origine humaine et animale des contaminations.

Plusieurs souches de *Bacteroides* spp. infectées par des bactériophages ont été sélectionnées pour identifier des contaminations d'origine humaine telles que *B. fragilis* HSP40 (Tartera et Jofre, 1987) et RYC2056 (Puig *et al.*, 1999) ou GA-17 proche de *B. thetaiotaomicron* (Payan *et al.*, 2005).

**Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

**Tableau 12 : Principales méthodes culturales et moléculaires, ainsi que les cibles associées permettant d'identifier l'origine des contaminations fécales**

Méthodes	Etape de culture	Bases de données	Cibles	Origine
<b>Sérotypage et génotypage de virus</b>	Oui	Non	Bactériophages F-ARN spécifiques	Humaine/animale
<b>Ratio coliformes thermotolérants/streptocoques fécaux</b>	Oui	Non	Coliformes thermotolérants, Streptocoques fécaux	Humaine ou animale
<b>Culture des bifidobactéries sur milieu sélectif</b>	Oui	Non	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Humaine
<b>Gène de virulence</b>	Oui	Non	<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp. pathogènes	Humaine, bovine, porcine
<b>ARA et MAR</b>	Oui	Oui	<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp.	Humaine ou animale
<b>CUP</b>	Oui	Oui	<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp.	Humaine ou animale
<b>Rep-PCR</b>	Oui	Oui	<i>E. coli</i> <i>Enterococcus</i> spp.	Humaine ou animale
<b>RAPD</b>	Oui	Oui	<i>E. coli</i>	Humaine ou animale
<b>AFLP</b>	Oui	Oui	<i>E. coli</i>	Humaine ou animale
<b>PFGE</b>	Oui	Oui	<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp.	Humaine ou animale
<b>Ribotypage</b>	Oui	Oui	<i>E. coli</i> , entérocoques fécaux	Humaine ou animale
<b>T-RFLP</b>	Non	Oui	<i>Bacteroidales</i>	Humaine/animale, bovine
<b>DGGE</b>	Non	Non	<i>E. coli</i>	Humaine ou animale
<b>T-RFLP et LH-PCR</b>	Non	Non	<i>Bacteroidales</i> , <i>Bifidobacterium</i>	Humaine, ruminant
<b>PCR</b> (conventionnelle, en temps réel, Reverse-Transcriptase PCR (RT-PCR), nichée...)	Non	Non	<i>Bacteroidales</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Rhodococcus</i> , Bactériophages F-ARN spécifiques, Virus entériques, Mitochondries des cellules eucaryotes, Archaeobactéries	Humaine/animale Bovine, porcine, aviaire, équine, canine, féline

## **Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

---

Cependant la sensibilité et spécificité de ces cibles ont été remises en question car ces souches peuvent être faiblement détectées dans les selles humaines et également présentes dans les fèces animales (Puig *et al.*, 1999 ; Payan *et al.*, 2005).

Les bactériophages F-ARN spécifiques, de la famille des *Leviviridae*, capables d'infecter les entérobactéries, ont également été recherchés, par culture et génotypage, à l'aide de sondes d'hybridation (Hsu *et al.*, 1995 ; Beekwilder *et al.*, 1996). Les génogroupes II et III, spécifiques de l'Homme, sont associés respectivement aux sondes GA et Q $\beta$  et les génogroupes I (principalement animal) et IV (animal) sont associés respectivement aux sondes MS2 et SP (Cole *et al.*, 2003). Toutefois, la spécificité des génogroupes I et III a été remise en question car ils ont respectivement été retrouvés dans des effluents d'origine urbaine et dans des fèces d'origine porcine et aviaire (Cole *et al.*, 2003 ; Blanch *et al.*, 2006 ; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006).

La recherche des gènes de virulence, tels que ceux codant pour les entérotoxines d'*E. coli* et des entérocoques pathogènes, nécessite également une étape de culture ou d'enrichissement avant d'amplifier l'ADN génomique bactérien cible par Polymerase Chain Reaction (PCR) pour différencier les contaminations d'origine humaine, bovine et porcine, (Khatib *et al.*, 2002 ; Khatib *et al.*, 2003).

### - Dépendantes d'une base de données

Les méthodes culturelles dépendantes d'une base de données sont basées sur des analyses phénotypiques et génotypiques, à partir des cibles *E. coli* et entérocoques, pour identifier les contaminations d'origine humaine ou animale (Fig. 2 et Tab. 12). Après culture sur des milieux sélectifs, les profils obtenus pour chaque cible sont analysés statistiquement et sont ensuite comparés à ceux des bases de données obtenus à partir de souches isolées de selles humaines et de fèces animales.

Les méthodes basées sur des analyses phénotypiques sont représentées essentiellement par les méthodes de résistance aux antibiotiques (l'analyse de résistance aux antibiotiques, ARA ou de résistance multiple aux antibiotiques, MAR (Wiggins, 1996 ; Harwood *et al.*, 2003)) et l'utilisation de substrats carbonés (CUP) (Hagedorn *et al.*, 2003) (Tab 12). Ces méthodes présentent cependant des limites en raison du transfert de gènes de résistance entre bactéries de l'environnement et les bactéries cibles (MAR et ARA) (Ebdon et Taylor, 2006) et du manque de reproductibilité (CUP) (Hagedorn *et al.*, 2003 ; Harwood *et al.*, 2003 ; Wallis et Taylor, 2003 ; Blanch *et al.*, 2006).

## **Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

---

Les méthodes basées sur des analyses génotypiques sont représentées essentiellement par des techniques d'empreintes génétiques. Parmi ces méthodes, le ribotypage et la PCR répétitive (Rep-PCR) sont les plus utilisées. Par ribotypage, des résultats satisfaisants ont été obtenus car les isolats provenant de source animale ont été classés avec succès pour plus de 92 % et pour les isolats provenant de source humaine à plus de 67 % (Parveen *et al.*, 1999 ; Carson *et al.*, 2001 ; Carson *et al.*, 2003 ; Scott *et al.*, 2003). Cependant, d'après Carson *et al.* (2003), la Rep-PCR serait une technique plus fiable et plus reproductible que le ribotypage. Il a été montré qu'avec cette méthode, sur 154 isolats d'*E. coli* analysés, 78 % (origine aviaire : canard) à 100 % (origine bovine et aviaire : poulet) des isolats ont été assignés dans les bons groupes (Dombek *et al.*, 2000). Les méthodes telles que l'analyse du polymorphisme de l'amplification aléatoire de l'ADN (RAPD), le polymorphisme de fragments amplifiés (AFLP) et l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) ont été moins utilisées (Parveen *et al.*, 2001 ; Myoda *et al.*, 2003 ; Venieri *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2010). La méthode AFLP semble se distinguer des autres méthodes car lorsqu'elle a été comparée aux méthodes MAR et analyse des séquences des gènes codant les ARNr 16S, en recherchant la cible *E. coli*, elle a permis d'obtenir les résultats les plus fiables. En effet, 94 % des isolats ( $n=319$ ) ont été classés correctement pour différencier l'origine humaine et animale alors que pour la méthode la moins discriminante, la MAR, seulement 46 % des isolats provenant des ruminants ont été classés correctement. L'analyse des séquences avait permis de classer correctement plus de 74 % des isolats provenant des ruminants et jusqu'à 80 % des isolats provenant de l'Homme (Guan *et al.*, 2002). Ces résultats ont été confirmés par Leung *et al.* (2004) qui ont comparé cette méthode à la Rep-PCR en utilisant des isolats d'*E. coli* pathogènes et non pathogènes ( $n=110$ ) d'origine humaine, bovine et porcine. L'AFLP était la méthode la plus discriminante car plus de 90,7 % des isolats ont été classés correctement (avec différenciation *E. coli* pathogènes/non pathogènes) alors que la Rep-PCR n'a pas permis de classer d'isolats pour les bovins.

Les méthodes culturales, sont donc des méthodes simples, rapides et peu onéreuses mais la recherche de souches cultivables conduit souvent à des résultats peu spécifiques. De plus, les méthodes dépendantes d'une base de données nécessitent une collection de nombreux isolats pour édifier la base de données dont la taille idéale, pour être représentative des échantillons de l'environnement, n'est toujours pas connue (généralement de 100 à 400 isolats/hôte). A ces limites, s'ajoute la stabilité de la base de données qui peut être variable d'un site à un autre (Tab. 13). La recherche des gènes de virulence permet de différencier les

## Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales

contaminations d'origine humaine des contaminations d'origine bovine et porcine. Cependant, la faible présence de gènes de virulence des bactéries cibles dans l'environnement est une limite importante. Ainsi, pour pallier au manque de spécificité des méthodes culturales, il existe des méthodes non culturales qui semblent plus appropriées pour différencier des contaminations d'origine humaine des contaminations d'origine animale ainsi que pour différencier les contaminations animales entre elles.

**Tableau 13 : Principaux avantages et inconvénients des méthodes culturales et non culturales utilisées pour identifier l'origine des contaminations**

	Avantages	Inconvénients
<b>Méthodes culturales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu onéreuses</li> <li>- Accès technique aisé</li> <li>- Etape d'enrichissement permettant d'augmenter le nombre d'organismes cibles</li> <li>- Discrimination entre les contaminations humaines et animales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Limitées à des souches cultivables</li> <li>- Souches peu spécifiques de l'hôte</li> <li>- Pour les bases de données besoin de nombreux isolats</li> <li>- Taille idéale de la base de données non déterminée</li> <li>- Faible stabilité géographique de la base de données</li> <li>- Pas de discrimination entre les différentes espèces animales</li> </ul>
<b>Méthodes non culturales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Représentation plus large de la population bactérienne</li> <li>- Ciblent des bactéries non cultivables</li> <li>- Discrimination entre les contaminations humaines et animales (porcs, bovins...)</li> <li>- Possibilité d'une étape d'enrichissement</li> <li>- Possibilité de quantification de la cible dans l'échantillon</li> <li>- Réponse rapide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Equipement onéreux</li> <li>- Peu de corrélation avec les indicateurs classiques et les pathogènes</li> <li>- Persistance des cibles non déterminée</li> <li>- Stabilité géographique non déterminée</li> </ul>

### 4.2.2 Les méthodes non culturales

#### - Dépendantes d'une base de données

Très peu d'études ont utilisé des méthodes non culturales dépendantes d'une base de données pour différencier les contaminations d'origine humaine et animale. On peut citer néanmoins la méthode de l'analyse de la longueur des fragments de restriction terminaux (T-RFLP) qui a été utilisée par Field *et al.* (2003), Griffith *et al.* (2003) et Fogarty et Voytek, (2005) en recherchant la cible *Bacteroidales* (Fig. 2 et Tab. 12). Les profils de restriction obtenus ont été comparés à une base de données de profils de restriction basés sur les gènes codant l'ARNr 16S de *Bacteroidales* issus de selles humaines et de fèces animales. Toutefois, les résultats obtenus par cette méthode sont peu concluants car elle n'a pas permis d'identifier

## **Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

---

correctement des échantillons testés en aveugle (30 % de faux négatifs dans des échantillons d'effluents urbains et 50 % de faux positifs dans des échantillons de selles humaines (Griffith *et al.*, 2003).

### - Indépendantes d'une base de données

Les méthodes non culturales indépendantes d'une base de données sont principalement basées sur la recherche, après extraction de l'ADN génomique, des gènes codant les ARN ribosomiaux 16S (ARNr 16S) de microorganismes cibles pour identifier les contaminations d'origine humaine ou animale dont les contaminations d'origine porcine, ruminant, aviaire, équine et féline (Fig. 2 et Tab. 12).

Parmi ces méthodes, quelques études ont été réalisées en utilisant l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE). Toutefois, cette méthode appliquée aux gènes codant l'ARNr 16S d'*E. coli*, n'a pas permis de différencier les contaminations d'origine humaine et animale devant l'importante diversité des isolats d'*E. coli* dans l'environnement (Farnleitner *et al.*, 2000 ; Buchan *et al.*, 2001). Les méthodes T-RFLP et LH-PCR (Length Heterogeneity-PCR) utilisées par Bernhard et Field (2000a ; 2000b) ont permis de différencier les contaminations fécales humaines des contaminations fécales des ruminants en ciblant spécifiquement les gènes codant l'ARNr 16S du genre *Bifidobacterium* et de l'ordre des *Bacteroidales*. Ils ont montré qu'il existait une composition différente des espèces de ces deux groupes dans les selles humaines et les fèces bovines et que ces espèces différentes se retrouvaient dans des eaux impactées par des matières fécales. La cible *Bacteroidales* s'est révélé être une cible plus intéressante que le genre *Bifidobacterium* car ce dernier n'a pas été toujours retrouvé dans des eaux contaminées. De plus, les *Bacteroidales* ont permis de différencier les contaminations fécales humaines de celles des ruminants. Des marqueurs de PCR conventionnelle ciblant l'ensemble des *Bacteroidales* et plus particulièrement les *Bacteroidales* spécifiques de l'Homme et des ruminants ont ensuite été développés.

Aujourd'hui, l'utilisation de la PCR, pour identifier l'origine des contaminations fécales en direct après une étape d'extraction de l'ADN génomique est largement appliquée. Les cibles recherchées à l'aide de marqueurs de PCR sont multiples : (i) des bactéries (*Bacteroidales*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Rhodococcus*...), (ii) des virus (bactériophages F-ARN spécifiques, entérovirus, adénovirus...), (iii) des archaebactéries, et (iv) des mitochondries de cellules eucaryotes.

Les études utilisant des marqueurs de PCR pour identifier l'origine des contaminations dans l'environnement sont présentées plus en détails dans les sous-parties 4.3 et 5.4.

De nombreuses méthodes sont donc disponibles pour identifier l'origine des contaminations. Les cibles les plus souvent recherchées sont des bactéries : *E. coli*, les entérocoques, les bifidobactéries et les *Bacteroidales*. Les méthodes non culturales indépendantes d'une base de données telle que la PCR, semblent se dégager des autres méthodes. En effet, elles permettent par une analyse directe, de différencier l'origine humaine et animale des contaminations et de différencier les contaminations animales entre elles (Tab. 13).

### **4.3 Les marqueurs de PCR**

L'identification des contaminations fécales d'origine humaine ou animale par PCR nécessite de définir à partir des cibles sélectionnées telles que les bactéries, les virus, les archaebactéries ou les mitochondries de cellules eucaryotes, des marqueurs suffisamment sensibles et spécifiques.

#### *4.3.1 Marqueurs bactériens*

Les marqueurs de PCR recherchant les cibles bactériennes reposent principalement sur l'ordre des *Bacteroidales* et le genre *Bifidobacterium*. D'autres marqueurs, reposant sur le genre *Desulfovibrio* et les espèces *Rhodococcus coprophilus*, *Lactobacillus amylovorus* et *Catelicoccus marimammalium* ont également été développés pour identifier plus spécifiquement les contaminations d'origine aviaire, porcine ou par les ruminants (Tab. 14). La cible *Bacteroidales* et ses marqueurs de PCR, qui représentent une partie plus approfondie de cette revue bibliographique, sont présentés dans la partie V.

#### - Bifidobactéries

Plusieurs espèces de bifidobactéries telles que *Bifidobacterium adolescentis* (Bonjoch *et al.*, 2004 ; Gourmelon *et al.*, 2010c), *B. dentium* (Bonjoch *et al.*, 2004) et *B. catenulatum* (Dorai-Raj *et al.*, 2009) ont été recherchées par PCR pour mettre en évidence les contaminations fécales d'origine humaine tandis que l'espèce *B. thermacidophilum* subsp. *Porcinum* (Marti *et al.*, 2009) s'est révélée être une cible intéressante pour identifier les contaminations porcines (Tab. 14).

Les marqueurs de PCR de la cible *B. adolescentis* se sont révélés sensibles mais moins spécifiques ; ils ont en effet été détectés dans des échantillons d'origine bovine et aviaire. Ces marqueurs ont également été retrouvés dans des eaux de l'environnement impactées par des contaminations humaines (Bonjoch *et al.*, 2004 ; King *et al.*, 2007 ; Gourmelon *et al.*, 2010c).

## **Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

---

Un marqueur de l'espèce *B. thermacidophilum* subsp. *Porcinum* ciblant les contaminations porcines, a été développé par Marti *et al.* (2009) en étudiant les populations bactériennes dominantes du lisier à l'aide d'une technique de typage moléculaire, la Capillary-Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP). Ce marqueur a également été retrouvé dans des eaux de ruissellement impactées par des lisiers de porcs.

### - *Lactobacillus amylovorus*

Marti *et al.* (2009) ont montré également qu'une autre espèce, *L. amylovorus*, était aussi présente dans l'ensemble des lisiers de porcs qu'ils avaient testé ( $n=10$ ). Ils ont ensuite utilisé les amorces dessinées par Konstantinov *et al.* (2005) et Su *et al.* (2008) pour mettre en évidence cette bactérie par PCR quantitative en temps réel (qPCR) (Marti *et al.*, 2010) (Tab. 14). Ce marqueur, sensible et spécifique sur des fèces et des effluents, a été amplifié dans les eaux de ruissellement impactées par des lisiers de porcs ( $n=3$ ) et dans trois des 30 eaux de rivière testées pouvant ou non être impactées par des effluents porcins, à des concentrations comprises entre 3,8 et 4,2 U. Log<sub>10</sub> bactéries/100 ml d'eau.

### - *Rhodococcus coprophilus*

*R. coprophilus*, bactérie commensale de la flore fécale des herbivores, a été proposée par Rowbotham et Cross (1977) comme indicateur de contamination d'origine ruminant. Plus récemment, Savill *et al.* (2001) ont développé un marqueur de PCR conventionnelle et de qPCR ciblant les gènes codant l'ARNr 16S de cette bactérie qui ont conduit à de très bons résultats de sensibilité et spécificité (Tab. 14). Ce marqueur a cependant été testé sur un faible nombre d'échantillons et la recherche de ce marqueur dans des eaux de rivière montre des concentrations proches de la limite de détection (Gilpin *et al.*, 2002 ; Plummer et Long, 2007). De plus, il faut noter que cette bactérie a aussi été isolée dans des boues activées de STEP (Sezgin *et al.*, 1988).

### - *Desulfovibrio* spp., *Catelicoccus marimammali* et *Brevibacterium* spp.

Si la plupart des marqueurs ont été développés pour identifier les contaminations d'origine humaine, bovine ou porcine, quelques études se sont intéressées aux marqueurs de contaminations d'origine aviaire (Devane *et al.*, 2007 ; Lu *et al.*, 2008 ; Weidhaas *et al.*, 2010) (Tab. 14).

## Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales

---

Le marqueur développé par Devane *et al.* (2007), basé sur les gènes codant l'ARNr 16S de la bactérie du genre *Desulfovibrio* a été développé pour identifier les contaminations fécales des canards sauvages en Nouvelle Zélande. Cependant, même si ce marqueur n'a pas été détecté dans des échantillons fécaux d'origine humaine ou animale autre qu'aviaire ( $n=138$ ) et qu'il a été retrouvé dans 13 eaux de l'environnement ( $n=31$ ) potentiellement impactées par des contaminations fécales de canards sauvages, le marqueur a aussi été détecté dans 20 % des fientes de cygnes ( $n=10$ ), 15 % des fientes d'oies du Canada ( $n=20$ ) et 13 % des fientes d'oies domestiques ( $n=15$ ) (Devane *et al.*, 2007). Ce marqueur a également été testé en France et a montré un manque de spécificité. En effet, s'il a été retrouvé dans tous les échantillons de fientes de canards testés ( $n=4$ ), il a été détecté dans huit échantillons de fèces de porcs ( $n=10$ ) (Caprais *et al.*, 2010b).

L'analyse phylogénétique de la communauté bactérienne présente dans le tractus digestif des goélands, réalisée par Lu *et al.* (2008), a montré que 26 % des séquences ( $n=282$ ) étaient proches de celles de l'espèce *C. marimammalium*, récemment décrite par Lawson *et al.* (2006). Des amorces ont ensuite été dessinées pour cibler les séquences proches de cette espèce par qPCR. Ce marqueur s'est avéré spécifique des goélands et des mouettes et a été retrouvé dans des eaux issues de différents lieux géographiques aux Etats-Unis où des contaminations fécales par les goélands étaient suspectées. Testé en France, ce marqueur s'est également révélé sensible car il a été quantifié dans 92,9 % des échantillons de fientes d'oiseaux de bord ( $n=29$ ) et dans 33 % des échantillons de fientes d'oiseaux domestiques ( $n=6$ ). Ce marqueur n'a pas été détecté dans des échantillons de fèces et d'effluents non cibles ( $n=75$ ) (Caprais *et al.*, 2010b).

Weidhaas *et al.* (2010) ont récemment développé un marqueur de qPCR permettant de mettre en évidence les contaminations fécales liées aux élevages de volailles (poulets et dindes). Les amorces de ce marqueur ont été dessinées à partir d'une séquence proche à 98 % des gènes codant l'ARNr 16S de l'espèce *Brevibacterium avium*. Le marqueur a présenté 76 % de sensibilité lorsqu'il a été testé sur des échantillons cibles de litière de volailles et de fientes de poulets et de dindes ( $n=57$ ) et 93 % de spécificité lorsqu'il a été testé sur des échantillons cibles de fèces et fumiers de bovins, de lisiers de porcs, de fèces de canards et d'oies et d'effluents de STEP ( $n=116$ ). Ce marqueur a également été quantifié dans des eaux de ruissellement impactées par des litières de volailles à des concentrations pouvant atteindre 5 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau.

#### 4.3.2 Marqueurs viraux

Les marqueurs viraux regroupent principalement les bactériophages F-ARN spécifiques, les adénovirus, les polyomavirus, les entérovirus et les teschovirus. Ils permettent d'identifier les contaminations d'origine humaine et animale (porcine et ruminant) (Tab. 14). Parmi les virus, les marqueurs des génogroupes des bactériophages F-ARN spécifiques (I et IV origine animale et II et III origine humaine), développés par Ogorzaly et Gantzer (2006), permettent de caractériser les contaminations humaines des contaminations animales (Tab. 14).

Ces marqueurs n'ont cependant pas été testés sur un nombre élevé d'échantillons. Recherchés dans des échantillons d'effluents urbains ( $n=7$ ), le génogroupe II mais également le génogroupe I ont été détectés dans tous les échantillons. Les auteurs proposent d'utiliser le ratio [génogroupe II/génogroupe I] pour différencier les contaminations humaines des contaminations mixtes dans les eaux (Ogorzaly *et al.*, 2009).

L'identification des contaminations d'origine humaine, porcine et ruminant est possible avec l'utilisation d'autres marqueurs viraux, tels que les adénovirus, les polyomavirus, les entérovirus et les teschovirus (Ley *et al.*, 2002 ; Jimenez-Clavero *et al.*, 2003 ; Maluquer de Motes *et al.*, 2004 ; Hundesa *et al.*, 2006). Ces marqueurs n'ont cependant pas été testés sur un nombre élevé d'échantillons et leur sensibilité et spécificité étaient souvent peu satisfaisantes, excepté pour les marqueurs ciblant les adénovirus et les polyomavirus développés par Hundesa *et al.* (2009) et McQuaig *et al.* (2009) où les sensibilités et spécificités étaient respectivement supérieures à 89 et 100 % (Tab. 14).

Malgré leur faible niveau de concentration dans les eaux, les marqueurs viraux ont été détectés dans des eaux impactées par des effluents d'origine animale (Jimenez-Clavero *et al.*, 2003 ; Hundesa *et al.*, 2010). A titre d'exemples, (i) le marqueur de contamination porcine ciblant les teschovirus a été quantifié dans des eaux de rivière fortement impactées par des contaminations d'origine porcine à des concentrations comprises entre 2,1 et 5,2 U. Log<sub>10</sub> génomes/100 ml, et (ii) le marqueur de contamination bovine ciblant les polyomavirus a été quantifié dans des échantillons d'eau de rivière impactés par des contaminations fécales bovines à des concentrations de 1,5 U. Log<sub>10</sub> copies de génomes/100 ml (Tab. 14).

#### 4.3.3 Marqueurs d'archaebactéries

Les marqueurs d'archaebactéries ciblent des archaebactéries méthanogènes pour différencier les contaminations fécales d'origine humaine, porcine ou ruminant (Tab. 14).

## **Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

---

La sensibilité des amorces amplifiant une séquence du gène *nifH* de l'archaebactérie méthanogène *Methanobrevibacter smithii* pour identifier les contaminations d'origine humaine s'est avérée élevée dans les effluents et peu élevée dans les selles (29 % ;  $n=70$ ) (Ufnar *et al.*, 2006). Ces résultats ont été confirmés par Harwood *et al.* (2009) et McQuaig *et al.* (2009) qui ont obtenu respectivement une sensibilité et une spécificité de ce marqueur supérieure à 84 et 98 % dans des effluents urbains et des fèces animales.

Toujours à partir d'archaebactéries méthanogènes, des amorces spécifiques des porcs ont ensuite été dessinées pour amplifier le gène *mcrA* codant pour la sous-unité  $\alpha$  de la méthyle coenzyme M réductase (Ufnar *et al.*, 2007a). Testées par Lamendella *et al.* (2009), sur des fèces et des effluents cibles, la sensibilité (49,5 % ;  $n=103$ ) de ce marqueur étaient inférieure à celle obtenue par Ufnar *et al.* (2007a) et le marqueur n'a été retrouvé qu'à 5 reprises sur 60 eaux de lagunes et de rivière, impactées par des rejets porcins.

Ufnar *et al.* (2007b) ont également développé des amorces pour amplifier une séquence du gène *nifH* de l'archaebactérie méthanogène *M. ruminantium* pour identifier des contaminations fécales par les ruminants (bovins, moutons et chèvres) (Tab. 14).

Ces trois marqueurs développés pour la PCR conventionnelle ont été peu testés dans des eaux de l'environnement.

**Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

**Tableau 14 : Principaux marqueurs de PCR, autres que les marqueurs *Bacteroidales*, pour identifier les contaminations fécales humaines et animales ainsi que leur sensibilité et spécificité**

Cibles	Méthodes	Origine (Nom du marqueur)	Sensibilité % (n)	Spécificité % (n)	Références
<b>BACTERIES</b>					
<b>Bifidobactéries</b>	PCR multiplexe	Humaine (ADO & DEN)	100 (22) <sup>a</sup>	84,2 (19) <sup>a</sup>	Bonjoch <i>et al.</i> (2004)
	PCR conventionnelle	Humaine (BiCATg 1 & 2)	46 (26) <sup>a</sup>	87 (119)	Dorai-Raj <i>et al.</i> (2009)
	qPCR	Humaine (SFA41)	100 (33) <sup>b</sup> 94,4 (18) <sup>a,b</sup>	94,5 (73) <sup>a,b</sup>	Gourmelon <i>et al.</i> (2010c)
<b><i>R. coprophilus</i></b>	PCR nichée qPCR et PCR conventionnelle	Porcine (GE 35/36) Ruminant	98,4 (62) <sup>a,b,c</sup> 100 (11) <sup>b</sup>	100 (86) <sup>a,b,c</sup> 100 (9) <sup>b</sup>	Marti <i>et al.</i> (2009) Savill <i>et al.</i> (2001)
<b><i>L. amylovorus</i></b>	qPCR	Porcine	100 (78) <sup>a,b</sup>	95,6 (115) <sup>a,b</sup>	Marti <i>et al.</i> (2010)
<b><i>Desulfovibrio spp.</i></b>	PCR semi-nichée	Aviaire (canard)	76 (42) <sup>b</sup>	97,3 (183) <sup>a,b</sup>	Devane <i>et al.</i> (2007)
<b><i>C. marimammalium</i></b>	qPCR	Aviaire (Goéland-Gull-2)	100 (13) <sup>a</sup>	100 (26) <sup>a</sup>	Lu <i>et al.</i> (2008)
<b><i>Brevibacterium sp.</i></b>	qPCR	Aviaire (volaille-LA35)	76 (57) <sup>a,b</sup>	93 (116) <sup>a,b</sup>	Weidhaas <i>et al.</i> (2010)
<b>VIRUS</b>					
<b>Bactériophages</b>	RT-PCR	Animal (GI) Humaine (GII) Humaine (GIII) Animal (GIV)	NT <sup>d</sup> 100 (7) <sup>a</sup> 85,7 (7) <sup>a</sup> NT	100 (7) <sup>a</sup> NT NT 0 (7) <sup>a</sup>	Ogorzaly et Gantzer (2006)
<b>Adénovirus</b>	PCR nichée	Porcine (PAV) Bovine (BAV)	70 (24) <sup>b</sup> 75 (8) <sup>b</sup>	100 (12) <sup>a</sup> 100 (12) <sup>a</sup>	Maluquer de Motes <i>et al.</i> (2004)
	PCR nichée	Humaine Porcine Bovine	100 (9) <sup>a</sup> 100 (10) <sup>a</sup> 4,5 (22) <sup>a</sup>	100 (22) <sup>a</sup> NT NT	Hundesa <i>et al.</i> (2006)
<b>Polyomavirus</b>	qPCR	Porcine	89,1 (46) <sup>a,b</sup>	100 (9) <sup>a</sup>	Hundesa <i>et al.</i> (2009)
	PCR nichée	Bovine (BpyV)	94,4 (18) <sup>a</sup>	100 (4) <sup>a</sup>	Hundesa <i>et al.</i> (2006)
	qPCR	Bovine (BpyV)	38,2 (47) <sup>e</sup>	100 (8) <sup>a</sup>	Hundesa <i>et al.</i> (2010)
	PCR nichée	Humaine (HpyV)	100 (50) <sup>a</sup>	100 (37) <sup>a</sup>	McQuaig <i>et al.</i> (2006)

**Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

<b>Entérovirus</b>	qPCR	Humaine (HpyV)	89,9 (69) <sup>a,c</sup>	100 (127) <sup>a</sup>	McQuaig <i>et al.</i> (2009)
	RT-PCR	BEV (bovine)	76 (95) <sup>b</sup>	63 (54) <sup>f</sup>	Ley <i>et al.</i> (2002)
	RT-PCR	BEV (bovine)	78 (100) <sup>b</sup>	54 (50) <sup>b</sup>	Jimenez-Clavero <i>et al.</i> (2005)
<b>Teschovirus</b>	RT-PCR	PTV (porcine)	100 (5) <sup>a,b,c</sup>	100 (NP) <sup>g</sup>	Jimenez-Clavero <i>et al.</i> (2003)
<b>ARCHAEBACTERIES</b>					
<b><i>Methanobrevibacter smithii</i></b>	PCR conventionnelle	Humaine (Mnif)	29 (70) <sup>b</sup> 93 (27) <sup>a</sup>	100 (797) <sup>h,i</sup>	Ufnar <i>et al.</i> (2006)
<b>Archaeobactérie méthanogène</b>	PCR conventionnelle	Porcine (P23-2)	86,6 (30) <sup>a,b</sup>	99,6 (260) <sup>b</sup> 100 (688) <sup>c,h,i,j</sup>	Ufnar <i>et al.</i> (2007a)
<b>Archaeobactérie méthanogène</b>	PCR conventionnelle	Ruminant (Mrnif)	84,3 (102) <sup>a,b</sup>	100 (831) <sup>a,b,c,e</sup>	Ufnar <i>et al.</i> (2007b)
<b>MITOCHONDRIES</b>					
	qPCR/PCR multiplexe	Humaine	90,5 (21) <sup>a,b</sup>	100 (NP) <sup>a,b,g</sup>	Caldwell <i>et al.</i> (2007)
		Bovine	100 (4) <sup>a,b</sup>	100 (NP) <sup>a,b</sup>	
		Porcine	100 (3) <sup>a,b</sup>	100 (NP) <sup>a,b</sup>	
	qPCR	Humaine et canine	100 (24) <sup>k</sup>	100 (NP) <sup>b</sup>	Caldwell et Levine (2009)
		Bovine	41,7 (24) <sup>k</sup>	100 (NP) <sup>b</sup>	
		Féline	4 (24) <sup>k</sup>	100 (NP) <sup>b</sup>	
		Aviaire et Cerf	NT <sup>d</sup>	100 (NP) <sup>b</sup>	
	qPCR	Humaine et porcine	100 (4) <sup>l</sup>	100 (NP) <sup>b,1</sup>	Baker-Austin <i>et al.</i> (2010)
		Bovine	100 (5) <sup>l</sup>	100 (NP) <sup>b</sup>	
		Ovine	100 (2) <sup>l</sup>	100 (NP) <sup>b</sup>	
<b>GENES DE VIRULENCE</b>					
<b><i>E. coli</i> entérotoxigénique</b>	PCR conventionnelle	Bovine	87,1 (31) <sup>b</sup>	100 (221) <sup>a,b,h</sup>	Khatib <i>et al.</i> (2002)
<b><i>E. coli</i> entérotoxigénique</b>	PCR conventionnelle	Porcine	94 (33) <sup>b</sup>	100 (274) <sup>a,b,h</sup>	Khatib <i>et al.</i> (2003)
<b><i>Enterococcus faecium</i></b>	PCR conventionnelle	Humaine	97 (65) <sup>b</sup>	100 (102) <sup>a,b</sup>	Scott <i>et al.</i> (2005)

<sup>a</sup> Effluents, <sup>b</sup> Fèces, <sup>c</sup> Eaux de l'environnement, <sup>d</sup> Non Testé, <sup>e</sup> Fèces, urine et eau en sortie d'abattoir, <sup>f</sup> Fèces, eau de rivière et huile, <sup>g</sup> Donnée non présentée, <sup>h</sup> Souches pures, <sup>i</sup> Souches isolées de l'environnement, <sup>j</sup> Sédiments, <sup>k</sup> Effluents de STEP, <sup>l</sup> Echantillons testés en aveugle

#### 4.3.4 Marqueurs mitochondriaux

Martellini *et al.* (2005) ont été les premiers à utiliser l'ADN mitochondrial, présent en quantité importante dans les fèces, pour différencier les contaminations fécales humaines et animales dans les eaux de l'environnement. Ils ont développé des amorces de PCR ciblant les ADN mitochondriaux de cellules humaines, bovines, ovines et porcines. Toutefois, la spécificité et la sensibilité de ces marqueurs ont été testées que sur un petit nombre d'échantillons et ils n'ont pratiquement pas été détectés dans les eaux de l'environnement.

Des marqueurs ciblant les contaminations fécales spécifiques des animaux domestiques (chiens et chats), des animaux d'élevages (bovins, porcs, chevaux, moutons et poulets) et des animaux sauvages (oies du Canada et cerfs) ont également été développés (Tab. 14). Cependant, ces marqueurs ont également été testés sur très peu d'échantillons et n'ont pas été appliqués, à notre connaissance, dans des eaux de l'environnement. Il est cependant important de considérer, pour identifier l'origine de la contamination fécale, le fait que la consommation d'aliments d'origine animale conduit à l'excrétion de cellules animales par l'homme ; par exemple, le marqueur bovin développé par Caldwell et Lavigne, (2009) a été retrouvé dans des selles humaines où les individus avaient consommé 24 h auparavant de la viande bovine.

#### 4.3.5 Marqueurs de gènes de virulence

Les marqueurs ciblant les gènes de virulence permettent de différencier les contaminations fécales d'origine humaine, bovine et porcine (Tab. 14).

Les gènes *esp* codant pour une protéine de surface chez *Enterococcus faecium* ont été utilisés pour identifier les contaminations fécales humaines (Scott *et al.*, 2005). Les amorces ciblant ces gènes se sont révélées sensibles et spécifiques (Tab. 14). Le marqueur humain *esp* (avec une amorce reverse différente de celle dessinée par Scott *et al.* (2005)), a également été testé dans des eaux de l'environnement impactées par des pollutions humaines (McQuaig *et al.*, 2006 ; Ahmed *et al.*, 2007). Utilisé en qPCR, des concentrations variant de 4 à 4,6 et de 2 à 2,7 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau ont été obtenue dans respectivement 100 % des échantillons d'eaux usées ( $n=16$ ) et 38 % des échantillons d'eaux de l'environnement ( $n=16$ ) (Ahmed *et al.*, 2008c). Toutefois, l'étude de Kim *et al.* (2010), remet en cause la sensibilité du marqueur humain *esp*, car sur 34 souches d'*E. faecium* isolées de selles humaines, seulement trois souches étaient positives. De plus, l'étude de Layton *et al.* (2009) démontre que ce marqueur ne semble pas approprié pour mettre en évidence des contaminations fécales exclusivement

## **Etude bibliographique : IV Les méthodes pour discriminer l'origine des contaminations fécales**

---

d'origine humaine car il a été retrouvé dans des fèces de chiens, chevaux, goélands et phoques.

Concernant les contaminations fécales bovines et porcines, les gènes de virulence ciblés étaient respectivement les gènes de virulence des toxines LTIIIa et STII d'*E. coli* entérotoxigénique (ETEC) (Khatib *et al.*, 2002 ; Khatib *et al.*, 2003). A notre connaissance, ces marqueurs n'ont pas été testés dans des eaux de l'environnement.

Conclusion partie IV : Les cibles et méthodes disponibles pour identifier l'origine des contaminations fécales sont nombreuses. Parmi les cibles chimiques : les stérols et les stanols fécaux, les molécules liées à la consommation humaine (caféine et dérivés du tabac) et certaines molécules de synthèse semblent appropriées pour identifier l'origine humaine ou animale des contaminations. Les microorganismes cibles, associés à des méthodes non culturales, indépendantes d'une base de données, présentent en plus l'avantage de différencier les contaminations animales entre elles et plus particulièrement les contaminations bovines et porcines. Cependant, si les marqueurs de PCR se sont révélés assez sensibles et spécifiques lorsqu'ils ont été testés dans des fèces et des effluents cibles et non cibles, ils ont de manière générale été faiblement détectés dans les eaux de l'environnement. Dans la partie V de ce manuscrit, nous montrerons que la cible *Bacteroidales* et ses marqueurs de PCR semblent être une alternative pertinente.

## V Les *Bacteroidales*

### 5.1 Les *Bacteroidales* au sein du microbiote intestinal

#### 5.1.1 Taxinomie

La taxinomie de l'ordre des *Bacteroidales* a subi de nombreuses révisions depuis plus de 15 années avec des inclusions ou exclusions d'espèces relativement fréquentes (Moore *et al.*, 1985 ; Shah et Collins, 1989). Ces modifications ont mis en évidence que le phénotype et le génotype de cet ordre sont très hétérogènes. Les principales différences ont été observées par l'étude des porphyrines, des profils enzymatiques, la constitution des lipides membranaires et depuis peu, par la phylogénie, c'est à dire l'étude de la composition de l'ADN (Wexler, 2007).

Des travaux récents ont proposé un remaniement de la classification des bactéries de l'ordre des *Bacteroidales* principalement représentés par deux genres : les *Bacteroides* et les *Prevotella* (Ludwing *et al.*, 2008). D'un point de vue taxinomique, les *Bacteroidales* appartiennent au règne des procaryotes, au domaine des *Bacteria*, au phylum des *Bacteroidetes* et à la classe des *Bacteroidia*. L'ordre des *Bacteroidales* est divisé en cinq familles comprenant au moins deux genres chacune : les *Bacteroidaceae*, les *Prevotellaceae*, les *Porphyromonadaceae*, les *Rikenellaceae* et les *Marinilabiliaceae* (Tab. 15, Annexe A).

**Tableau 15 : Familles et genres composant l'ordre des *Bacteroidales* par Ludwing *et al.* (2008)**

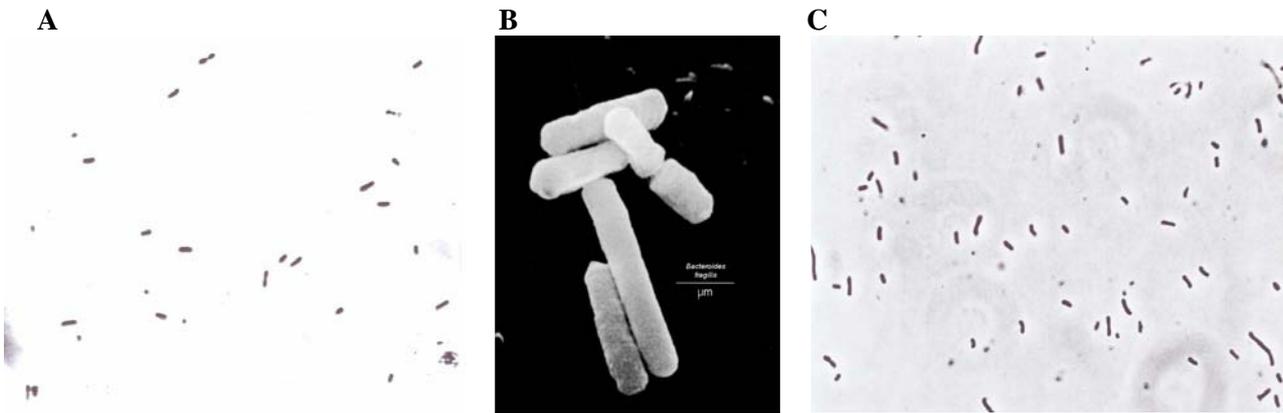
Familles	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Marinilabiliaceae</i>
Genres	<i>Bacteroides</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Rikenella</i>	<i>Marinilabilia</i>
	<i>Acetofilamentum</i>	<i>Xylanibacter</i>	<i>Barnesiella</i>	<i>Alistipes</i>	<i>Anaerophaga</i>
	<i>Acetomicrobium</i>		<i>Dysgonomonas</i>		<i>Alkaliflexus</i>
	<i>Acetothermus</i>		<i>Paludibacter</i>		
	<i>Anaerorhabdus</i>		<i>Parabacteroides</i>		
			<i>Petrimonas</i>		
			<i>Proteiniphilum</i>		
			<i>Tannerella</i>		

Récemment, suite à une étude de la composition de l'ADN, de nouvelles espèces de *Bacteroides* et *Prevotella* ont été identifiées. Trois nouvelles espèces : *B. graminisolvens*, *P. falsenii* et *P. micans*, isolées respectivement chez le bovin, le singe et l'Homme ont été décrites (Downes *et al.*, 2009 ; Nishiyama *et al.*, 2009 ; Sakamoto *et al.*, 2009).

#### 5.1.2 Description

Les *Bacteroidales* sont des bactéries de la flore dominante du microbiote digestif de l'Homme, mais également de tous les animaux à sang chaud, excepté les oiseaux. Elles représentent de 20 à 35 % de la diversité (Salysers, 1984 ; Hold *et al.*, 2002 ; Dick *et al.*,

2005). La colonisation du tube digestif par les *Bacteroidales* dans le corps humain a lieu lors des premiers stades de la vie et plus particulièrement lors du passage du nouveau-né au contact des flores vaginales, intestinales et cutanées et très rapidement, après la naissance, par les flores de l'environnement. Ce sont des bacilles ou des coccobacilles, polymorphes à Gram négatif, non sporulés, anaérobies strictes et immobiles ou mobiles (Fig. 3).



**Figure 3 : Photographie de microscopie photonique, résolution  $\times 1\ 000$ , de *Bacteroides vulgatus* (A) sur milieu de culture liquide BHI + L-Cystéine après 20 h de pré-culture et de *Prevotella buccae* (C) sur milieu de culture liquide BHI + L-Cystéine + cellobiose + maltose et vitamine K1 après 20 h de pré-culture, et (B) de microscopie électronique de *Bacteroides fragilis* (Source (A) et (C) : INRA, UEPSD, Jouy-en-Josas, source (B) : <http://biology.kenyon.edu>)**

#### - Le genre *Bacteroides*

Le genre *Bacteroides*, décrit par Shah et Collins (1989), comprend des espèces isolées principalement à partir du tractus gastro-intestinal, des selles humaines et des fèces animales. Ces bactéries peuvent être mobiles avec des flagelles péritriches et encapsulés. Elles forment des colonies brunes sur gélose au sang. Leur croissance optimale est observée à 37°C en présence de bile mais elles ne poussent pas à des températures égales ou supérieures à 42°C (Bakir *et al.*, 2006). Les *Bacteroides* sont saccharolytiques et produisent des acides tels que les acides acétique, propionique, isobutyrique, isovalérique, succinique et phényl-acétique.

Les espèces de *Bacteroides* sont classées en deux groupes : le groupe 1, appelé groupe *Bacteroides fragilis* et le groupe 2. Le groupe 1 comprend 10 espèces de bactéries caractérisées par une activité saccharolytique, une résistance à la colistine, à la kanamycine et à la vancomycine. Ses espèces sont réparties en deux sous-groupes : le sous-groupe indole (+) et le sous-groupe indole (-). Le premier sous-groupe, se différenciant par la fermentation du tréhalose, de l'arabinose, du saccharose, du rhamnose et de la salicine, comprend cinq espèces : *B. eggerthii*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* et le second sous-groupe comprend également cinq espèces : *B. fragilis*, *B. caccae*, *B. distasonis*, *B. merdae*, *B. vulgatus*. Le groupe 2, moins décrit, comprend *B. acidofaciens* et *B. pyogenes*.

- Le genre *Prevotella*

Le genre *Prevotella* (du microbiologiste français A. R. Prévot, pionnier dans la microbiologie des anaérobies) a été différencié du genre *Bacteroides* par Shah et Collins (1990). Ces espèces ont généralement été isolées à partir de la cavité buccale de l'Homme ou du rumen chez les ruminants. Ces espèces sont, pour la plus grande majorité, présentes dans le tractus digestif de l'Homme et des animaux ; une exception pour l'espèce *P. paludivivens*, qui n'a pas été isolée chez l'Homme ou l'animal mais à partir de racines de plant de riz (Ueki et al., 2007). Leur croissance est inhibée par la présence de bile et elles sont résistantes à la kanamycine et à la vancomycine. Il existe deux groupes : le groupe dont les espèces sont non pigmentées telles que *P. dentalis*, *P. oralis* et *P. bivia* et le groupe dont les espèces présentent une pigmentation noire sur gélose au sang. Toutefois, cette pigmentation peut parfois être tardive et n'apparaître qu'après 10 à 15 jours, tels que chez *P. melaninogenica* et *P. intermedia*.

## 5.2 Activité commensale et pouvoir pathogène des *Bacteroidales*

### 5.2.1 Activité commensale

Les *Bacteroidales* peuvent être qualifiés de bactéries commensales<sup>2</sup> de l'Homme. Cependant, des études récentes tendent à démontrer que la relation qu'entretiennent les *Bacteroidales* avec l'Homme pourrait plutôt être décrite comme du mutualisme car le résultat de cette relation permet d'augmenter la « fitness » ou valeur sélective<sup>3</sup> de l'Homme et de la bactérie (Backhed et al., 2005).

Les *Bacteroidales* participent ainsi à la physiologie de leurs hôtes par de nombreux aspects (Wexler, 2007) avec :

- Un rôle fondamental dans la transformation de molécules complexes en simples composés par le biais de leur activité saccharolytique qui permet d'obtenir du carbone et de l'énergie par l'hydrolyse de molécules carbohydrates (cellulose, xylan, amylopectine...) provenant de l'hôte ou de l'alimentation
- Un rôle dans la production d'acides gras volatiles (acétate, propionate ou butyrate) résultants de la fermentation des carbohydrates
- Un rôle dans la biotransformation des acides biliaires

---

<sup>2</sup> Le commensalisme : type d'interaction biologique où un organisme bénéficie des relations qu'il entretient avec son hôte pour qui le bénéfice de cette relation n'est pas réciproque.

<sup>3</sup> Valeur sélective : capacité d'un individu d'un certain génotype à se reproduire

- Une capacité à limiter la colonisation du tractus digestif par les pathogènes (*Clostridium difficile*, *Salmonelle enteritidis*, *Shigella flexineri*...) grâce, par exemple, à la production d'acides biliaires libres, toxiques pour beaucoup d'organismes pathogènes
- Un rôle dans la mise en place de la réponse immunitaire pour limiter l'entrée et la prolifération des pathogènes dans le tractus digestif par production de polysaccharide zwitterionique qui permet l'activation des lymphocytes-T
- Un rôle dans le développement des formations lymphoïdes digestives à l'origine de l'activation de la réponse immunitaire
- Un rôle dans la production de peptides antibactériens *via* la stimulation des cellules de Paneth

De récentes études associent aussi les *Bacteroidales* à la protection contre l'obésité. Chez des individus obèses, il a été mis en évidence la forte présence du phylum des *Firmicutes* et au contraire la faible présence du phylum des *Bacteroidetes* alors que chez des individus minces les proportions sont inversées (Ley *et al.*, 2006 ; Turnbaugh *et al.*, 2006). Cependant, le rôle des *Bacteroidales* dans le processus de l'obésité reste encore à clarifier. D'autres études remettent en cause cette hypothèse et proposent de nouvelles pistes dans lesquelles d'autres bactéries seraient impliquées dans ce processus (Duncan *et al.*, 2007).

### 5.2.2 Pouvoir pathogène

Les *Bacteroidales* peuvent être dans une moindre mesure, responsables d'infections et dans les cas les plus extrêmes, entrainer la mort. Ils contribuent au développement de l'infection par (i) la stimulation de la formation d'abcès, (ii) la réduction de la capacité des leucocytes polymorphonucléaires à phagocyter les cellules bactériennes et, (iii) l'inactivation des antibiotiques par la production de  $\beta$ -lactamases.

La pathogénicité des *Bacteroidales* peut être le plus souvent impliquée dans :

- Les septicémies intra-abdominales
- Les formations d'abcès
- Les infections de la cavité abdominale
- Les infections gynécologiques
- La production d'hémolysines et d'enzymes histolytiques pouvant induire la destruction des tissus
- Les infections de la peau et des tissus
- La production d'entérotoxines qui peuvent induire des maladies du tractus digestif

- Les ostéomyélites (infections osseuses)
- La maladie de Crohn (implication probable)

Parmi les *Bacteroidales*, *B. fragilis* est le pathogène anaérobie le plus communément isolé du fait de ses nombreux facteurs de virulence qui permettent (i) l'adhérence aux tissus, (ii) la protection contre la réponse immunitaire de l'hôte, et (iii) la destruction des tissus. Les fimbriae et les agglutinines de *B. fragilis* lui permettent de s'établir dans les tissus de l'hôte et sa production d'enzymes (héparinases et neuraminidases), de polysaccharides capsulaires et de lipopolysaccharides lui permettent de se protéger de la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, sa capsule est souvent responsable de la formation d'abcès et ses enzymes histolytiques peuvent entraîner la dégradation des tissus (Tzianabos *et al.*, 1995). *B. fragilis* possède aussi la capacité de croître en présence de faibles concentrations d'oxygène ce qui lui permet de proliférer dans les tissus de l'hôte avant que l'abcès, avec des conditions anaérobies, soit formé (Baughn et Malamy, 2004). Cette résistance au stress oxydatif résulte de sa capacité à produire des enzymes (catalases, superoxyde dismutases...) qui permettent de détoxifier ou de protéger la bactérie contre les radicaux libres (Rocha *et al.*, 2003).

### **5.3 Les *Bacteroidales* au sein de la flore fécale**

L'étude du microbiote intestinal reposait jusqu'à quelques années uniquement sur la maîtrise de la culture en anaérobie. Malgré des améliorations techniques récentes, environ 60 à 70 % du microbiote fécal dominant anaérobie (11 à 12 U. Log<sub>10</sub> UFC/g de selles) chez l'Homme comme chez les animaux échappent encore à la culture (Suau *et al.*, 1999). Le développement des techniques moléculaires a permis de s'affranchir de cette étape culturelle. Les inventaires bactériens sont alors possibles grâce à la connaissance des séquences des gènes codant les ARNr 16S. Ces inventaires, réalisés principalement chez l'Homme et dans une moindre mesure, chez les bovins et les porcs, permettent de regrouper les microorganismes d'un écosystème en groupes bactériens ou en espèces moléculaires.

#### **5.3.1 Chez l'Homme**

L'écosystème intestinal est extrêmement complexe et diversifié. De plus, les communautés, représentées par environ 400 espèces de bactéries, restent relativement stables au cours du temps (Matsuki *et al.*, 2004 ; Zoetendal *et al.*, 2004). Seules 25 à 40 espèces de bactéries cultivables composeraient le microbiote fécal propre à chaque individu (Savage, 1977). L'étude récente de Tap *et al.* (2009) a montré, par des méthodes moléculaires, que

50 % des selles analysées ( $n=17$ ) avaient en commun 66 espèces moléculaires dont 24 correspondaient à des souches cultivables. Ces 66 espèces composeraient le core phylogénétique du microbiote humain.

- Analyse du microbiote par culture

L'étude des populations du tractus digestif, rendue possible par la maîtrise de l'anaérobiose, a conduit à la description des flores dominantes, sous-dominantes et en transit. Les *Bacteroidales*, s'inscrivent au niveau de la flore dominante du microbiote digestif (9 à 11 U. Log<sub>10</sub> UFC/g de selles). On y trouve également en dominance les *Eubacterium*, les *Bifidobacterium* et les *Clostridium* qui sont des bacilles à Gram positif et les *Peptostreptococcus* qui sont des coques à Gram positif (Annexe A). Il existe également une flore sous-dominante, aéro-anaérobie facultative, dont la population est estimée de 6 à 8 U. Log<sub>10</sub> UFC/g de selles et qui comprend les *E. coli*, les entérocoques et les lactobacilles. Enfin, il existe une flore dite fluctuante qui est très polymorphe et représente moins de 6 U. Log<sub>10</sub> UFC/g de selles. Elle comprend essentiellement des entérobactéries (*Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp...) ainsi que des levures (*Candida* spp...). Le tractus digestif de l'Homme comprend ainsi au total 14 U. Log<sub>10</sub> microorganismes en symbiose avec l'hôte, les populations les plus denses se situant dans le colon avec 11 U. Log<sub>10</sub> microorganismes/g de contenu, avec en majorité des bactéries anaérobies (Rambaud *et al.*, 2004).

- Analyse du microbiote par biologie moléculaire

Les méthodes les plus utilisées pour étudier la diversité du microbiote sont l'hybridation par dot-blot et l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) couplée à la cytométrie de flux qui utilisent des sondes d'hybridation. Depuis quelques années, la qPCR utilisant des amorces et des sondes spécifiques est apparue. Récemment, l'apparition des techniques d'analyses haute densité a permis une description *quasi* exhaustive des populations bactériennes. Ces méthodes sont qualifiées de métagénomique et métatranscriptomique.

Tandis que l'hybridation par dot-blot fournit des proportions relatives d'ARNr cible parmi l'ARNr bactérien total, la FISH couplée à la cytométrie de flux permet d'obtenir les proportions relatives des cellules bactériennes cibles parmi le nombre total de cellules bactériennes. Ces deux méthodes fournissent des résultats comparables, exceptés pour le groupe des *Bacteroides* où les proportions sont plus faibles avec la méthode FISH (Sghir *et al.*, 2000 ; Rigottier-Gois *et al.*, 2003 ; Lay *et al.*, 2005). Elles mettent en évidence, toutes les

deux, la dominance des groupes *Bacteroides* et *Clostridium* dans la composition du microbiote (Tab. 16). La différence de résultats dans les proportions des *Bacteroides* par les deux méthodes peut s'expliquer par : (i) la nature des sondes utilisées, il a été montré que la sonde utilisée en hybridation par dot-blot avait un spectre de détection plus large pour le groupe ciblé, et (ii) la nature des paramètres mesurés : l'hybridation par dot-blot présente le nombre d'opérons ribosomiaux et l'activité métabolique tandis que la FISH mesure le nombre de cellules. Contrairement aux autres groupes bactériens, il a été observé que les *Bacteroides* avaient un index d'ARNr supérieur (Klappenbach *et al.*, 2001) ce qui traduit une forte activité métabolique de ces bactéries dans le colon, probablement liée à la dégradation des polysaccharides.

**Tableau 16 : Proportions des principaux groupes de bactéries entériques dans les selles humaines obtenues par deux méthodes moléculaires : l'hybridation par dot-blot et la FISH couplée à la cytométrie de flux (Sghir *et al.*, 2000 ; Rigottier-Gois *et al.*, 2003 ; Lay *et al.*, 2005)**

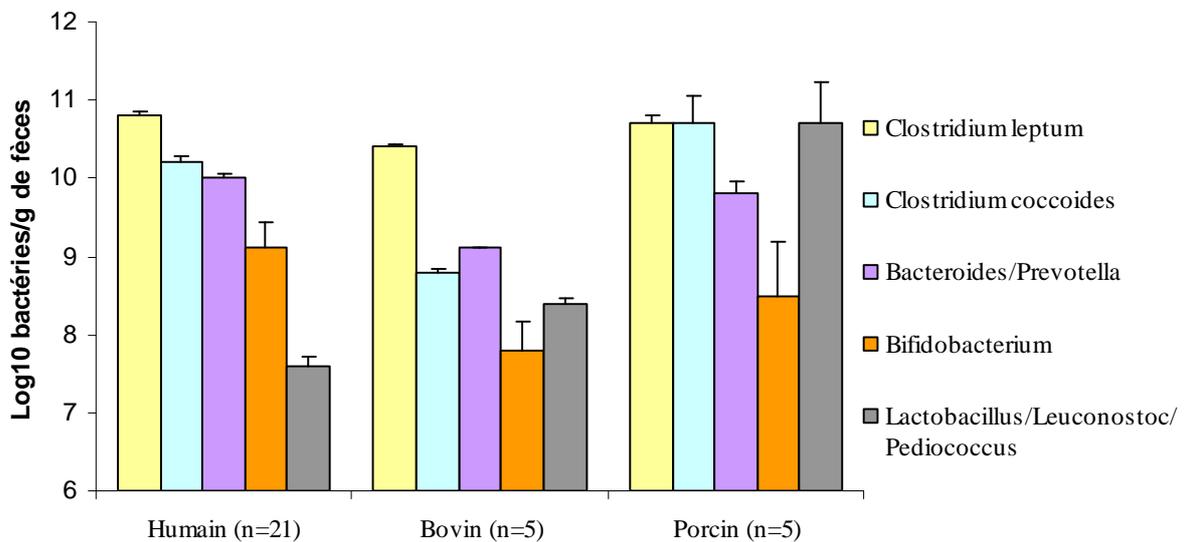
Groupes	Proportions (%)	
	Hybridation par dot-blot	FISH + cytométrie de flux
<i>Bacteroides</i> spp.	37 ± 16	9,1 ± 6,7
	41,7 ± 13,5	8,5 ± 7,1
<i>Clostridium leptum</i>	16 ± 7	26,7 ± 7,6
<i>Clostridium coccoïdes</i>	14 ± 6	22 ± 7,6
	21,9 ± 10,2	28 ± 11,3
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<2	4,1 ± 3,9
	2,9 ± 4,2	4,4 ± 4,3
<i>Lactobacillus</i> spp.	<2	1,8 ± 1,4

Au sein des *Bacteroidales*, les espèces dominantes de *Bacteroides* ont également été recherchées par la FISH couplée à la cytométrie de flux dans 20 selles humaines (Rigottier-Gois *et al.*, 2003). Cette étude a ainsi mis en évidence la dominance de *B. fragilis* et *B. vulgatus* dans respectivement 90 et 85 % des échantillons et la présence d'espèces secondaires telles que *B. ovatus* et *B. distasonis*.

Les résultats obtenus par hybridation dot-blot et FISH ont été confirmés par l'analyse phylogénétique des séquences de gènes codant les ARNr 16S (Hold *et al.*, 2002). Les résultats ont montré que les groupes *Bacteroides* et *Clostridium* étaient également dominants (Fig. 5). La quantification des groupes dominants a été réalisée, pour la première fois, par Matsuki *et al.* (2004). Ils ont dessiné des amorces de qPCR spécifiques des grands groupes bactériens qu'ils ont ensuite testées sur 46 échantillons de selles humaines. Le groupe *Clostridium coccoïdes*, suivi des groupes *Clostridium leptum* et *Bacteroides*, ont présenté les plus

importantes concentrations avec respectivement  $10,3 \pm 0,3$ ,  $9,9 \pm 0,7$  et  $9,9 \pm 0,3$  U.  $\text{Log}_{10}$  cellules/g de selles. Les amorces ciblant le genre *Prevotella* n'ont conduit à des résultats positifs que dans 46 % des échantillons avec des concentrations moyennes de  $9,7 \pm 0,8$  U.  $\text{Log}_{10}$  cellules/g de selles.

Récemment, Furet *et al.* (2009) ont comparé, par qPCR, le microbiote humain au microbiote de plusieurs animaux tels que les bovins et les porcs. Les concentrations des trois groupes dominants (*Bacteroides/Prevotella*, *Clostridium coccoides* et *Bifidobacterium*) du microbiote humain présentaient des différences significatives par rapport à celles du microbiote des animaux tandis que le groupe *Clostridium leptum* présentait de faibles différences. Concernant les concentrations du groupe *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus*, une différence significative de 2,9 U.  $\text{Log}_{10}$  a été obtenue entre l'Homme et les porcs (Fig. 4).



**Figure 4 : Concentrations des groupes bactériens dominants composant le microbiote de l'Homme, des bovins et des porcs d'après Furet *et al.* (2009)**

Cette étude a permis de montrer des différences entre les microbiotes humains et les microbiotes des animaux et de mettre en évidence que certaines bactéries étaient présentes plus spécifiquement dans un type d'hôte.

### 5.3.2 Chez les ruminants

Le rumen, pré-estomac des ruminants (bovins, ovins, caprins ...), renferme un écosystème complexe constitué de protozoaires, de champignons, d'archaebactéries et de bactéries. Ces espèces participent à la dégradation des matières végétales par fermentation anaérobie. Le microbiote du rumen varie en abondance et en diversité au cours du temps, ces

variations étant fonction de l'âge de l'animal, de son alimentation, de la saison et de l'utilisation d'antibiotiques (Dehority et Orpin, 1997).

- Analyse du microbiote par culture

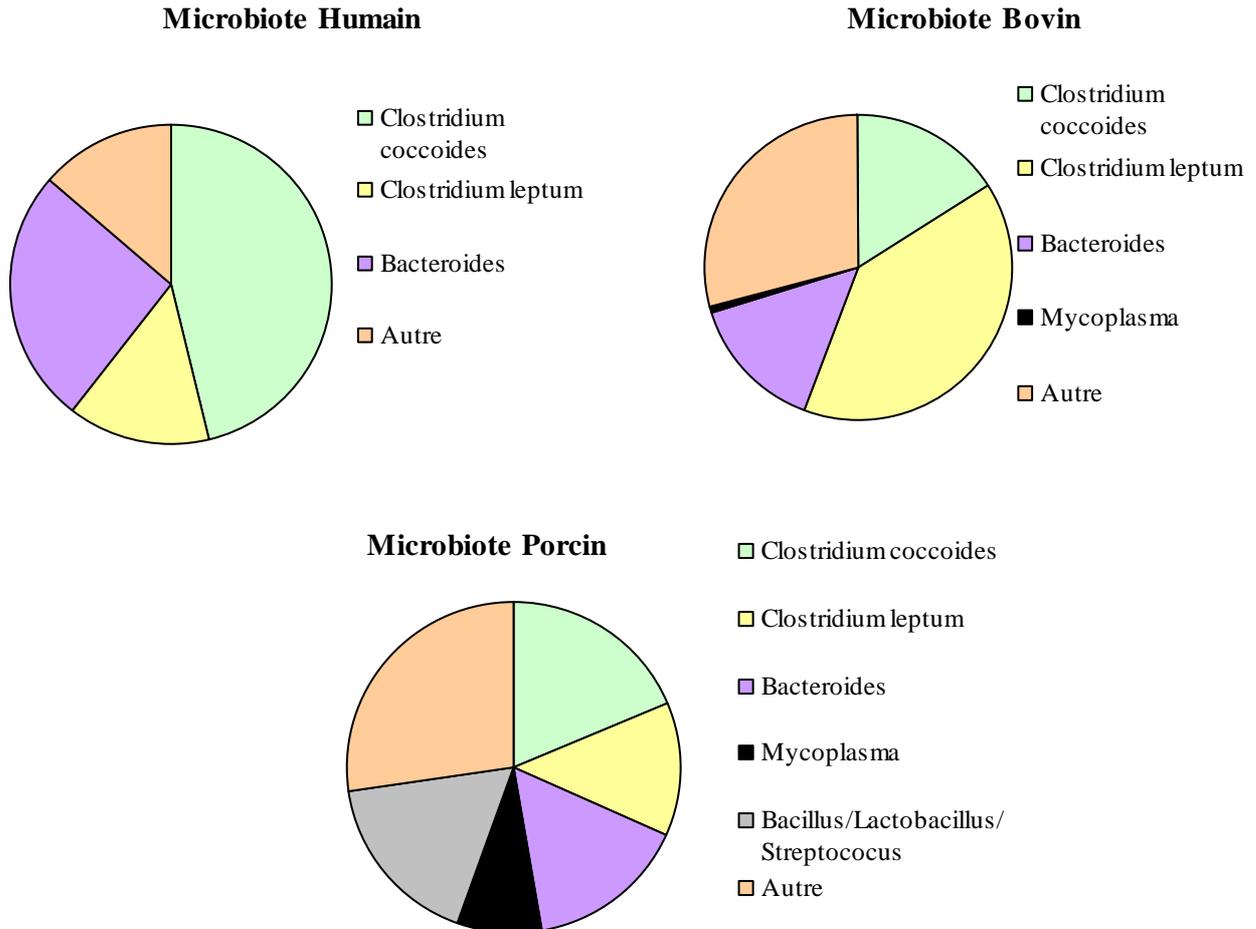
La population bactérienne du microbiote des ruminants a été estimée à environ  $11 \text{ U. Log}_{10} \text{ UFC/g}$  de fèces et est constituée principalement de bactéries anaérobies strictes (Yokohama et Johnson, 1988). Les espèces cultivables les plus abondantes dans le rumen appartiennent aux *Bacteroidales* et *Clostridiales* et plus particulièrement aux genres *Prevotella* spp. et *Butyrivibrio* spp. (Flint, 1997).

- Analyse du microbiote par biologie moléculaire

L'évaluation de la diversité microbienne du rumen a été principalement réalisée par l'analyse phylogénétique des séquences des gènes codant les ARNr 16S. Ozutsumi *et al.* (2005) ont montré que, dans le rumen des bovins, le groupe *Clostridium leptum* était dominant (39,4 % des séquences) suivi des groupes *Clostridium coccooides* (16,2 %) et *Bacteroides/Prevotella* (14,4 %) (Fig. 5).

Le caractère dominant des groupes *Clostridium* et des *Bacteroides/Prevotella* a été confirmé (Whitford *et al.*, 1998 ; Tajima *et al.*, 1999 ; Edwards *et al.*, 2004), avec cependant, d'importantes variations des proportions de ces groupes suivant les études. A titre d'exemple, la proportion des groupes des *Clostridium* et *Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides* variaient représenter respectivement de 23 à 81,1 % et de 9,4 à 72,1 % des séquences analysées dans ces études.

Dans le rumen, le genre *Prevotella* est généralement dominant au sein des *Bacteroidales*. Ainsi, Wood *et al.* (1998) ont montré que les *Prevotella* représentaient 62 % des bactéries dans le rumen tandis que les *Bacteroides* ne représentaient que 12 %. Ces résultats ont été confirmés ceux de Stevenson et Weimer (2007) qui ont démontré que les *Prevotella* représentaient de 42 à 60 % des bactéries dans le rumen, les espèces les plus souvent présentes étant *P. ruminicola*, *P. albensis*, *P. bryantii* et *P. brevis*.



**Figure 5 : Composition des groupes dominants du microbiote intestinal de l'Homme, des bovins et des porcs par analyse des gènes codant les ARNr 16S d'après Hold *et al.* (2002), Otzumi *et al.* (2005) et Snell-Castro *et al.* (2005)**

Récemment, la diversité bactérienne du rumen a été étudiée avec une nouvelle technique de biologie moléculaire : le pyroséquencage. Par cette méthode, Dowd *et al.* (2008) ont obtenu entre 1 700 et 3 200 séquences partielles de gènes codant l'ARNr 16S par échantillon de fèces ( $n=20$ ). Le nombre conséquent de séquences a permis de déterminer les espèces dominantes, représentées, par ordre décroissant, par *Clostridium* spp., *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp., *Ruminococcus* spp., *Alistipes* spp., *Lachnospira* spp. et *Prevotella* spp.

### 5.3.3 Chez les porcs

La diversité du microbiote intestinal porcin a été à l'origine étudiée pour comprendre quel était le rôle du microbiote dans l'émission des fortes odeurs dues à la volatilisation de l'ammonium pendant le stockage des lisiers ou bien dans la transformation physico-chimique des lisiers.

- Analyse du microbiote par culture

Les fèces de porcs comprennent de 9 à 10 U. Log<sub>10</sub> bactéries/g dont seulement 10 à 20 % peuvent être cultivées (Cotta *et al.*, 2003). Parmi la flore bactérienne cultivable, les genres *Peptococcus* spp., *Ruminococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Lactobacillus* spp. et *Bacteroides* spp. ont souvent été identifiés dans les fèces et les lisiers (Salanitro *et al.*, 1977 ; Spoelstra, 1978 ; Iannotti *et al.*, 1982).

- Analyse du microbiote par biologie moléculaire

L'analyse phylogénétique des séquences des gènes codant les ARNr 16S issus d'échantillons de lisiers de porcs ( $n=202$ ), réalisée par Snell-Castro *et al.* (2005), a montré que le microbiote porcin était dominé par quatre groupes : *Clostridium coccooides* (22 % des séquences), *Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus* (20,3 %), *Bacteroides/Prevotella* (18,3 %) et *Clostridium leptum* (15,3 %). Le genre *Mycoplasma*, sous-dominant, représentait 10 % des séquences analysées (Fig. 5). Enfin, le domaine des archaebactéries était également présent avec principalement des méthanogènes hydrogénotrophes.

Avec plus de 4 000 séquences obtenues à partir d'échantillons issus du tractus digestif du porc ( $n=52$ ), Leser *et al.* (2002) ont également mis en évidence que les groupes *Clostridium*, *Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus* et *Bacteroides/Prevotella* étaient dominants car ils représentaient respectivement 29,1 %, 12,3 % et 11,2 % des séquences. Parmi le groupe *Bacteroides/Prevotella*, 33 % des séquences obtenues appartenaient au sous-groupe *P. buccae*, 14 % au sous-groupe *P. nigrescens* dont les espèces les plus proches étaient : *P. denticola*, *P. veroralis*, *P. oris* et *P. albensis*, 9 % au sous-groupe *P. tanneriae* et 5 % au sous-groupe *B. fragilis* et *B. distasonis*.

Confirmant les résultats obtenus par Leser *et al.* (2002), les travaux de Lamendella *et al.* (2009), basés sur l'étude phylogénétique de 1 340 séquences issues des gènes codant l'ARNr 16S des *Bacteroidales* à partir d'effluents porcins ont démontré que le genre *Bacteroides* était très peu représenté (2 % des séquences) par rapport à celui des *Prevotella* (98 % des séquences).

#### 5.3.4 Chez les oiseaux

La diversité du microbiote des oiseaux est importante. On peut noter que les études du microbiote aviaire sont beaucoup plus nombreuses pour la volaille que pour les oiseaux sauvages.

- Analyse du microbiote par culture

Chez la volaille, le caecum et l'iléon de poulet, peuvent contenir respectivement 11 et 9 U. Log<sub>10</sub> bactéries/g de contenu et jusqu'à 60 % des bactéries présentes dans le caecum peuvent être cultivées (Barnes *et al.*, 1972). Les bactéries dominantes sont anaérobies strictes et sont principalement représentées par les genres *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Bifidobacterium* spp. et par l'ordre des *Bacteroidales* (Mead, 1989).

Chez les oiseaux sauvages, peu d'études ont été réalisées sur la composition de leur microbiote, néanmoins on peut citer l'étude de Devane *et al.* (2007) qui a mis en évidence les genres *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp. et *Campylobacter* spp. à partir de fientes de canards.

- Analyse du microbiote par biologie moléculaire

Chez la volaille et les oiseaux sauvages, les groupes dominants sont représentés par les *Lactobacillales*, les *Bacillales* et les *Clostridiales* (de 11 à 47 % des séquences). Contrairement au microbiote de l'Homme, des bovins et des porcs, les *Bacteroidales* sont très peu représentés (de 1 à 10 % des séquences) (Zhu *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2003 ; Lu et Domingo, 2008 ; Lu *et al.*, 2008 ; Lu *et al.*, 2009).

Même si la proportion des *Bacteroidales* reste très faible dans les fientes d'oiseaux d'élevage, huit souches de *Bacteroides* ont été isolées récemment au niveau de caeca de poulet. Elles appartiennent, pour cinq d'entre elles, à des espèces déjà décrites *B. coprocola*, *B. plebeius*, *B. uniformis*, *B. eggerthii*, *B. stercoris* et, pour les trois autres, à de nouvelles espèces : *B. barnesiae*, *B. salanitronis* et *B. gallinarum* (Lan *et al.*, 2006).

En résumé, les *Bacteroidales*, bactéries anaérobies strictes, sont donc retrouvées par culture ou par des techniques de biologie moléculaire chez les principaux hôtes susceptibles d'être à l'origine de contaminations fécales dans le milieu. Ils sont généralement dominants chez les humains, les ruminants et les porcs (14 à 42 % des bactéries totales) et au contraire, faiblement présents chez les oiseaux (< 10 %). Au sein des *Bacteroidales*, le genre *Bacteroides* est fortement présent chez l'Homme alors que le genre *Prevotella* est fortement représenté chez les ruminants et les porcs.

Ces résultats confirment donc que la cible *Bacteroidales* est prometteuse pour identifier les contaminations fécales d'origine humaine, bovine et porcine. Toutefois elle semble plus incertaine pour identifier les contaminations fécales d'origine aviaire. Aussi, des marqueurs

de PCR ont été développés pour identifier principalement les contaminations d'origine humaine, bovine et porcine.

#### 5.4 Les marqueurs *Bacteroidales* de PCR

Dès les années 1980, les *Bacteroidales*, et plus particulièrement les souches du groupe *B. fragilis*, ont été suggérés comme potentiel indicateur de contamination fécale dans les eaux (Allsop et Stickler, 1985 ; Fiksdal *et al.*, 1985). Cependant, ils n'ont réellement été utilisés comme marqueurs de contamination que depuis les années 2000, une fois leur détection par des méthodes moléculaires possible. De nombreuses études ont mis en évidence la particularité de certaines espèces des *Bacteroidales* à posséder une répartition spécifique de l'hôte, ce qui permet de différencier les contaminations fécales humaines des contaminations animales mais également de différencier les contaminations fécales animales porcines, bovines, équine ou canines. Il existe actuellement, dans la littérature, plus d'une trentaine de couples d'amorces de PCR (essentiellement de PCR conventionnelle et en qPCR) ciblant les gènes codant l'ARNr 16S des *Bacteroidales*. Le développement des marqueurs a été réalisé à partir : (i) des approches T-RFLP et LH-PCR, (ii) du clonage-séquençage et de l'analyse phylogénétique des séquences, ou (iii) à partir de l'analyse phylogénétique des séquences présentes dans les bases de données.

##### 5.4.1 Les marqueurs de PCR conventionnelle

###### - Les marqueurs de contaminations fécales humaines

Les premiers marqueurs humains de PCR conventionnelle ont été développés par Kreader *et al.* (1995) à partir des espèces *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron* et *B. vulgatus* en associant une sonde d'hybridation pour augmenter la spécificité des systèmes. Cependant, les résultats de sensibilité et de spécificité étaient assez faibles même si les concentrations dans les fèces non cibles étaient 100 à 1 000 fois moins importantes que celles obtenues dans les selles humaines. Un second marqueur, spécifique de *B. thetaiotaomicron*, a été développé par Carson *et al.* (2005) et s'est révélé sensible et spécifique (seulement cinq échantillons de fèces canines étaient positives sur les 241 fèces animales testées) (Tab. 17).

**Tableau 17 : Principaux marqueurs *Bacteroidales* de PCR conventionnelle pour identifier les contaminations fécales d'origine humaine ainsi que leur sensibilité et spécificité**

Marqueurs	Pays	Sensibilité % (n)	Spécificité % (n)	Références
<i>B. distasonis</i> <i>B. thetaiotaomicron</i> <i>B. vulgatus</i>	Etats-Unis	<b>67 - 78 (9)<sup>a</sup></b>	<b>76 (71)<sup>a</sup></b>	<b>Kreader (1995)<sup>e</sup></b>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	Etats-Unis	<b>95,5 (45)<sup>a,b</sup></b>	<b>98 (241)<sup>a</sup></b>	<b>Carson et al. (2005)</b>
<b>HF183F/ Bac708R</b>	Etats-Unis	<b>87,5 (16)<sup>a,b</sup></b>	<b>100 (46)<sup>a</sup></b>	<b>Bernhard et Field (2000b)</b>
	Etats-Unis	71,1 (45) <sup>a,b</sup>	95,5 (241) <sup>a</sup>	Carson et al. (2005)
	Etats-Unis	20 (20) <sup>a</sup>	100 (68) <sup>a</sup>	Fogarty et Voytek (2005)
	Belgique	81,8 (11) <sup>a,b</sup>	100 (19) <sup>a,b</sup>	Seurinck et al. (2005)
	Etats-Unis	40 (10) <sup>b</sup>	99,5 (173) <sup>a</sup>	Lamendella et al. (2007)
	France	98,2 (55) <sup>a,b</sup>	95 (102) <sup>a,b</sup>	Gourmelon et al. (2007)
	Europe <sup>c</sup>	86 (104) <sup>a</sup>	97,5 (360) <sup>a</sup>	Gawler et al. (2007)
	Australie	100 (52) <sup>a</sup>	100 (155) <sup>b</sup>	Ahmed et al. (2008b)
	Irlande	44 (56) <sup>a,b</sup>	100 (119) <sup>a</sup>	Dorai-Raj et al. (2009)
	Canada	95,2 (62) <sup>a,b</sup>	100 (211) <sup>a</sup>	Fremaux et al. (2009)
<b>HF134F/HF654R</b>	Etats-Unis	<b>43,8 (16)<sup>a,b</sup></b>	<b>97,7 (19)<sup>a</sup></b>	<b>Bernhard et Field (2000b)</b>
	Etats-Unis	40 (10) <sup>b</sup>	93 (173) <sup>a</sup>	Lamendella et al. (2007)
	France	87,3 (55) <sup>a,b</sup>	99 (102) <sup>a,b</sup>	Gourmelon et al. (2007)
	Australie	100 (52) <sup>b</sup>	95,5 (155) <sup>a</sup>	Ahmed et al. (2008b)
	Canada	32 (44) <sup>a</sup>	NT <sup>d</sup>	Fremaux et al. (2009)
<b>Hum 19</b>	Etats-Unis	<b>100 (16)<sup>a</sup></b>	<b>100 (90)<sup>a</sup></b>	<b>Shanks et al. (2007)</b>
<b>Hum 22</b>	Etats-Unis	<b>100 (16)<sup>a</sup></b>	<b>100 (90)<sup>a</sup></b>	<b>Shanks et al. (2007)</b>
<b>Hum 30</b>	Etats-Unis	<b>100 (16)<sup>a</sup></b>	<b>100 (90)<sup>a</sup></b>	<b>Shanks et al. (2007)</b>

<sup>a</sup> Selles, <sup>b</sup> Effluents, <sup>c</sup> France, Irlande, Portugal et Grande Bretagne, <sup>d</sup> Non testé, <sup>e</sup> Auteurs ayant développé le marqueur

Si l'espèce *B. thetaiotaomicron* semble être une piste intéressante pour identifier les contaminations humaines, la recherche de souches bactériennes appartenant à une espèce déjà décrite, ne permet pas d'obtenir une forte spécificité des marqueurs car si elles ont été isolées la première fois chez l'Homme, ces espèces sont généralement également présentes chez les animaux.

Dans une première étude, Bernhard et Field (2000a) ont utilisé les méthodes T-RFLP et LH-PCR pour obtenir des groupes de séquences des gènes codant les ARNr 16S de *Bacteroidales* spécifiques des humains et des bovins. Ils ont ensuite développé un marqueur amplifiant l'ensemble des *Bacteroides* et *Prevotella* (Bac32F/Bac708R). Dans une seconde étude, Bernhard et Field (2000b) ont développé deux couples d'amorces ciblant les contaminations fécales humaines (HF183F/Bac708R, marqueur HF183 et HF134F/HF654R, marqueur HF134) ; le marqueur HF183 conduisant aux résultats de sensibilité et de spécificité les plus intéressants (> 87,5 %). Ces deux marqueurs ont ensuite été testés dans de nombreuses études

sur des échantillons de différentes origines (Tab. 17). De même, dans ces études, le marqueur HF183 a conduit aux résultats les plus satisfaisants car même s'il a été parfois peu détecté dans des selles humaines, il a été retrouvé dans la totalité des effluents urbains testés, excepté dans les études de Lamendella *et al.* (2007) et Dorai-Raj *et al.* (2009). L'ensemble de ces résultats lui confère ainsi une présence cosmopolite car il a été testé avec succès dans des échantillons de diverses origines (Europe, Etats-Unis, Australie et Canada).

Si les marqueurs *Bacteroidales* reposent principalement sur les gènes codant l'ARNr 16S, Shanks *et al.* (2007) se sont basés sur une approche différente en utilisant les gènes de ces bactéries codant pour des protéines (protéines hypothétiques BF3236 et polymérase extracytoplasmiques) pour développer des marqueurs de contamination fécale humaine. Trois marqueurs ont été développés et se sont révélés sensibles et spécifiques lorsqu'ils étaient testés sur des fèces. Cependant, les auteurs recommandent plus particulièrement l'utilisation des marqueurs Hum 19 et Hum 30 qui ont donné des signaux positifs dans seulement 37,5 % échantillons d'eau impactés par des contaminations humaines ( $n=8$ ) contrairement au marqueur Hum 22 qui n'a été détecté que dans deux eaux prélevées à 100 m d'une STEP (Tab. 17).

#### - Les marqueurs de contaminations fécales animales

Parmi les marqueurs de contamination animale, ce sont les marqueurs ruminants, CF128 et CF193, développés par Bernhard et Field (2000b) qui ont été le plus souvent utilisés. Ces marqueurs mettent en évidence les contaminations fécales émises par les bovins, les cerfs, les élans, les chèvres, les lamas et les moutons. Leur sensibilité et spécificité varient selon l'origine et la nature (fèces ou effluents) des échantillons. Par exemple, pour le marqueur CF128, des sensibilités et spécificités variant respectivement de 56 % (Australie) à 100 % (Etats-Unis et Europe) et de 68,5 % (Europe) à 100 % (Etats-Unis) ont été obtenues (Tab. 18). Cette différence peut être cependant imputée au nombre différent d'échantillons analysés (20 *versus* 368).

Shanks *et al.* (2006) ont également développé trois marqueurs de contamination fécale ciblant les ruminants à partir de séquences issues de gènes codant pour des protéines (protéines de sécrétion, protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et le transport des électrons et protéines sécrétrices d'acide sialique). Les deux marqueurs Bac1F et Bac2F permettent de différencier les contaminations fécales bovines des contaminations émises par les chèvres, les moutons, les alpagas, les lamas et les cerfs.

Un marqueur, sensible et spécifique, ciblant les contaminations fécales porcines (PF163) a été développé par Dick *et al.* (2005) aux Etats-Unis et ensuite testé en France, au Canada et aux Etats-Unis par respectivement Gourmelon *et al.* (2007), Frémaux *et al.* (2009) et Lamendella *et al.* (2009) (Tab. 18).

Un marqueur ciblant les contaminations fécales équine a également été développé par Dick *et al.* (2005) (Tab. 18). Testé au laboratoire sur des fèces d'origine équine et d'autres origines, ce marqueur s'est révélé 100 % sensible ( $n=11$ ) et spécifique ( $n=20$ ) (Caprais *et al.*, 2010a). Toutefois, il n'a pas été détecté dans les eaux de l'environnement (Caprais *et al.*, 2010a).

Tableau 18 : Principaux marqueurs *Bacteroidales* de PCR conventionnelle pour identifier les contaminations fécales d'origine animale ainsi que leur sensibilité et spécificité

Hôte	Marqueurs	Pays	Sensibilité % (n)	Spécificité % (n)	Références
Ruminant	CF128F/Bac708R	Etats-Unis	96,7 (31) <sup>a</sup>	100 (31) <sup>a</sup>	<b>Bernhard et Field (2000b)<sup>f</sup></b>
		Etats-Unis	100 (20) <sup>a</sup>	100 (20) <sup>a</sup>	Fogarty et Voytek (2005)
		Etats-Unis	98 (107) <sup>a</sup>	97,5 (76) <sup>a,b</sup>	Lamendella <i>et al.</i> (2007)
		France	100 (44) <sup>a</sup>	71 (113) <sup>a,b</sup>	Gourmelon <i>et al.</i> (2007)
		Europe <sup>c</sup>	100 (100) <sup>a</sup>	68,5 (368) <sup>a</sup>	Gawler <i>et al.</i> (2007)
		Australie	56 (50) <sup>a</sup>	98 (147) <sup>a,b</sup>	Ahmed <i>et al.</i> (2008a)
		Etats-Unis	98,2 (56) <sup>a</sup>	NT <sup>e</sup>	Lee <i>et al.</i> (2008)
		Irlande	95 (74) <sup>a,b</sup>	94 (104) <sup>a,b</sup>	Dorai-Raj <i>et al.</i> (2009)
		Canada	98 (121) <sup>a</sup>	92,8 (152) <sup>a,b</sup>	Fremaux <i>et al.</i> (2009)
	CF193F/Bac708R	Etats-Unis	96,7 (31) <sup>a</sup>	100 (31) <sup>a</sup>	<b>Bernhard et Field (2000b)</b>
		Etats-Unis	90,6 (107) <sup>a</sup>	98,7 (76) <sup>a,b</sup>	Lamendella <i>et al.</i> (2007)
		France	95,5 (100) <sup>a</sup>	100 (113) <sup>a,b</sup>	Gourmelon <i>et al.</i> (2007)
		Canada	16 (32) <sup>a</sup>	NT	Fremaux <i>et al.</i> (2009)
	Bac1F/Bac1R	Etats-Unis	72 (148) <sup>a</sup>	100 (279) <sup>a,b</sup>	<b>Shanks <i>et al.</i> (2006)</b>
		Etats-Unis	78,6 (56) <sup>a</sup>	NT	Lee <i>et al.</i> (2008)
	Bac2F/Bac2R	Etats-Unis	80 (148) <sup>a</sup>	100 (279) <sup>a,b</sup>	<b>Shanks <i>et al.</i> (2006)</b>
		Etats-Unis	91,1 (56) <sup>a</sup>	NT	Lee <i>et al.</i> (2008)
	Bac3F/Bac3R	Etats-Unis	91 (148) <sup>a</sup>	99,2 (279) <sup>a,b</sup>	<b>Shanks <i>et al.</i> (2006)</b>
		Etats-Unis	76,8 (56) <sup>a</sup>	NT	Lee <i>et al.</i> (2008)
	Bac5F/Bac5R	Etats-Unis	69,9 (56) <sup>a</sup>	NT	Lee <i>et al.</i> (2008)
	RumB1F/BacPreR	Irlande	97 (74) <sup>a,b</sup>	97 (103) <sup>a,b</sup>	<b>Dorai-Raj <i>et al.</i> (2009)</b>
Bac32F/RumD1R	Irlande	91 (74) <sup>a,b</sup>	100 (103) <sup>a,b</sup>	<b>Dorai-Raj <i>et al.</i> (2009)</b>	
Bac32F/RumD2R	Irlande	100 (74) <sup>a,b</sup>	95 (103) <sup>a,b</sup>	<b>Dorai-Raj <i>et al.</i> (2009)</b>	

<b>Porcin</b>	<b>PF163F/Bac708R</b>	<b>Etats-Unis</b>	<b>100 (1)<sup>d</sup></b>	<b>100 (10)<sup>d</sup></b>	<b>Dick <i>et al.</i> (2005)</b>
		France	100 (35) <sup>a,b</sup>	98,4 (122) <sup>a,b</sup>	Gourmelon <i>et al.</i> (2007)
		Canada	100 (50) <sup>a</sup>	100 (223) <sup>a,b</sup>	Fremaux <i>et al.</i> (2009)
		Etats-Unis	87,4 (103) <sup>a, b</sup>	77,3 (119) <sup>a,b</sup>	Lamendella <i>et al.</i> (2009)
<b>Equin</b>	<b>HoF597F/Bac708R</b>	<b>Etats-Unis</b>	<b>100 (1)<sup>d</sup></b>	<b>100 (10)<sup>d</sup></b>	<b>Dick <i>et al.</i> (2005)</b>

<sup>a</sup> Fèces, <sup>b</sup> Effluent, <sup>c</sup> France, Irlande, Portugal et Grande Bretagne, <sup>d</sup> Pools de 4 à 10 échantillons de fèces, <sup>e</sup> Non testé, <sup>f</sup> Auteurs ayant développé le marqueur

- Application des marqueurs de PCR conventionnelle dans des eaux de l'environnement

Disponibles depuis plus d'une dizaine d'année, les marqueurs de PCR conventionnelle, dont la finalité est de discriminer les contaminations d'origine humaine et animale dans l'environnement, ont donc été recherchés dans des eaux de rivière.

Parmi les marqueurs présentés dans le tableau 19, les marqueurs majoritairement retenus pour identifier les contaminations fécales dans les eaux étaient les marqueurs humains HF134 et HF183, les marqueurs ruminants CF128 et CF193 et le marqueur porcine PF163.

**Tableau 19 : Fréquence de détection des marqueurs *Bacteroidales* d'origine humaine (HF183 et HF134), ruminant (CF128 et CF193) et porcine (PF163) dans des eaux de l'environnement**

<b>Nom du site et sources potentielles de contaminations</b>	<b>Nb d'échantillons d'eau (n)</b>	<b>HF183 (%)</b>	<b>HF134 (%)</b>	<b>CF128 (%)</b>	<b>CF193 (%)</b>	<b>PF163 (n)</b>	<b>Références</b>
<b>Plum Creek (Etats-Unis) :</b> urbaine et rurale, ruminant (1 200) et equine (10)	156	3	5	54	28	NT <sup>a</sup>	Lamendella <i>et al.</i> (2007)
<b>Estuaire de l'Aber Benoît (France) :</b> urbaine (25 000 habitants), bovine (26 700), porcine (225 500) et aviaire (803 900)	18	66,7	16,7	44,5	44,5	11,1	Gourmelon <i>et al.</i> (2007)
<b>Havre de l'Ay (France) :</b> urbaine (7 000), ruminant (3 300)	6	0	0	50	0	0	Gourmelon <i>et al.</i> (2007)
<b>Havre de la Vanlée (France) :</b> urbaine (5 800), ruminant (4 900)	4	0	0	100	0	0	Gourmelon <i>et al.</i> (2007)
<b>Ningi Creek (Australie) :</b> urbaine, agricole et forestière	16	62,5	37,5	68,8	NT	NT	Ahmed <i>et al.</i> (2008a)
<b>Qu'Appelle River (Canada) :</b> urbaine et ruminant	70	41	NT	14	NT	0	Fremaux <i>et al.</i> (2009)

<sup>a</sup> Non testé

Il apparaît que les marqueurs HF183 et CF128 sont les plus pertinents pour mettre respectivement en évidence des contaminations fécales d'origine humaine et ruminant dans les eaux de l'environnement. Parmi les sites potentiellement impactés par des contaminations fécales provenant des ruminants, le marqueur CF128 a été détecté dans tous les sites à une fréquence comprise entre 14 et 100 %. Au contraire, le marqueur porcine (PF163) a été peu détecté ; toutefois un seul site était connu comme potentiellement impacté par des contaminations fécales porcines (Tab. 19).

Les conclusions de ces études sont : (i) qu'à l'échelle du bassin versant, les sites où les marqueurs sont les plus fréquemment détectés sont situés en aval (Lamendella *et al.*, 2007), (ii) que la présence des marqueurs dans les eaux est augmentée après un événement pluvieux (Lamendella *et al.*, 2007), et (iii) qu'il peut exister une relation entre les marqueurs et les concentrations en indicateurs classiques et les pathogènes (Gourmelon *et al.*, 2007), par exemple, des corrélations positives d'une part entre *E. coli*/Entérocoques et les marqueurs HF183 et HF134 (Ahmed *et al.*, 2008a) et d'autre part entre le marqueur CF128 et la prévalence de *Salmonella* spp. (Fremaux *et al.*, 2009) ont été observées.

Les marqueurs de PCR conventionnelle se sont révélés être des marqueurs capables de différencier les contaminations humaines des contaminations porcines et par les ruminants à l'échelle d'un bassin versant. Cependant, les marqueurs n'ont pas toujours été détectés dans des eaux contaminées et les résultats sont seulement exprimés en terme de présence/absence. Le passage à la qPCR permet de s'affranchir de cette limite pour exprimer les résultats en terme de « quantification » et indiquer ainsi les contributions relatives de chaque marqueur au sein d'un échantillon lorsque les contaminations sont mixtes.

#### 5.4.2 Les marqueurs de PCR quantitative en temps réel

##### - Les marqueurs de contaminations fécales humaines

Le premier marqueur de contamination fécale humaine (HF183) de qPCR, a été proposé par Seurinck *et al.* (2005). L'amorce sens du marqueur HF183 de Bernhard et Field (2000b) a été conservée et une nouvelle amorce antisens a été dessinée pour réduire la longueur du fragment à amplifier (Tab. 20). Ce marqueur, comme le marqueur HF183 de PCR conventionnelle, a été préférentiellement amplifié dans des effluents urbains ( $n=4$ ) avec des concentrations comprises entre 9,8 et 10,5 U. Log<sub>10</sub> copies de gènes codant les ARNr 16S/100 ml d'eau avec une limite de quantification estimée à 4,7 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau (Seurinck *et al.*, 2005).

Les principaux marqueurs humains ont été comparés dans deux études, réalisées par Kildare *et al.* (2007) et Amhed *et al.* (2009a). L'étude de Kildare *et al.* (2007) a comparé trois marqueurs : BacHum-UCD (Kildare *et al.*, 2007), HF183 (Seurinck *et al.*, 2005) et HuBac (Layton *et al.*, 2006) sur 59 échantillons de fèces d'origine diverse (humaine, bovine, équine, canine, féline et aviaire) et sur 14 échantillons d'effluent de STEP (Tab. 20). Le marqueur BacHum-UCD a permis d'obtenir les résultats de sensibilité (81,3 %) et de spécificité (97,6 %) les plus intéressants car il a été amplifié dans seulement 13 % des fèces d'origine

canine ( $n=8$ ). Le marqueur HF183, aussi sensible que le marqueur précédent (78,1 %), s'est avéré moins spécifique car il a été amplifié dans 25 et 14 % des fèces canines et félines ( $n=7$ ). Enfin, le marqueur HuBac, s'est avéré sensible mais insuffisamment spécifique ; il a été ainsi amplifié respectivement dans 38 %, 13 %, 88 % et 71 % des fèces bovines, équine, canines et félines testées. La faible spécificité du marqueur HuBac avait déjà été mise en évidence dans l'étude de Layton *et al.* (2006) où il avait été amplifié dans des échantillons de fèces canines ( $n=4$ ), bovines ( $n=6$ ) et dans trois fèces porcines ( $n=4$ ).

L'étude d'Ahmed *et al.* (2009a) a comparé, quand à elle, cinq marqueurs : BacHum-UCD, HF183, HuBac et les marqueurs BacH (Reischer *et al.*, 2007) et Human-Bac1 (Okabe *et al.*, 2007) sur 136 échantillons de fèces d'origine diverse (humaine, ruminant, porcine, équine, caprine, féline et aviaire) et sur 50 échantillons d'effluents de STEP (Tab. 20). Les marqueurs ont tous présenté 100 % de sensibilité et seul le marqueur HF183 a permis d'obtenir une spécificité de plus de 99 %. Les marqueurs ont été classés par ces auteurs selon leur spécificité : HF183 > BacHum-UCD > BacH > Human-Bac1 > HuBac.

**Tableau 20 : Principaux marqueurs *Bacteroidales* de PCR quantitative en temps réel pour identifier les contaminations fécales d'origine humaine ainsi que l'évaluation de leur sensibilité et spécificité**

Nom des marqueurs	Pays	Sensibilité % ( $n$ )	Spécificité % ( $n$ )	Références
<b>HF183</b>	<b>Belgique</b>	<b>90,9 (11)<sup>a, b</sup></b>	<b>100 (19)<sup>a</sup></b>	<b>Seurinck <i>et al.</i> (2005)<sup>e</sup></b>
	Etats-Unis	78,1 (32) <sup>a, b</sup>	92,7 (41) <sup>a</sup>	Kildare <i>et al.</i> (2007)
	Australie	100 (50) <sup>b</sup>	99,3 (136) <sup>a</sup>	Ahmed <i>et al.</i> (2009a) <sup>c</sup>
	Australie	100 (32) <sup>b</sup>	98 (50) <sup>a</sup>	Ahmed <i>et al.</i> (2009b) <sup>c</sup>
	Kenya	64,7 (17) <sup>a, b</sup>	100 (25) <sup>a</sup>	Jenkins <i>et al.</i> (2009)
<b>HuBac</b>	<b>Etats-Unis</b>	<b>100 (3)<sup>a</sup></b>	<b>33,4 (18)<sup>a</sup></b>	<b>Layton <i>et al.</i> (2006)</b>
	Etats-Unis	93,6 (32) <sup>a, b</sup>	61 (41) <sup>a</sup>	Kildare <i>et al.</i> (2007)
	Australie	100 (50) <sup>b</sup>	63,2 (136) <sup>a</sup>	Ahmed <i>et al.</i> (2009a)
<b>BacHum-UCD</b>	<b>Etats-Unis</b>	<b>81,2 (32)<sup>a, b</sup></b>	<b>97,6 (41)<sup>a</sup></b>	<b>Kildare <i>et al.</i> (2007)</b>
	Australie	100 (50) <sup>b</sup>	95,6 (136) <sup>a</sup>	Ahmed <i>et al.</i> (2009a)
	Kenya	17,6 (17) <sup>a, b</sup>	100 (25) <sup>a</sup>	Jenkins <i>et al.</i> (2009)
	Etats-Unis	100 (12) <sup>b</sup>	70,7 (41) <sup>a, d</sup>	Silkie et Nelson (2009)
<b>BacH</b>	<b>Autriche</b>	<b>97,6 (41)<sup>a, b</sup></b>	<b>99 (302)<sup>a</sup></b>	<b>Reischer <i>et al.</i> (2007)</b>
	Australie	100 (50) <sup>b</sup>	94,1 (136) <sup>a</sup>	Ahmed <i>et al.</i> (2009a)
<b>Human-Bac1</b>	<b>Japon</b>	<b>100 (4)<sup>a</sup></b>	<b>NP (12)<sup>a</sup></b>	<b>Okabe <i>et al.</i> (2007)</b>
	Australie	100 (50) <sup>b</sup>	83,8 (136) <sup>a</sup>	Ahmed <i>et al.</i> (2009a)
<b><i>B. thetaiotaomicron</i> VPI 5482</b>	<b>Etats-Unis</b>	<b>100 (20)<sup>b</sup></b>	<b>100 (16)<sup>a, d</sup></b>	<b>Yampara-Iquise <i>et al.</i> (2008)</b>

<sup>a</sup> Fèces, <sup>b</sup> Effluent, <sup>c</sup> Marqueur HF183 développé par Bernhard and Field (2000b) pour la PCR conventionnelle, testé en qPCR, <sup>d</sup> Pools d'échantillons, <sup>e</sup> Auteurs ayant développé le marqueur

Il existe également un marqueur dessiné à partir de la séquence du génome de *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI 5 482 (Yampara-Iquise *et al.*, 2008). Les amorces et la sonde ciblent plus spécifiquement les gènes codant pour l' $\alpha$ -1-6 mannanase. Testé seulement sur des fèces, ce marqueur s'est révélé sensible et spécifique (Tab. 20).

#### - Les marqueurs de contaminations fécales animales

Les marqueurs de contamination fécale animale les plus représentés sont les marqueurs ruminants (Tab. 21). Seuls les marqueurs BoBac (Layton *et al.*, 2006), CowM2 et CowM3 (Shanks *et al.*, 2008) permettent de différencier les contaminations fécales bovines de celles des autres ruminants (ovins et caprins).

Les marqueurs ruminants ont été très peu testés sur des eaux de l'environnement. On peut néanmoins citer les études de Reischer *et al.* (2006) et Okabe *et al.* (2007) qui ont montré respectivement des concentrations variant de 1,6 à 4,5 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau et de 1,6 à 3,6 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau avec les marqueurs BacR et Cow-Bac2.

Concernant les marqueurs de contamination fécale porcine, Okabe *et al.* (2007) ont développé deux marqueurs (PigBac1 et PigBac2). Ces marqueurs se sont révélés sensibles mais leur spécificité, testée sur un faible nombre d'échantillons de fèces, n'a pas été présentée (Tab. 21). Cependant, les auteurs ont précisé que le marqueur PigBac2 avait été faiblement amplifié dans des échantillons de selles humaines et des fèces bovines. Le marqueur PigBac2 a ensuite été testé dans des eaux de rivière et des concentrations variant de 1,7 à 4,3 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau ont été obtenues. Le marqueur PigBac1 a également été testé par Lamendella *et al.* (2009) en PCR conventionnelle et des amplifications non spécifiques ont été obtenues dans des échantillons de selles humaines et de fèces bovines, équines, aviaires et de rats laveurs. Ces mêmes auteurs ont utilisé le marqueur PF163 développé en PCR conventionnelle par Dick *et al.* (2005) et ont montré que sa sensibilité et spécificité étaient plus élevées que celles du marqueur PigBac1 et que ce dernier était plus fréquemment retrouvé dans les eaux de rivière.

Des marqueurs de contamination équine, canine et aviaire (oies du Canada) ont également été respectivement développés par Silkie et Nelson (2009), Kildare *et al.* (2007) et Fremaux *et al.* (2010). Les marqueurs de contamination équine et aviaire ont montré une forte spécificité tandis que la sensibilité des marqueurs de contamination canine et aviaire était relativement faible (51 - 62,5 %). Les deux marqueurs ciblant les contaminations aviaires ont respectivement été quantifiés dans 87 et 73 % des eaux ( $n=75$ ), suspectées d'être contaminées

par des oies du Canada, à des concentrations comprises entre 1,7 et 3,9 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau.

**Tableau 21 : Principaux marqueurs *Bacteroidales* de PCR quantitative en temps réel pour identifier les contaminations fécales d'origine animale ainsi que leur sensibilité et spécificité**

Hôte	Nom des marqueurs	Pays	Sensibilité % (n)	Spécificité % (n)	Références
Ruminant /Bovin	BoBac	Etats-Unis	100 (6) <sup>a</sup>	86,7 (15) <sup>a</sup>	Layton <i>et al.</i> (2006) <sup>f</sup>
		Etats-Unis	100 (8) <sup>a</sup>	96,9 (65) <sup>a, b</sup>	Kildare <i>et al.</i> (2007)
	BacR	Autriche	100 (57) <sup>a</sup>	100 (146) <sup>a, b</sup>	Reischer <i>et al.</i> (2006)
	BacCow- UCD	Etats-Unis	100 (8) <sup>a</sup>	95,4 (65) <sup>a, b</sup>	Kildare <i>et al.</i> (2007)
		Kenya	93,3 (15) <sup>a</sup>	100 (27) <sup>a, b</sup>	Jenkins <i>et al.</i> (2009)
		Etats-Unis	100 (21) <sup>a, d</sup>	53,1 (32) <sup>a, b, d</sup>	Silkie et Nelson (2009)
	Cow-Bac1	Japon	100 (7) <sup>a</sup>	100 (9) <sup>a</sup>	Okabe <i>et al.</i> (2007)
	Cow-Bac2	Japon	100 (7) <sup>a</sup>	100 (9) <sup>a</sup>	Okabe <i>et al.</i> (2007)
	CowBac3	Japon	100 (7) <sup>a</sup>	100 (9) <sup>a</sup>	Okabe <i>et al.</i> (2007)
	CowM2	Etats-Unis	98 - 100 (60) <sup>a</sup>	100 (144) <sup>a</sup>	Shanks <i>et al.</i> (2008)
CowM3	Etats-Unis	NT	100 (175) <sup>a</sup>	Shanks <i>et al.</i> (2010)	
Porcin	PigBac1	Japon	100 (5) <sup>a</sup>	NP <sup>e</sup> (11) <sup>a</sup>	Okabe <i>et al.</i> (2007)
		Etats-Unis	79,4 (103) <sup>a, b</sup>	67,2 (119) <sup>a, b</sup>	Lamendella <i>et al.</i> (2009) <sup>c</sup>
	PigBac2	Japon	100 (5) <sup>a</sup>	NP (11) <sup>a</sup>	Okabe <i>et al.</i> (2007)
Equin	HorseBac	Etats-Unis	100 (10) <sup>a, d</sup>	100 (43) <sup>a, b, d</sup>	Silkie et Nelson (2009)
Canin	BacCan- UCD	Etats-Unis	62,5 (8) <sup>a</sup>	87,2 (65) <sup>a, b</sup>	Kildare <i>et al.</i> (2007)
		Australie	85 (20) <sup>a</sup>	96 (177) <sup>a, b</sup>	Ahmed <i>et al.</i> (2008a) <sup>c</sup>
		Etats-Unis	100 (10) <sup>a, d</sup>	34,9 (43) <sup>a, b, d</sup>	Silkie et Nelson (2009)
Aviaire (oies)	CGOF1-Bac	Canada	57 (101) <sup>a</sup>	99,7 (291) <sup>a</sup>	Fremaux <i>et al.</i> (2010)
	CGOF2-Bac	Canada	51 (101) <sup>a</sup>	100 (291) <sup>a</sup>	Fremaux <i>et al.</i> (2010)

<sup>a</sup> Fèces, <sup>b</sup> Effluent, <sup>c</sup> Testé en PCR conventionnelle, <sup>d</sup> Pools d'échantillons, <sup>e</sup> Données non présentées, <sup>f</sup> Auteurs ayant développé le marqueur

L'utilisation des marqueurs *Bacteroidales* de qPCR pour identifier et quantifier l'origine humaine et animale des contaminations dans l'environnement est une approche relativement récente (premières études en 2005) et en plein essor car une vingtaine de marqueurs ont été développés depuis ces cinq dernières années. Si les marqueurs humains et ruminants ont été plus souvent développés que les marqueurs porcins, ces marqueurs ont cependant été peu recherchés dans des eaux de l'environnement et n'ont pas été, à notre connaissance, recherchés dans les coquillages. En outre, avant une application de ces marqueurs à grande échelle dans des eaux, il est intéressant d'étudier leur persistance dans

l'environnement sous l'influence de différents facteurs afin d'évaluer si ces marqueurs peuvent persister suffisamment longtemps dans l'environnement pour être détectés dans une eau de baignade ou dans des coquillages.

### 5.5 Persistance des marqueurs *Bacteroidales* dans l'environnement

La sensibilité et la spécificité des marqueurs *Bacteroidales* sont des éléments importants à prendre en compte pour identifier correctement l'origine des pollutions fécales. Néanmoins, la compréhension et l'évaluation de leur persistance dans l'environnement sont aussi des éléments essentiels à considérer lors de leur application sur des échantillons issus de l'environnement.

Les premières études sur la survie des bactéries entériques à l'extérieur du tractus digestif ont concerné l'indicateur *E. coli*. Ces études ont démontré qu'un déclin plus ou moins rapide des concentrations en *E. coli* était observé sous l'action de la lumière solaire et tout particulièrement des UV, de la prédation, des fortes températures et de la salinité et qu'au contraire l'association de facteurs tels que la turbidité, le sédiment et la présence de matière organique permettaient d'augmenter ou de maintenir sa survie (Gourmelon *et al.*, 1994 ; Rozen et Belkin, 2001).

Concernant les *Bacteroidales*, les premières études ont été réalisées à partir de souches pures de *Bacteroides*. Ainsi, Fiksdal *et al.* (1985) ont démontré que 1 % des colonies de *B. fragilis* pouvait être détecté après une semaine dans une eau à 12°C en présence d'oxygène, 2 % pour *E. coli* et 9 % pour *Streptococcus faecalis*. Il est toutefois probable que la persistance d'autres souches de *Bacteroidales*, plus sensibles à l'oxygène, soit plus faible.

L'étude de la persistance des marqueurs *Bacteroidales* dans les eaux a principalement été réalisée en microcosmes sous l'influence des facteurs physico-chimiques tels que la température, la lumière ou la salinité (Kreader, 1998 ; Savichtcheva *et al.*, 2005 ; Okabe et Shimazu, 2007 ; Walters et Field, 2009 ; Walters *et al.*, 2009) ou bien sous l'influence de la prédation (Kreader, 1998 ; Bell *et al.*, 2009 ; Saunders *et al.*, 2009 ; Dick *et al.*, 2010).

#### 5.5.1 La température

Les différentes études sur la persistance des marqueurs *Bacteroidales* par des expérimentations en microcosmes d'eau de rivière ont montré que plus la température était élevée plus elle avait un effet négatif sur la persistance quelque soit le marqueur (Tab. 22). A une température de 4°C, les concentrations restaient stables au cours du temps, tandis que

pour des températures supérieures à 15-20°C, des déclin variant de 2,5 à 4,5 U. Log<sub>10</sub> ont été observés (Tab. 22).

L'étude de Savichtcheva *et al.* (2005), sur la survie des *Bacteroidales* dans des eaux destinées à la consommation humaine a permis de différencier les cellules vivantes des cellules mortes par LDS-FISH (Live/Dead Staining-Fluorescence *in situ* Hybridization). Le microcosme était constitué d'eau potable à 4 et 24°Censemencée par une culture pure de *B. fragilis* et des selles humaines. Les résultats ont montré que l'augmentation des températures était associée à une décroissance de la survie de la culture de *B. fragilis* et des *Bacteroides* spp. De plus, cette étude a permis de démontrer que les techniques de biologie moléculaire, ciblant à la fois les bactéries vivantes et mortes, conduisaient à des temps de persistance plus élevés que lorsque seulement les bactéries viables étaient recherchées. A 24°C, *B. fragilis* viable a été détecté pendant 48 h alors que les *Bacteroides* spp. viables n'ont été détectés que pendant 4 h.

**Tableau 22 : Persistance, en microcosme d'eau de rivière, des marqueurs *Bacteroidales* selon différentes conditions de températures**

Nom des marqueurs	Origine	Conditions microcosmes	Température (°C)	Persistance (jours)	Décroissance (U. Log <sub>10</sub> )	Références
<b>B. distasonis</b>	Humaine	Eau de rivière +	4	14	-	Kreader (1998)
		fèces humaines	24	2	-	
<b>HF183</b>	Humaine	Eau de rivière +	4	10	0	Seurinck <i>et al.</i> (2005)
		eaux usées	12	10	1	
		urbaines	28	6	2	
<b>Human-Bac1</b>	Humaine	Eau de rivière +	4	25 [7] <sup>a</sup>	4 [0] <sup>a</sup>	Okabe et Shimazu (2007)
		fèces (porcines,	10	18 [7]	4 [0]	
		humaines et	20	15 [7]	4 [4]	
		ruminants)	30	6	4	
<b>BacR</b>	Ruminant	Eau de rivière +	4	>60	0	Reischer <i>et al.</i> (2006)
<b>CowBac2</b>	Ruminant	Eau de rivière +	4	16 [7]	5 [0,2]	Okabe et Shimazu (2007)
		fèces (porcines	10	21 [7]	5 [0,2]	
		humaines, et	20	10 [7]	5 [4,5]	
		ruminants)	30	12 [7]	5 [4,5]	
<b>Pig-Bac2</b>	Porcine	Eau de rivière +	4	>35 [7]	3 [0,2]	Okabe et Shimazu (2007)
		fèces (porcines	10	18 [7]	4 [2]	
		humaines, et	20	>35 [7]	3 [3]	
		ruminants)	30	12 [7]	4 53,5]	
<b>AllBac</b>	General	Eau de rivière +	5	>15 [7]	2,5 [0,5]	Bell <i>et al.</i> (2009)
		fèces équine	10	>9 [7]	1,5 [2]	
			15	>7	2,5	
			35	>7	3,5	

<sup>a</sup> Persistance des marqueurs sur sept jours et valeur de décroissance associée pour une lecture des données uniformisée

Bell *et al.* (2009) ont récemment comparé les effets de la température, de la taille des agrégats fécaux (de 125 µm à 2 mm), de la lumière et la prédation sur la persistance du marqueur

général AllBac, dessiné par Layton *et al.* (2006) dans des microcosmes d'eau de rivière où avaient été ajoutées des fèces de chevaux. Les résultats, comparables à ceux obtenus par Kreader (1998), ont montré que la température et la prédation étaient les facteurs les plus importants et que dans une moindre mesure, la taille et la concentration initiale des agrégats fécaux influençaient négativement sur la persistance du marqueur.

#### 5.5.2 La lumière

Bae et Wuertz, (2009b) ont étudié la persistance des marqueurs *Bacteroidales* développés par Kildare (2007) et des *Bacteroidales* sous l'effet de la lumière en utilisant la technique PMA-qPCR (qPCR avec propidium monoazide) permettant d'amplifier uniquement des cellules vivantes (Bae et Wuertz, 2009a). Des microcosmes d'eau de mer à température ambiante contenant les fèces de différents hôtes (humain, bovin et canin) ont été constitués. Les résultats ont montré qu'une réduction de 2 U. Log<sub>10</sub> a été obtenue en 28 h pour les cellules vivantes de *Bacteroidales* alors que cette réduction n'a été observée qu'après plus de sept jours pour les marqueurs *Bacteroidales*. Le marqueur général et le marqueur humain ont été détectés tout au long de l'expérience (>23 jours), les marqueurs bovin et canin n'ont été détectés respectivement que pendant six et 11 jours sous des conditions de lumière et d'obscurité. La lumière, dans les conditions de l'expérience, n'a donc pas eu d'effet sur la persistance des marqueurs. Ces résultats se sont révélés contraires à ceux obtenus par Walters *et al.* (2009) qui ont également étudié la persistance du marqueur BacHum-UCD dans des microcosmes d'eau de mer. Ils ont observé un déclin du marqueur plus important avec la lumière naturelle (T<sub>90</sub> : 1,8 jours) qu'à l'obscurité (T<sub>90</sub> : 8,7 jours).

L'effet de la lumière sur les marqueurs humains (HF134 et HF183) et ruminants (CF128 et CF193) a également été étudié, par PCR conventionnelle, qPCR et RT-PCR, en microcosmes d'eau de rivière incubés à 13°C où ont été ajoutées des selles humaines ou des fèces de ruminants (Walters et Field, 2009). Concernant les marqueurs de PCR conventionnelle, les deux marqueurs humains présentaient une persistance similaire (six jours) et n'étaient pas affectés par la lumière tandis que les deux marqueurs ruminants présentaient une persistance différente. En effet, en présence de lumière, la persistance du marqueur CF193 était de quatre jours et celle du marqueur CF128 de 14 jours. Concernant les marqueurs de qPCR, les marqueurs humains n'étaient pas affectés par l'exposition à la lumière. Toutefois les marqueurs associés aux cellules vivantes mis en évidence par la RT-PCR en temps réel étaient affectés par cette exposition.

### 5.5.3 La prédation

D'après plusieurs études, l'effet de la prédation des bactéries par des protozoaires semble être un des facteurs ayant le plus d'impact sur la persistance des marqueurs *Bacteroidales*. Kreader, en 1998, a démontré qu'en microcosme d'eau de rivière à 24°C où ont été diluées des selles humaines et où un inhibiteur de cellules eucaryotes, la cycloheximide, a été ajouté pour supprimer l'effet de la prédation, la persistance du marqueur de PCR conventionnelle *B. distasonis* a été augmentée d'une semaine. En comparant la persistance des gènes codant l'ARNr 16S de *B. vulgatus*, Saunders *et al.* (2009), ont observé qu'ils persistaient pendant plus de 200 jours dans de l'eau potable stérile à 10°C alors que dans de l'eau potable non stérile à la même température, une réduction de 3 U. Log<sub>10</sub> a été obtenue après 100 jours. En étudiant la persistance du marqueur général AllBac en microcosmes d'eau de rivière filtrée et non filtrée, Bell *et al.* (2009) ont également montré que la prédation était un facteur contrôlant la persistance des marqueurs *Bacteroidales*.

La persistance des marqueurs *Bacteroidales* dans les eaux de l'environnement est donc influencée par de multiples facteurs physico-chimiques et par la prédation. L'étude de leur persistance est complexe car les facteurs sont souvent étudiés indépendamment les uns des autres en microcosmes alors que dans l'environnement, la persistance est influencée par un ensemble de facteurs. De plus, on peut noter que l'effet de la teneur en oxygène dissous sur la persistance des marqueurs *Bacteroidales* n'a pas encore été étudié.

Conclusion partie V : L'utilisation des marqueurs *Bacteroidales* de qPCR s'impose pour différencier les contaminations d'origine humaine des contaminations d'origine animale et les contaminations animales entre elles. En effet, les *Bacteroidales* sont présents chez les principaux hôtes (humain, bovin et porc) pouvant être à l'origine des principales sources de contaminations dans l'environnement et possèdent des espèces ayant une répartition spécifiques de l'hôte. Cette spécificité d'hôte a permis le développement de marqueurs de PCR conventionnelle puis de qPCR. Cependant, la spécificité de certains marqueurs n'est pas toujours suffisante et seuls deux marqueurs de qPCR, peu spécifiques, pour identifier les contaminations d'origine porcine ont été décrits. De plus, ces marqueurs n'ont été que rarement recherchés dans des eaux de l'environnement et n'ont pas été recherchés dans les coquillages. Enfin, peu d'études ont été réalisées pour évaluer leur persistance dans les eaux de l'environnement et tout particulièrement sous l'influence de l'oxygène dissous.

## **AXES DE RECHERCHE**

---



Suite à l'étude bibliographique présentée dans ce manuscrit, les principaux axes de recherche de mon travail de thèse étaient : (i) de développer et valider une approche moléculaire d'identification de l'origine de la pollution fécale de l'environnement, ciblée sur la recherche de bactéries appartenant à l'ordre des *Bacteroidales*, (ii) d'évaluer le devenir dans l'environnement des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte sous l'influence de certains facteurs abiotiques, et enfin (iii) d'évaluer la pertinence de ces marqueurs pour identifier l'origine d'une contamination de la source jusqu'au littoral et plus particulièrement dans les coquillages.

Ces principaux axes de recherche ont conduit à la réalisation de cinq étapes majeures :

- Exploitation d'une banque de séquences des gènes codant l'ARNr 16S des *Bacteroidales* issues d'échantillons de fèces et d'effluents acquise précédemment au laboratoire (Yala, 2006 ; Mieszkin, 2007)<sup>4</sup>.
  
- Développement de marqueurs *Bacteroidales* de qPCR et évaluation de leur sensibilité et spécificité dans des échantillons de fèces et d'effluents de diverses origines.
  
- Evaluation de la persistance des gènes codant l'ARNr 16S de l'ensemble des *Bacteroidales* et des *Bacteroidales* spécifiques de contaminations fécales porcines dans des microcosmes d'eau de rivière sous l'influence de deux paramètres physico-chimiques : la température et l'oxygène dissous.
  
- Validation des marqueurs *Bacteroidales* de qPCR à petite échelle dans des eaux de ruissellement résultant de simulations d'épandage de lisier de porcs et de fumiers de bovins sur des parcelles expérimentales et à grande échelle dans des eaux de rivière issues d'un bassin versant breton.
  
- Détermination d'un protocole de détection des marqueurs *Bacteroidales* dans les huîtres et recherche de ces marqueurs dans des huîtres naturellement contaminées.

---

<sup>4</sup> Les séquences de gènes codant les ARNr 16S de *Bacteroidales* issues des échantillons de fèces (Yala, 2006) et issues des échantillons de lisiers de porcs (Mieszkin, 2007) ont été acquises dans le cadre de stages de Master Recherche tandis que les séquences de gènes codant les ARNr 16S de *Bacteroidales* issues des échantillons de fumiers de bovins et les eaux de STEP ont été obtenues en 2007 dans le cadre du projet Trace 1



# **PLAN DES CHAPITRES DU MANUSCRIT DE THESE**

---



Les travaux réalisés et les résultats acquis au cours de cette thèse sont présentés sous forme de publications (six dont deux soumises) pour les six premiers chapitres et sous forme manuscrite pour le chapitre VII.

Le **chapitre I** présente l'analyse phylogénétique de l'ensemble des séquences des gènes codant l'ARNr 16S des *Bacteroidales* issues d'échantillons de fèces et d'effluents d'origine humaine et animale. C'est à partir de cette analyse que des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques des contaminations fécales d'origine humaine, porcine et par les ruminants ont été identifiés. L'originalité de ce travail réside dans le fait que nous avons pris en compte des séquences issues d'effluents et non seulement des séquences issues de fèces pour évaluer la répartition des séquences de *Bacteroidales* suivant les hôtes et définir ensuite des marqueurs spécifiques de l'hôte. En effet, peu de séquences de *Bacteroidales* issues d'effluents et tout particulièrement d'effluents d'origine animale étaient disponibles dans les bases de données telles que National Center for Biotechnological Information (NCBI) et Ribosomal Database Project (RDPII). Ce chapitre présente également le marqueur *Bacteroidales* de qPCR (Rum-2-Bac) spécifique des contaminations fécales par les ruminants (bovins et ovins). Enfin, la sensibilité et la spécificité de ce marqueur ont été évaluées sur des échantillons fécaux et le marqueur a été recherché dans des eaux de ruissellement impactées par des fumiers de bovins.

Le **chapitre II** est consacré au développement de deux marqueurs *Bacteroidales* de qPCR spécifiques des contaminations fécales porcines, Pig-1-Bac et Pig-2-Bac, en utilisant l'analyse phylogénétique réalisée dans le chapitre I. La sensibilité et la spécificité de ces deux marqueurs ainsi que leur capacité à identifier une origine porcine des contaminations fécales dans des eaux de rivière a également été évaluée.

Le **chapitre III** s'intéresse à la persistance des deux marqueurs porc développés dans le chapitre précédent en microcosmes d'eau de rivière contaminées par du lisier de porcs, sous l'influence de deux paramètres : la température (4 et 20°C) et l'oxygène dissous (microaérophilie et aérobie), sur une période de 43 jours. Leur persistance a également été comparée à celle du marqueur de l'ensemble des *Bacteroidales* (AllBac) et à un troisième marqueur porc, développé par nos partenaires scientifiques du Cemagref de Rennes, ciblant spécifiquement la bactérie *Lactobacillus amylovorus* (*L. amylovorus*) (Marti *et al.*, 2010). En parallèle, des numérations des indicateurs classiques de contamination fécale, *E. coli* et entérocoques, ont été réalisées. En fonction des différentes conditions testées, l'évolution des

principaux groupes bactériens auxquels appartenait les marqueurs porcs a également été étudiée par l'analyse de profils obtenus par la technique de typage moléculaire de CE-SSCP.

Une fois ces marqueurs de l'origine animale des contaminations fécales développés, il était important d'évaluer si ces marqueurs présents dans les effluents susceptibles d'être épandus pouvaient être transférés dans l'environnement *via* les eaux de ruissellement. Dans ce but, ils ont été recherchés lors de simulations de pluie sur des parcelles expérimentales épandues avec du lisier de porcs et du fumier de bovins. Le **chapitre IV**, présente l'évaluation du transfert des marqueurs *Bacteroidales* Pig-1-Bac, Pig-2-Bac et Rum-2-Bac, dans les eaux de ruissellement, à celui des autres marqueurs développés ou sélectionnés par nos partenaires scientifiques, c'est-à-dire le marqueur *L. amylovorus* et les marqueurs chimiques (les stéroïdes et la fluorescence de la matière organique) et à celui des indicateurs classiques de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques) et aux coliphages F-spécifiques.

Le **chapitre V** présente la validation à grande échelle dans des eaux de rivière (bassin versant de Daoulas, Finistère) des marqueurs *Bacteroidales* Pig-2-Bac, Rum-2-Bac ainsi que d'un nouveau marqueur *Bacteroidales* spécifique des contaminations fécales humaines (Hum-1-Bac) développé dans ce chapitre suite à l'analyse phylogénétique réalisée dans le chapitre I.

Afin d'identifier efficacement l'origine des contaminations fécales dans l'environnement, l'approche la plus pertinente semble être l'utilisation d'un panel de marqueurs, ou « boîte à outils », composé de marqueurs bactériens, viraux et/ou chimiques. Aussi, l'intérêt d'intégrer les marqueurs *Bacteroidales* spécifiques des contaminations fécales humaines, porcines et par les ruminants dans cette « boîte à outils » a été évalué. Le **chapitre VI** est donc consacré à la comparaison de plusieurs marqueurs bactériens (*Bacteroidales*, *L. amylovorus* et *Bifidobacterium adolescentis*), viraux (bactériophages F-ARN spécifiques) et chimiques (stéroïdes, caféine et molécules de synthèse) dans des eaux de différentes natures et à la sélection des marqueurs les plus pertinents.

Après avoir démontré que les marqueurs *Bacteroidales* pouvaient être détectés et quantifiés dans les eaux de l'environnement, il était également important d'évaluer leur potentielle détection dans les coquillages. En effet, les microorganismes d'origine fécale véhiculés *via* les eaux sont susceptibles d'atteindre les zones littorales et donc de contaminer les coquillages. Afin d'optimiser et d'évaluer la détection des marqueurs *Bacteroidales* dans

les coquillages, deux phases se sont succédées dans le **chapitre VII**. La première phase a consisté en une comparaison et une optimisation de protocoles d'extraction d'ADN bactérien génomique à partir d'échantillons de liquide intervalvaire et de tissus digestifs provenant de lots d'huîtres. Des expérimentations de bioaccumulation des bactéries provenant de fèces de porc et de souches pures de *Bacteroides vulgatus* par des huîtres placées dans des microcosmes d'eau de mer ont ainsi été réalisées. Le protocole d'extraction des ADN bactériens le plus prometteur a ensuite été optimisé. La seconde phase a consisté à rechercher les marqueurs de l'ensemble des *Bacteroidales* et des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'Homme, des ruminants et des porcs dans des huîtres naturellement contaminées, situées en zone estuarienne (Estuaire de l'Elorn, Finistère), dans des conditions de pluviométrie et des niveaux de contamination fécale variables.

En fin de manuscrit, sont présentés la discussion des résultats obtenus au cours de cette thèse ainsi que les perspectives de recherche dégagées à l'issue de ce travail de thèse.

Concernant les publications ou manuscrits soumis dans ce manuscrit de thèse, ma participation a été plus réduite dans les chapitres IV et VI qui présentaient l'ensemble des marqueurs développés ou sélectionnés par l'ensemble des partenaires des projets Traces 1 et 2<sup>5</sup>. J'ai ainsi participé à la majorité des analyses concernant les marqueurs *Bacteroidales* et pris part à la rédaction de ces publications. Toutefois, il m'a semblé important de présenter ces articles dans le manuscrit du fait qu'ils apportaient des éléments indispensables pour la validation des marqueurs développés au cours de ce travail de thèse.

---

<sup>5</sup> Projets nationaux Traces 1 (2007-2009) et Traces 2 (2009-2010) - Traceurs de contamination fécale des eaux de surface, recherche de marqueurs microbiologiques et chimiques de l'origine de la contamination fécale des eaux de surface. Coordinateur : A. M. Pourcher, Cemagref de Rennes, France. Participants : (i) LEESA de l'Université d'Angers, (ii) CNRS Géosciences de Rennes, (iii) l'INRA UMR SAS de Rennes, (iv) LBE de l'INRA de Narbonne, (v) CEMAGREF de Rennes et, (vi) Ifremer de Brest. Financement : ANSES



# CHAPITRE I

---

**Analyse phylogénétique des séquences de gènes codant l'ARNr 16S des *Bacteroidales* issues d'effluents et de fèces d'origine humaine et animale et développement d'un marqueur de PCR quantitative en temps réel ciblant les contaminations fécales par les ruminants**

-

**Résumé**

### CONTEXTE ET OBJECTIFS

Afin d'identifier les contaminations fécales émises par les ruminants dans l'environnement, deux marqueurs de PCR quantitative en temps réel (qPCR) disponibles dans la littérature, BoBac et BacR, développés respectivement en 2006 par Layton *et al.* et Reischer *et al.*, ont été sélectionnés et testés au laboratoire. Dans nos conditions, un manque de spécificité a été obtenu pour ces deux marqueurs (amplification sur des selles humaines et des fèces porcines). En conséquence, nous avons choisi l'option de développer un nouveau marqueur plus spécifique à partir de séquences de gènes codant les ARNr 16S de *Bacteroidales* issues d'effluents et de fèces de diverses origines et ce en raison du peu de séquences de *Bacteroidales* issues d'effluents d'origine animale disponibles dans les bases de données NCBI et EMBL.

Les objectifs de cette étude étaient (i) d'évaluer la distribution hôte-spécifique des séquences des gènes codant l'ARNr 16S des *Bacteroidales* issues à la fois des effluents (eaux en sortie de STEP, fumiers de bovins et lisiers de porcs) et des fèces (humaines, bovines, porcines et aviaire) obtenus au laboratoire, et (ii) de développer à partir de l'analyse phylogénétique de ces séquences un marqueur *Bacteroidales* de qPCR ciblant les contaminations fécales par les ruminants (bovins et ovins).

### METHODES

L'analyse phylogénétique repose sur la construction d'une banque de séquences des gènes codant l'ARNr 16S des *Bacteroidales* issues à la fois d'effluents (10 eaux en sortie de STEP, 10 fumiers de bovins et 10 lisiers de porcs) et des fèces (10 selles humaines, 10 fèces bovines, 10 fèces porcines et 10 fientes aviaires) d'origine humaine et animale après clonage et séquençage. Les séquences ont été assignées en Operational Taxonomic Unit (OTU), ce qui a permis de les regrouper avec un seuil de similarité fixé à 98 %.

A partir de l'analyse phylogénétique, un marqueur de qPCR, ciblant les contaminations fécales par les ruminants (Rum-2-Bac) a été développé. La spécificité *in silico* des amorces et de la sonde TaqMan® a été vérifiée en utilisant les programmes BLAST de NCBI et RDP II. A partir de la banque de clones, un clone contenant le fragment d'intérêt, amplifiable par le marqueur Rum-2-Bac, a été sélectionné. Le plasmide a ensuite été extrait, linéarisé puis quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre. La quantification du marqueur a ensuite été réalisée par le biais d'une gamme standard où le plasmide a été dilué de 10 en 10 sur une échelle de dilution de  $1,6 \times 10^7$  à  $1,6 \times 10^0$  copies de gènes codant les ARNr 16S par

puits (la valeur du cycle seuil (Ct) a été associée au nombre de copies de gènes codant l'ARNr 16S) induisant une limite de détection de 1,6 copies dans le puits PCR.

La sensibilité et la spécificité du marqueur ont été respectivement testées sur 30 ADN cibles (fèces bovines et ovines et fumiers de bovins) et 40 ADN non cibles (selles humaines, fèces porcines et équinées et fientes aviaires). Ce marqueur a ensuite été appliqué dans des eaux de ruissellement issues de simulations expérimentales d'épandage de fumiers de bovin.

### RESULTATS

Le clonage et le séquençage réalisé à partir des échantillons d'effluents et de fèces a permis d'obtenir 477 séquences de gènes codant l'ARNr 16S des *Bacteroidales*, d'une longueur d'environ 690 paires de bases, correspondant à 185 OTU. L'analyse *in silico* a montré que les OTU d'origine porcine (fèces et lisiers) appartenaient majoritairement au genre *Prevotella* contrairement aux OTU d'origine humaine, bovine et aviaire qui appartenaient plutôt au genre *Bacteroides*. De plus, peu d'OTU étaient proches de séquences d'espèces cultivables. L'analyse phylogénétique a ensuite démontré la présence de six groupes d'OTU spécifiques de l'hôte, provenant à la fois d'effluents et de fèces, qui ont été notés HUMAN I et II pour les humains, BOVINE I et II pour les bovins, PIG pour les porcs et WILD BIRD pour les oiseaux sauvages. Des groupes d'OTU issus de plusieurs hôtes ont également été identifiés.

Le groupe BOVINE II a permis de dessiner les amorces et la sonde TaqMan® du marqueur ruminant (Rum-2-Bac). Testées *in silico*, l'amorce sens BacB2-590F et la sonde BacB2-626P étaient hautement spécifiques tandis que l'amorce anti-sens Bac708Rm était présente chez l'ensemble des *Bacteroidales*. Testés sur des échantillons d'ADN cibles et non cibles, la sensibilité et la spécificité du marqueur Rum-2-Bac étaient respectivement de 97 et 100 % avec des concentrations moyennes respectives de  $1,6 \times 10^8$ ,  $2,5 \times 10^8$  et de  $1,0 \times 10^7$  copies/g de fèces bovines, ovines et de fumiers de bovins. Ce marqueur a également été quantifié dans des eaux de ruissellement issues de simulations expérimentales d'épandages de fumiers de bovins à une concentration moyenne de  $1,6 \times 10^7$  copies/100 ml d'eau.

### CONCLUSIONS

L'originalité de cette étude réside dans le fait que l'analyse phylogénétique a été réalisée à partir de séquences de *Bacteroidales* issues d'effluents (soit à l'échelle de la population) et de fèces (soit à l'échelle de l'individu) d'origine humaine et animale afin de

développer de nouveaux marqueurs *Bacteroidales* de qPCR spécifiques des contaminations fécales humaines, porcines et par les ruminants. De plus, ces séquences ont permis d'enrichir la base de données NCBI.

L'analyse phylogénétique réalisée dans cette étude confirme que certaines bactéries qui appartiennent aux genres *Bacteroides* et *Prevotella* s'avèrent être spécifiques de l'hôte qu'elles colonisent. Cette constatation nous a renforcé dans l'idée d'utiliser la cible *Bacteroidales* pour développer des marqueurs spécifiques de l'hôte. Les six groupes d'OTU spécifiques de l'hôte, définis précédemment, comportent des séquences issues de fèces et d'effluents. Ceci démontre que :

- Les *Bacteroidales* identifiés dans les fèces sont encore présents dans les effluents
- Les *Bacteroidales* peuvent persister dans l'environnement même après un traitement de l'effluent (traitement des eaux de STEP, des lisiers...)
- La classification de ces six groupes est pertinente pour développer des marqueurs spécifiques qui devraient par la suite être détectés dans l'environnement.

Le marqueur de qPCR, Rum-2-Bac, développé à partir des OTU du groupe BOVINE II issues d'échantillons de fumiers et de fèces de bovin a été quantifié uniquement dans des échantillons d'origine bovine et ovine. De plus, le fait qu'il n'ait pas été détecté dans les cas de contaminations fécales équine, renforce l'idée de sa spécificité dans la détection des contaminations fécales par les ruminants (bovins et ovins).

Ce marqueur permettra ainsi d'identifier avec succès les contaminations fécales par les ruminants issues : (i) des mauvaises pratiques d'épandage ou des ruissellements par temps de pluie, (ii) du pâturage à proximité d'un cours d'eau et de l'accès à la rivière comme abreuvoir sauvage, et (iii) des fuites au niveau du siège d'exploitation.

**PUBLICATION I**

**Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from  
human and animal effluents and assessment of ruminant  
faecal pollution by real-time PCR**

**Sophie Mieszkin, Jean-Fabrice Yala, Rozenn Joubrel, Michèle Gourmelon**  
*EMP, Laboratoire de Microbiologie, Ifremer, 29280 Plouzané, France,*

**Journal of Applied Microbiology (2010) 108; 974-984**

## ABSTRACT

**Aims:** The aims of this study were to evaluate the host-specific distribution of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human- and animal-related effluents and faeces, and to define a ruminant-specific marker.

**Methods and Results:** *Bacteroidales* 16S rRNA gene clone libraries were constructed from samples of effluent (sewage, bovine manure and pig slurry) and faeces (human, bovine, pig and wild bird), using PCR primers targeting order *Bacteroidales*. The phylogenetic analysis revealed six main distinct human-, bovine-, pig- and wild bird-specific clusters. From the bovine-specific cluster II, we designed a ruminant-specific marker, Rum-2-Bac, and this showed 97% sensitivity ( $n=30$ ) and 100% specificity ( $n=40$ ) when tested by TaqMan® real-time PCR. Average concentrations of this marker in bovine and sheep faeces and in bovine manure were  $8.2 \pm 0.5$ ,  $8.4 \pm 1.3$  and  $7 \pm 0.5$   $\log_{10}$  copies per g, respectively. It was also quantified in samples of runoff water impacted by bovine manure, with average concentrations of  $5.1 \pm 0.3$   $\log_{10}$  copies per ml water.

**Conclusions:** Our results confirmed that some members of *Bacteroidales* isolated from effluents and faeces had host-specific distributions. Identification of a bovine-specific cluster made it possible to design a reliable ruminant-specific marker.

**Significance and Impact of Study:** The host-specific distribution of *Bacteroidales* sequences from effluents mirrored the host-specific distribution of sequences observed in individual faeces. This efficient new ruminant-specific *Bacteroidales* 16S rRNA marker represents an useful addition to the microbial source-tracking toolbox.

**Keywords:** Sewage and manure, Microbial Source Tracking, *Bacteroidales*, 16S rRNA gene, Faecal contamination

## INTRODUCTION

Human and animal faecal pollution affects environmental water quality in both inland and coastal areas, with negative implications for recreational uses, public safety and shellfish sanitary status (Feldhusen, 2000; Gourmelon *et al.* 2007; Dorfman and Sinclair Rosselot 2008). Such pollution can also lead to economic losses if there are shellfish market closures or restrictions on bathing (Rabinovici *et al.* 2004).

France is an important animal producer in the European Union. It is the top cattle producer and ranks third for pig production. Indeed, in 2006, more than 19.5 million cattle and 14.8 million pigs were reared in France. Brittany and Normandy account for 10.5% and 11.7% of total national cattle production (Agreste Scees 2007). Furthermore, in Normandy, the presence of sheep on salt meadows could lead to human health risks in coastal waters (Hubbard *et al.* 2004). The coastal areas of these regions are thus particularly sensitive to animal faecal pollution. Bovine faecal contamination can arise due to slurry or manure spreading on arable land, cattle grazing or drinking near rivers, or stock movements.

Due to difficulties in the identification of non-point sources and the combined presence of urban and agricultural activities on some watersheds, Microbial Source Tracking (MST) methods are crucial for effective resource management and remediation. Many MST techniques have been developed to discriminate between human and non-human sources of faecal contamination, and to distinguish contamination from different animal species (Wiggins 1996; Parveen *et al.* 1999; Bernhard and Field 2000a and b; USEPA 2005). These methods aim to detect microbial or chemical targets associated with human and animal faeces, or sewage- or animal-related effluents (Marvin *et al.* 2001; Glassmeyer *et al.* 2005).

Among these methods, the detection of host-specific bacterial genetic markers such as *Bacteroidales* 16S rRNA genes in DNA extracts is a promising method. Detection of these anaerobic bacteria was proposed as an alternative and possibly superior water quality indicator (Fiksdal *et al.* 1985), as this group represents the main component of human and animal flora. Members of *Bacteroidales* are present at high concentrations in faeces (e.g. about  $10^9$ - $10^{11}$  per g of human faeces) but do not maintain culturability for very long once released into fresh or marine waters, due to their low oxygen tolerance (Allsop and Stickler; 1985; Fiskdal *et al.* 1985). Furthermore, some faecal members of *Bacteroidales* are described as having host species-specific or group-specific distributions (Kreader 1995; Bernhard and Field, 2000b). To quantify the relative contributions of specific hosts in an environmental sample, real-time PCR assays have recently been developed targeting human-specific (Seurinck *et al.* 2005; Layton *et al.* 2006; Kildare *et al.* 2007; Okabe *et al.* 2007; Reischer *et al.* 2007), ruminant-specific (Layton *et al.* 2006; Reischer *et al.* 2006) and pig-specific (Okabe *et al.* 2007; Mieszkin *et al.* 2009) *Bacteroidales* markers. As preliminary assays in our laboratory with previously developed ruminant-specific *Bacteroidales* markers showed some lack of specificity on pig or human faecal samples from France with these primer sets, we decided to develop a new ruminant-specific marker. Furthermore, identification of partial *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from hosts in different locations is still needed to improve host-specific *Bacteroidales* PCR assays. Moreover there are few *Bacteroidales* sequences obtained from effluents or, particularly, from animal waste such as slurries or manure, available in databases. Designing host-specific markers based on sequences obtained from this kind of sample should improve the efficiency of 16S rRNA genetic markers for identifying faecal contamination in the environment.

The aims of this study were (i) to determine host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequence distribution with sequences isolated from wastewater treatment plants (WWTP) water, bovine manure and pig slurry samples, and from human, bovine, pig and wild bird faeces; (ii) to design new primers and a probe to quantify the ruminant-specific *Bacteroidales*

16S rRNA gene by TaqMan® analysis; and (iii) to validate this marker on samples of runoff water impacted by bovine manure.

To our knowledge, this is the first study on the distribution of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences that focuses on sewage and animal waste samples.

## MATERIALS AND METHODS

### *Sample collection*

To consider *Bacteroidales* from human and animal sources at the individual and population level, a total of 82 faeces and 52 effluent samples were collected from August 2004 to April 2008 in France.

### **Faecal samples**

Human faeces were obtained from 17 healthy adult and child volunteers from Brittany. Animal faeces were collected immediately after excretion from apparently healthy animals (19 cows, 10 sheep, 10 horses, 16 pigs, and 10 wild birds). Cow faeces were sampled from animals kept on pasture or housed in stalls on 6 farms in Brittany and Normandy. Sheep faeces were collected from one farm in Brittany and from salt meadows on two farms in Normandy. Horse faeces were collected from stud farms in Brittany and Pays de la Loire. Pig faeces were collected from sows, adult males, young pigs and piglets mainly housed in stalls on 7 farms in Brittany. Wild bird faeces were collected mainly from seagulls, gulls, Eurasian widgeon, and brent goose on two beaches in Brittany.

### **Effluent and water samples**

Ten WWTP water samples were collected at the outlets of 10 independent municipal WWTP not connected to slaughterhouses, in Brittany, Normandy and Pays de la Loire. Twenty bovine manure and 10 pig slurry samples were collected from 11 independent farms in Brittany.

For the run-off experiments, bovine manure with a concentration of 30 t per ha was spread on experimental arable land (75 cm by 150 cm). Runoff water samples were collected after 15 and 120 min of rainfall simulations with a rainfall intensity ranging from 50 to 55 mm per hour, corresponding to a storm event. A total of 12 field runoff water samples were collected, either previously spread with bovine manure (6 samples) or left as an untreated control (6 samples). Rain was simulated by watering with deep well water used, which was also sampled for testing.

All samples were placed in sterile containers and transported to the laboratory in insulated coolers. Faeces and bovine manure samples were aliquoted and cells from water and effluent samples were captured on filters upon arrival at the laboratory. All the samples were then stored at -20°C until analysis.

### *Sample preparation and DNA extraction*

For faeces and bovine manure samples, DNA was extracted from 250 mg wet weight of sample using the Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedical, Illkirsh, France), according to Dick *et al.* (2005). Pig slurry and runoff water samples (50 ml) were centrifuged at 9000 × g for 15 minutes and DNA extracted from 250 mg of the pellet using the Fast DNA Spin Kit for Soil. For WWTP water samples, 20-100 ml were filtered through 0.22 µm Nuclepore membrane filters (Whatman, Boumath, France), respectively. Filters were then placed in 0.5 ml of GITC buffer (5 M guanidine isothiocyanate, 100 mM EDTA [pH = 8.0], 0.5% Sarkosyl) and kept frozen at -20°C until extraction (Dick and Field 2004). DNA was then extracted using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) as described in Dick and Field (2004).

### *PCR and 16S rRNA gene library construction*

The primers Bac32F and Bac708R (Bernhard and Field, 2000b) were used to selectively amplify *Bacteroidales* 16S rRNA genes from DNA extracted from  $n=10$  samples each of

human, porcine, bovine and wild bird faeces; WWTP water, pig slurry and bovine manure. Two microlitres of DNA extracts were added to a 40 µl-reaction mixture containing 1X PCR buffer (Roche Diagnostics, Meylan, France), 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate, 0.5 µM of each primer, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 1U Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics). Reactions were carried out for 30 cycles of 94 °C for 30 s, 61 °C for 30 s and 72 °C for 30 s in a Peltier Thermal Cycler (PTC 200; MJ Research, Waltham, MA, USA), apart from the DNA from wild bird faeces. To obtain enough PCR products from wild bird faeces, 40 cycles of amplification were needed. Positive (DNA from faeces previously found positive) and negative (water) controls were included in each experiment. PCR products obtained from each library, which were then pooled to obtain seven clone libraries, were gel purified (Nusieve GTG agarose 2%; BMA, Rockland, USA) using the QiaQuick gel purification kit (Qiagen, France). Libraries were cloned into the pCR2.1 vector using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The vectors were transformed into chemically competent *Escherichia coli* (*E. coli*) cells (One Shot TOP10F; Invitrogen). Ninety-six transformants from each host-specific library were randomly picked on Luria-Bertani (LB) agar plates and used to inoculate 96-well culture plates (Deep-Well; Millipore) containing one ml LB 2X broth with ampicillin (50 µg ml<sup>-1</sup>). Culture plates were incubated at 37°C for 24 h with shaking (130 rpm). After centrifugation, they were stored at -20°C until the plasmid purification step, performed with the Plasmid Miniprep 96 Kit (Millipore), the inserts were then sequenced.

### ***Sequencing and phylogenetic analysis***

Sequencing was performed on an ABI PRISM 9700 capillary sequencer using the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle sequencing kit with M13-f and M13-r primers, as described by the manufacturer (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Sequences were edited using BioEdit (Hall, 1999). DNA sequences (approximately 690 bp) were processed using MALLARD software (Ashelford *et al.* 2006) to eliminate chimeric sequences. Sequences were aligned using MAFFT (version 5) and the distance matrix calculated using DNADIST (version 3.5c). This matrix was used with DOTUR software (Shloss and Handelsman 2005) to assign sequences to operational taxonomic units (OTUs). OTUs were defined by assigning 16S rRNA gene sequences of >98% identity to the same species. Representative OTU sequences were retrieved rationally with the pipeline application RapidOTU (Legrand *et al.* 2008) and were compared with the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using BLAST. Sixty-five uncultured *Bacteroidales* sequences isolated from human and animal effluent sources (bovine manure, pig slurry and sewage) from the GenBank database were added. Multiple alignments were performed with CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1997). A phylogenetic tree was constructed using PHYLO-WIN (Galtier *et al.* 1996). The root was determined using the 16S rRNA gene sequence of *Cytophaga fermentans* (M58766) as an outgroup. Distance trees were constructed using Neighbour-Joining algorithms (Saitou and Nei 1987) with the Kimura two-parameter correction (Kimura 1980). The statistical significance of tree branches was evaluated by bootstrap analysis using 500 resamplings.

### ***Oligonucleotide primers and probes***

The ruminant-specific *Bacteroidales* primers and probe (Rum-2-Bac) was designed from multiple alignments of partial *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences obtained in this study (Table 1). The primers and probe All-*Bacteroidales* (AllBac) from Layton *et al.* (2006) was used to amplify total *Bacteroidales* 16S rRNA genes. Oligonucleotide specificity for ruminant-associated *Bacteroidales* 16S rRNA genes was verified using the BLAST (NCBI) and Probe Match (Ribosomal Database Project: RDP II) programs.

**Table 1: Oligonucleotide sequences and amplification conditions for conventional and real-time PCR assays**

Primers and Probes	Primer and probe sequence (5'→3') <sup>a</sup>	Size of amplicon (bp)	Annealing Temp. (°C)	Final concentration (nmol)	Target	Reference
Bac32F Bac708R	AACGCTAGCTACAGGCTT CAATCGGAGTTCTTCGTG	690	60	500 500	All <i>Bacteroidales</i>	Bernhard and Field 2000a
<u>AllBac</u> AllBac296F AllBac467R AllBac375Bhqr	GAGAGGAAGGTCCCCAC CGCTACTTGGCTGGTTCAG (FAM)CCATTGACCAATATTCCTCA CTGCTGCT(BHQ-1)	106	60	200 200 100	All <i>Bacteroidales</i>	Layton <i>et al.</i> 2006
<u>Rum-2-Bac</u> BacB2-590F Bac708Rm BacB2-626P	ACAGCCCGGATTGATACTGGTAA CAATCGGAGTTCTTCGTGAT (FAM)ATGAGGTGGATGGAATTCG TGGTGT(BHQ-1)	99	60	200 200 200	Ruminant-specific <i>Bacteroidales</i>	This study

<sup>a</sup>FAM, 6-carboxyfluorescein; BHQ-1, black hole quencher 1

### Real-time PCR assays

All real-time PCR were performed using the TaqMan<sup>®</sup> Brilliant II QPCR Master Mix kit (Stratagene). Amplifications were performed using a Stratagene MX 3000 P with software version 4. Each reaction was run in duplicate with the following cycle conditions: 1 cycle at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min. TaqMan reactions were carried out in a final volume of 25 µl with appropriate final concentrations of the primers and probe (Table 1).

The presence/absence of PCR inhibitors was verified using an Internal Positive Control (IPC; Applied Biosystems, France). Samples were diluted if inhibitors were present. Negative controls (no template DNA) were performed in triplicate for each run.

The sensitivity and the specificity of the ruminant-specific *Bacteroidales* marker (Rum-2-Bac) was tested on target DNA ( $n=30$ ) represented by bovine and sheep faeces and by bovine manure samples and non target DNA ( $n=40$ ) represented by human, pig, horse and wild bird faeces and by pig slurry samples.

### DNA standard curves and quantification

Linear plasmid DNA used to generate standard curves was extracted with the QIAquick Miniprep Extraction Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. The linear forms of bovine plasmid were obtained with NotI enzyme (Roche Diagnostics) in a final volume of 50 µl for 3 h at 37°C. For the quantification of *Bacteroidales* markers, standard curves were generated from serial dilutions of a known concentration of plasmid DNA. Standard curves were generated by plotting threshold cycles (Ct) against 16S rRNA gene copy numbers.

For Rum-2-Bac and AllBac, bovine plasmid DNA containing partial 16S rRNA, gene sequence inserts were used as standards at 10-fold dilutions ranging from  $1.6 \times 10^7$  to  $1.6 \times 10^0$  copies per real-time PCR, with a quantification limit of 1.6 target copies per reaction.

Consequently, the lower quantification limit of both the ruminant-specific *Bacteroidales* and All-*Bacteroidales* markers was 4.5 log<sub>10</sub> copies per g in faeces. For the runoff experiments, the lower quantification limit of the markers was 2.9 log<sub>10</sub> copies per millilitre.

### Data treatment

The results of general and ruminant-specific *Bacteroidales* marker quantifications were expressed in 16S rRNA gene copies per g of faeces or bovine manure and per ml of runoff water.

To evaluate the performance of the ruminant-specific marker on faecal samples, sensitivity ( $r$ ) and specificity ( $s$ ) were defined as  $r = a/(a+c)$  and  $s = d/(b+d)$ , where  $a$  is the number of faecal samples that were positive for the marker of their own species (true positive);  $b$  is the number

of faecal samples that were positive for a marker of another species (false positive); c, is the number of faecal samples that were negative for a marker of their own species (false negative); and d is the number of faecal samples that were negative for a marker of another species (true negative) (Fisher and Van Bell 1993).

***Nucleotide sequence accession numbers***

Sequence data used in this study has been submitted to the GenBank database under numbers EU797125 to EU797175 and EU913511 to EU913643.

## RESULTS

### *Sequence and phylogenetic analysis*

From a total of 672 clones sequenced from the seven clone libraries, 594 partial *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences were obtained. One hundred and seventeen sequences were identified as potentially chimeric and were removed from the phylogenetic analysis. The final analysis contained 477 unambiguous sequences corresponding to 185 OTUs (Table 2).

### **Analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA genes from human and animal effluent and faeces samples**

Table 2 presents the number of sequences and OTUs, obtained from each type of faeces or effluent sample, shown the similarities of the OTUs to sequences from the NCBI database. Pig faeces and slurry are different from the other samples, as their *Bacteroidales* were predominantly *Prevotella*-like rather than *Bacteroides*-like.

Finally, most of the OTUs isolated from a host were similar to sequences isolated from the same origin found in the Genbank database. For example, of the 27 OTUs isolated from pig faeces, 60% were closest to sequences from Genbank database isolated from pig sources whereas 26% were closest to sequences from human sources.

### **Distribution of *Bacteroidales* 16S rRNA OTUs in host-specific clusters and design of ruminant-specific *Bacteroidales* marker**

Phylogenetic analysis of the *Bacteroidales* OTUs identified in this study and the *Bacteroidales* sequences isolated from human and animal effluents from the Genbank database showed six main distinct host-specific clusters with sequences from both effluent and faeces samples (Fig. 1). Several clusters containing sequences from multiple faecal sources were also identified in the phylogenetic tree.

For reasons of clarity of presentation, only 22 and 17 OTUs from bovine and pig faeces, respectively, were included in the phylogenetic tree.

Two human-specific clusters were distinguished, HUMAN I and II, which contained 12 and 5 OTUs, respectively. The HUMAN I cluster contained the 'Fhc 10' OTU, which was 99% identical to *Bacteroides thetaiotaomicron* (AE015928), and the 'Fhc17' and 'STEPc48' OTUs, which were 99% identical to *Bacteroides ovatus* (AY652736, EU722734 and DQ100446). The HUMAN II cluster contained the OTUs 'Fhc31' and 'STEPc77', which were 100% identical to cultured *Bacteroides vulgatus* (EU728705, and EU136687 and CP000139, respectively). The 'Fhc11' and 'STEPc81' OTUs were 100% and 99% identical to cultured bacteria *Bacteroides dorei* (EU722737), respectively, and 99% identical to the clones 'HF145' and 'HF8' (Bernhard and Field 2000a; AF233408 and AF233411), respectively. This cluster also contained four sequences isolated from human sewage samples (EU573838, EU573839, EU573847 and EU573852).

One pig-specific cluster was identified: PIG. This cluster contained 10 OTUs, of which OTU 'Fpc8' was 99% identical to the clone 'PigC1' (AY695691) described by Dick *et al.* (2005). The OTUs 'Fpc35' and 'Fpc3' were closer to clones 'P93' (AB237869) and 'P80' (AB237867) obtained by Okabe *et al.* (2007) (96% and 94% identity, respectively). This cluster also contained three sequences isolated from aerated pig manure slurry samples (AB331475, AB331465 and AB331464).

Only one cluster was identified for wild bird *Bacteroidales* OTUs, WILD BIRD, which contained seven OTUs.

**Table 2: Distribution and characterization of *Bacteroidales* operational taxonomic units (OTUs) from French samples of faeces and effluents**

Types of samples	Main host-sources of the samples	Seq* (n)	OTUs (n)	% of OTU with <98% identity to GenBank sequences	Bacteroides- or Prevotella-like† (%)	Host-sources of sequences from GenBank‡ closest to OTUs with 100% identity	References
<b>Faeces</b>	<b>Human</b>	73	16	94	<i>Bacteroides</i> (94)	82% Human; 12.5% Turkey	Eckburg <i>et al.</i> 2005; Manichanh <i>et al.</i> 2008; Scupham 2007
	<b>Bovine</b>	75	37	58	<i>Bacteroides</i> (89)	92% Ruminant; 8% Environmental	Dick <i>et al.</i> 2005; Layton <i>et al.</i> 2006; Bernhard and Field 2000a
	<b>Pig</b>	63	27	33	<i>Prevotella</i> (85)	60% Pig; 26% Human	Leser <i>et al.</i> 2002; Dick <i>et al.</i> 2005; Eckburg <i>et al.</i> 2005
	<b>Wild bird</b>	61	15	45	<i>Bacteroides</i> (87)	40% Chicken; 33% Human; 13% Horse; 13% Environmental	Layton <i>et al.</i> 2006; Scupham 2007; Eckburg <i>et al.</i> 2005; Simpson <i>et al.</i> 2004; Lamendella <i>et al.</i> 2007
<b>Effluents</b>	<b>WWTP waters</b>	68	30	70	<i>Bacteroides</i> (67)	57% Human; 27% Ruminant; 10% Dog	Ley <i>et al.</i> 2006; Li <i>et al.</i> 2008 Ley <i>et al.</i> 2008; Layton <i>et al.</i> 2006
	<b>Bovine manure</b>	79	36	57	<i>Bacteroides</i> (92)	78% Ruminant; 22% Environmental	Layton <i>et al.</i> 2006; Ueki <i>et al.</i> 2008
	<b>Pig slurry</b>	58	24	60	<i>Prevotella</i> (55)	55% Pig; 13% Environmental	Leser <i>et al.</i> 2002; Dick <i>et al.</i> 2005; Eckburg <i>et al.</i> 2005; Okabe <i>et al.</i> 2007
<b>Total</b>		477	185				

WWTP: Wastewater Treatment Plant

\*Seq: unambiguous sequences

†From RDPII (>98% identity)

‡From NCBI with Blast program

Two bovine-specific clusters were isolated, BOVINE I and II, which contained 10 and 24 OTUs, respectively. The BOVINE I cluster contained one sequence isolated from a continuously stirred tank reactor of bovine waste samples (EU551115). The BOVINE II cluster contained 1 OTU, 'Fbc86', which was 97% identical to the clone 'CF123' (Bernhard and Field 2000a; AF233400). This cluster was used to design a ruminant-associated real-time PCR assay that we named Rum-2-Bac. To validate this PCR assay, oligonucleotide specificity for ruminant-associated *Bacteroidales* 16S rRNA genes were tested *in silico* using the BLAST (NCBI) and Probe Match (RDP II) programs. The primer BacB2-590F and the probe BacB2-626P were found highly specific to ruminant source.

**Figure 1: Phylogenetic relationships of 185 operational taxonomic units from partial *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences isolated from effluent samples (WWTP water, STEPc; bovine manure, Fubc; and pig slurry, Lpc) and faeces (human, Fhc; bovine, Fbc; wild bird, Foc; and pig, Fpc). The scale bar represents 2.8% sequence divergence. Bootstrap values were calculated with 500 resamplings, and values below 75% were omitted. The 16S rRNA gene sequence from *Cytophaga fermentans* (M58766) was used as an outgroup for rooting the tree. Uncultured *Bacteroidales* isolated from faecal and effluent origin and sequences of cultivated and described *Bacteroides* and *Prevotella* species obtained from GenBank were also included**



***Determination of faecal concentration of general and ruminant-specific *Bacteroidales* markers in effluent and faeces***

Table 3 presents the percentage of positive results and average concentrations of ruminant-specific and general *Bacteroidales* markers in human and animal faeces and bovine manure.

The Rum-2-Bac marker showed 97% sensitivity ( $n=30$ ) and 100% specificity ( $n=40$ ). Average concentrations of the Rum-2-Bac marker obtained on bovine and sheep faeces were similar ( $8.2 \pm 0.5$  and  $8.4 \pm 1.3 \log_{10}$  copies per g, respectively) whereas in bovine manure, average concentration was lower with  $7 \pm 0.5 \log_{10}$  copies per g. No amplification was observed with DNA from human, horse, pig and wild bird faeces samples.

The average concentrations of the All-*Bacteroidales* marker in faeces samples ranged between  $5.3 \pm 1.1 \log_{10}$  copies per g in wild bird faeces to  $10.2 \pm 0.5 \log_{10}$  copies per g in human faeces. Furthermore, for one faeces sample from a seagull, no amplification was obtained. For bovine manure samples, average concentrations of the All-*Bacteroidales* marker were  $9.6 \pm 0.3 \log_{10}$  copies per g (Table 3).

**Table 3: Quantification of All-*Bacteroidales* (AllBac) and ruminant-specific markers in faecal and effluent samples; percentage of positive samples and concentrations**

Samples	AllBac		Rum-2-Bac	
	Positive samples (%)	Concentration*	Positive samples (%)	Concentration
<b>Bovine faeces (<math>n=10</math>)</b>	100	$9.8 \pm 0.2$	100	$8.2 \pm 0.5$
<b>Sheep faeces (<math>n=10</math>)</b>	100	$9.8 \pm 0.9$	100	$8.4 \pm 1.3$
<b>Horse faeces (<math>n=10</math>)</b>	100	$8.8 \pm 0.3$	0	<4.5
<b>Pig faeces (<math>n=10</math>)</b>	100	$10.1 \pm 0.8$	0	<4.5
<b>Human faeces (<math>n=10</math>)</b>	100	$10.2 \pm 0.5$	0	<4.5
<b>Wild bird faeces (<math>n=10</math>)</b>	90	$5.3 \pm 1.1$	0	<4.5
<b>Bovine manure (<math>n=10</math>)</b>	100	$9.6 \pm 0.3$	90	$7 \pm 0.5$

\* Concentrations are expressed in  $\log_{10}$  copies per gram in faeces and bovine manure samples

***Application of general and ruminant-specific *Bacteroidales* markers in runoff waters impacted by bovine manure***

Run-off experiments were performed in order to test the capacity of the ruminant-specific marker to be detected after storm events in run-off waters from arable land where bovine manure had previously been spread. The ruminant-specific and general *Bacteroidales* markers were quantified in runoff waters impacted by bovine manure, with mean estimated concentrations of  $5.1 \pm 0.3$  and  $7.1 \pm 0.5 \log_{10}$  copies per ml of water, respectively. In the control runoff water, all the results with the Rum-2-Bac and AllBac markers were below the quantification limit ( $2.9 \log_{10}$  copies per mlilitre).

## DISCUSSION

Coastal waters and rivers can be contaminated in multiple ways, especially by human sources, farm animals and wildlife (Griffin *et al.* 2001; Shanks *et al.* 2006; Savichtcheva *et al.* 2007). While wild bird droppings from roosting seagulls and faeces from pastured cattle have been described as potential sources of faecal pollution, municipal wastewater effluents and bovine or pig slurry manure spreading on arable land are also known to be also important sources of faecal contamination (Griffin *et al.* 2001; Savichtcheva *et al.* 2007; Lu *et al.* 2008). *Bacteroidales* have previously been noted to have several desirable characteristics as faecal source identifiers, including the possibility of quantitative assessment, broad geographic stability and broad distribution in target host animals (USEPA, 2005).

Our work has provided interesting data on *Bacteroidales* 16S rRNA gene diversity among different hosts, by identifying 185 OTUs and six host-specific clusters (two for human, two for bovine, one for pig and one for wild bird). Interestingly, all human-, bovine- and pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequence clusters identified contained sequences from both effluents and faeces. These results suggest that i) some host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences identified in faeces could still be present in effluents (Peu *et al.* 2006) and ii) they could persist in the environment, even after a passage through the sewage network, or storage/treatment of these wastes (Kreader, 1998; Peu *et al.* 2006; Okabe and Shimazu 2007).

Most *Bacteroidales* OTUs identified were not closely related to cultured bacteria species, indicating a high level of (as yet uncultured) diversity, as observed by Dick *et al.* (2005), Layton *et al.* (2006) and Okabe *et al.* (2007). In contrast, some OTUs from humans were found to be >99% identical to sequences of cultured *Bacteroides*, as in Dick *et al.* (2005). However, as *Bacteroides*-related sequences from bird, cat and dog faeces were also closely related to these sequences, cultured *Bacteroidales* do not seem to be efficient MST targets.

Compared to high number of 16S rRNA gene sequences isolated from faeces samples in the database, there are few *Bacteroidales* sequences isolated from effluent samples and still fewer derived from animal wastes (Whitehead *et al.* 2005; Shipin *et al.* 2007; Ueki *et al.* 2008; Hanajima *et al.* 2009). Phylogenetic analysis with effluent sequences from this study and database supported the host specificity of the clusters. Furthermore, some of the sequences found to be host-specific in this study were also found specific to the same host in geographic areas other than France, such as the United States or Japan (Bernhard and Field 2000b; Okabe *et al.* 2007). For example, the HUMAN II cluster contained four sequences, present in the Genbank database, that had been isolated from sewage in Ireland, and the clones 'HF8' and 'HF145', isolated in the United States, that were used to design the human-specific HF 183 marker (Bernhard and Field 2000b; Seurinck *et al.* 2005). The PIG cluster contained sequences that were used to design the pig-specific markers in the studies of Okabe *et al.* (2007) and Mieszkin *et al.* (2009).

These results suggest the existence of host-specific *Bacteroidales* sequences with a broad geographic distribution. One explanation for the presence of host-specific *Bacteroidales* could be the differences in digestive tract physiology and diet of humans and animal species, rather than the physiology of these hosts (Dick *et al.* 2005).

This study also provided data on the presence of *Bacteroidales* in different faecal samples. Indeed, all samples tested were found to contain *Bacteroidales*, and quantitative results were obtained on these samples (except for one seagull faeces sample) by performing All-*Bacteroidales* real-time PCR assays. All-*Bacteroidales* marker concentrations were similar in bovine faeces and manure and in horse, sheep, pig and human faeces whereas lower concentrations were obtained in wild bird faeces. A lower level of *Bacteroidales* in wild bird samples than in other origin faeces has already been observed in previous studies. For

example, no positive results on wild bird faeces by conventional PCR assay were observed by Fogarty and Voytek (2005). Furthermore, Lu *et al.* (2003; 2008) by phylogenetic analysis of faecal flora, demonstrated that *Bacteroidales* are poorly represented in avian faeces (about 1%), while *Lactobacillaceae* (70%) and *Clostridiaceae* (11%) are dominant.

The ruminant-specific marker (Rum-2-Bac), which we developed from the bovine-specific cluster Bovine II, was quantified in bovine and ovine faecal samples suggesting that this marker could be used to detect bovine and sheep faecal contamination that arises in the coastal environment due to grazing alongside rivers and on salt meadows. This marker represents 1-5% of the total *Bacteroidales* populations in bovine and sheep feces samples. These results are similar of those that we obtained for the human-specific *Bacteroidales* marker developed by Seurinck *et al.* (2005) and for the two pig-specific *Bacteroidales* markers developed by Mieszkin *et al.* (2009). Furthermore, the high Rum-2-Bac marker concentrations obtained in all bovine manure samples showed that this marker is reliable for investigating faecal pollution from bovine manure spread on arable land. Indeed, this marker was detected and quantified in water samples impacted by bovine manure (concentration 30 t ha<sup>-1</sup>) during runoff simulations with a rain intensity corresponding to a storm event.

The Rum-2-Bac marker was not amplified in horse faeces suggesting that this marker is able to discriminate between horse and cattle faecal pollution.

The design of a new ruminant-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene marker to discriminate ruminant faecal contaminations from other faecal sources represents an efficient tool for a microbial source tracking toolbox to improve and monitor water quality in watersheds and coastal areas impacted by faecal pollution.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly supported by the French agency AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). Sequencing was performed at Ouest-Génopole platform. We thank Dr A. Jaffrezic for the experimental runoff simulations and S. Lozach and P. Bodenes for technical assistance. S. Mieszkina was supported by a grant from Ifremer and Région Bretagne.

## REFERENCES

- Agreste Scees (2007) Statistique agricole annuelle: Résultats 2006. *Chiffres et données Agriculture*, no. 191.
- Allsop, K. and Stickler, D. J. (1985) An assessment of *Bacteroides fragilis* group organisms as indicators of human faecal pollution. *J Appl Bacteriol* 58, 95-99.
- Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J. and Weightman, A. J. (2006) New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol* 72, 5734-5741.
- Bernhard, A. E. and Field, K. G. (2000a) Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl Environ Microbiol* 66, 1587-1594.
- Bernhard, A. E. and Field K. G. (2000b) A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 66, 4571-457.
- Dick, L. K., Bernhard, A. E., Brodeur, T. J., Santo Domingo, J. W., Simpson, J. M., Walters, S. P. and Field, K. G. (2005) Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl Environ Microbiol* 71, 3184-3191.
- Dick, L. K., and Field, K. G. (2004) Rapid estimation of numbers of fecal *Bacteroidales* by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 70, 5695-5697.
- Dorfman, M. and Sinclair Rosselot, K. (2008) Testing the waters 2008: A guide to water quality testing at vacation beaches. Washington D.C., Natural Resources Defense Council.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E. and Relman D. A. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-1638.
- Feldhusen, F. (2000) The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect* 2, 1651-1660.
- Fiksdal, L., Maki, J. S., LaCroix, S. J. and Staley, J. T. (1985) Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl Environ Microbiol* 49, 148-150.
- Fisher, L. D. and Van Belle, G. (1993) Biostatistics: a methodology for health sciences. Wiley, New York, NY.
- Fogarty, L. R. and Voytek, M. A. (2005) Comparison of *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species. *Appl Environ Microbiol* 71, 5999-6007.
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12, 543-548.
- Glassmeyer, S. T., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Cahill, J. D., Zaugg, S. D., Werner, S. L., Meyer, M. T. and Kryak, D. D. (2005). Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5157-5169.
- Gourmelon, M., Montet, M. P., Lozach, S., Le Menec, C., Pommepuy, M., Beutin, L. and Vernozy-Rozand, C. (2006) First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J Appl Microbiol* 100, 85-97.
- Griffin, D. W., Lipp, E. K., McLaughlin, M. R. and Rose, J. B. (2001) Marine recreation and public health microbiology: quest for the ideal indicator. *Bioscience* 51, 817-825.

- Hall, T. A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Hanajima, D., Haruta, S., Hori, T., Ishii, M., Haga, K. and Igarashi, Y. (2009) Bacterial community dynamics during reduction of odorous compounds in aerated pig manure slurry. *J Appl Microbiol* 106, 118-129.
- Hubbard, R. K., Newton, G. L. and Olson, B. H. (2004) Water quality and the grazing animal. *J Anim Sci.* 82, E255-E263.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. and Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucl Acido Res* 30, 3059–3066.
- Kildare, B.J., Leutenegger, C.M., McSwain, B.S., Bambic, D.G., Rajal, V.B. and Wuertz, S. (2007) 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: a Bayesian approach. *Water Res* 41, 3701–3715.
- Kimura, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.
- Kreder, C. A. (1995) Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. *Appl Environ Microbiol* 61, 1171-1179.
- Kreder, C. A. (1998) Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water. *Appl Environ Microbiol* 64, 4103-4105.
- Lamendella, R., Domingo, J. W., Oerther, D. B., Vogel, J. R. and Stoeckel, D. M. (2007) Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of *Bacteroidetes* 16S rRNA gene. *FEMS Microbiol Ecol.* 59, 651-600.
- Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R. and Sayler, G. (2006) Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-Based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol* 72, 4214-4224.
- Legrand, L., Tap, J., Gauthey, C., Doré, J., Caron, C. and Leclerc, M. (2008) RapidOTU: a fast pipeline to analyse 16S rRNA sequences by alignment or tetranucleotide frequency. *Proc. Gut Microbiome Symp. 2008 6<sup>th</sup> Congr.* Clermont-Ferrand, France: INRA Rowett Res. Inst., poster 26, p. 35.
- Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M. and Moller, K. (2002) Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 68, 673-690.
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R. and Gordon, J. I. (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320, 1647-1651.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. and Gordon, J. I. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.
- Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., Zhang, Y., Shen, J., Pang, X., Zhang, M., Wei, H., Chen, Y., Lu, H., Zuo, J., Su, M., Qiu, Y., Jia, W., Xiao, C., Smith, L. M., Yang, S., Holmes, E., Tang, H., Zhao, G., Nicholson, J. K., Li, L. and Zhao, L. (2008) Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 2117-2122.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer J. and Lee, M. D. (2003) Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 69, 6816-6824.
- Lu, J., Santo Domingo, J. W., Lamandella, R., Edge, T. and Hill, S. (2008) Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in Gull feces. *Appl Environ Microbiol* 74, 3969-3976.
- Manichanh, C., Chapple, C. E., Frangeul, L., Gloux, K., Guigo, R. and Dore, J. (2008) A comparison of random sequence reads versus 16S rDNA sequences for estimating the biodiversity of a metagenomic library. *Nucleic Acids Res* 36, 5180-5188.
- Marvin, C., Coakley, J., Mayer, T., Brown, M. and Thiessen, L. (2001) Application of fecal sterol ratios in sediments and effluents as source tracers, *Water Qual Res J Can* 36, 781-792.
- Mieszkin, S., Furet, J. P., Corthier, G. and Gourmelon, M. (2009) Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 75, 3045-3054.

- Okabe, S., Okayama, N., Savichtcheva, O. and Ito, T. (2007) Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 890-901.
- Okabe, S. and Shimazu, Y. (2007) Persistence of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity. *Appl Microbiol Biotechnol* 76, 935-944.
- Parveen, S., Portier, K. M., Robinson, K. Edminston, L. and Tamplin, M. L. (1999) Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and non human sources of fecal pollution. *Appl Environ Microbiol* 65, 3142-3147.
- Peu, P., Brugère, H., Pourcher, A. M., Kérourédan, M., Godon, J. J., Delgenès, J. J. and Dabert, P. (2006) Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Appl Environ Microbiol* 72, 3578-3585.
- Rabinovici, S. J., Bernknopf, R. L., Wein, A. M., Coursey, D. L. and Whitman, R. L. (2004) Economic and health risk trade-offs of swim closures at a Lake Michigan beach. *Environ Sci Technol* 38, 2737-2745.
- Reischer, G. H., Casper, D. C., Steinborn, R., Mach, R. L. and Farnleitner, A. H. (2006) Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in Alpine karstic regions. *Appl Environ Microbiol* 72, 5610-5614.
- Reischer, G.H., Casper, D.C., Steinborn, R., Farnleitner, A.H. and Nach, R.L. (2007) A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. *Lett Appl Microbiol* 44, 351-356.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Savichtcheva, O., Okayama, N. and Okabe, S. (2007) Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Res* 41, 3615-3628.
- Scupham, A. J. (2007) Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiol Ecol* 60, 136-147.
- Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W. and Siciliano, S. D. (2005) Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ Microbiol* 7, 249-259.
- Shanks, O. C., Nietch, C., Simonich, M., Younger, M., Reynolds, D. and Field, K. G. (2006) Basin-wide analysis of the dynamics of fecal contamination and fecal source identification in Tillamook bay, Oregon. *Appl Environ Microbiol* 72, 5537-5546.
- Shipin, O. V., Lee, S. H., Chiemchaisri, C., Wiwattanakom, W., Ghosh, G. C., Anceno, A. J. and Stevens, W. F. (2007) Piggery wastewater treatment in a tropical climate: biological and chemical treatment options. *Environ Technol* 28, 329-337.
- Shloss P. D. and Handelsman, J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 71, 1501-1506.
- Simpson, J. M., Santo Domingo, J. W. and Reasoner, D. J. (2004) Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiol Ecol* 47, 65-75.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882.
- Ueki, A., Abe, K., Kaku, N., Watanabe, K. and Ueki, K. (2008) *Bacteroides propionicifaciens* sp. nov., isolated from rice-straw residue in a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 346-352.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). (2005) *Microbial Source Tracking Guide Document*. Washington, DC: EPA Office of Research and Development.
- Whitehead, T. R., Cotta, M. A., Collins, M. D., Falsen, E. and Lawson, P. A. (2005) *Bacteroides coprosuis* sp. nov., isolated from swine-manure storage pits. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2515-2518.

Wiggins, B. A. (1996) Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl Environ Microbiol* 62, 3997-4002.



## CHAPITRE II

---

**Estimation des contaminations fécales d'origine porcine dans des eaux de rivière d'un bassin versant en utilisant deux marqueurs *Bacteroidales* de contaminations porcines par PCR quantitative en temps réel**

-

**Résumé**

### CONTEXTE ET OBJECTIFS

Deux marqueurs de contamination fécale d'origine porcine ont été développés parallèlement au marqueur de contamination fécale par les ruminants (chapitre I). Une détection efficace et spécifique de la contamination fécale d'origine porcine revêt toute son importance en France, troisième producteur de porcs en Europe et plus particulièrement en Bretagne qui représente à elle seule plus de 56 % de la production porcine nationale. Cette forte activité d'élevage est donc susceptible de contaminer l'environnement par (i) les mauvaises pratiques d'épandage des lisiers et des composts sur les terres arables et les ruissellements par temps de pluie, (ii) les fuites et les débordements des cuves à lisier sur le siège d'exploitation, et (iii) l'utilisation des eaux de lagunage pour l'irrigation. A notre connaissance, il n'existe dans la littérature, que deux marqueurs porcs de qPCR, PigBac1 et PigBac2, utilisant la chimie sybrGreen® dont la spécificité n'avait été testée que sur très peu d'échantillons ( $n=11$ ) et qui ont conduit à des amplifications dans des ADN non cibles. (Okabe *et al.*, 2007).

Les objectifs de cette étude étaient (i) de développer à partir des séquences de l'analyse phylogénétique un ou des marqueurs *Bacteroidales* de qPCR ciblant les contaminations fécales porcines, (ii) de tester la sensibilité et la spécificité de ces marqueurs sur des ADN cibles issus de fèces et lisiers de porcs, de refus de centrifugation (fraction solide du lisier traitée par centrifugation) et d'eaux de lagunage et sur des ADN non cibles d'origine humaine et animale, et (iii) d'appliquer ces marqueurs sur des eaux de l'environnement pour évaluer le niveau de contaminations fécales porcines à l'échelle d'un bassin versant.

### METHODES

Les marqueurs porcs de qPCR TaqMan® ont été dessinés à partir de l'analyse phylogénétique réalisée dans le chapitre I et dans ce chapitre. De la même façon que pour le marqueur ruminant, la spécificité *in silico* des amorces et des sondes a été vérifiée et deux plasmides en vue de la quantification des marqueurs porcs ont été obtenus. La limite de détection pour les deux marqueurs porcs était de 1,6 copies dans le puits PCR.

Les sensibilités et spécificités de ces marqueurs ont été respectivement testées sur 69 ADN bactériens cibles issus d'une chaîne de traitement du lisier (fèces et lisiers de porcs, refus de centrifugation et eaux de lagunage) et sur 54 ADN bactériens non cibles (fèces humaines, bovines, ovines et équines).

Les deux marqueurs porcs ont ensuite été appliqués dans des eaux de rivière (14 sites ;  $n=24$ ) du bassin versant de Daoulas (Bretagne, Finistère) comportant des élevages porcins, bovins et aviaires, des zones urbaines et des zones conchylicoles classées en catégorie B. Six sites ont été sélectionnés pour leur proximité avec des élevages porcins, trois pour leur proximité avec des élevages bovins et cinq sites en zone urbaine en aval du bassin versant.

### RESULTATS

Les amorces et sondes TaqMan® des deux marqueurs *Bacteroidales* de qPCR ciblant les contaminations fécales porcines : Pig-1-Bac et Pig-2-Bac ont respectivement été dessinées à partir des groupes d'OTU nommés Cluster I et Cluster II (ou groupe d'OTU nommé PIG dans le chapitre D).

Testés sur des échantillons issus d'une chaîne du traitement des lisiers, des concentrations moyennes respectives des marqueurs Pig-1-Bac et Pig-2-Bac ont été déterminées à  $8,6 \pm 0,8$  et  $8,5 \pm 0,6$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/g de fèces de porcs, à  $6,8 \pm 0,9$  et  $6,9 \pm 0,7$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/100 ml de lisier, à  $4,4 \pm 0,4$  et  $4,6 \pm 0,4$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/100 ml d'eau de lagune et à  $5,3 \pm 0,5$  et  $5,3 \pm 0,6$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/g de refus de centrifugation. Aucune amplification n'a été observée avec des échantillons d'origine humaine, bovine, ovine et équine. D'une façon générale ces marqueurs ont montré 98 à 100 % de sensibilité et 100 % de spécificité.

Recherché dans des eaux de rivière du bassin versant de Daoulas, le marqueur Pig-1-Bac a été détecté dans 37,5 % des échantillons d'eau collectés près des élevages porcins et quantifié dans 25 % des échantillons ( $3,9$  à  $4$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/100 ml). Il a aussi été détecté dans 30 % des échantillons d'eaux collectés en aval du bassin versant et n'a pas été détecté dans les échantillons d'eaux collectés près des élevages de bovins. Le marqueur Pig-2-Bac a été détecté dans 87,5 % des échantillons d'eau collectés près des élevages porcins et quantifié dans 62,5 % ( $3,6$  à  $4,1$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/100 ml). Il a aussi été détecté dans 20 % des échantillons d'eaux collectés en aval du bassin versant et n'a pas été détecté dans des échantillons d'eaux collectés près des élevages de bovins.

### CONCLUSIONS

Comme pour le marqueur ruminant développé dans le chapitre précédent, les deux marqueurs porcs se sont révélés sensibles et spécifiques et leur application sur des échantillons de fèces, d'effluents et d'eaux de rivière a démontré qu'ils permettaient d'identifier et de quantifier les contaminations fécales porcines dans des échantillons

fortement (fèces et lisiers de porcs et refus de centrifugation) et faiblement contaminés (eaux de lagunage et eaux de rivière). Le marqueur Pig-2-Bac semble le plus adapté pour une plus large application au niveau du bassin versant de Daoulas car il a été plus fréquemment détecté que le marqueur Pig-1-Bac. Ce marqueur sera retenu pour identifier les contaminations fécales porcines dans les eaux de l'environnement et les coquillages dans la suite de cette étude.

**PUBLICATION II**

**Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by  
Real-Time PCR using two pig-specific *Bacteroidales*  
16S rRNA genetic markers**

**Sophie Mieszkin,<sup>1</sup> Jean-Pierre Furet,<sup>2</sup> Gérard Corthier<sup>2</sup> and Michèle Gourmelon,<sup>1</sup>**  
*Ifremer EMP, Laboratoire de Microbiologie, 29280 Plouzané, France<sup>1</sup> and Unité d'Ecologie  
et de Physiologie du Système Digestif (UEPSD), INRA, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France<sup>2</sup>*

**Applied and Environmental Microbiology (2009) 79 (10); 3045-3054**

### ABSTRACT

The microbiological quality of coastal or river water can be affected by fecal contamination from human or animal sources. To discriminate pig fecal pollution from other pollution, a library-independent Microbial Source Tracking (MST) method targeting *Bacteroidales* host-specific 16S rRNA gene markers by real-time PCR was designed. Two pig-specific *Bacteroidales* markers (Pig-1-Bac and Pig-2-Bac) were designed using 16S rRNA gene *Bacteroidales* clone libraries from pig feces and slurry. For these 2 pig markers, 98-100% sensitivity and 100% specificity were obtained when tested by TaqMan® real-time PCR. A decrease in the concentrations of Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers was observed throughout the slurry treatment chain. The two newly designed pig-specific *Bacteroidales* markers, plus the human-specific (HF183) and ruminant-specific (BacR) *Bacteroidales* markers were then applied to river water samples ( $n=24$ ), representing 14 different sites from the French Daoulas catchment (Brittany, France). Pig-1-Bac and Pig-2-Bac were quantified in 25% and 62.5% of samples collected around pig farms, respectively, with concentrations ranging from 3.6 to 4.1  $\log_{10}$  copies per 100 ml of water. They were detected in water samples collected downstream but never detected near cattle farms. HF183 was quantified in 90% of water samples collected downstream near Daoulas town with concentrations ranging between 3.6 and 4.4  $\log_{10}$  copies per 100 ml of water and BacR in all water samples collected around cattle farms with concentrations ranging between 4.6 and 6.0  $\log_{10}$  copies per 100 ml of water. This study highlights that pig fecal contamination was not as frequent as human or bovine contamination and that fecal pollution generally came from multiple origins. The two pig-specific *Bacteroidales* markers can be applied to environmental water to detect pig fecal pollution.

**Keywords:** Microbial Source Tracking, fecal contamination, 16S rRNA gene, Real-Time PCR, *Bacteroidales*, environmental water

## INTRODUCTION

Human and animal fecal pollution of coastal environments affects shellfish and recreational water quality and safety, in addition to causing economic losses from the closure of shellfish harvesting areas and from bathing restrictions (13, 19, 33). Human feces are known to contain human-specific enteric pathogens (3, 18, 28), but animals can also be reservoirs for numerous enteric human pathogens such as *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp, *Mycobacterium* spp or *Listeria* spp that may persist in the soil or surface waters (6, 8, 22, 24). Among animals, pigs are known to carry human pathogens that are excreted with fecal wastes. There are approximately 125 million pigs in the European Union (EU) and 114 million in North America (12, 36, 48), generating an estimated 100 and 91 million tons of pig slurry per year, respectively (4). France, the third largest pig producer in the EU, with about 23,000 farms, generates 8 to 10 million tons of pig slurry per year. Brittany accounts for 56.1% of the total national pig production on only 6% (27,200 km<sup>2</sup>) of the French territory though it has 40% (2,700 km) of the coast line. This production could contaminate the environment when tanks on farms overflow, when slurry or compost is spread onto soils or, to a lesser extent, when lagoon surface waters are used for irrigation (38, 47, 52).

Fecal contamination in shellfish-harvesting and bathing areas is currently evaluated by the detection and enumeration of culturable facultative-anaerobic bacteria, such as *E. coli*, enterococci or fecal coliforms (11) in shellfish and bathing waters (European Directives 2006/113/CE; 2006/7/CE). Pigs are among the potential sources of *E. coli* inputs to the environment; a pig produces approximately  $1 \times 10^7$  *E. coli* per gram of feces which corresponds to an *E. coli* flow rate per day that is 28 times higher than that of one human (16, 34, 55).

*E. coli* is not a good indicator of fecal sources of pollution in water because of its presence in both human and animal feces, therefore alternative fecal indicators must be used. Microbial Source Tracking methods (43) are being developed to discriminate between human and non-human sources of fecal contamination and to distinguish contamination from different animal species (17, 46, 54). Many of these methods are library-dependent, requiring a large number of isolates to be cultured and tested, which is time-consuming and labor intensive. For these reasons, library-independent methods are preferred for the detection of host-specific markers. The detection of host-specific *Bacteroidales* markers is a promising library-independent method and has been used for identifying contaminations from human and bovine origins (25, 29, 39, 40, 44). In this study, we selected *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers and real-time PCR to focus on fecal contamination from pigs. To date, only one pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene marker has been developed and used on water samples for the identification of pig fecal contamination by real-time PCR assay (SyberGreen®; 37). When this pig-specific *Bacteroidales* marker was tested on a small number of fecal samples ( $n=16$ ), it showed some cross-reaction with human and cow feces.

The present study investigated pig fecal contamination in a French catchment, the Daoulas estuary (Brittany), which has commercial and recreational shellfish harvesting areas and which is potentially subject to fecal contamination. The aims of the present study were: (i) to design new primers for detection and quantification of pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes by TaqMan® analysis; (ii) to validate the sensitivity and specificity of the new primers and TaqMan® assay using target (feces, slurry, compost and lagoon water samples) and non-target (human and other animal sources) DNA, respectively; and (iii) to evaluate the TaqMan® assay for proper detection and quantitative estimation of pig-associated fecal pollution. It represents the first application of pig-specific *Bacteroidales* markers using a TaqMan® assay in Europe and includes a monitoring study of marker levels throughout the various stages of slurry treatment.

## MATERIALS AND METHODS

### *Sample collection*

#### **Fecal samples**

Individual human and animal fecal samples were collected from April 2004 to March 2008. Human fecal samples were obtained from 24 healthy adult and child volunteers from Brittany (France). Animal fecal samples were collected immediately after excretion from apparently healthy animals (25 pigs, 10 cows, 10 sheep, and 10 horses). Pig fecal samples were collected from sows and male adults, young pigs and piglets, mainly housed in stalls on 15 farms in Brittany. Cow fecal samples were collected from animals kept on pasture or housed in stalls, and included samples from adults and heifers on six independent beef and dairy farms in Brittany and Normandy. Samples from sheep were collected from one farm in Brittany and from salt meadows on two farms in Normandy. Samples from horses were collected from stud farms in Brittany and Pays de la Loire.

#### **Pig effluent samples**

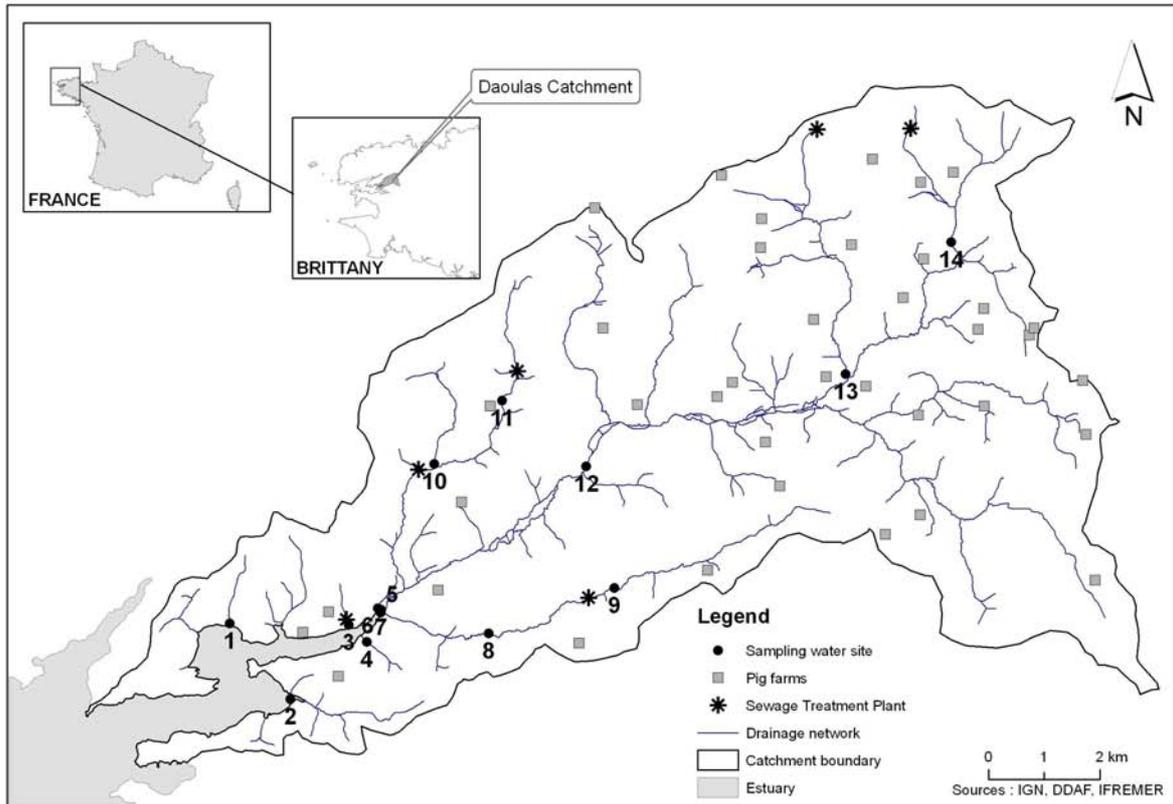
Twenty-three slurry and 14 lagoon surface water samples were collected from 14 and 9 independent farms, respectively, in Brittany during April and December 2007 and March 2008. Seven compost samples obtained by slurry centrifugation were also collected on one of these farms.

#### **Case study of the pig-specific markers through a slurry treatment process on a pig farm**

A pig farm that performs slurry treatment was also selected to evaluate the new pig markers during a slurry treatment process. This case illustrates the most frequent slurry treatment process used in Brittany. Indeed, 71% of farms in Brittany use this biologically activated sludge method to treat slurry effluents, while 17% use composting (32). In this case, the main farm collects and processes its own slurry, along with slurries from 4 other surrounding farms: corresponding to the wastes of approximately 800 sows in total. Mixed slurries are centrifuged as part of compost production (60 m<sup>3</sup> per day) and the resulting water is biologically treated through an activated sludge process. After decantation, surface water is stored in a lagoon basin (13,000 m<sup>3</sup>). A total of 5 pig fecal and 5 slurry samples (from the main farm and 2 surrounding farms), and 5 compost and 5 lagoon waters samples (from the main farm) were collected in March 2008.

#### **River water samples**

River water samples were collected on the catchment of the Daoulas estuary (Brittany) from January 2006 to January 2008 (Fig. 1). This catchment is located about 20 km south-east of Brest and covers 113 km<sup>2</sup>, with 90 km of river system. It is mainly characterised by intensive livestock farming (dairy cows [5,300], pigs [151,000] and poultry [782,000]) with the total number of human inhabitants in the catchment estimated at 15,000. The coastal shellfish harvesting areas are classified as B-category according to European legislation (European Directive 91/492/EEC). This means that the shellfish have been found to contain between 230 and 4,600 *E. coli* per 100 g of total flesh and must be depurated for  $\geq 48$ h in good quality water prior to sale. Twenty-four water samples were collected at 14 different sites. Six sites (2, 10, 11, 12, 13 and 14) were selected for their proximity to pig farming activities, 3 sites (1, 8, 9) for their proximity to cattle farming and 5 sites (3, 4, 5, 6, 7) downstream and near an urban area (Daoulas). Sites 1, 3, 8, 9, 11 and 13 were sampled twice while sites 5 and 6 were sampled three times. All samples were placed in sterile containers and transported in insulated coolers. Cells were captured on filters upon arrival to the laboratory and stored at -20°C.



**Figure 1:** Location of water sampling sites, pig farms and sewage treatment plants on the catchment and estuary of the Daoulas river, Brittany, France. Cattle farms are not shown

### ***Sample preparation and DNA extraction***

For water samples, approximately 200 ml were filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  Nuclepore membrane filters (Whatman, Schleicher and Schuell, Germany). Filters were then placed in 0.5 ml of GITC buffer (5 M guanidine isothiocyanate, 100 mM EDTA [pH = 8.0], 0.5% Sarkosyl) (8) and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until extraction. DNA was extracted using the DNeasy Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) with two modifications: the proteinase K step was omitted and 700  $\mu\text{l}$  of Qiagen Buffer AL were added to the filters after the GITC buffer (9).

For fecal and compost samples, DNA was extracted from 250 mg wet weight using the Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedical, Illkirsh, France), according to the supplier's instructions, with an additional wash using the SEWS-M reagent as suggested by Dick and Field (9). Pig slurry samples (50 ml) were centrifuged at  $9,000 \times g$  for 15 minutes. DNA was then extracted from 250 mg of the pellet using the Fast DNA Spin Kit for Soil.

### ***PCR and 16S rRNA gene library construction***

The primers Bac32F and Bac708R (Table 1) were used to selectively amplify *Bacteroidales* 16S rRNA genes from DNA extracts from 10 pig feces and 10 pig slurry samples. Reactions were performed in a Peltier Thermal Cycler (PTC 200; MJ Research, Waltham, MA, USA) for 30 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min,  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $61^{\circ}\text{C}$  for 30 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s. Final extension was carried out at  $72^{\circ}\text{C}$  for 7 min. PCR products from each library were pooled to obtain 2 different clone libraries (from pig feces and pig slurry). Pooled PCR products were gel purified (Nusieve GTG agarose 2%; BMA, Rockland, USA) using the QiaQuick gel purification kit (Qiagen, France). They were cloned into the pCR2.1 vector using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The vectors were transformed into chemically competent *E. coli* cells (One Shot TOP10F'; Invitrogen). Ninety-

six transformants were randomly picked on Luria-Bertani (LB) agar plates from each host-specific library and used to inoculate 96-well culture plates (Deep-Well; Millipore) containing 1 ml LB 2X broth with ampicillin ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Culture plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h with shaking (130 rpm). After centrifugation, they were stored at  $-20^\circ\text{C}$  prior to sequencing the inserts.

### ***Sequencing and phylogenetic analysis***

Sequencing was performed on an ABI PRISM 9700 capillary sequencer using the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle sequencing kit with M13-f and M13-r primers, as described by the manufacturer (Perkin–Elmer Applied Biosystems).

Sequences were edited using BioEdit (21). DNA sequences (approximately 690 bp) were processed using the MALLARD software (2) to eliminate chimeric sequences. Sequences were aligned using MAFFT (version 5) and the distance matrix calculated using the software DNADIST (version 3.5c). The distance matrix was used with DOTUR software (45) to assign sequences to operational taxonomic units (OTUs). OTUs were defined by assigning 16S rRNA gene sequences of  $>98\%$  identity to the same species. Representative OTU sequences were retrieved rationally with the pipeline RapidOTU (30, <http://genome.jouy.inra.fr/rapidotu/>) and compared with the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Multiple alignments were performed using CLUSTAL W (51). A phylogenetic tree was constructed using the PHYLO-WIN program (15). The root was determined using the 16S rRNA gene sequence of *Cytophaga fermentans* (GenBank accession number M58766) as an out-group. Distance trees were constructed using Neighbor-Joining algorithms (41) with the Kimura two-parameter correction (26). The statistical significance of tree branches was evaluated by bootstrap analysis using 500 resampling (branches with values of  $<70$  are not shown).

### ***Oligonucleotide primers and probes***

The primers and probe All-*Bacteria* (Bact2, modified from reference 50) and All-*Bacteroidales* (AllBac) from Layton *et al.* (29), were used to amplify total bacterial and total *Bacteroidales* 16S rRNA genes. Detection of human and ruminant-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers (HF183 and BacR) was performed with the primers and probe described by Seurinck *et al.* (44) and Reischer *et al.* (39), respectively (Table 1). Two pig-specific *Bacteroidales* primers and probe (Pig-1-Bac and Pig-2-Bac) were designed from multiple alignments of partial *Bacteroidales* 16S rRNA genes obtained in this study (Table 1). Oligonucleotide specificity for pig-associated *Bacteroidales* 16S rRNA genes was verified using the BLAST (NCBI) and the Probe Match (Ribosomal Database Project: RDP II) programs. The pig-specific *Bacteroidales* marker (Pig-Bac2) described by Okabe *et al.* (37) was also tested on target and non target DNA preparations and compared with the two pig-specific *Bacteroidales* designed in this study.

**Table 1: Oligonucleotide sequences for conventional and real-time PCR assays with the annealing temperature, the final concentration and the expected size for each amplified product**

Primers and Probes	Primer and probe sequence (5'→ 3') <sup>b</sup>	Size of amplicon (bp)	Annealing Temp.(°C)	Final concentration (nmol)	Target	Reference
Bac32F Bac708R	AACGCTAGCTACAGGCTT CAATCGGAGTCTTCGTG	690	60	500 500	All <i>Bacteroidales</i>	(5)
Bact2 <sup>a</sup> BACT1369F PROK1492R TM1389F	CGGTGAATACGTTCCCGG TACGGCTACCTTGTTACGACTT (FAM)CTTGTAACACCCGCCGTC(N FQ-MGB)	142	60	200 200 250	All <i>Bacteria</i>	(50)
AllBac AllBac296F AllBac467R AllBac375Bhqr	GAGAGGAAGGTCCCCAC CGCTACTGGCTGGTTCAG (FAM)CCATTGACCAATATTCCTCAC TGCTGCT(BHQ-1)	106	60	200 200 100	All <i>Bacteroidales</i>	(29)
HF183 HF183f HF183r	ATCATGAGTTCACATGTCCG TACCCCGCCTACTATCTAATG	83	60	200 200	Human <i>Bacteroidales</i>	(44)
BacR BacR_f BacR_r BacR_p	GCGTATCCAACCTTCCCG CATCCCCATCCGTTACCG (FAM)CTTCCGAAAGGGAGATT(NFQ- MGB)	100	60	100 200 200	Ruminant <i>Bacteroidales</i>	(39)
Pig-Bac2 qBac41F qPS183R	TACAGGCTTAACACATGCAAGTCG CTCATACGGTATTAATCCGCCTTT	145	60	300 300	Pig-specific <i>Bacteroidales</i>	(37)
Pig-1-Bac Pig-1-Bac32Fm Pig-1-Bac108R Pig-1-Bac44P	AACGCTAGCTACAGGCTTAAC CGGGCTATTCCTGACTATGGG (FAM)ATCGAAGCTTGCTTTGATAGA TGGCG(BHQ-1)	129	60	200 200 200	Pig-specific <i>Bacteroidales</i>	This study
Pig-2-Bac Pig-2-Bac41F Pig-2-Bac163Rm Pig-2Bac113MGB	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT ACCTCATACGGTATTAATCCGC (VIC)TCCACGGGATAGCC(NFQ-MGB)	116	60	300 300 200	Pig-specific <i>Bacteroidales</i>	This study

<sup>a</sup> Modified from reference (50), <sup>b</sup> FAM, 6-carboxyfluorescein; NFQ-MGB, nonfluorescent quencher group-minor groove binder; BHQ-1, black hole quencher 1

### Real-Time PCR assays

All real-time PCR were performed using the TaqMan<sup>®</sup> Brilliant QPCR Core reagent kit (Stratagene), except for the human-specific and the pig-specific markers defined by Okabe *et al.* (37) that used the Brilliant SYBR-Green<sup>®</sup> QPCR Master Mix (Stratagene).

Amplifications were performed using a Stratagene MX 3000 P with software version 4. Each reaction was run in duplicate with the following cycle conditions: 1 cycle at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min. For SYBR-Green<sup>®</sup> amplifications, a dissociation step was added to improve amplification specificity.

TaqMan and SYBR-Green<sup>®</sup> reactions were carried out in a final volume of 25 µl with appropriate final concentrations of primers and probe (Table 1).

The presence/absence of PCR inhibitors was verified using an Internal Positive Control (IPC; AppliedBiosystem, France). Samples were diluted if inhibitors were present. Negative controls (no template DNA) were performed in triplicate for each run.

Host-specific *Bacteroidales*, all-*Bacteroidales* and all-*Bacteria* markers were tested on all feces, pig waste effluent and river water samples.

### DNA standard curves and quantification

Linear plasmid DNA used to generate standard curves were extracted with the QIAquick Miniprep Extraction Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. The linear forms of pig, bovine and human plasmids were obtained with NotI enzyme (Roche Diagnostics) in a final volume of 50 µl for 3 h at 37°C. For the quantification of *Bacteroidales* markers, standard curves were generated from serial dilutions of a known concentration of plasmid

DNA. Standard curves were generated by plotting threshold cycles (Ct) against 16S rRNA copy numbers.

A PCR standard for the all-*Bacteria* marker was prepared using a 10-fold dilution of bacterial genomic DNA extracted from pure culture of *E. coli* with the Wizard genomic DNA purification Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The copy number of 16S rRNA/genome was considered to be 7 copies for the *E. coli* strain (27).

### ***Enumeration of E. coli***

*E. coli* was enumerated in a sub-set of the pig fecal samples, effluent samples and in all water samples from the Daoulas catchment by the microplate method (standard NF IN ISO 9308-3 [1]) with a detection limit of <10 Most Probable Number (MPN) per g for feces and compost and <15 MPN per 100 ml of water.

### ***Data treatment and statistical analyses***

The results of the general and host-specific marker quantifications were expressed in 16S rRNA gene copies per g or ml of feces, compost, slurry or water.

All statistical analyses were performed using STATISTICA version 6.1 (StatSoft; France). To evaluate the performance of the MST methods on fecal samples, sensitivity (r) and specificity (s) were defined as  $r = a/(a+c)$  and  $s = d/(b+d)$ , where a, when a fecal sample was positive for the marker of its own species (true positive); b, when a fecal sample was positive for a marker of another species (false positive); c, when a fecal sample was negative for a marker of its own species (false negative); d, when a fecal sample was negative for a marker of another species (true negative) (14). Fisher's exact test was used to verify if the observed differences in the frequency of detection of the various markers in their target or non target fecal samples were significantly different. Analysis of variance (ANOVA), followed by comparisons of means using Fisher's LSD test, was used to test for significant differences between the concentrations of the different markers at the same stage of slurry treatment and between the different stages of the slurry treatment ( $P < 0.05$ ). Linear regression analysis (analysis of the completed model) was used to verify if differences in concentration between *Bacteroidales* markers and *E. coli* concentrations were significant.

### ***Nucleotide sequence accession numbers***

Sequence data used in this study has been submitted to the GenBank database under numbers EU797125 to EU797175.

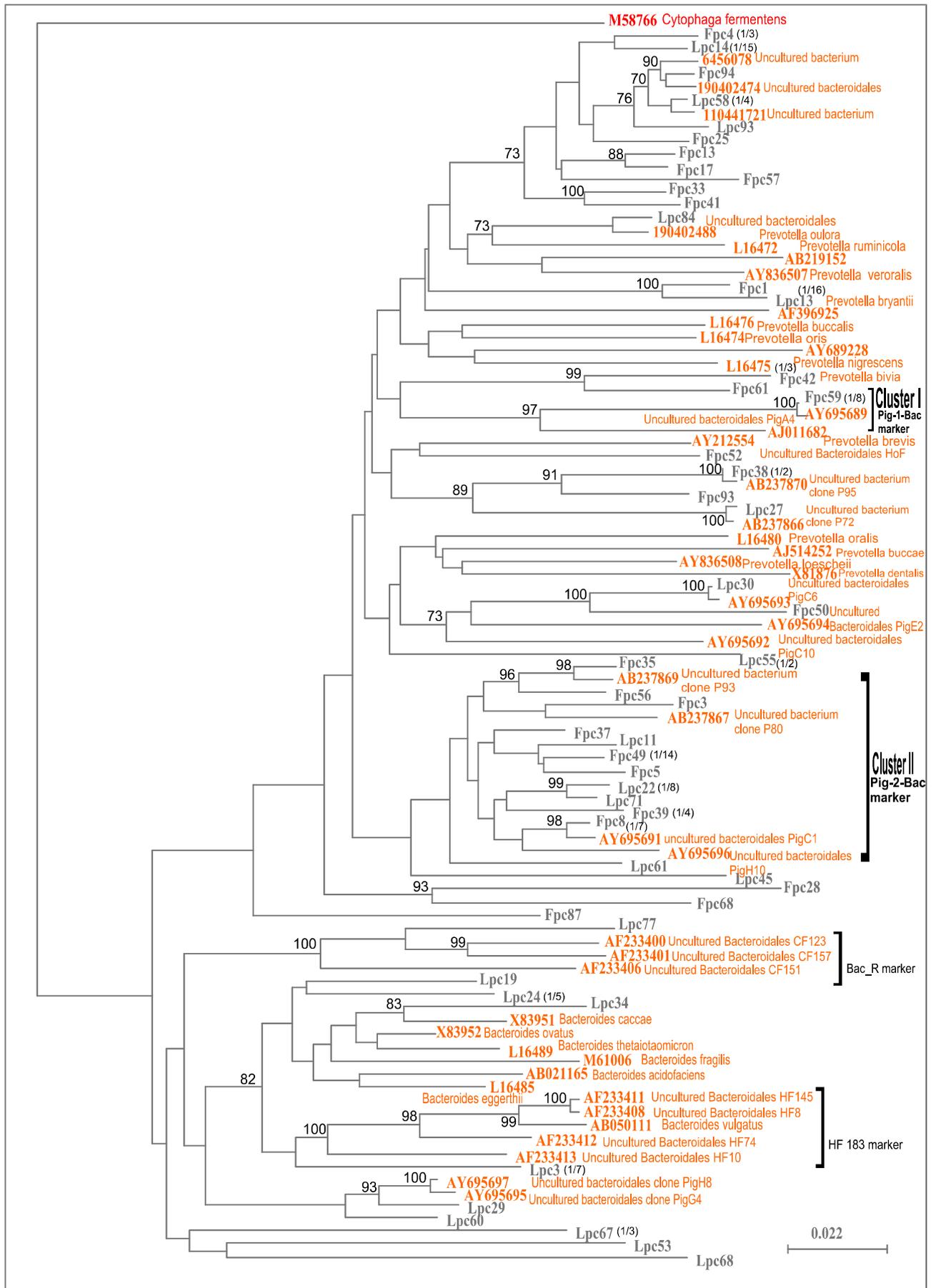
## RESULTS

### *Phylogenetic analysis of Bacteroidales 16S rRNA genes from pig feces and pig slurry samples*

Of the 96 clones obtained from *Bacteroidales* 16S rRNA gene libraries derived from pig feces and pig slurry samples, 94 and 86 clones yielded unambiguous sequence data, respectively. Twenty-seven and 24 different OTUs were obtained for pig feces and slurry, respectively, with 16 OTUs showing common clone sequences from both feces and slurry. Forty-five and 60% of the sequences from pig feces and pig slurry libraries had more than 98% identity to bacterial 16S rRNA gene sequences published in GenBank (NCBI).

The 16S rRNA pig *Bacteroidales* sequences were predominantly *Prevotella*-like, 85% from feces and 55% from slurry. From pig feces, 60% of the sequences were closely related to isolates from pig feces and 26% were related to sequences derived from human tissues and stools. From pig slurry samples, 55% of the sequences showed >98% identity with bacterial 16S rRNA gene sequences isolated from pig fecal samples, 21% with sequences associated with human tissues or stools and 13% corresponded to environmental clones.

To design *Bacteroidales* pig-specific primers, clusters of pig-specific sequences were investigated using: (i) the partial *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences obtained from the slurry and fecal samples; and (ii) partial *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences of human and bovine fecal origin in the GenBank database. Phylogenetic analysis of the 51 OTUs showed two distinct clusters of pig-specific sequences (Fig. 2). Sequences from clusters I and II were selected to design *Bacteroidales* pig-specific primers to detect the pig-specific *Bacteroidales* markers. Cluster I contained only one OTU (Fpc59) which represented 8 *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences with 5 sequences isolated from pig feces and 3 from pig slurry. The 'Fpc59' OTU was closely related (99% identity) to PigA4 uncultured *Bacteroidales* sequences from a pig fecal sample (10) and to a lesser extent, to *Prevotella brevis* (AJ011682; 90% identity). This cluster was used to design the first pig-associated real-time PCR assay, Pig-1-Bac. Cluster II contained 12 OTUs: 8 from pig feces OTUs and 4 from pig slurry. In cluster II, the OTUs 'Fpc8', 'Lpc61' and 'Fpc37' were closely related to the pig marker PigC1 described by Dick *et al.* (10) with 99%, 96% and 94% identity, respectively. Clone sequence 'Fpc35' was 96% similar to clone sequence 'P93' (AB237869) obtained by Okabe *et al.* (37). Clone sequence 'Fpc3' showed 94% identity to clone sequences 'P80' (AB237867; 37). This cluster was used to design the second pig-associated real-time PCR assay named Pig-2-Bac.



**Figure 2: Phylogenetic relationships of 51 OTUs obtained from partial 16S rRNA gene sequences from pig fecal (Fpc) and pig slurry samples (Lpc) using Bac32F and Bac708R (5). An OUT is defined by assigning 16S rRNA gene sequences of >98% identity to the same species. The numbers above the branch points are the percentages of bootstrap replicates that support the branching order. Scale bar represents 2.2% sequence divergence. The numbers in parentheses indicate the frequency of identical clones (example: 1/8 – 1 OTU represents 8 sequences). Accession numbers of known *Bacteroides* and *Prevotella* sequences obtained from GenBank are also included**

### ***Real-Time PCR assays and limits of quantification***

For the two pig-specific *Bacteroidales* markers designed in this study and for the all-*Bacteroidales*, HF183 and BacR markers, plasmid DNAs containing partial 16S rRNA gene sequence insert were run as standards, using 10-fold dilutions ranging from  $1.6 \times 10^7$  to  $1.6 \times 10^0$  copies per PCR mixture, with a quantification limit of 1.6 target copies per reaction. Genomic DNA dilutions from a pure culture of *E. coli*, ranging from  $7 \times 10^6$  to  $7 \times 10^1$  16S rRNA gene copies per PCR, were run as standards for the all-*Bacteria* assay, with a quantification limit of 70 target copies per reaction mixture.

Consequently, the lower limits for quantification of the all-*Bacteroidales* and host-specific *Bacteroidales* markers were  $4.5 \log_{10}$  copies per g in feces and composts and  $3.5 \log_{10}$  copies per 100 ml of water.

### ***Testing general and host-specific Bacteroidales markers in feces and effluent samples***

The sensitivities and specificities of the general and host-specific *Bacteroidales* primers and probes developed in this present study or described previously (29, 39, 45) were tested on target and non-target fecal DNA samples.

The two pig-specific *Bacteroidales* primers and probe sets were both applied to 69 samples of pig origin (Table 2). For Pig-1-Bac and Pig-2-Bac, average concentrations were estimated to be  $8.6 \pm 0.8$  (mean  $\pm$  standard deviation) and  $8.5 \pm 0.6 \log_{10}$  copies per g feces (wet weight),  $4.8 \pm 0.9$  and  $4.9 \pm 0.7 \log_{10}$  copies per ml of slurry,  $2.4 \pm 0.4$  and  $2.6 \pm 0.4 \log_{10}$  copies per ml of lagoon water and  $5.3 \pm 0.5$  and  $5.3 \pm 0.6 \log_{10}$  copies per g of compost samples. No amplification was observed with non-target DNA. The two pig-specific *Bacteroidales* markers showed 98 to 100% sensitivity and 100% specificity. The pig-specific *Bacteroidales* primers (Pig-Bac2) described by Okabe *et al.* (37) demonstrated 100% sensitivity ( $n=10$ ; pig feces and effluent samples). However, positive results were also observed on non-target DNA ( $n=30$ ; human, bovine, sheep and horse feces samples), with an overall score of 54% specificity.

All fecal and pig waste samples were positive for both the all-*Bacteria* and the all-*Bacteroidales* markers (Table 2). For samples of pig origin, the all-*Bacteroidales* marker concentrations were  $10.1 \pm 0.7 \log_{10}$  copies per g of pig feces,  $6.9 \pm 1.1 \log_{10}$  copies per ml of slurry,  $4.7 \pm 0.6 \log_{10}$  copies per ml of lagoon water, and  $9.5 \pm 0.4 \log_{10}$  copies per g of compost samples. The human-specific *Bacteroidales* marker HF183 was present in 13 of 24 human stool samples, with average concentrations of  $7.8 \pm 2.1 \log_{10}$  copies per g of wet feces, implying 54% sensitivity. Negative results with HF183 were obtained for all non-target DNA, showing 100% specificity. The ruminant-specific *Bacteroidales* marker BacR gave positive results on all bovine and sheep feces, with average concentrations estimated at  $10 \pm 0.3 \log_{10}$  copies per g of wet feces, corresponding to 100% sensitivity. Amplifications were observed with pig effluent samples and human feces samples, showing 89% specificity. The observed differences in the frequency of detection of host-specific *Bacteroidales* markers in their target and non target samples were significantly different ( $P<0.05$ ).

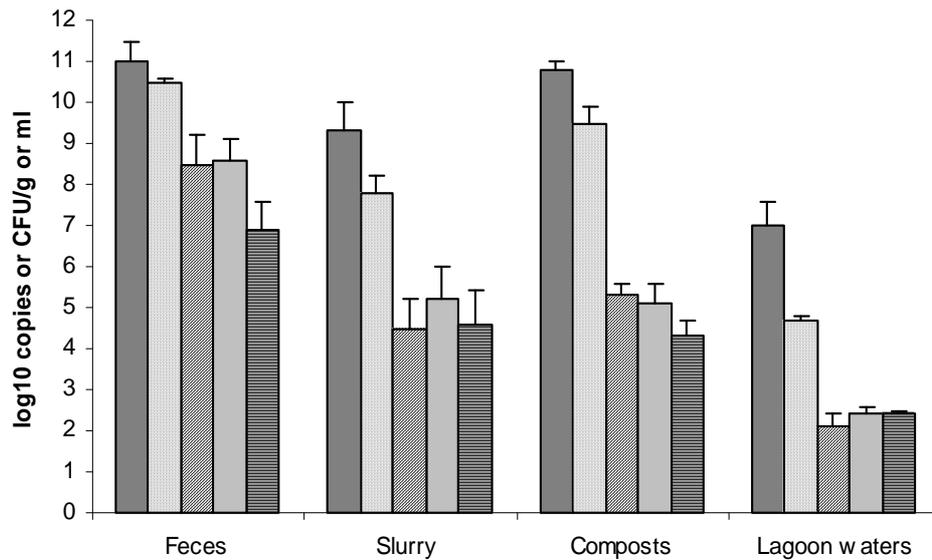
**Table 2: All-*Bacteria* and *Bacteroidales* markers tested with different fecal and effluent samples from human, pig and other animal sources**

% of samples positive with the different PCR assays <sup>a</sup>						
Source of samples (no. of samples)	All- <i>Bacteria</i>	All- <i>Bacteroidales</i>	Pig-specific <i>Bacteroidales</i>		Human-specific <i>Bacteroidales</i>	Ruminant-specific <i>Bacteroidales</i>
	Bact2	AllBac	Pig-1-Bac	Pig-2-Bac	HF183	BacR
<b>Pig</b>						
Feces ( <i>n</i> =25)	100	100	100	100	0	0
Slurry ( <i>n</i> =23)	100	100	100	100	0	17
Lagoon water ( <i>n</i> =14)	100	100	93	100	0	28
Compost ( <i>n</i> =7)	100	100	100	100	0	43
Human feces ( <i>n</i> =24)	100	100	0	0	54	4
Bovine feces ( <i>n</i> =10)	100	100	0	0	0	100
Ovine feces ( <i>n</i> =10)	100	100	0	0	0	100
Equine feces ( <i>n</i> =10)	100	100	0	0	0	0

<sup>a</sup> A result was considered positive when marker concentration was greater than 4.5 log<sub>10</sub> copies per g in feces and composts and 3.5 log<sub>10</sub> copies per 100 ml of water

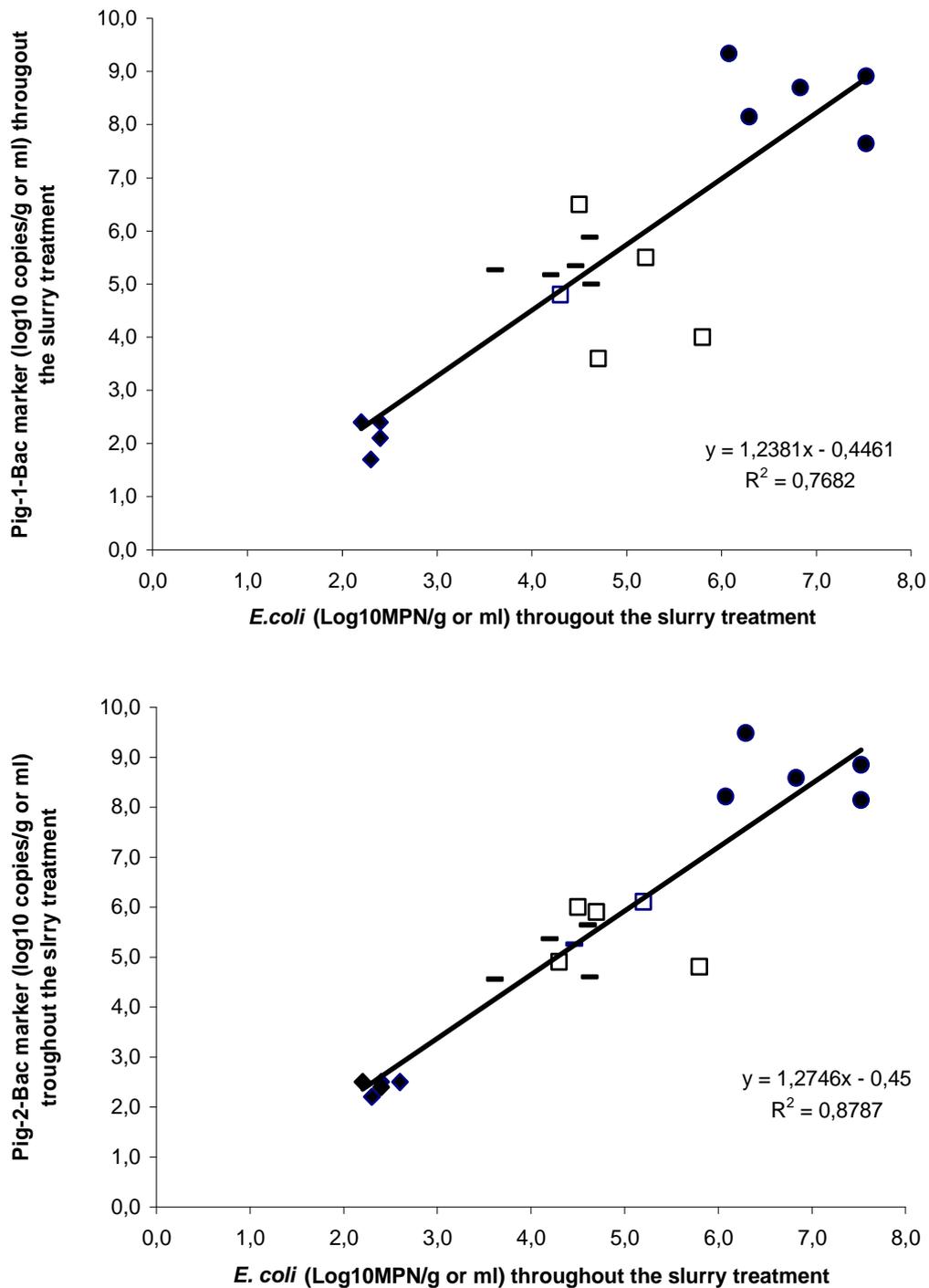
### Case study of the pig-specific markers throughout a slurry treatment process on a pig farm

All markers and, especially, the pig-specific markers and *E. coli* enumerated by a culture technique were detected throughout the pig waste treatment chain, and their concentrations were seen to decrease throughout the slurry treatment process (Fig. 3). Indeed, Pig-1-Bac concentrations were 8.5 ± 0.7 log<sub>10</sub> copies per g in feces, 4.8 ± 0.7 log<sub>10</sub> copies per ml in slurry, 2.1 ± 0.3 log<sub>10</sub> copies per ml in lagoon water and 5.3 ± 0.5 log<sub>10</sub> copies per g in compost samples. Pig-2-Bac concentrations were 8.6 ± 0.5 log<sub>10</sub> copies per g in feces, 4.9 ± 0.7 log<sub>10</sub> copies per ml in slurry, 2.4 ± 0.2 log<sub>10</sub> copies per ml in lagoon water and 5.1 ± 0.5 log<sub>10</sub> copies per g in compost samples. ANOVA confirmed that the concentrations of the two markers were not significantly different in any of the stages of slurry treatment (P>0.05). Concentrations of the all-*Bacteroidales* marker were 10.5 ± 0.1 log<sub>10</sub> copies per g in feces, 7.8 ± 0.4 log<sub>10</sub> copies per ml in slurry, 2.1 ± 0.3 log<sub>10</sub> copies per ml in lagoon water and 5.3 ± 0.3 log<sub>10</sub> copies per g in compost samples (Fig. 3).



**Figure 3: Concentrations of all-Bacteria (■), all-Bacteroidales (▤), Pig-1-Bac (▨), and Pig-2-Bac (▧) markers (log<sub>10</sub> copies per g or ml) and *E. coli* bacteria (▩ ; MPN per g or ml) in different target samples (feces and waste effluents samples,  $n=5$ ) from three farms, obtained throughout the slurry treatment process. Error bars show standard deviations**

Concentrations of *E. coli* by culture were  $6.9 \pm 0.7$  log<sub>10</sub> MPN per g in feces,  $6.6 \pm 0.8$  log<sub>10</sub> MPN per ml in slurry,  $2.4 \pm 0.1$  log<sub>10</sub> MPN per ml in lagoon water and  $4.3 \pm 0.4$  log<sub>10</sub> MPN per g in compost samples (Fig. 3). ANOVA indicated that concentrations of Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers were not significantly different to *E. coli* concentrations either in slurry or in lagoon water samples, whereas concentrations of the all-Bacteroidales marker were significantly different from *E. coli* concentrations at all treatment stages. A high level of correlation was found between the concentrations of the two pig-specific *Bacteroidales* markers and *E. coli* concentrations obtained by culture in pig wastes ( $R^2 = 0.77$  for Pig-1-Bac and  $R^2 = 0.88$  for Pig-2-Bac) (Fig. 4).



**Figure 4: Relation between concentrations of pig-specific *Bacteroidales* markers (Fig-1-Bac and Fig-2-Bac) and *E. coli* bacteria throughout the slurry treatment process. ●, feces; □, slurry; —, compost; ◆, lagoon**

**Marker concentrations in environmental river water samples**

*Escherichia coli* was found in all samples at concentrations that varied with sampling point and date from 2.5 to 4.3 log<sub>10</sub> MPN per 100 ml (Table 3). The all-*Bacteroidales* marker was quantified in all samples, at concentrations that ranged between 4.6 and 7.8 log<sub>10</sub> copies per 100 ml of water. At least one host-specific marker was quantified in samples from all sites, with most cases having multiple markers. The Fig-1-Bac marker was quantified in 25% of water samples collected around pig farms corresponding to site 10, with 4 log<sub>10</sub> copies per 100

ml, and to site 11, with 3.9 log<sub>10</sub> copies per 100 ml, and it was detected in 37.5% of these samples. It was detected in 30% of water samples collected downstream, corresponding to site 6, and never detected in samples collected near cattle farms. The Pig-2-Bac marker was quantified in 62.5% of water samples collected around pig farms (site 2, 4.1 log<sub>10</sub> copies per 100 ml; site 10, 4 log<sub>10</sub> copies per 100 ml; site 11, 3.6 and 3.8 log<sub>10</sub> copies per 100 ml; and site 14, 3.6 log<sub>10</sub> copies per 100 ml) and detected in 87.5% of these samples. It was detected in 20% of water samples collected downstream corresponding to sites 6 and 7, and never detected in samples collected near cattle farms.

The HF183 marker was quantified in 90% of water samples collected downstream near Daoulas town, corresponding to sites 3, 4, 5, 6 and 7. The concentrations of the marker in these sites ranged between 3.5 and 4.4 log<sub>10</sub> copies per 100 ml. It was quantified in 50% of water samples collected around pig farms corresponding to sites 11, 12 and 13. The concentrations in samples from these sites ranged between 3.9 and 5.1 log<sub>10</sub> copies per 100 ml. It was also quantified in 17% of water samples collected around cattle farms, corresponding to site 9 with 4.3 log<sub>10</sub> copies per 100 ml. The BacR marker was quantified in all water samples collected around cattle farms, corresponding to sites 1, 7 and 8. The concentrations of the marker in these sites ranged between 4.6 and 6.0 log<sub>10</sub> copies per 100 ml. It was quantified in 62.5% of water samples collected around pig farms corresponding to sites 2, 10, 12 and 13 and concentrations ranged between 4.5 to 6 log<sub>10</sub> copies per 100 ml. It was also quantified in 60% of water samples collected downstream, corresponding to sites 5, 6 and 7 and concentrations ranged between 5.7 and 6 log<sub>10</sub> copies per 100 ml.

No significant correlation was observed between *E. coli* concentration and the concentrations of the two pig-specific *Bacteroidales* markers ( $R^2 = 0.12$  and  $0.11$ ), the human and ruminant-specific *Bacteroidales* marker ( $R^2 = 0.11$  and  $0.10$ ), or the All-*Bacteroidales* marker ( $R^2 = 0.15$ ) in the river water samples.

**Table 3: *Bacteria* and *Bacteroidales* marker results from water samples taken from the catchment of the Daoulas river estuary**

Site	Sampling date (mo/day/yr)	No of <i>E. coli</i> [log(MPN/100ml)]	Results (log <sub>10</sub> copies/100ml) for indicated probe <sup>a</sup>					
			All <i>Bacteria</i>	All <i>Bacteroidales</i>	Pig-specific <i>Bacteroidales</i>		Human-specific <i>Bacteroidales</i>	Ruminant-specific <i>Bacteroidales</i>
			BACT2	AllBac	Pig-1-Bac	Pig-2-Bac	HF 183	BacR
1	12/06/2006	2.5	7	5.1	<3.5	<3.5	<3.5	4.6
	01/14/2008	4.3	7.6	6.7	<3.5	<3.5	<3.5	6.0
2	01/17/2006	3.3	7.9	6.9	<3.5	4.1	<3.5	4.8
	01/17/2006	3.9	7.5	6.5	<3.5	<3.5	3.6	<3.5
3	03/28/2006	3.9	7.5	5.4	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5
	01/17/2006	3.1	7.9	6.9	<3.5	<3.5	3.7	<3.5
4	01/17/2006	4.0	8.2	7.3	<3.5	<3.5	4.4	5.7
	03/28/2006	3.0	7.8	6.1	<3.5	<3.5	3.6	5.7
5	12/06/2006	3.0	8.5	6.5	<3.5	<3.5	3.8	5.9
	01/17/2006	3.5	8.4	7.8	<3.5 ; D <sup>b</sup>	<3.5	3.9	6.0
6	01/14/2008	3.3	7.6	5.9	<3.5 ; D	<3.5 ; D	3.6	<3.5
	01/17/2008	3.1	6.5	5.6	<3.5 ; D	<3.5	3.7	5.7
7	01/17/2006	3.5	9.1	7.7	<3.5	<3.5 ; D	3.6	5.9
	01/14/2008	3.9	7.7	6.4	<3.5	<3.5	<3.5	5.6
8	01/17/2008	3.1	7.7	6.4	<3.5	<3.5	<3.5 ; D	5.3
	01/14/2008	3.0	7.5	6.2	<3.5	<3.5	<3.5	5.5
9	01/17/2008	2.9	6.4	6.2	<3.5	<3.5	4.3	5.3
	01/17/2008	3.1	6.3	4.7	4	4	0.0	4.1
10	01/14/2008	4.3	7.8	6.9	<3.5	3.6	5.1	<3.5
	01/17/2008	3.9	8.1	6.8	3.9	3.8	5.1	<3.5
11	01/17/2008	3.0	7.2	4.6	<3.5	<3.5	<3.5 ; D	4.5
	01/14/2008	3.0	7.9	6.2	<3.5	<3.5 ; D	4	4.8
12	01/17/2008	3.3	6.6	5.1	<3.5	<3.5 ; D	3.9	4.8
	01/17/2008	3.5	6.5	4.9	<3.5 ; D	3.6	<3.5	<3.5

<sup>a</sup> The quantification limit of *Bacteroidales* markers is 3.5 log<sub>10</sub>copies/100ml of water sample

<sup>b</sup> D: detected, i.e., positive results were obtained in two repeated experiments

## DISCUSSION

In this study, *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences were obtained from pig feces and slurries, and host-specific TaqMan® real-time PCR primers and probes were designed to identify pig fecal contamination in natural water samples. Most of the *Bacteroidales* sequences identified in the present study were related to uncultured *Prevotella* bacteria, thus indicating a high level of (as yet uncultured) diversity similar to that observed by Dick *et al.* (10) and Okabe *et al.* (37). Sequence analyses showed that clusters with only pig-specific sequences (from both feces and slurry samples) were represented in the genus *Prevotella*. In the phylogenetic tree, among a total of 51 OTUs, 16 OTUs represented sequences from pig feces and slurry; underlining that the *Bacteroidales* present in pig feces can also be found in pig slurry.

Two clusters (I and II) were identified and used for designing primers and probes for two pig-specific *Bacteroidales* markers with OTUs from both feces and slurry samples. The first cluster (cluster I) has not been previously described in the literature whereas the second cluster (cluster II) contained sequences closely related to the clone sequence “PigC1” obtained by Dick *et al.* (10) and to the clones “P80” and “P93” described by Okabe *et al.* (37). These studies highlight that pig-specific sequences can be obtained from different geographical areas (USA, Japan and France) and that a cosmopolitan distribution of the *Bacteroidales* can be observed. Thus, bacteria belonging to the *Bacteroidales* order seem to be promising fecal indicators to identify pig fecal pollution sources (9, 10) and could be used to design pig-specific PCR primer and probe sets for real-time PCR assays. The Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers were designed from clusters I and II, respectively. These pig-specific markers succeeded in identifying pig fecal pollution in target samples, and their concentrations were correlated with culturable *E. coli* concentrations throughout a pig waste treatment chain (from feces to compost or lagoon waters). However, concentrations of these pig-specific markers were low in comparison to All-*Bacteroidales* marker concentrations. One explanation for these lower concentrations could be that the total *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from pig samples are not all pig-specific. Indeed, 30% of the *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from pig samples obtained in this study showed 98% identity with *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences isolated from human samples published in GenBank. The identity between *Bacteroidales* from pig and human *Bacteroidales* sequences was also found previously (29, 49) and was explained by their common omnivorous diet and similar digestive tract (10). The proportion of pig-specific markers relative to the All-*Bacteroidales* marker and proportion of the All-*Bacteroidales* marker relative to the All-*Bacteria* marker decreased along the waste treatment chain. Explanations could include (i) a loss of *Bacteroidales* during slurry storage, slurry treatment under aerobic conditions or by activated sludge or (ii) dilution of *Bacteroidales* in bacteria community during pig slurry storage. Indeed, Peu *et al.* (38) observed changes in the dominant microbial population between feces and slurry, and between a slurry storage tank and a pond by performing PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism) profiles. Furthermore, aerobic bacteria such as *Bacillus thuringiensis*, *Sphingobacterium mizutae* or *Paenibacillus* sp have been shown to appear during slurry storage (31).

Previously, pig-specific *Bacteroidales* primers were described and found to be specific to pig feces from geographically distant sources in the USA (10) and to pig feces and pig waste effluent samples from France (20). However, these studies used conventional PCR assays, and as such only provided qualitative data (presence/absence) of the pig-specific marker. In 2007, pig-specific *Bacteroidales* primers (Pig-Bac2) were designed by Okabe *et al.* (37) for real-time PCR with the SYBR-Green® assay. However, when tested in the laboratory, this marker was found to amplify non specific DNA extracted from human, bovine, sheep and

horse feces. These results are similar to those obtained by Okabe *et al.* (37) where a few human and bovine fecal samples showed non specific amplifications.

In the present study, *Escherichia coli* concentrations measured in the river Daoulas catchment area were in agreement with the level of fecal contamination in shellfish collected downstream. Multiple fecal sources from pig-, human- or ruminant-specific markers were detected at least once at each sampling site. Due to the large-scale pig production (approximately 150,000 pigs) in this catchment, frequent detection of the pig markers was expected in most of the samples collected around pig farm sites. The Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers were quantified in 25% and 62.5% of samples collected around pig farms, respectively. In sub-catchments with farms producing only pigs or pigs and cattle, only pig markers, or pig and ruminant markers were detected, respectively (sites 2, 10 and 14). Other sampling sites which could be contaminated by pig wastes showed the presence of markers for multiple sources (sites 6, 7 and 13). No pig markers were found in samples from sites without pig farms nearby (sites 1, 3, 4, 5, 8 and 9).

The concentrations of the pig-specific *Bacteroidales* markers were similar to those observed for the human-specific marker but lower than those for the ruminant-specific marker. This latter marker was found to be from 4.1 to 6 log<sub>10</sub> copies per 100 ml of water sample in the Daoulas catchment. These results were in agreement with those obtained in target feces samples in which the pig- and human-specific marker concentrations were  $8.6 \pm 0.7$  and  $7.8 \pm 2.1$  log<sub>10</sub> copies per g of feces, respectively and the ruminant marker concentrations were  $10 \pm 0.3$  log<sub>10</sub> copies per g of feces. The lower frequency of detection of the pig marker in river water could be explained by the transfer mechanisms of pig fecal contamination such as slurry and compost spreading or by irrigation with lagoon water (38). Spreading pig effluent on soil has been found to significantly reduce the numbers of fecal coliforms or *Salmonella spp* present in such effluent (17). Subsequent transfer of bacteria into surface and groundwater requires a certain level of rainfall after slurry spreading (7, 35). This weak detection of pig fecal pollution in these environmental water samples using pig-specific *Bacteroidales* markers was confirmed by results obtained using another pig-specific marker, the pig-specific archaeal molecular marker developed by Ufnar *et al.* (53). Indeed, no positive results in these water samples were obtained with this marker. However, testing this marker on target fecal samples showed weak PCR signals for half of samples tested (data not shown). For environmental contamination from humans, transfer occurs mainly from point sources such as sewage treatment plants, although diffuse pollution by leaking septic systems may also occur (23). Cattle fecal pollution may occur during grazing, movement or access of cattle to rivers and to a lesser extent from bovine slurry or manure spread on arable land.

Detection of pig-specific *Bacteroidales* markers in river water samples was performed in two previous studies. The pig-specific *Bacteroidales* marker described by Dick *et al.* (10) was previously tested on another French catchment (the Aber Benoît estuary which is also important for pig production with approximately 225,500 pigs). It was rarely detected in river water samples from this area (20). In contrast, the pig-specific *Bacteroidales* marker designed by Okabe *et al.* (37) was detected in all 4 Japanese rivers sampled and at higher levels than the all-*Bacteroidales* marker (42). Savichtcheva *et al.* (42) recommended further validation of this pig-specific marker. Among the 2 pig-specific markers described in the present study, the Pig-2-Bac marker was detected more often in environmental waters than the Pig-1-Bac marker although both were detected in similar concentrations in pig feces and effluents from different farms and geographical areas. Thus, a study on the persistence of both of these markers in the environment could be useful to evaluate the difference in detection in river samples.

In conclusion, this study has provided efficient TaqMan® real-time PCR assays targeting pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes to discriminate pig fecal contamination in natural waters. Moreover, the detection of the pig-specific *Bacteroidales* markers over a 48 month period demonstrates their temporal stability. Among the two pig *Bacteroidales* markers designed, the Pig-2-Bac marker appears to be the most suitable, as it was detected more frequently in rivers. This study confirms that fecal pollution in river waters often comes from multiple sources; it was mainly of human and bovine origin on the sampling dates investigated in the Daoulas catchment. However, additional sampling should be carried out during high rainfall events within the pig slurry spreading period to determine whether the pig markers and thus pollution from pigs could be more prevalent then. These pig-specific *Bacteroidales* markers could represent an efficient tool in a microbial source tracking toolbox, to discriminate fecal pollution from pigs from other fecal sources. This tool will assist in the management of microbial water quality of bathing and shellfish-farming areas.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported partly by the French agency AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). S. Mieszkin was supported by a grant from Ifremer and Région Bretagne.

We thank D. Hervio Heath and J. Porter for scientific advice and for discussions on this manuscript. We also thank J.C. Le Saux and M. Bougeard for the water sampling on the Daoulas estuary catchment and S. Dupont for performing statistical analysis. We are grateful to R. Joubrel, S. Lozach and C. Le Mennec for their technical assistance.

## REFERENCES

1. Anonymous. 1991. Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water. Miniaturized method (most probable number) by inoculation in liquid medium. NF EN ISO 9308-3: water quality. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
2. Ashelford, K. E., N. A. Chuzhanova, J. C. Fry, A. J. Jones, and A. J. Weightman. 2006. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5734-5741.
3. Baudart, J. J., J. Gradulos, J. P. Barusseau, and P. Lebaron. 2000. *Salmonella spp.* and fecal coliform loads in coastal waters from a point vs. nonpoint source of pollution. *J. Environ. Qual.* 29:241-250.
4. Bernet, N., J.P. Delgenes, and R. Moletta. 2000. [Pig slurry: the biological solution] *Biofutur.* 197: 42-45.
5. Bernhard, A. E., and K. G. Field. 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1587-1594.
6. Brown, P. E., O. F. Christensen, H. E. Clough, P. J. Diggle, C. A. Hart, S. Hazel, R. Kemp, A. J. H. Leatherbarrow, A. Moore, J. Sutherst, J. Turner, N. J. Williams, E. J. Wright, and N. P. French. 2004. Frequency and special distribution of environmental *Campylobacter spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6501-6511.
7. Cools, D., R., Merckx, K., Vlassak, J. Verhaegen. 2001. Survival of *E. coli* and *Enterococcus spp.* derived from pig slurry in soils of different texture. *Appl. Soil Ecol.* 17:53-62.
8. Cox, P., M. Griffith, M. Angles, D. Deere, and C. Ferguson. 2005. Concentration of pathogens and indicators in animal feces in the Sydney watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5929-5934.
9. Dick, L. K., and K. G. Field. 2004. Rapid estimation of numbers of fecal *Bacteroidales* by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5695-5697.
10. Dick, L. K., A. E. Bernhard, T. J. Brodeur, J. W. Santo Domingo, J. M. Simpson, S. P. Walters, and K. G. Field. 2005. Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3184-3191.
11. Edberg, S. C., E. W. Rice, R. J. Karling, and M. J. Allen. 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *J. Appl. Microbiol.* 88:105S-116S.
12. Eurostat. (2003). Pig stock trends in European Union, 1994-2002. Eurostat, Luxembourg. [http://www.eds-destatis-.de/en/downloads/sif/nn\\_03\\_36.pdf](http://www.eds-destatis-.de/en/downloads/sif/nn_03_36.pdf).
13. Feldhusen, F. 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect.* 2:1651-1660.
14. Fisher, L. D., and G. Belle. 1993. *Biostatistics: a methodology for health sciences*. Wiley, New York, NY.
15. Galtier N., M. Gouy, and C. Gautier. 1996. SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12:543-548.
16. Geldreich E. E. 1978. Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. p. 51-97. *In*: G. Berg (ed), *Indicator of viruses in water of food*. Arbor science, Ann Arbor, MI.

17. Gessel P. D., H. C. Neil, G. M. Sagar, J. J. Lee and J. Webb. 2004. Persistence of zoonotic pathogens in surface soil treated with different rates of liquid pig manure. *Appl. Soil Ecol.* 24: 237-243.
18. Godfree, A., and J. Farell. 2005. Processes for managing pathogens. *J. Environ. Qual.* 34:105-113.
19. Gourmelon, M., M. P. Montet, S. Lozach, C. Le Menec, M. Pommepuy, L. Beutin, and C. Vernozy-Rozand. 2006. First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J. Appl. Microbiol.* 100:85-97.
20. Gourmelon, M., M. P. Caprais, R Ségura, C. Le Menec, S. Lozach, J. Y. Piriou, and A. Rincé. 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4857-4866
21. Hall TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
22. Hancock, D., T. Besser, J. Lejeunes, M. Davis, and D. Rice. 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol.* 66:71-78.
23. Handler, N. B., A. Paytan, C. P. Higgins, R. G. Luthy, and A. B. Boehm. 2006. Human development is linked to multiple water-body impairments along the California Coast. *Estuaries Coasts (formerly Estuaries)* 29:860-870.
24. Ibekwe, A. M., M. W. Pamela, M. G. Catherine, K. S. Vijay, and R. L. Steven. 2002. Multiplex Fluorogenic Real-time PCR for Detection and Quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy Wastewater Wetlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4853–4862.
25. Kildare, B. J., C. M. Leutenegger, B. S. McSwain, D. G. Bambic, V. B. Rajal, and S. Wuertz. 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: A Bayesian approach. *Water Res.* 41:3701-3715.
26. Kimura M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111–120.
27. Klappenbach, J. A., P. R. Saxman, J. R. Cole, and T. M. Schmidt. 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research.* 29:181-184.
28. Koopmans, M., and E. Duizer. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90:23-41.
29. Layton, A., L. McKay, D. Williams, V. Garrett, R. Gentry and G. Sayler. 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-Based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4214-4224.
30. Legrand, L., J. Tap, C. Gauthey , J. Doré, C. Caron, and M. Leclerc. 2008. RapidOTU: a fast pipeline to analyse 16S rDNA sequences by alignment or tetranucleotide frequency. *Proc. Gut Microbiome Symp. 2008 6<sup>th</sup> Congr. INRA Rowett Res. Inst.*, poster 26, p 35.
31. Leung, K., and E. Topp. 2001. Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage: molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38:169-177.
32. Levasseur, P., and N. Lemaire. 2003. The situation of pig slurry treatment in France. *Techni Porc* 26:41-42. (In French)
33. Lipp, E. K., and J. B. Rose. 1997. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 16:620-640.
34. Mara D. D., and J. I. Oragui. 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* 55:349-357.
35. Mawdsley, J. L., R. D. Bardgett, R. J. Merry, B. F. Pain, and M. K. Theodorou. 1995. Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Appl. Soil Ecol.* 2:1-15.
36. NASS (National Agricultural Statistics Service). 2002. Monthly hogs and pigs. Available from: [www.usda.gov/nass/](http://www.usda.gov/nass/).
37. Okabe S., N. Okayama, O. Savichtcheva, and T. Ito. 2007. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 74:890–901
38. Peu P., H. Brugère, A. M. Pourcher, M. Kérourédan, J. J. Godon, J. J. Delgenès, and P. Dabert. 2006. Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3578-3585.

39. Reischer, G. H., D. C. Casper, R. Steinborn, R. L. Mach, and A. H. Farnleitner. 2006. Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in Alpine karstic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5610-5614.
40. Reischer, G. H. D. C. Casper, R. Steinborn, A. H. Farnleitner, and R. L. Mach. 2007. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. *Letters in Appl. Microbiol.* 44:351-356.
41. Saitou N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
42. Savichtcheva, O., N. Okayama, and S. Okabe. 2007. Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Res.* 41:3615-3628.
43. Scott, T. M., J. B. Rose, T. M. Jenkins, S. R. Farrah, and J. Lukasik. 2002. Microbial Source Tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5796-5803.
44. Seurinck, S., T. Defoirdt, W. Verstraete, and S. D. Siciliano. 2005. Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ. Microbiol.* 7:249-259.
45. Shloss P. D., and J. Handelsman. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1501-1506.
46. Simpson, J. M., J. W. Santo Domingo, and D. J. Reasoner. 2002. Microbial source tracking: state of the science. *Environ. Sci. Technol.* 36:5279-5288.
47. Snell-Castro, R., J. J. Godon, J. P. Delgenes, and P. Dabert. 2005. Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52:229-242.
48. Statistical Reference Centre, Canada. 2001. Pigs, provinces. Statistical Reference Centre, Canada, Ottawa, Ontario. <http://www40.statcan.gc.ca/L01/cst01/prim51a-eng.htm>.
49. Steven, C. E. 1988. Comparative physiology of the vertebrate digestive system. Cambridge University Press, New York, N. Y.
50. Suzuki, M. T., L. T. Taylor, and E. F. DeLong. 2000. Quantitative Analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial population via 5'-Nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4605-4614.
51. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.
52. Tiquia, S. M. 2005. Microbiological parameters as indicators of compost maturity. *J. Appl. Microbiol.* 99:816-828.
53. Ufnar, J. A., D. F. Ufnar, S. Y. Wang, and R. D. Ellender. 2007. Development of a swine-specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5209-5217.
54. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 2005. Microbial Source Tracking Guide Document. EPA Office of Research and Development, US. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
55. Wheather, D. W. F., D. D. Mara, and J. Oragui. 1979. Indicator systems to distinguish sewage from stormwater run-off and human from animal faecal material. p. 21, 27. *In* A. James L. Evison (ed), Biological indicators of water quality. J. Wiley and Sons, Hoboken, NJ.

## **CHAPITRE III**

---

**Effet de l'oxygène dissous et de la température sur la  
persistance de marqueurs spécifiques d'une contamination  
fécale porcine en microcosmes d'eau de rivière et étude de  
la dynamique des populations bactériennes  
dominantes d'un échantillon de lisier**

-

**Résumé**

### CONTEXTE ET OBJECTIFS

Si la sensibilité et la spécificité des marqueurs *Bacteroidales* développés dans cette thèse sont des éléments importants pour identifier correctement l'origine des pollutions fécales, la compréhension et l'évaluation de la persistance de ces marqueurs dans l'environnement sont aussi des éléments essentiels à prendre en compte lors de leur quantification. Dans le tractus digestif, les *Bacteroidales* sont adaptées à des conditions anaérobies riches en nutriments. Une fois dans les fèces et les lisiers, ces conditions sont encore dominantes alors que dans les eaux continentales et littorales, les conditions changent pour devenir généralement riches en oxygène et pauvres en nutriments.

De nombreuses études ont été réalisées sur la persistance des marqueurs *Bacteroidales* sous l'influence de la température et de la prédation, paramètres ayant une forte influence sur le devenir des bactéries dans les eaux de l'environnement. Il nous paraît important d'étudier un troisième paramètre, l'oxygène dissous, influençant fortement le devenir de ces bactéries dans l'environnement, qui à notre connaissance, a été peu étudié à ce jour.

Les objectifs de cette étude, par le biais de microcosmes d'eau de rivièreensemencés artificiellement par des lisiers de porcs, étaient d'évaluer l'influence de deux paramètres abiotiques, l'oxygène (aérobie et microaérophilie) et la température (4 et 20°C) sur (i) la persistance de trois nouveaux marqueurs porcs : les marqueurs Pig-1-Bac et Pig-2-Bac développés au laboratoire et le marqueur de la bactérie *Lactobacillus amylovorus*, développé par nos partenaires scientifiques du Cemagref de Rennes, (ii) la survie des indicateurs conventionnels (*E. coli* et les entérocoques), et (iii) l'évolution des groupes bactériens dominants auxquels appartiennent les marqueurs à l'aide de profils obtenus par une technique de typage moléculaire, la CE-SSCP (Capillary-Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism).

Cette étude a été réalisée en collaboration avec A.M. Pourcher et R. Marti de l'unité de recherche « Gestion environnementale et traitement biologique des déchets » du Cemagref de Rennes.

### METHODES

Quatre microcosmes d'eau de rivière ont été préparés en diluant du lisier de porcs au 100<sup>ème</sup> dans de l'eau de rivière non contaminée en *E. coli*. Quatre conditions ont ensuite été testées : 4°C et 20°C en présence d'oxygène (aérobie) ou en conditions appauvries en

oxygène (microaérophilie). Quatorze prélèvements ont été réalisés sur 43 jours. Les marqueurs bactériens ont été recherchés par qPCR et les indicateurs classiques par culture. Les profils des groupes bactériens dominants auxquels appartiennent les marqueurs ont été obtenus par CE-SSCP. Une PCR conventionnelle avec des amorces spécifiques des groupes dominants du lisier *Bacteroides-Prevotella* (BP) et *Bacillus-Streptococcus-Lactobacillus* (BSL) a été réalisée. Les produits d'amplification de cette PCR ont ensuite été utilisés pour réaliser une PCR CE-SSCP à l'aide d'amorces universelles. Les fragments d'ADN de conformation différente ont été séparés par une électrophorèse de type SSCP. Les pics dominants des profils ont ensuite été identifiés par clonage et séquençage.

## **RESULTATS**

Les profils CE-SSCP ont montré que la composition des deux groupes dominants BP et BSL était stable en condition de microaérophilie à 4°C et dans une moindre mesure à 20°C. Dans les microcosmes en condition d'aérobie, une perte de la diversité des populations dominantes, accentuée à 20°C, a été observée car le nombre de pics sur les profils a diminué. Ces changements de diversité se sont accompagnés d'une modification de la persistance des marqueurs porcs de PCR. En effet, la persistance des marqueurs n'a pas ou peu été affectée par la condition de microaérophilie à 4 et 20°C alors qu'elle l'était fortement en condition d'aérobie, et ceci de façon beaucoup plus marquée à 20°C. Sous ces conditions défavorables, elle variait, de plus, suivant le type de marqueur. Par exemple, le marqueur Pig-2-Bac a perdu 3,5 U. Log<sub>10</sub> en 16 jours alors que le marqueur *L. amylovorus* a perdu 2,9 U. Log<sub>10</sub> en 43 jours.

Concernant les indicateurs classiques, le facteur qui a affecté le plus leur survie était la température. Le déclin le plus important a été observé à 20°C en microaérophilie pour *E. coli* qui a atteint la limite de détection en 25 jours et à 20°C en aérobie pour les entérocoques où le déclin a été observé à partir du 7<sup>ème</sup> jour pour atteindre la limite de quantification le 16<sup>ème</sup> jour de l'expérience.

## **CONCLUSIONS**

Cette étude montre que les marqueurs bactériens utilisés pour identifier les contaminations fécales porcines dans l'environnement peuvent avoir une persistance différente selon les bactéries ciblées. Même si tous les paramètres tels que la lumière, la prédation ou la turbidité n'ont pas été pris en compte, les marqueurs *Bacteroidales* semblent

être moins persistants que le marqueur *L. amylovorus*, tout particulièrement lorsque les eaux sont saturées en oxygène dissous, ce qui est le cas le plus souvent rencontré dans les eaux de rivière. Cette étude met en avant l'importance d'évaluer la persistance des marqueurs pour obtenir une estimation de « l'âge » de la contamination (récente ou ancienne) mais également pour indiquer la contribution des différentes sources de contaminations en fonction de la persistance de chaque marqueur. Il nous semble donc nécessaire de rechercher, à la fois, le marqueur *Bacteroidales* Pig-2-Bac et *Lactobacillus amylovorus*, pour obtenir le maximum d'informations sur l'origine des contaminations fécales quelles que soient les conditions environnementales. Ce type d'étude devra être reconduit en prenant également en compte d'autres facteurs tels que la salinité ou la lumière afin d'obtenir une évaluation plus complète de la persistance de ces marqueurs porcs et des autres marqueurs développés pendant cette thèse.

**PUBLICATION III**

**Effect of oxygen and temperature on the persistence of pig-specific genetic markers and on the dynamics of the dominant bacterial populations of pig manure in river water microcosms**

**Romain Marti<sup>2,3,\*</sup>, Sophie Mieszkin<sup>1,\*</sup>, Anne-Marie Pourcher<sup>2,3,\*</sup>,  
Dominique Hervio-Heath<sup>1</sup> and Michèle Gourmelon<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Cemagref, Rennes, France,*

<sup>2</sup>*Université Européenne de Bretagne, Rennes, France,*

<sup>3</sup>*Ifremer EMP, Laboratoire de Microbiologie, 29280 Plouzané, France'*

\*These authors contributed equally to the work

**ABSTRACT**

The quantification of the pig-specific *Bacteroidales* genetic markers Pig-1-Bac and Pig-2-Bac and *Lactobacillus amylovorus* is a promising tool for the identification of pig manure contamination. To examine the persistence of these markers, filtered river water was inoculated with manure and incubated under microaerophilic and aerobic conditions, at 4°C and 20°C. The persistence of the markers was measured by real-time PCR and compared to the survival of *Escherichia coli* and enterococci. The composition of *Bacteroides-Prevotella* and *Bacillus-Sreptococcus-Lactobacillus* groups was analysed by capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). At 4°C, under microaerophilic conditions, the concentrations of the markers and the CE-SSCP profiles of both groups of bacteria remained unchanged whereas shifts in the composition of the populations were observed under other conditions. The greatest changes were observed at 20°C under aerobic conditions, leading to a marked decrease in the diversity of the bacterial populations and to a large fall in the concentrations of Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers (more than 3.5 log<sub>10</sub> units after 16 and 21 days, respectively). The decrease in the concentration of *L. amylovorus* was less at 2.9 log<sub>10</sub> units after 43 days. None of the pig markers were able to multiply in the river water in microcosm conditions and their persistence was consistent with the survival of conventional fecal indicators. These results support the use of Pig-1-Bac and Pig-2-Bac and *Lactobacillus amylovorus* as markers of pig fecal pollution.

**Keywords:** Microbial Source Tracking, fecal contamination, 16S rRNA gene, Real-Time PCR, *Bacteroidales*, *Lactobacillus amylovorus*, persistence, river water

## INTRODUCTION

In intensive livestock areas such as Brittany in France, where 56% of total French pig production takes place, spreading of pig manure over agricultural land contributes to the contamination of the aquatic environment and could lead to the degradation of shellfish farming and bathing waters. Management and remediation efforts have been proposed to correctly identify the origin of the organic pollution and distinguish between animal and human sources. For example, in response to the health risks in recreational waters, the revised Bathing Water European Directive (2006/7/EC) changed the bathing water classification system and introduced more stringent standards. One important change was the requirement to produce bathing water profiles, which requires identification of the origin of the fecal contamination. Standard techniques that enumerate culturable fecal coliforms, however, are not sufficient to determine the origin of contamination as bacteria such as *Escherichia coli* and enterococci are found in the feces of humans and warm-blooded animals (e.g., birds, wild animals and livestock). To distinguish between human and animal sources of fecal pollution, chemical compounds and microbial source tracking (MST) methods have been developed (8, 22, 45, 67). Among them, promising library-independent MST methods based on molecular techniques such as the Polymerase Chain Reaction (PCR) have been developed to target host-specific bacteria (7, 8). Real-time PCR have been developed to quantify human-, ruminant- and pig-specific bacteria (44, 56, 60). Previous studies suggested that *Bacteroidales* could be used as alternative fecal-indicator organisms, as they are numerically dominant in the intestinal flora, highly abundant in feces with  $10^9$  to  $10^{11}$  bacteria per g of feces, restricted to warm-blooded animals and they are not known for multiplication in the environment (1, 17, 19, 20, 36, 52, 62). *Lactobacillus* is also a dominant genus in the pig intestinal tract with  $10^8$  to  $10^{10}$  bacteria per g of feces (31, 34, 55, 66, 75) and one species, *L. amylovorus* appears to be a good indicator of pig fecal pollution (44). To date, only three pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers have been developed to identify and quantify pig fecal pollution in the environment with real-time PCR (47, 52). The marker developed by Okabe *et al.* (52) showed some cross reaction with human and cow feces in France while the Pig-1-Bac and the Pig-2-Bac markers based on the TaqMan® assay developed by Mieszkin *et al.* (47) demonstrated 98 to 100% sensitivity in pig feces, in manure and in lagoon water samples and 100% specificity in samples of human, bovine, ovine and equine feces. Furthermore, average concentrations of these pig-specific *Bacteroidales* markers were estimated at  $8.6 \pm 0.7 \log_{10}$  copies per g of wet feces and  $4.8 \pm 0.8 \log_{10}$  copies per mL of manure. The *L. amylovorus* marker proposed by Marti *et al.* (44) based on the SYBRGreen® assay, using the primers designed by Konstantinov *et al.* (32), also showed a high level of sensitivity (100%;  $n=76$ ) to pig feces and manure samples and specificity (96%;  $n=115$ ) in samples of human, bovine, ovine, and poultry feces. Average concentrations of *L. amylovorus* were  $7.2 \pm 0.5 \log_{10}$  cells per g of wet feces and  $5.9 \pm 0.6 \log_{10}$  cells per mL of manure.

If host specificity needs to be taken into account to check if a marker is able to trace the origin of fecal contamination, their persistence in environmental surface water is also an important factor. Given their habitat, *Bacteroidales* and lactobacilli are well adapted to anaerobic and microaerophilic conditions and in nutrient-rich gut environments (18, 73). In aerobic fresh waters for example, less than 1% of *Bacteroides fragilis* cells could be detected after a week (19). It was thus important to study the persistence of the three pig-specific markers initially present in pig manure, in surface water under the influence of the two major factors that could affect the survival of indicator bacteria i.e., oxygen and temperature. To our knowledge, no data has been reported on the impact of abiotic factors on the persistence of *L. amylovorus* in water. However, a few studies using molecular methods described the survival of *Bacteroidales* under oxygen stress, temperature, predation, and salinity (35, 53, 59, 60). These

studies focused on persistence of bacteria from feces or pure culture using several methods such as bromodeoxyuridine immunocapture, LDS-FISH and conventional and real-time PCR. Globally, these authors observed a decrease in the persistence of *Bacteroidales* with an increase in temperature, with higher concentrations of oxygen, and low salinity. For host-specific *Bacteroidales* markers detected using real-time PCR, the effect of temperature, salinity and predation has also been studied (6, 53, 60). However, only one study concerning pig-specific *Bacteroidales* has been published (53).

The aim of this study was to evaluate the impact of four conditions of oxygen concentrations/temperature in filtered river water microcosms inoculated with a pig manure (i) on the dynamics of two dominant manure populations (*Bacteroidales* and *Bacillus-Streptococcus-Lactobacillus* (BSL)) using CE-SSCP analysis; (ii) on the persistence of *Bacteroidales*, Lactobacilli, Pig-1-Bac, Pig-2-Bac markers and *L. amylovorus*; and (iii) on the survival of fecal indicators *E. coli* and enterococci by culture.

This paper compares the behaviour of three recently developed pig-specific genetic markers to that of conventional fecal indicators and provides a better understanding of their persistence in the aquatic environment.

## MATERIALS AND METHODS

### *River water microcosms*

Water samples were collected from the Neven River, Brittany, France, where the concentration of *E. coli* was lower than 1 Colony Forming Unit (CFU) per 100 mL water, and stored at 4°C before experimentation. The samples were filtered through 3-µm nitrocellulose membrane filters (Millipore, Ireland) to eliminate most grazing protozoa (71). Pig manure was collected from a farm located in Brittany and samples were taken from a storage tank after homogenisation with propeller agitator for 20 minutes. The chemical characteristics of the manure were pH 7.6, dry matter 4.6% (wt/wt), total Kjeldahl nitrogen content 4.1 g per L, ammonium 2.6 g per L, total Chemical Oxygen Demand (COD) 51 g O<sub>2</sub> per L.

Microcosms, which consisted of 100-fold dilution of pig manure in filtered river water, were prepared in sterile 2-liter or 5-liter flasks. Four conditions were tested: 4°C or 20°C with aerobic (5-liter flasks) or microaerophilic (2-liter flasks) atmosphere. Microaerophilic flasks were hermetically sealed with silicone caps. Aerobic conditions were established by flushing river water microcosms with 0.22 µm filter-sterilized air (Millipore, France) to obtain oxygen saturation. Microaerophilic conditions were established by flushing river water microcosms with filter-sterilized nitrogen. In these conditions, oxygen concentrations ranged from 0.4 to 1.9 mg oxygen per L (corresponding to % of saturation).

The four river water microcosms and their respective control river water microcosms (same conditions without manure) were kept in the dark and gently stirred with a magnetic barrel. Fourteen samples in duplicate were collected over a 43-day period from each microcosm.

### *Sample preparation and DNA extraction*

Sampling was carried out daily for the first five days, every two days until day 11 (D11) and every four days until D26. Additional samples were also collected on D34 and D43. At each sampling date, 55 mL were collected in duplicate either with a sterile pipette for aerobic conditions or with a 20-mL sterile barrel syringe for microaerophilic conditions and transferred to sterile vials for molecular and cultural analyses. After sampling, microaerophilic microcosms were flushed with filter-sterilized nitrogen for at least 15 min.

For each duplicate sample collected per river microcosm, a volume of 5 mL of water was kept for analysis and 50 mL were filtered through 0.22 µm Nuclepore membrane filters (Whatman, Germany). The filters were then placed in 1.6 mL of Stool Lysis (ASL) buffer and frozen at -20°C until extraction. DNA was extracted using the QIAamp DNA stool kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) in accordance with the manufacturer's instructions. The elution volume was 50 µL.

### *Enumeration of *E. coli* and enterococci*

Fecal indicators were enumerated in duplicate to estimate the level of fecal contamination. *Escherichia coli* was counted using 3M<sup>TM</sup> Petrifilm *E. coli* (3M, France). The gel of the Petrifilm was rehydrated with 1 mL of sample and incubated for 24 h at 44°C. Blue colonies (Glucuronidase positive) were counted to determine the concentration of *E. coli* (68). The detection limit was  $1 \times 10^2$  CFU per 100 mL of water.

Enterococci were detected according to the Standard Procedures for Water Analysis (ISO 7899-2:2000). Filtration was replaced by the plating of 0.1 mL of sample onto Slanetz and Bartley agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). After incubation at 37°C for 48 h, typical colonies (pink, red or maroon) were transferred onto Bile-Esculin-Azide agar (BEA) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and incubated for 2 h at 44°C. Black colonies on BEA were counted as enterococci. The detection limit was  $1 \times 10^3$  CFU per 100 mL water.

### **PCR for CE-SSCP analysis**

Conventional PCRs were performed for the *Bacteroides-Prevotella* and BSL groups. The reaction mix was 200 nM dNTP, 350 nM of each primer (Table 1), 1x AccuPrime *Taq* DNA polymerase buffer II, 2.5 U AccuPrime *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 1 µL DNA extracts (10-fold dilutions) from each river water microcosm and control river water microcosm at D0 and D43 of the experiment. The final reaction volume was 20 µL. The annealing temperature was 55°C for the *Bacteroides-Prevotella* group and 61°C for the *Bacillus-Streptococcus-Lactobacillus* group. After a denaturation step at 94°C for 2 min, the reactions were carried out by 30 cycles at 94°C for 30 s, at the annealing temperature for 90 s, and at 68°C for 90 s. No final elongation was performed, as recommended by the supplier (Invitrogen). The reaction was stopped by cooling the mixture to 10°C.

The size of the amplification products was confirmed by agarose gel electrophoresis (TBE 1X 1.5 % agarose (wt/vol)). The PCR products were visualised under UV light after gel staining with ethidium bromide. A volume of 1 µL of each PCR product was used as template for the CE-SSCP analyses.

The CE-SSCP-PCRs were performed with primers W34 and W49 targeting the 16S rDNA V3 region (200 base pairs) (Table 1). The reaction mix was 200 nM dNTP, 390 nM of each primer, 1x *Pfu* turbo buffer, 0.625 U *Pfu* turbo (Stratagene) and 1 µL of the previously amplified PCR products. The final reaction volume was 20 µL. The amplification conditions were 2 min at 94°C followed by 25 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 61°C then 30 s at 72°C, and a final elongation step of 10 min at 72°C. The resulting PCR products were separated by SSCP capillary electrophoresis using an ABI 310 genetic analyser (Applied Biosystems) as described by Delbes *et al.* (16) but using a CAP 5.58 % - Glycerol 10 % polymer (Applied Biosystems).

### **Real-time PCR for pig-specific and general markers**

The three pig-specific markers and general All-*Bacteria*, All-*Bacteroidales* and total lactobacilli markers were quantified in the samples of river water and river water microcosms.

### **Oligonucleotide primers and probes**

The primers and probe All-*Bacteria* (Bact2, modified from Suzuki *et al.* (63)) and All-*Bacteroidales* (AllBac) from Layton *et al.* (37), were used to amplify total bacterial and total *Bacteroidales* 16S rRNA genes. The primers lactobacilli LAC1 (69), and Lab0677 (27) were used to amplify total lactobacilli 16S rRNA genes (Table 1).

The two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers (Pig-1-Bac and Pig-2-Bac) and Representational Difference Analysis (RDA) fragment A of *L. amylovorus* marker were quantified with the primers and probe described by Mieszkin *et al.* (47) and Konstantinov *et al.* (32), respectively (Table 1).

### **Real-time PCR assays**

All amplifications were performed using the Chromo4 real-time detection system associated with Bio-Rad Opticon Manager software version 3.1 (Bio-Rad, Hercules, CA). For the All-*Bacteria*, All-*Bacteroidales*, Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers, real-time PCR was performed using the TaqMan<sup>®</sup> Brilliant II QPCR Master Mix kit (Stratagene) whereas for the total lactobacilli and *L. amylovorus* markers, real-time PCR was performed using the IQ SYBR-Green Supermix (Bio-Rad).

**Table 1: Oligonucleotide sequences for real-time PCR assays with the annealing temperature, the final concentration and the expected size for each amplified product**

Primers and Probes	Primer and probe sequence (5'→ 3') <sup>b</sup>	Size of amplicon (bp)	Annealing Temp.(°C)	Final concentration (nmol)	Target	Reference
<u>Bact2<sup>a</sup></u>						
BACT1369F	CGGTGAATACGTTCCCGG	142	60	200	All- <i>Bacteria</i>	Suzuki <i>et al.</i> , (63)
PROK1492R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT			200		
TM1389F	<b>(FAM)CTTGTACACACCGCCCGTC(NFQ-MGB)</b>			250		
<u>AllBac</u>						
AllBac296F	GAGAGGAAGGTCCCCAC	106	60	200	All- <i>Bacteroidales</i>	Layton <i>et al.</i> , (38)
AllBac467R	CGCTACTTGGCTGGTTCAG			200		
AllBac375Bhqr	<b>(FAM)CCATTGACCAATATTCTCACTGCTGCT(BHQ-1)</b>			100		
<u>Pig-1-Bac</u>						
Pig-1-Bac32Fm	AACGCTAGCTACAGGCTTAAC	129	60	200	Pig-specific <i>Bacteroidales</i>	Mieszkin <i>et al.</i> (47)
Pig-1-Bac108R	CGGGCTATTCTGACTATGGG			200		
Pig-1-Bac44P	<b>(FAM)ATCGAAGCTTGCTTTGATAGATGGCG(BHQ-1)</b>			200		
<u>Pig-2-Bac</u>						
Pig-2-Bac41F	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT	116	60	300	Pig-specific <i>Bacteroidales</i>	Mieszkin <i>et al.</i> (47)
Pig-2-Bac163Rm	ACCTCATACGGTATTAATCCGC			300		
Pig-2Bac113MGB	<b>(VIC)TCCACGGGATAGCC(NFQ-MGB)</b>			200		
<u>Lactobacilli</u>						
LAC1	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	320	60	200	Lactobacilli	Walter <i>et al.</i> , (69); Heilig <i>et al.</i> (28)
Lab0677	CACCGCTACACATGGAG			200		
<u><i>L. amylovorus</i></u>						
OTU171_RDA_F	TTCTGCCTTTTTGGGATCAA	175	60	200	<i>L. amylovorus</i>	Konstantinov <i>et al.</i> (35)
OTU171_RDA_R	CCTTGTTTATTCAAGTGGGTGA			200		
<u>BSL_SSCP</u>						
W18	GAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	670	61	350	<i>Bacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	Godon <i>et al.</i> (24); Heilig <i>et al.</i> (28)
GE08	ATT(C/T)CACCGCTACACATG			350		
<u><i>Bacteroides-Prevotella</i></u>						
<u>SSCP</u>		880	55	350	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i>	Godon <i>et al.</i> (24); Wood <i>et al.</i> (74)
W18	GAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG			350		
rBacPre	TCACCGTTGCCGGCGTACTC					
W49	ACGGTCCAGACTCCTACGGG					
W34	TTACCGCGGCTGCTGGCAC <b>(FAM)</b>	200	61	390	16S rRNA V3 region	Delbes, (17)
				390		

<sup>a</sup> Modified from reference (Suzuki *et al.*, 2000); <sup>b</sup> FAM, 6-carboxyfluorescein; NFQ-MGB, nonfluorescent quencher group-minor groove binder; BHQ-1, black hole quencher

Each reaction was run in duplicate. The cycle conditions for the TaqMan<sup>®</sup> assays were 1 cycle at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min. The cycle conditions for the SYBR-Green<sup>®</sup> assay were 1 cycle at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 45 s. To control amplification specificity, a dissociation step was added at 95°C for 1 min, 55°C for 30 s and 95°C for 30 s.

Reactions were carried out in a final volume of 25 µL with appropriate final concentrations of primers and probe (Table 1). The presence/absence of PCR inhibitors was verified using an Internal Positive Control (IPC; AppliedBiosystem, France). Samples were diluted if inhibitors were present. Negative controls (no template DNA) were performed in triplicate for each run.

#### ***DNA standard curves***

Linear plasmids (47) used to generate standard curves were extracted with the QIAquick Miniprep Extraction Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. The linear forms of plasmids were obtained with *NotI* enzyme (Roche Diagnostics) in a final volume of 50 µL for 3 h at 37°C. For the quantification of *Bacteroidales* markers, standard curves were generated from serial dilutions of estimated concentration of plasmid DNA ranging from  $1.6 \times 10^7$  to 1.6 copies per PCR.

The PCR standard for the All-*Bacteria* and for the total lactobacilli and *L. amylovorus* markers was prepared by 10-fold dilution of bacterial genomic DNA extracted from a pure culture of *E. coli* and from a pure culture of *L. amylovorus* DSM16698, respectively, with the Wizard genomic DNA purification Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Dilutions ranged from  $7 \times 10^6$  to  $7 \times 10^1$  copies per PCR for *E. coli* and from  $7 \times 10^5$  to 7 cells per PCR for *L. amylovorus* DSM16698. The number of copies of 16S rRNA genes per genome was considered to be 7 copies for the *E. coli* strain (30).

Standard curves were generated by plotting threshold cycles (Ct) against 16S rRNA genes or cells, depending on the marker.

#### ***Limit of quantification in river water microcosms of the real-time PCR assay***

Limits of quantification for All-*Bacteroidales*, lactobacilli and the three pig-specific markers in river water microcosms were assessed. Pig manure and the filtered river water used for river water microcosms were mixed to obtain 100-fold dilution from the manure. Series of 10-fold dilution from  $10^{-2}$  to  $10^{-9}$  of the suspension were made in the same filtered river water in duplicate. Fifty milliliters of each dilution were filtered through 0.22 µm Nuclepore membrane filters and DNA was extracted using the QIAamp DNA stool kit. Real-time PCR assays for All-*Bacteroidales*, total lactobacilli, pig-specific *Bacteroidales* and *L. amylovorus* markers were performed. The quantification limit was defined as the lowest concentration of the markers still within the linear range of quantification of the real-time PCR assay in serially diluted suspensions.

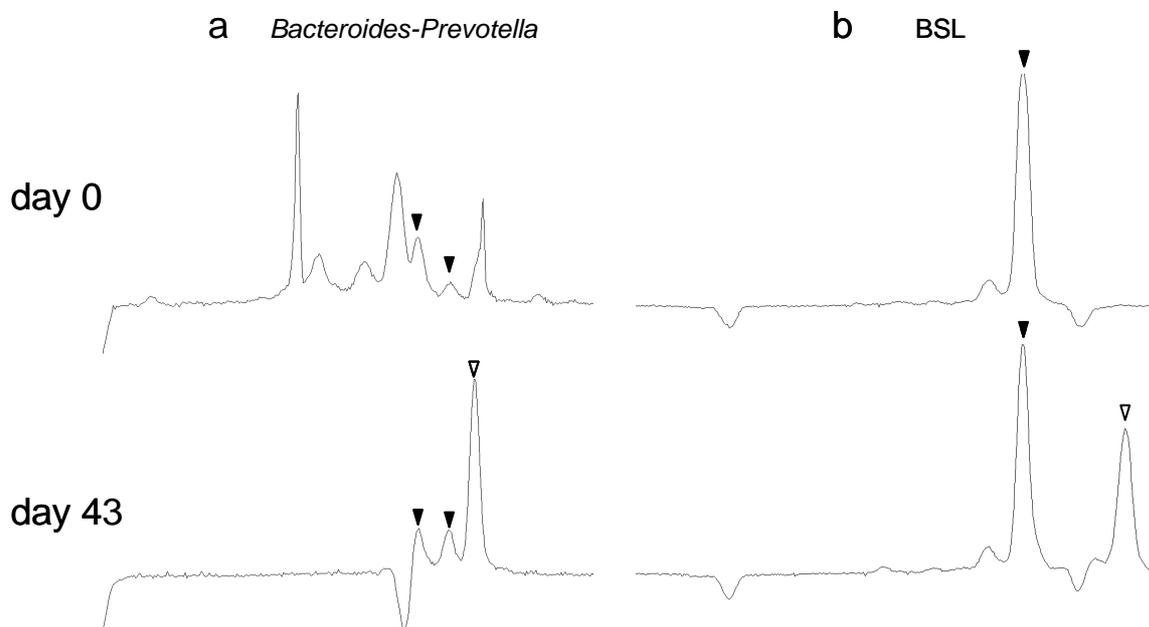
#### ***Calculation of decay rates***

Decay rates of the different genetic markers and of cultured fecal indicator organisms were calculated using the following equation:  $r = (\ln(N_t) - \ln(N_0))/t$ , where  $r$ =decay rate,  $N_t$ = number of copies, cells or CFU per 100 mL water at time  $t$ ,  $N_0$ = number of copies, cells or CFU per 100 mL water at time zero, and  $t$ =time (days). Time  $t$  corresponded to the number of days between day 0 (the beginning of the experiment) and day 43 (the end of the experiment) or between day 0 and day 16, which was the last day when all the target bacteria could be quantified.

## RESULTS

### CE-SSCP profiles

The effect of temperature and oxygen concentration on *Bacteroides-Prevotella* and BSL groups in river water microcosms was evaluated by 16S rRNA gene-targeted PCR-SSCP analysis. The SSCP profile of *Bacteroides-Prevotella* of the control river water microcosms presented seven distinguishable peaks (Fig. 1a). After 43 days, regardless of the control river water microcosms, the profiles had only three peaks, two of them being common with the profile at day 0 (Fig. 1a). The BSL SSCP profile of the control river water had one peak which persisted throughout the experiment (Fig. 1b). A second peak appeared after 43 days in all the conditions tested (Fig. 1b). None of the peaks present on the profile of the control river water at day 0 comigrated with any of the peaks of the manure sample (data not shown). According to these results, the SSCP profiles of each microcosm observed at day 0 corresponded to the bacterial population of the manure.

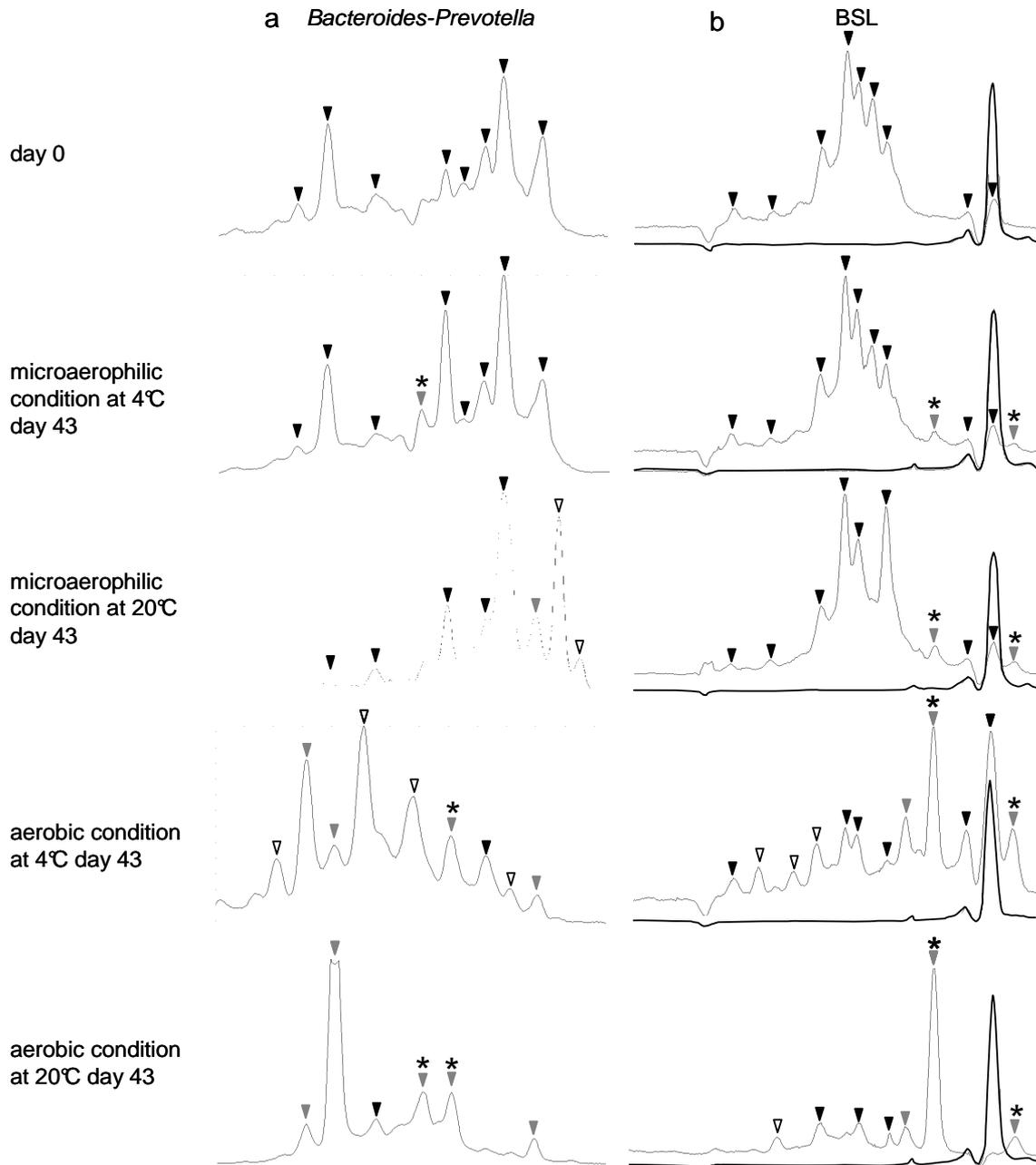


**Figure 1: CE-SSCP profiles of *Bacteroides-Prevotella* group (a) and BSL group (b) at day 0 (upper graphs) and at day 43 (lower graphs) in the control river water. As the profiles were similar regardless of the temperature and the oxygen concentration, only one profile (aerobic conditions at 20°C) is presented. Black arrow heads indicate common peaks at day 0 and day 43. White arrow heads indicate peaks present only at day 43**

The CE-SSCP profiles of *Bacteroides-Prevotella*, BSL groups and the V3 region of the 16S DNA of *L. amylovorus* DSM 16698, obtained at day 0 and at day 43 are aligned in figure 2. The profiles of *Bacteroides-Prevotella* and BSL groups at day 0 which were identical in the four microcosms, had eight and nine distinguishable peaks, respectively, that emerged from the background of subdominant bacterial diversity. The last peak of the BSL group profile comigrated perfectly with the peak corresponding to *L. amylovorus* (Fig. 2b).

At 4°C, in microaerophilic conditions, all peaks observed at day 0 were still present at day 43, suggesting that the diversity of the two groups of bacteria remained unchanged. The small peaks, which appeared on the profiles (indicated by an asterisk in Fig. 2) comigrated with one peak (for *Bacteroides-Prevotella*) and the two peaks (for BSL group) observed at day 43 in the river water. At 20°C, in microaerophilic conditions, the profile of the BSL group remained

very similar to that observed at 4°C, except for one peak which disappeared (Fig. 2b). The *Bacteroides-Prevotella* group was most affected by the temperature of 20°C as three peaks disappeared and three peaks appeared (Fig. 2a).



**Figure 2: CE-SSCP profiles of *Bacteroides-Prevotella* group (a) and BSL group at day 0 (upper graphs) and at day 43 (lower graphs) in microaerophilic conditions at 4°C and 20°C, and in aerobic conditions at 4°C and 20°C. Black arrow heads indicate common peaks at day 0 and day 43, grey arrow heads indicate peaks present only on day 43 and common to at least two profiles, white arrow heads indicate peaks present only at day 43 and specific to the profile; black stars indicate peaks present in the river water. Profiles in bold corresponds to the profile of the V3 region of 16S DNA of *L. amylovorus* DSM16698**

The CE-SSCP profiles revealed significant changes in the bacterial community of the two groups of bacteria when exposed to oxygen. At 4°C, the CE-SSCP profile of the BSL group had 10 small peaks and two dominant peaks that comigrated with one peak of the river water and with the peak corresponding to *L. amylovorus*. At 20°C, there was a clear reduction in the diversity compared to the profile at 4°C. Five small peaks remained but only one peak, which comigrated with one of the peaks of the river water, became clearly dominant.

Oxygen also had a marked effect on the *Bacteroides-Prevotella* group. At 4°C, only one dominant peak observed at day 0 was still present at day 43, whereas eight new peaks appeared, one of which comigrated with a peak of the river water (Fig. 2a). At 20°C, as observed for the BSL group, there was a decrease in the diversity as one peak became highly dominant.

#### ***Quantification limit of the general and pig-specific markers***

The linear decrease in the number of copies of *All-Bacteroidales*, Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers as a function of 10-fold serial dilution of suspended pig manure in filtered river water resulted in a quantification limit of 4.2, 2.8 and 2.3 log<sub>10</sub> 16S rRNA gene copies per 100 mL water corresponding to 320, eight and four copies per reaction, respectively. The limits of quantification of total lactobacilli and *L. amylovorus* markers were 4.6 and 2.1 log<sub>10</sub> cells per 100 mL water, corresponding to 860 and two cells per reaction, respectively.

#### ***Quantification of bacteria in river water and in microcosms after addition of pig manure***

Concentrations of *All-Bacteria*, *All-Bacteroidales*, Pig-1-Bac, Pig-2-Bac, total lactobacilli and *L. amylovorus* markers were evaluated by real-time PCR. *Escherichia coli* and enterococci were enumerated simultaneously by culture.

In filtered river water samples, concentrations of *All-Bacteria*, *All-Bacteroidales* and total lactobacilli were respectively  $7.4 \pm 0.1$ ,  $4.2 \pm 0.1$  log<sub>10</sub> copies and  $4.8 \pm 0.2$  log<sub>10</sub> log<sub>10</sub> cells per 100 mL water whereas *E. coli*, enterococci and the three pig-specific markers were not quantifiable.

At day 0, after addition of manure, the mean concentrations of *All-Bacteria*, *All-Bacteroidales* and total lactobacilli were  $11 \pm 0.5$  log<sub>10</sub> copies,  $8.8 \pm 0.2$  log<sub>10</sub> copies and  $6.0 \pm 0.2$  log<sub>10</sub> cells per 100 mL, respectively. For the three pig-specific markers, Pig-1-Bac, Pig-2-Bac and *L. amylovorus*, concentrations were  $5.4 \pm 0.1$ ,  $5.7 \pm 0.2$  log<sub>10</sub> copies and  $5.8 \pm 0.2$  log<sub>10</sub> cells per 100 mL, respectively (Fig. 3). The mean concentrations of *E. coli* and enterococci were  $3.3 \pm 0.1$  log<sub>10</sub> CFU and  $4.1 \pm 0.1$  log<sub>10</sub> CFU per 100 mL, respectively (Fig. 4).

In the four control river water microcosms, no conventional fecal indicator and none of the three pig-specific markers were detected during the 43 days of the experiment (data not shown).

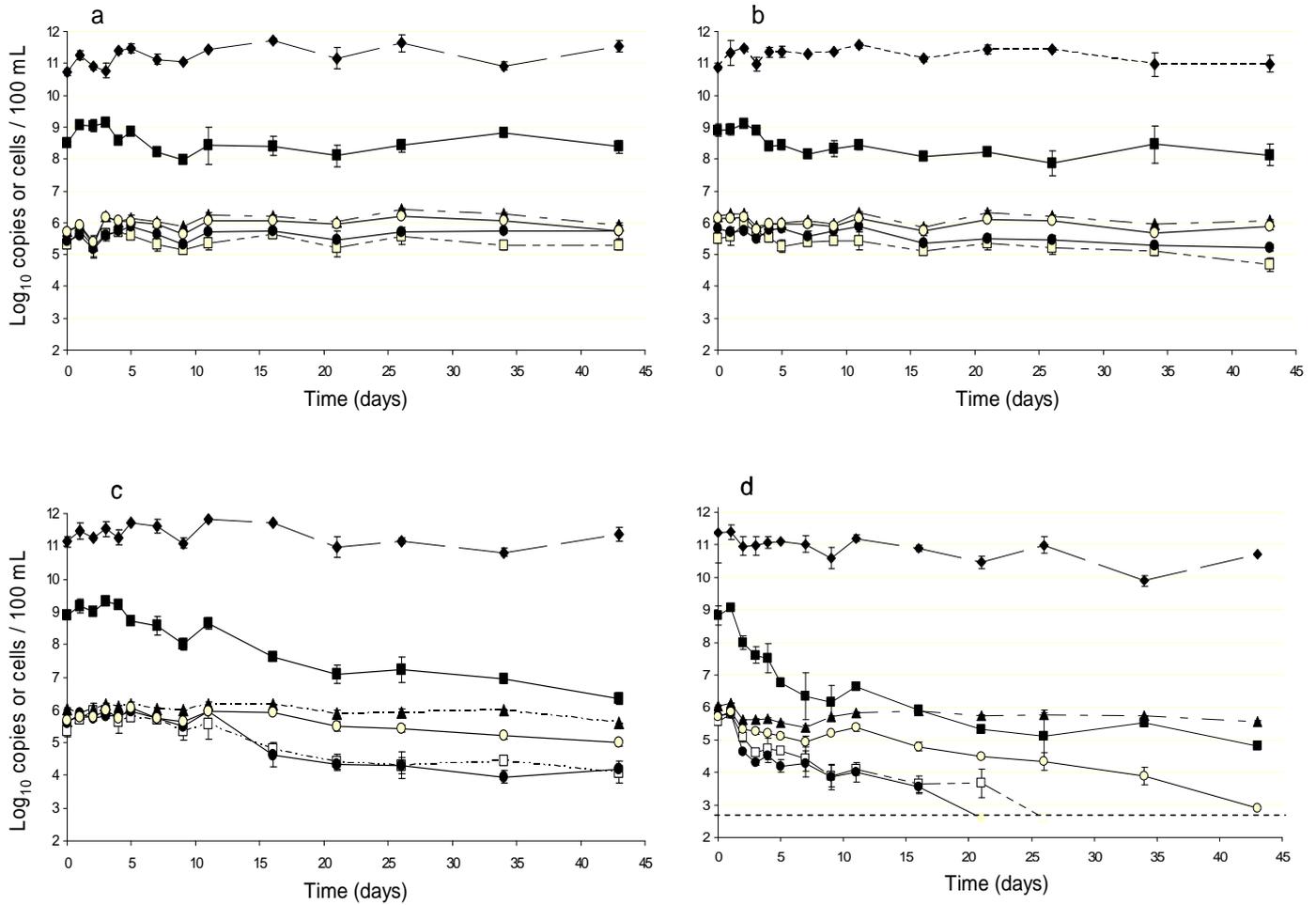
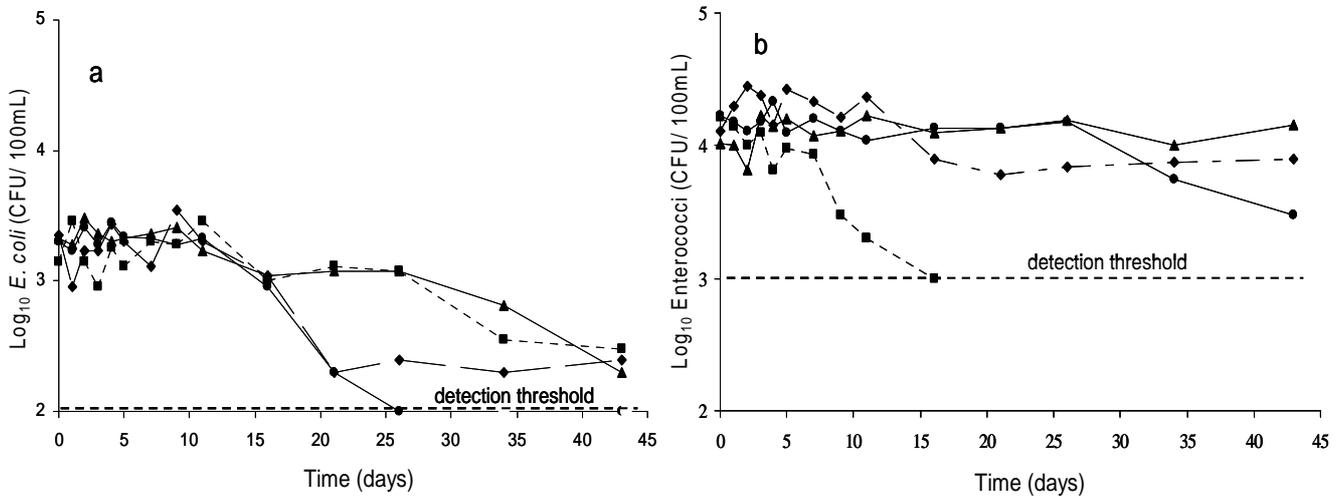


Figure 3: Persistence of All-Bacteria (◆), All-Bacteroidales (■), total lactobacilli (▲), Pig-1-Bac (□), Pig-2-Bac (●) and *L. amylovorus* (○) markers in microcosms under microaerophilic conditions at 4°C (a), microaerophilic conditions at 20°C (b), aerobic conditions at 4°C (c), and aerobic conditions at 20°C (d); the dotted lines indicate the mean quantification limits of the Pig-1-Bac marker. Error bars indicate the standard deviation of reaction ( $n=4$ ). In some cases, the error bars were too small to be illustrated



**Figure 4: Survival of the fecal indicators *E. coli* (a) and enterococci (b) in filtered river water microcosms incubated under aerobic conditions at 4°C (◆), aerobic conditions at 20°C (■), microaerophilic conditions at 4°C (▲) and microaerophilic conditions at 20°C (●). Dotted lines indicate the detection threshold of the Pig-1-Bac marker**

***Effects of oxygen and temperature on the persistence of genetic markers***

The behaviour of each group of bacteria depended on the incubation conditions. The level of total bacteria remained stable for the 43 days of the experiment regardless of the temperature and the oxygen concentration (Fig. 3). In most cases, regardless of the microcosm conditions, the two pig-specific *Bacteroidales* markers presented decay rates lower than those of All-*Bacteroidales* whereas the decay rates of *L. amylovorus* were equal to or higher than those of total lactobacilli (Table 2). Microaerophilic conditions at 4°C had no effect on the persistence of the markers, whose concentrations did not change significantly over the course of the experiment (Fig. 3a). Indeed, the decay rates calculated for the whole experiment were equal to 0 or slightly positive. At 20°C, under microaerophilic conditions, a slight decrease was observed (less than one logarithmic unit) for the three *Bacteroidales* markers whereas total lactobacilli and *L. amylovorus* -which presented lower decay rates- remained stable (Fig. 3b). As observed for the CE-SSCP profiles, aerobic conditions led to the biggest changes. Under aerobic conditions at 4°C, concentrations of All-*Bacteroidales* and total lactobacilli markers decreased by 2.6 and 0.4 log<sub>10</sub> units after 43 days, respectively (Fig. 3c). The decay rates of Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers were more affected by oxygen exposure than *L. amylovorus* as indicated by their higher decay rates. The biggest decline was observed at 20°C for the All-*Bacteroidales* markers, whose concentration was reduced by about 4 log<sub>10</sub> units within 43 days (Fig. 3d), while the concentration of total lactobacilli only decreased slightly (less than 0.5 log<sub>10</sub> unit). Concentrations of the Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers decreased considerably under these conditions (more than 3.5 log<sub>10</sub> units) and reached the limit of quantification after 21 and 16 days, respectively. The decrease in the concentration of *L. amylovorus* was less marked but reached 2.9 log<sub>10</sub> units after 43 days.

**Table 2: Decay rates for All-Bacteria, All-Bacteroidales, total lactobacilli, pig markers, *E. coli* and enterococci**

Microcosm conditions	Day	Decay rates from <sup>a</sup>							
		Total bacteria	AllBac	Pig-1-Bac	Pig-2-Bac	Total lactobacilli	<i>L. amylovorus</i>	<i>E. coli</i>	enterococci
aerobic 4°C	16	0,09	-0,19	-0,09	-0,14	0,01	0,04	-0,04	-0,03
	43	0,02	-0,14	-0,07	-0,07	-0,02	-0,04	-0,05	-0,01
aerobic 20°C	16	-0,07	-0,42	-0,29	-0,32	-0,02	-0,1	-0,02	-0,18
	43	-0,04	-0,21	-	-	-0,03	-0,1	-0,04	-
microaerophilic 4°C	16	0,14	-0,01	0,04	0,04	0,07	0,05	-0,04	0,01
	43	0,04	0	0	0,02	0,01	0	-0,05	0,01
microaerophilic 20°C	16	0,03	-0,12	-0,06	-0,06	-0,05	-0,06	-0,05	-0,01
	43	0	-0,04	-0,04	-0,03	-0,01	-0,01	-	-0,04

<sup>a</sup> Decay rates were calculated as described in Materials and Methods

***Effects of oxygen and temperature on the survival of fecal indicators***

The survival of *E. coli* and enterococci was also compared. Except under aerobic conditions at 20°C, the decay rates of enterococci were lower than those of *E. coli* (Table 2). The highest decay rates were observed at 20°C, under microaerophilic conditions for *E. coli* and under aerobic conditions for enterococci.

While at 4°C the counts of enterococci remained stable throughout the experiment, they decreased at 20°C. The decrease, which started after 27 days under microaerophilic conditions, did not exceed 0.7 log<sub>10</sub> at day 43 whereas under aerobic conditions, the number of enterococci declined after 7 days and reached the quantification limit after 16 days (Fig. 4). The concentrations of *E. coli* decreased in the four microcosms, suggesting that *E. coli* was less persistent than enterococci in our experimental conditions.

## DISCUSSION

For intensive pig farming areas, such as Brittany, spreading of pig manure contributes to the degradation of water quality. It is thus important to have tools to identify this type of fecal pollution. The specificity and sensitivity of two pig-specific markers based on real-time PCR amplification of *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA gene (47) and of one specific gene of *L. amylovorus* (44) were previously successfully tested for the detection and quantification of pig manure contamination in feces, effluents (manure, compost...) and in surface river waters. However, the persistence of these different pig markers after discharge of manure into environmental waters is unknown. The risk of transfer of enteric microorganisms from pig manure into surface water is mainly due to rainfall events following manure spreading (65). The enteric microorganisms are transferred via surface runoff into fresh water and are subsequently transported to coastal waters. In this study, microcosms of fresh river water inoculated with manure were used to examine the persistence of markers in water contaminated by manure after a rainfall event.

Prior to evaluating the persistence of the pig specific markers, water was filtered to eliminate grazing which was previously found to drastically reduce the survival of enteric bacteria (6, 42, 46) and to be positively correlated with temperature (12).

The persistence of pig-specific genetic markers, *Bacteroidales*, total lactobacilli and conventional fecal indicators (*E. coli* and enterococci) was examined under different oxygen and temperature conditions.

In the river water, lactobacilli and *Bacteroidales* were detected at similar concentrations and represented less than 0.1% of total bacteria. Their presence in the river is consistent with the fact that lactobacilli are widely distributed in nature (18) and that *Bacteroidales* have already been identified in fresh waters (5, 40). In the river water, wider diversity was expected for the *Bacteroidales* than for the BSL group as the CE-SSCP profiles showed seven and one peak, respectively. Interestingly, none of the peaks found in the river water were the same as those observed on the profiles of each microcosm at day 0, confirming the specificity of the dominant bacterial population of the manure. Significant differences in the bacterial CE-SSCP profiles were observed depending on the temperature and oxygen. At 4°C, under microaerophilic conditions, the SSCP profiles remained unchanged whereas there was a marked decrease in the diversity of both groups of bacteria at 20°C under aerobic conditions, suggesting that the dominant species of both groups of bacteria are not well adapted to survive in river water with a high level of dissolved oxygen at a temperature of 20°C. Both *Bacteroidales* and BSL bacterial groups originated from manure stored for one month under anaerobic conditions at temperatures ranging from 15 to 20°C. Despite dilution in water, the relative stability of the two bacterial groups under microaerophilic conditions is in agreement with the data reported by Leung and Topp (39) and Peu et al. (54) who observed stability of the dominant bacterial populations during anaerobic storage of manure. The significant effect of oxygen on the two groups of bacteria is consistent with the study of Leung and Topp (39), who observed significant changes in bacterial populations during aeration of manure. Marti et al. (43), who compared the CE-SSCP profiles of raw and biologically treated manures also highlighted a shift in *Bacteroidales* species that they attributed to oxygenation of the manure. Moreover, the present results confirm the dominance of *L. amylovorus* in manure, which remained dominant in the river water microcosm despite the shift in the BSL population at 4°C under aerobic conditions and at 20°C under microaerophilic conditions.

In accordance with the CE-SSCP profiles, the concentrations of all target bacteria remained stable during the course of the experiment under microaerophilic conditions whereas there was a significant decrease in the concentrations of bacteria under aerobic conditions at 20°C, except for *E. coli*, which was most affected by microaerophilic conditions. Nevertheless, the

initial concentration of *E. coli* at day 0 and the threshold of the method could explain why the detection limit was reached rapidly. Under aerobic conditions at 20°C, during the first 16 days, the concentrations of All-*Bacteroidales*, Pig-1-Bac and Pig-2-Bac decreased more rapidly than those of total lactobacilli, *L. amylovorus* and enterococci as expected due to their weaker oxygen tolerance. These results indicate that lactic bacteria are more tolerant to oxygen than *Bacteroidales*. Lactobacilli contain a large number of aerotolerant species (3, 10, 15, 18). Although they have no electron transport chain, they possess oxidases that utilize O<sub>2</sub> and enable growth under aerobic conditions (10). It has been reported that strains of *L. amylovorus* could adapt to the presence of oxygen (51). In this study, contrary to lactobacilli, *L. amylovorus* was affected at 20°C by aerobic conditions as its concentration -which was stable under microaerophilic conditions- progressively decreased in the presence of oxygen. *Bacteroidales* are strictly anaerobic bacteria but the species differ in their tolerance to oxygen. Thus, while *Bacteroides fragilis* is a aerotolerant anaerobic bacterium and can persist in aerobic environments for extended periods, other species such as *Prevotella melaninogenica* are strictly anaerobic bacteria (57, 64). It is important to note that the pig-specific *Bacteroidales* markers used in this study belong to *Prevotella* genus (47). Furthermore, phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene clone libraries constructed from pig fecal samples showed that respectively 85% of the sequences from pig feces and 55% of the sequences from pig slurry belonged to the *Prevotella* genus (48).

In this study, oxygen had a significant influence on the persistence of the two pig-specific *Bacteroidales* markers, as their concentrations decreased markedly under aerobic conditions at 20°C. These results are consistent with those of Savichtcheva *et al.* (59) who obtained a decrease in the viability of pure cultures of *B. fragilis* cells and fecal *Bacteroides* spp. However, it is important to emphasize that the effect of oxygen is closely related to that of temperature as the influence of aeration on the persistence of the pig-specific markers was less marked at low temperatures. The present results, which showed that lower temperatures increased the persistence of *Bacteroidales*, are in good agreement with data in the literature (36, 53, 59, 60). Concentrations of Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers in aerobic conditions at 20°C started to decrease after 2 days with a decline of 1.5 and 1.8 log<sub>10</sub> copies per 100 mL, respectively after 11 days. In a microcosm of unfiltered river water inoculated with pig feces and kept under aerobic conditions, Okabe and Shimazu (53) also observed that the persistence of a *Bacteroidales* specific marker (Pig-Bac2) varied inversely with temperature. The decrease in the Pig-Bac2 marker was 2 and 3 log<sub>10</sub> copies per 100mL respectively at 4°C and 20°C after 10 days. The lesser decrease observed in the present study in comparison with the data of Okabe and Shimazu (53) could be explained by different behaviour of the *Bacteroidales* specific markers or by the use of filtered river water in our experiment. As reported by Bell *et al.* (6), among the most important factors that influence the persistence of *Bacteroidales* in water are biological agents such as protozoans.

In a previous study, the Pig-2-Bac marker was more often detected than the Pig-1-Bac marker in river water samples although their concentrations were similar in pig feces and pig effluents (47), suggesting that the Pig-1-Bac marker could be less persistent than the Pig-2-Bac marker. In the present study, there was no significant difference in persistence between the two *Bacteroidales* markers regardless of the temperature and oxygen conditions. However, other factors such as salinity, sunlight, presence of toxic agents, could also influence the behaviour of the two markers. Walters and Field (70) indeed observed that two *Bacteroidales* cattle markers showed differential survival linked with light conditions.

The two conventional fecal indicators were detected at 20°C, until day 16 and were still present after 43 days at 4°C regardless of the concentration of oxygen. The longer survival of enterococci under microaerophilic conditions is consistent with the results of the experiment conducted by Roslev *et al.* (58), which showed that in a drinking water microcosm

contaminated with raw sewage, the survival rate of enterococci was higher under anaerobic conditions than under aerobic conditions. In our microcosm experiments, none of the pig markers had the ability to multiply in the river water. This is in accordance with the growth characteristics of *L. amylovorus*, which has an optimum growth temperature of between 37°C and 45°C (33, 50) and which does not grow below 15°C (33). The changes in the concentrations of the three pig markers were comparable to those of conventional fecal indicators, suggesting that they reflect the persistence of these bacteria after transfer to surface waters. Although the survival of enteric pathogen bacteria, viruses and protozoa is highly variable, they persist longer in environmental samples at low temperatures (26) as was observed for the three pig specific markers in our experiments. However, the relationship between the persistence of fecal indicators, specific markers and pathogens is extremely complex given the large number of parameters involved in their survival. The survival of enteric bacteria is influenced by many factors including UV and visible light (25, 61), salinity (21, 49), pH (11), nutrient deprivation (41), temperature (38), oxygen concentration (58), hydrostatic pressure (72), sedimentation (28), protozoan grazing (24) and bacterial competition (29). Moreover, once they are in the surface water, part of the enteric microorganisms are transferred to sediments or sand which form a reservoir for fecal bacteria (2, 4, 9, 13, 14) and can colonize biofilms (42). Taken together, these parameters -including temperature and oxygen- could lead to different behaviour of the pig markers.

The results of this study improve our understanding of the persistence of three anaerobe pig-specific markers in environmental waters and underline the fact that seasonal variations in temperature and the levels of oxygen dissolved in the river waters should therefore be taken into account when identifying sources of fecal pollution. These results also suggest that -consistent with the persistence of the markers selected in this study (at least 16 days)- they could survive during transport to recreational waters or shellfish farming areas via hydrological processes. Using river water microcosms inoculated with manure, we showed that under one of the conditions tested, the pig-specific *Bacteroidales* and the *L. amylovorus* markers displayed different behaviour due to their specific aerotolerance. This result suggests that environmental factors may also lead to different rates of persistence of the markers in surface waters or in sediments. Furthermore, tracing the bacterial source would be improved by the use of a combination of multiple genetic markers.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale et du Travail (AFSSET) (EST-2006/1/36). Romain Marti and Sophie Mieszkina are recipients of a Cemagref-Ademe and an Ifremer-Région Bretagne fellowship, respectively.

## **REFERENCES**

1. Allsop, K., and D. J. Stickler. 1985. An assessment of *Bacteroides fragilis* group organisms as indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* 58:95-99.
2. Alm, E. W., J. Burke, and A. Spain. 2003. Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. *Wat. Res.* 37:3978-3982
3. Amanatidou, A., M. H. Bennik, L. G. Gorris, and E. J. Smid. 2001. Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen. *Arch. Microbiol.* 176:79-88.
4. Anderson, K. L., J. E. Whitlock, and V. J. Harwood. 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3041-3048.
5. Baik, K. S., S. C. Park, E. M. Kim, K. S. Bae, J. H. Ahn, J. O. Ka, J. Chun, and C. N. Seong. 2008. Diversity of bacterial community in freshwater of Woopo wetland. *J. Microbiol.* 46:647-655.
6. Bell, A., A. C. Layton, L. McKay, D. Williams, R. Gentry, and G. S. Sayler. 2009. Factors influencing the persistence of fecal *Bacteroides* in stream water. *J. Environ. Qual.* 38:1224-1232.
7. Bernhard, A. E., and K. G. Field. 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1587-1594.
8. Bernhard, A. E., and K. G. Field. 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4571-4574.
9. Beversdorf, L. J., S. M. Bornstein-Forst, and S. L. McLellan. 2007. The potential for beach sand to serve as a reservoir for *Escherichia coli* and the physical influences on cell die-off. *J. Appl. Microbiol.* 102:1372-1381.
10. Brioukhanov, A. L., and A. I. Netrusov. 2007. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43:567-582.
11. Carlucci, A. F., and D. Pramer. 1960. An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in sea water. *Appl. Microbiol.* 8:247-250.
12. Choi, J. W., and F. Peters. 1992. Effects of Temperature on Two Psychrophilic Ecotypes of a Heterotrophic Nanoflagellate, *Paraphysomonas imperforata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:593-599.
13. Craig, D. L., H. J. Fallowfield, and N. J. Cromar. 2004. Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *J. Appl. Microbiol.* 96:922-930.
14. Davies, C. M., J. A. Long, M. Donald, and N. J. Ashbolt. 1995. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1888-1896.
15. De Angelis, M., and M. Gobbetti. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* 4:106-22.
16. Delbes, C., R. Moletta, and J. J. Godon. 2001. Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35:19-26.

17. Dick, L. K., A. E. Bernhard, T. J. Brodeur, J. W. Santo Domingo, J. M. Simpson, S. P. Walters, and K. G. Field. 2005. Host distribution of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3184-3191.
18. Felis, G. E., and F. Dellaglio. 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8:44-61.
19. Fiksdal, L., J. S. Maki, S. J. LaCroix, and J. T. Staley. 1985. Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:148-150.
20. Furet, J. P., O. Firmesse, M. Gourmelon, C. Bridonneau, J. Tap, S. Mondot, J. Dore, and G. Corthier. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68:351-362.
21. Gauthier, M. J., F. Cauvin, and J. P. Breittmayer. 1985. Influence of salts and temperature on the transfer of mercury resistance from a marine pseudomonad to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:38-40.
22. Glassmeyer, S. T., E. T. Furlong, D. W. Kolpin, J. D. Cahill, S. D. Zaugg, S. L. Werner, M. T. Meyer, and D. D. Kryak. 2005. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environ. Science Tech.* 39:5157-5169.
23. Godon, J. J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, and R. Moletta. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2802-2813.
24. Gonzalez, J. M., J. Iriberry, L. Egea, and I. Barcina. 1992. Characterization of culturability, protistan grazing, and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:998-1004.
25. Gourmelon, M., D. Touati, M. Pommepuy, and M. Cormier. 1997. Survival of *Escherichia coli* exposed to visible light in seawater: analysis of rpoS-dependent effects. *Can. J. Microbiol.* 43:1036-1043.
26. Guan, T. Y., and R. A. Holley. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness--a review. *J. Environ. Qual.* 32:383-392.
27. Heilig, H. G., E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A. D. Akkermans, and W. M. de Vos. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:114-123.
28. Hood, M. A., and G. E. Ness. 1982. Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:578-584.
29. Jannasch, H. W. 1969. Estimations of bacterial growth rates in natural waters. *J. Bacteriol.* 99:156-160.
30. Klappenbach, J. A., P. R. Saxman, J. R. Cole, and T. M. Schmidt. 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* 29:181-184.
31. Konstantinov, S. R., A. Awati, H. Smidt, B. A. Williams, A. D. Akkermans, and W. M. de Vos. 2004. Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3821-3830.
32. Konstantinov, H. Smith, and W. M. de Vos. 2005. Representational difference analysis and real-time PCR for strain-specific quantification of *Lactobacillus sobrius* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7578-7581.
33. Konstantinov, S. R., E. Poznanski, S. Fuentes, A. D. Akkermans, H. Smidt, and W. M. de Vos. 2006. *Lactobacillus sobrius* sp. nov., abundant in the intestine of weaning piglets. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:29-32.
34. Konstantinov, S. R., H. Smidt, A. D. Akkermans, L. Casini, P. Trevisi, M. Mazzoni, S. De Filippi, P. Bosi, and W. M. de Vos. 2008. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66:599-607.
35. Kreader, C. A. 1995. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1171-1179.

36. Kreader, C. A. 1998. Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4103-4105.
37. Layton, A., L. McKay, D. Williams, V. Garrett, R. Gentry, and G. Sayler. 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4214-4224.
38. Lessard, E. J., and J. M. Sieburth. 1983. Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and batch chambers in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:950-959.
39. Leung, K., and E. Topp. 2001. Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage: molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA FEMS *Microbiol. Ecol.* 38:169-177.
40. Liebner, S., J. Harder, and D. Wagner. 2008. Bacterial diversity and community structure in polygonal tundra soils from Samoylov Island, Lena Delta, Siberia. *Int. Microbiol.* 11:195-202.
41. Lopez-Torres, A. J., L. Prieto, and T. C. Hazen. 1988. Comparison of the in situ survival and activity of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in tropical marine environments. *Microb. Ecol.* 15:41-57.
42. Macfarlane, S., and G. T. Macfarlane. 2006. Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6204-6211.
43. Marti, R., P. Dabert, and A. M. Pourcher. 2009. Selection of a pig manure contamination marker based on the influence of biological treatment on the dominant faecal microbial groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4967-4974.
44. Marti, R., P. Dabert, C. Ziebal, and A. M. Pourcher. Evaluation of *Lactobacillus sobrius/amylovorus* as a new microbial marker of pig manure. Submitted to *Appl. Environ. Microbiol.*
45. Marvin, C. H., B. E. McCarry, J. Villella, L. M. Allan, and D. W. Bryant. 2000. Chemical and biological profiles of sediments as indicators of sources of contamination in Hamilton Harbour. Part II: bioassay-directed fractionation using the Ames Salmonella/microsome assay. *Chemosphere* 41:989-999.
46. Menon, P., G. Billen, and P. Servais. 2003. Mortality rates of autochthonous and fecal bacteria in natural aquatic ecosystems. *Water Res.* 37:4151-4158.
47. Mieszkin, S., J. P. Furet, G. Corthier, and M. Gourmelon. 2009. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by Real-Time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:3045-3054.
48. Mieszkin, S., J. F. Yala, R. Joubrel, and M. Gourmelon. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* "Accepted Article"; doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04499.x.
49. Munro, P. M., M. J. Gauthier, V. A. Breittmayer, and J. Bongiovanni. 1989. Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2017-2024.
50. Nakamura, L. K. 1981. *Lactobacillus amylovorus* a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bact.* 31:56-63.
51. Neysens, P., and L. De Vuyst. 2005. Carbon dioxide stimulates the production of amylovorin L by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, while enhanced aeration causes biphasic kinetics of growth and bacteriocin production. *Int. J. Food Microbiol.* 105:191-202.
52. Okabe, S., N. Okayama, O. Savichtcheva, and T. Ito. 2007. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:890-901.
53. Okabe, S., and Y. Shimazu. 2007. Persistence of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:935-944.
54. Peu, P., H. Brugere, A. M. Pourcher, M. Kerouredan, J. J. Godon, J. P. Delgenes, and P. Dabert. 2006. Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3578-3585.

55. Pieper, R., P. Janczyk, A. Zeyner, H. Smidt, V. Guiard, and W. B. Souffrant. 2008. Ecophysiology of the Developing Total Bacterial and *Lactobacillus* Communities in the Terminal Small Intestine of Weaning Piglets. *Microb. Ecol.* 56:474-483.
56. Reischer, G. H., D. C. Kasper, R. Steinborn, A. H. Farnleitner, and R. L. Mach. 2007. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. *Lett. Appl. Microbiol.* 44:351-356.
57. Reott, M. A., A. C. Parker, E. R. Rocha, and C. J. Smith. 2009. Thioredoxins in redox maintenance and survival during oxidative stress of *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 191:3384-3391.
58. Roslev, P., L. A. Bjergbaek, and M. Hesselsoe. 2004. Effect of oxygen on survival of faecal pollution indicators in drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 96:938-945.
59. Savichtcheva, O., N. Okayama, T. Ito, and S. Okabe. 2005. Application of a direct fluorescence-based live/dead staining combined with fluorescence in situ hybridization for assessment of survival rate of *Bacteroides* spp. in drinking water. *Biotechnol. Bioeng.* 92:356-363.
60. Seurinck, S., T. Defoirdt, W. Verstraete, and S. D. Siciliano. 2005. Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ. Microbiol.* 7:249-259.
61. Sinton, L., C. Hall, and R. Braithwaite. 2007. Sunlight inactivation of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica*, compared with *Escherichia coli*, in seawater and river water. *J. Water Health* 5:357-365.
62. Suau, A., R. Boonet, M. Sutren, J. J. Godon, G. Gibson, M. Collins, and J. Doré. 1999. Direct analysis of gene encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4799-4807.
63. Suzuki, M. T., L. T. Taylor, and E. F. DeLong. 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4605-4614.
64. Takeuchi, T., Y. Nakaya, N. Kato, K. Watanabe, and K. Morimoto. 1999. Induction of oxidative DNA damage in anaerobes. *FEBS Lett.* 450:178-180.
65. Thurston-Enriquez, J. A., J. E. Gilley, and B. Eghball. 2005. Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. *J. Water. Health.* 3:157-171.
66. Tzortzis, G., A. K. Goulas, J. M. Gee, and G. R. Gibson. 2005. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*. *J. Nutr.* 135:1726-1731.
67. Ufnar, J. A., D. F. Ufnar, S. Y. Wang, and R. D. Ellender. 2007. Development of a swine-specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5209-5217.
68. Vail, J. H., R. Morgan, C. R. Merino, F. Gonzales, R. Miller, and J. L. Ram. 2003. Enumeration of waterborne *Escherichia coli* with petrifilm plates: comparison to standard methods. *J. Environ. Qual.* 32:368-373.
69. Walter, J., G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, D. M. Loach, K. Munro, and T. Alatossava. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:297-303.
70. Walters, S., and K. Field. 2009. Survival and persistence of human and ruminant-specific faecal *Bacteroidales* in freshwater microcosms. *Env. Microbiol.* 11:1410-1421.
71. Weinbauer, M. G., and M. G. Hofle. 1998. Significance of Viral Lysis and Flagellate Grazing as Factors Controlling Bacterioplankton Production in a Eutrophic Lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:431-438.
72. Welch, T. J., A. Farewell, F. C. Neidhardt, and D. H. Bartlett. 1993. Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.* 175:7170-7.

73. Wexler, H. M. 2007. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin. Microbiol. Rev. 20:593-621.
74. Wood, J., K. P. Scott, G. Avgustin, C. J. Newbold, and H. J. Flint. 1998. Estimation of the relative abundance of different *Bacteroides* and *Prevotella* ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences. Appl. Environ. Microbiol. 64:3683-3689.
75. Yin, Q., and Q. Zheng. 2005. Isolation and identification of the dominant *Lactobacillus* in gut and faeces of pigs using carbohydrate fermentation and 16S rDNA Analysis. J. Biosci. Bioeng. 99:68-71.

## **CHAPITRE IV**

---

### **Transfert des marqueurs microbiens et chimiques dans des eaux de ruissellement impactées par des effluents d'origine animale**

-

#### **Résumé**

### CONTEXTE ET OBJECTIFS

Après avoir développé et validé des marqueurs *Bacteroidales* ciblant les contaminations fécales porcines, Pig-2-Bac, et ruminants, Rum-2-Bac, il est important d'évaluer si ces marqueurs, présents dans les effluents, sont susceptibles d'être retrouvés dans les eaux de l'environnement par un transfert *via* les eaux de ruissellement. En effet, les épandages de lisier de porcs ou de fumier de bovins, peuvent être une source indirecte de contamination des eaux lors d'événements pluvieux car les pluies peuvent générer un phénomène de ruissellement sur les terres épandues.

Les objectifs de cette étude sont donc (i) d'évaluer le transfert des marqueurs Pig-2-Bac et Rum-2-Bac dans des eaux de ruissellement par rapport au transfert du marqueur bactérien *L. amylovorus* et des marqueurs chimiques (rapports de stéroïdes fécaux et fluorescence de la matière organique), et (ii) de comparer ce transfert à celui des indicateurs (*E. coli*, entérocoques et les coliphages F-spécifiques).

Cette étude a été réalisée avec nos partenaires scientifiques des projets Trace 1 et 2 et la Chambre d'Agriculture Régionale de Bretagne de Kerguehennec.

### METHODES

Une simulation de pluie a été réalisée en triplicat sur un sol témoin, sur un sol avec apport de lisier de porcs et sur un sol avec apport de fumier de bovins, constituant neuf placettes expérimentales. La simulation de pluie a été réalisée sur ces placettes avec une intensité moyenne de 67 L/m<sup>2</sup>/h correspondant aux fortes pluies observables au printemps en Bretagne lors de la période des épandages. Pour chaque placette, huit échantillons d'eau de ruissellement ont été recueillis consécutivement. Les indicateurs ont été recherchés dans les huit échantillons tandis qu'en raison du faible volume d'eau disponible, l'ensemble des marqueurs n'ont été recherchés que dans deux échantillons.

Les marqueurs Pig-2-Bac, Rum-2-Bac et le marqueur de contamination porcine *L. amylovorus* ont été détectés et quantifiés par qPCR. Concernant les marqueurs chimiques, deux approches ont été retenues : des spectres de fluorescence tridimensionnelle Excitation Emission Matrix (EEM) de la matière organique dissoute ont été réalisés et analysés afin d'obtenir un ratio Biochimique/Géochimique ((Bio/Géo); tryptophane like/composés fulviques ou humiques) et un index de fluorescence géochimique. Enfin, des stéroïdes fécaux ont été recherchés par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) suivie d'une analyse multi-résidus et les ratios de stéroïdes R1 et R2, respectivement

[coprostanol/coprostanol+24ethylcoprostanol] et [sitostanol/coprostanol], ont été calculés. Les indicateurs, *E. coli*, entérocoques et les coliphages F-spécifiques, ont été recherchés par culture.

### RESULTATS

Le lisier de porcs et le fumier de bovins épandus sur les placettes expérimentales présentaient des concentrations moyennes respectives de  $3 \times 10^4$  et  $5,1 \times 10^4$  *E. coli*/g et de  $3,5 \times 10^4$  et  $8,5 \times 10^4$  entérocoques/g. Comme le lisier ne contenait pas de coliphages F-spécifiques, ce dernier a été inoculé par une souche de coliphage MS2 à une concentration finale de  $1,5 \times 10^3$  PFU/g. Le fumier, quant à lui, présentait une concentration en coliphages de  $8,5 \times 10^2$  PFU/g. Les marqueurs bactériens ciblant les contaminations porcines, Pig-2-Bac et *L. amylovorus*, ainsi que le marqueur ciblant les contaminations par les ruminants, Rum-2-Bac, ont été détectés à des concentrations 100 à 1 000 fois supérieures à celles des indicateurs dans ces effluents. En effet, des concentrations moyennes respectives de  $8,5 \times 10^6$  et  $1,8 \times 10^7$  copies/g de lisier ont été obtenues pour les marqueurs Pig-2-Bac et *L. amylovorus* et de  $2,4 \times 10^7$  copies/g de fumier pour le marqueur Rum-2-Bac. Concernant les marqueurs chimiques, les ratios de stéroïdes R1 et R2 étaient différents dans le lisier de porcs et le fumier de bovins. Dans le lisier de porc, le ratio R1 était supérieur à 58 % et le ratio R2 était inférieur à 1 tandis que dans le fumier de bovin, le ratio R1 était inférieur à 50 % et le ratio R2 était supérieur à 1. Concernant les mesures de fluorescence de la matière organique, des ratios Bio/Géo de 0,47 et 0,30 et des index de fluorescence de 1,33 et 1,26 ont respectivement été obtenus dans le lisier de porcs et le fumier de bovins.

Après simulation de pluie, les eaux de ruissellement issues des parcelles témoin ne contenaient pas d'indicateurs et de marqueurs. Par contre, les indicateurs ont été retrouvés dans les eaux de ruissellement issues des parcelles épandues avec du lisier de porcs et du fumier de bovins. Si l'on considère la totalité des eaux de ruissellement recueillies par placette, 1,9 à 4,7 % des indicateurs (*E. coli* et entérocoques) présents au départ dans le lisier de porcs ont été transférés dans les eaux de ruissellement tandis que 1,1 à 15,5 % des indicateurs présents au départ dans le fumier de bovins ont été transférés dans les eaux de ruissellement. Pour les coliphages F-spécifiques, des taux de transfert similaires à ceux des indicateurs fécaux ont été obtenus.

Concernant les marqueurs, ils ont tous été retrouvés dans les eaux de ruissellement des parcelles amendées. Dans les eaux de ruissellement impactées par du lisier de porcs, les

marqueurs Pig-2-Bac et *L. amylovorus* ont été respectivement détectés à des concentrations comprises entre  $7,1 \times 10^5$  et  $1,3 \times 10^6$  et entre  $3,5 \times 10^7$  et  $4,8 \times 10^7$  copies/100 ml d'eau tandis que dans les eaux de ruissellement impactées par du fumier de bovins, le marqueur Rum-2-Bac a été détecté à des concentrations comprises entre  $7,1 \times 10^6$  et  $1,2 \times 10^7$  copies/100 ml d'eau.

Les ratios de stéroïdes ont également été caractérisés dans les eaux de ruissellement permettant de différencier ainsi les contaminations porcines des contaminations bovines. Toutefois dans cette étude, la mesure de la fluorescence de la matière organique n'a pas permis de discriminer l'origine des contaminations porcines et bovines dans les eaux de ruissellement.

### **CONCLUSIONS**

Cette étude montre que les indicateurs et les marqueurs chimiques et bactériens, initialement présents dans les effluents agricoles, peuvent être transférés dans les eaux de l'environnement *via* les eaux de ruissellement générées lors d'événements pluvieux de forte intensité. Ainsi, les marqueurs développés ou sélectionnés dans le cadre du projet Trace 1 et 2 et tout particulièrement les marqueurs *Bacteroidales* : Pig-2-Bac et Rum-2-Bac, permettent d'identifier les pollutions dans les eaux lorsque ces dernières sont contaminées par des eaux de ruissellement impactées par des effluents d'origine porcine et bovine.

**PUBLICATION IV**

**Microbial and chemical markers: runoff transfer  
in animal manure-amended soils**

**Anne Jaffrezic<sup>1,2</sup>, Emilie Jardé<sup>2,3,\*</sup>, Anne-Marie Pourcher<sup>2,4</sup>, Michèle Gourmelon<sup>5</sup>,  
Marie-Paule Caprais<sup>5</sup>, Djilali Heddadj<sup>6</sup>, Patrice Cottinet<sup>6</sup>, Muhamad Bilal<sup>1,2</sup>,  
Morgane Derrien<sup>2,3</sup>, Romain Marti<sup>2,4</sup> and Sophie Mieszkin<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>*INRA Agrocampus Ouest, UMR 1069, Rennes, France*

<sup>2</sup>*Université européenne de Bretagne, France.*

<sup>3</sup>*Geosciences Rennes, UMR 6118 CNRS-Rennes 1 University, France*

<sup>4</sup>*Cemagref, UR GERE, F-35044 Rennes, France*

<sup>5</sup>*Ifremer, EMP, Laboratoire de Microbiologie, Plouzané, France*

<sup>6</sup>*Chambre d'Agriculture, pôle agronomie, Rennes, France*

**Accepté à Journal of Environmental Quality**

## **ABSTRACT**

The transfer of microbial and chemical markers from cattle and pig farm waste to runoff water is assessed by differentiating the sources of faecal contamination in bathing water as imposed by the new European Directive. The concentration of faecal indicators (*E. coli*, enterococci and F-specific bacteriophages), microbiological markers (Rum-2-bac, Pig-2-bac and *Lactobacillus amylovorus*) and chemical fingerprints (sterols and stanols and other chemical compounds analysed by 3D-fluorescence excitation–matrix spectroscopy) are determined in runoff waters generated by an artificial rainfall simulator. Three replicate plot experiments were conducted with swine slurry and cattle manure at agronomic nitrogen application rates. Low amounts of bacterial indicators (1.9 to 4.7%) are released in runoff water from swine-slurry-amended soils, whereas higher amounts (1.1 to 28.3%) of these indicators are released in runoff water from cattle-manure-amended soils. Microbial and chemical markers from animal manure are transferred to runoff water, allowing a discrimination between pig and cattle faecal contamination in the environment *via* runoff after manure spreading. Host-specific bacterial and chemical markers are quantified for the first time in runoff waters samples following the experimental spreading of swine slurry or cattle manure. Future studies should focus on quantification in catchments.

**Keywords:** Faecal pollution, manure, Microbial Source Tracking, *Bacteroidales*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus*, F-RNA bacteriophages, steroids, fluorescence

## **INTRODUCTION**

The practice of land spreading of livestock wastes, especially in intensive agricultural areas such as Brittany (France), represents one of the major diffuse sources of faecal pollution which may contaminate bathing waters. As cattle manure and swine slurry may contain pathogenic microorganisms (Guan and Holley, 2003; Omisakin *et al.*, 2003), the land spreading of animal wastes poses a human health risk (Bower *et al.*, 2005). Bacterial indicators and pathogenic microorganisms may contaminate the surface water through manure application *via* runoff (Duffy, 2003; Gerba and Smith, 2005; Guber *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2008). The risk of water contamination increases when rainfall occurs shortly after manure spreading (Guber *et al.*, 2006, Ferguson *et al.*, 2007). The application of animal manure can also greatly increase the amount of organic matter in river water after leaching of the soil on which organic wastes are applied. Otherwise, it can also modify the conditions of the water/soil interface, which can increase the solubilization of soil organic matter. High dissolved organic carbon (DOC) concentrations in streams are of concern because abundant DOC complicates water treatment and makes it more expensive, also providing a vector for micropollutants such as heavy metals or pesticides (Reuter and Perdue, 1977; Campbell *et al.*, 1992; Miskimmin *et al.*, 1992).

In response to the health risk associated with land spreading of manure, European Regulations have been strengthened. In the European Union, water quality is mainly governed by the Water Framework Directive (WFD; 2000/60/EC) and related regulations such as the revised Bathing Water Directive (BWD; 2006/7/EC). The former directive provides a framework for integrated management of groundwater and surface water by catchment area. It requires all inland and coastal waters to comply with good chemical and ecological status by 2015. In particular, the WFD deals with diffuse pollution, which has remained a problem despite improvements to most point source discharges. The main goals of the BWD are to improve the quality of bathing water and reduce the health risk to bathers. This new Directive introduces bathing water profiles, which are tools designed to identify and classify the sources of pollution of the bathing water and other surface waters in the catchment area of the bathing water concerned. Faecal contamination of water resources is currently evaluated by the enumeration of the faecal coliforms, *Escherichia coli* and enterococci, which point to potential pathogenic bacterial or viral contamination. However, the enumeration of these indicators does not allow us to differentiate between the sources of faecal contamination. Therefore, it is important to use alternative indicators of faecal contamination to identify livestock contamination in surface waters. Microbial Source Tracking (MST) methods, which have been developed to distinguish human and animal sources of faecal pollution (Scott *et al.*, 2002), appear helpful for the identification of livestock contamination of groundwater and surface water (Graves *et al.*, 2007). Different microbial and chemical markers exhibiting host-specificity have been proposed to identify human and animal contamination, especially related to swine slurry and cattle manure (Leeming *et al.*, 1996; Bernhard and Field 2000, Cole *et al.*, 2003). Molecular techniques using the Polymerase Chain Reaction (PCR), and more recently real-time PCR, have also been developed to differentiate human from animal contamination (Bernhard and Field, 2000; Kildare *et al.*, 2007; Ufnar *et al.*, 2007). The main host-specific bacteria tested in these studies are *Bacteroidales*, which are dominant in the intestinal flora of warm-blooded animals and which cannot proliferate in the environment (Fidskal *et al.*, 1985, Kreader 1998, Dick *et al.*, 2005). However, other microorganisms, such as *Lactobacillus amylovorus*, methanogenic *Archaea* and F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH), have also been proposed to distinguish between human and animal faecal contamination (Schaper *et al.*, 2002; Ufnar *et al.*, 2007; Marti *et al.*, 2010). Chemical markers such as steroids have been used to characterize human and/or herbivore faecal contamination

in water (Leeming *et al.*, 1996 ; Tyagi *et al.*, 2008 ; Hagedorn et Weisberg, 2009 ; Tyagi *et al.*, 2009). In particular, (Leeming *et al.*, 1996) have demonstrated that faecal steroids are potential source fingerprints. According to these authors, the distribution of faecal steroids, as well as their source specificity, arises from the combination of three factors that make up the “steroids fingerprint” of each animal species (Leeming *et al.*, 1996). Another type of chemical marker could be analysed by EEM (Excitation-Emission Matrix) fluorescence spectroscopy. This method appears as an interesting tool and has been applied to trace diffuse agricultural pollution from dairy cattle slurry spread on intensively-farmed grasslands (Naden *et al.*, 2010). Baker (2002) has demonstrated that farm wastes yield higher intensities of tryptophane-like as against fulvic/humic-like fluorescence compared to stream water. Naden *et al.* (2010) also used the ratio between tryptophane-like and fulvic/humic-like fluorescence intensities to distinguish incidental losses of dairy cattle slurry from uncontaminated drainage waters.

The perceived advantage of combined microbial and chemical methods is that the differential fate and transport of the respective markers improve the potential of detecting faecal pollution through an approach based on multiple lines of evidence (Sinton and Finlay, 1998, Seurinck *et al.*, 2005, Haack *et al.*, 2009, Hagedorn et Weisberg, 2009, and references cited therein). While the transfer of faecal indicators (*E. coli* and enterococci) after manure application is well documented (Guber *et al.*, 2006; Soupir *et al.*, 2006; Ferguson *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2008; Brooks *et al.*, 2009; Tyagi *et al.* 2009), there is no data concerning the release of host-specific specific bacterial and specific chemical markers from surface-applied manures. The experiments described in the present study provide an opportunity to assess the transfer of some specific markers in runoff water at field-scale level, having been previously developed and validated in the laboratory.

In this study, the selected microbial markers are the ruminant- and pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers Rum-2-Bac and Pig-2-Bac, which target cattle and pig faecal contamination, respectively, and the *Lactobacillus amylovorus* marker, which targets pig faecal contamination as previously described by Mieszkin *et al.* (2009, 2010) and Marti *et al.* (2010). The selected chemical markers are 15 sterols and stanols (cholesterol, coprostanol, epicoprostanol, cholestanol,  $\alpha$ -cholestanol, campesterol, campestanol, stigmasterol, stigmastanol, 5 $\beta$ -stigmastanol, 5 $\beta$ -epistigmastanol, sitosterol, sitostanol, 24-ethylcoprostanol and 24-ethylepicoprostanol), and the detection of the fluorescence profiles corresponding to regions I to V. These regions are related to simple aromatic proteins such as tyrosine and tryptophan (Regions I and II), humic acid-like substances (Region III) soluble microbial by-product-like material (Region IV) and fulvic acid-like organics (Region V).

The specific aim of this study is to compare the transfer of both microbial and chemical host-specific markers in runoff water after a simulated rainfall event on animal manure-amended soils. The results so obtained provide information on the ability of these MST markers to discriminate pig and cattle faecal contamination in the environment via runoff after manure spreading.

## **MATERIALS AND METHODS**

In April 2008, a rainfall simulation field experiment was carried out at the agricultural experimental research centre of Kerguehennec, Brittany, France. Three treatments involving a control, swine slurry and cattle manure were assessed in three replicates, which produced an experimental design consisting of nine plots.

A fallow plot of 10 m by 30 m was selected with an average slope of 3% and tilled to a depth of 15 cm. This plot was subdivided into nine tilled plots (0.75 m by 1.5 m) arranged in a rectangular shape. The soil was a cambisol (41% sand, 42% silt and 16% clay) with 2.5% total organic carbon content in the Ap horizon. Before each rainfall simulation, each plot was hydrologically isolated with galvanized iron (15 cm above and below the soil surface). The runoff collector was composed of a 10-cm-diameter polyvinyl chloride gutter (PVC) with 1 cm slit. This gutter was connected to a 2.5 L plastic beaker, previously washed with distilled water, *via* a PVC pipe as indicated in Fig. 1.

### ***Runoff experiment***

#### **Cattle manure and swine slurry characteristics and application rates**

Cattle manure and swine slurry were collected in Brittany from two farms located near the experimental research centre. Cattle manure was collected in plastic bags and swine slurry in plastic cans. As the swine slurry sample used in this study did not contain F-specific coliphages, it was inoculated with a strain of MS2 F-specific coliphage at a concentration of  $1.5 \cdot 10^3$  PFU/g (Plaque Forming Unit), corresponding to the concentration usually found in most swine slurries previously analysed in the laboratory (Gourmelon et al., 2007). Inoculated swine slurry was manually stirred and then applied with a watering can at a rate of  $2.4 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ , corresponding to the agronomic nitrogen requirement for maize cultivation ( $60 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Cattle manure was also manually applied at  $3.2 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $54 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). The carbon content of the swine slurry and cattle manure, respectively, was 41.7 and 47.2  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  on a dry matter basis, while the nitrogen content was 2.2 and 1.6  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  on a dry matter basis. Applications were carried out two hours before the rainfall simulation.

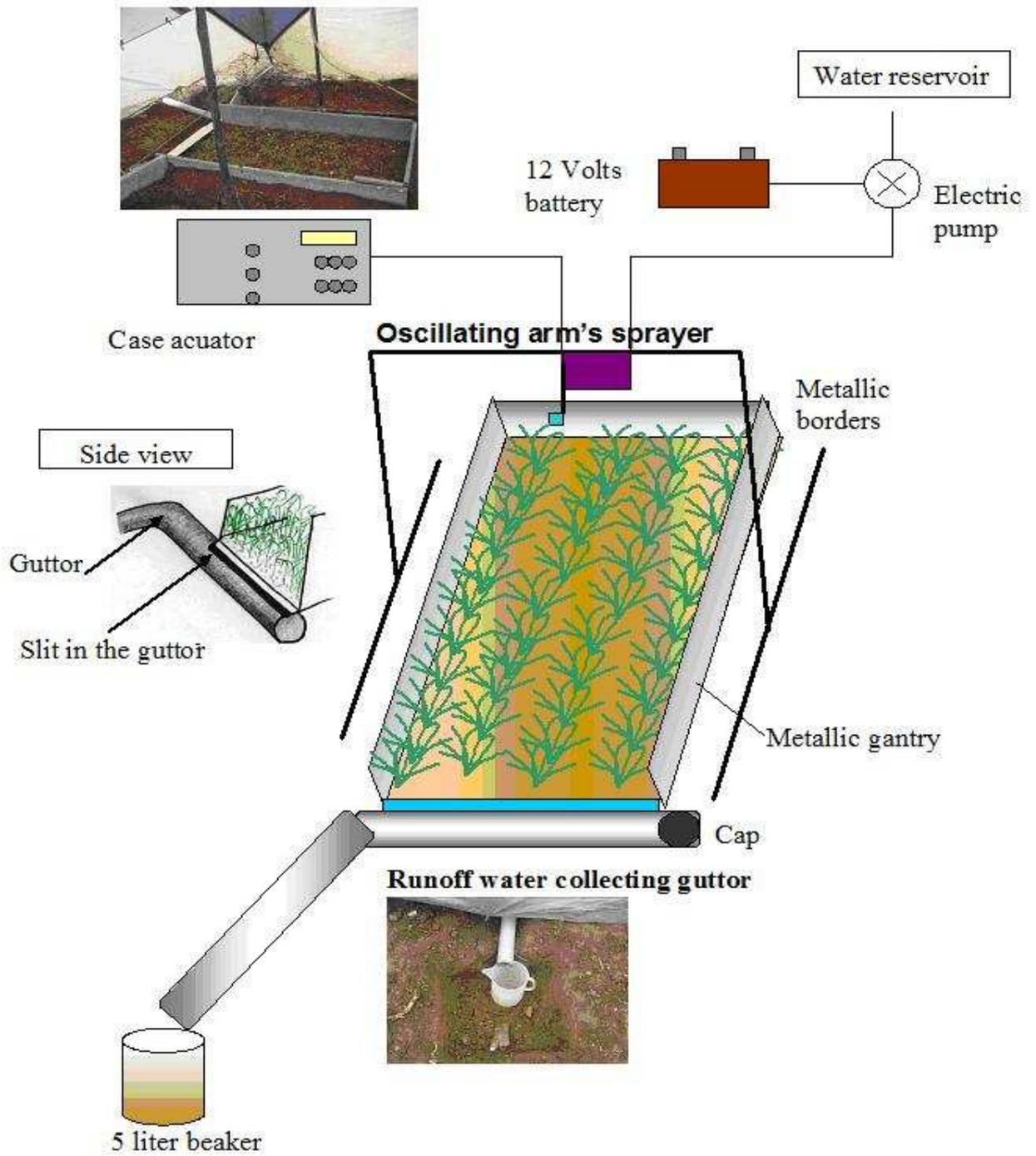


Figure 1: Schematic diagram of the rainfall experiment

### Rainfall simulation

The rainfall simulator was placed under a tent to prevent disturbances from wind and natural rain. The rainfall intensity was determined by measuring the volume collected in a 2 m<sup>2</sup> flask after one minute. As presented in Table 1, the simulated rain was applied for a duration of between 42 and 85 minutes, in order to collect runoff water from swine-slurry-amended soils and from cattle-manure-amended soils, respectively. The rainfall intensities ranged from 62 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> (on swine slurry-amended soils) to 69 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> (on cattle manure-amended soils). The average rainfall intensity was about 67 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>. The volume of cumulated runoff was similar for the three treatments (control, swine slurry and cattle manure; 11.6 to 11.8 L.m<sup>-2</sup>). The average rainfall intensity was found to be the minimal volume and time required to generate sufficient runoff to carry out all the marker determinations. The simulation duration is about twice as long for the soils treated with cattle manure as for the control and the soils treated with swine slurry. These differences could be due to the nature of cattle manure, which is a heterogeneous mixture of cowpat and straw.

**Table 1: Hydrological characteristics of rainfall simulation events. Average and Standard error of three replicates are reported**

Treatment	Rainfall intensity (L.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )	Cumulated runoff (L.m <sup>-2</sup> )	Simulation time (min)
Control	63 ±2	11.8 ±0.3	50 ±11
Pig slurry	62 ±2	11.6 ±0.2	42 ±6
Cattle manure	69 ±5	11.8 ±0.7	85 ±12

During the experiments, water was collected from the entire runoff event. Eight runoff samples (750 mL, 4L, 750 mL, 4L, 750 mL, 750 mL and 750 mL) were collected on each plot and used for the enumeration of bacterial indicators and the determination of dissolved organic carbon, whereas only the 4-L samples were used to analyse the microbial and chemical markers.

The time required to collect the samples was measured to compute runoff rate and volume. Groundwater was sampled in a 5-m-deep borehole and used for the rain water simulation. Soil was also sampled before the swine slurry and cattle manure applications.

### Runoff water sampling

Before sample collection, runoff water samples were agitated to suspend solids and then collected in 1-litre sterile plastic and glass bottles for microbiological and chemical analyses, respectively. All samples were stored at 4°C until analysis.

### Microbial methods

#### Enumeration of faecal indicators

To evaluate the level of the faecal contamination, faecal microbial indicators such as *E. coli*, enterococi and F-specific coliphages were enumerated in duplicate in all samples.

Bacterial indicators - *E. coli* and *enterococci*

*E. coli* was counted using 3M<sup>TM</sup> Petrifilm *E. coli* (3M, France). The gel of the Petrifilm was rehydrated with 1 mL of sample and incubated for 24 h at 44°C. Blue colonies (Glucuronidase positive) were counted to determine the concentration of *E. coli* (Marti *et al.*, 2010).

Enterococci were detected according to Standard Procedures for Water Analysis (ISO 7899-2:2000). Filtration was replaced by the plating of 0.1 mL of sample onto Slanetz and Bartley agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). After incubation at 37°C for 48 h, typical colonies (pink, red or maroon) were transferred onto Bile-Esculin-Azide agar (BEA) (Biokar

Diagnostics, Beauvais, France) and incubated for 2 h at 44°C. Black colonies on BEA were counted as enterococci.

### Viral indicator - F-specific coliphages

Analyses of F-specific coliphages in swine slurry, cattle manure, and runoff water samples were performed according to the ISO 10705-1 method. More precisely, for runoff water samples, their enumeration was carried out directly or after a concentration step, if needed, according to Mendez *et al.* (2004).

### ***Quantification of host-specific bacterial markers***

#### Sample preparation and DNA extraction

Aliquots of approximately 250 mg of swine slurry and cattle manure samples were stored at -20°C before analyses. Volumes of approximately 50 mL of runoff water samples were centrifuged at 9,000 g for 15 min and 250 mg pellets were transferred into microtubes and stored at -20°C. Then, DNAs of swine slurry, cattle manure and runoff water samples were extracted using the Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, France), according to Dick *et al.* (2005). The elution volume was 100 µL.

#### Real-time PCR assays

The primers for *L. amylovorus* and the primer and probe sets Pig-2-Bac and Rum-2-Bac from Mieszkin *et al.* (2009 and 2010) were used to amplify the Representational Difference Analysis (RDA) fragment of *L. amylovorus* and the pig- and ruminant-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes, respectively. The PCR standard for *L. amylovorus* was prepared by 10-fold dilution of bacterial genomic DNA extracted from a pure culture of *L. amylovorus* DSM16698, using the Wizard genomic DNA purification Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Dilutions ranged from  $7 \times 10^5$  to 7 cells per PCR for *L. amylovorus* DSM16698. The PCR standards for host-specific *Bacteroidales* markers were prepared by 10-fold dilution of linear plasmid DNAs extracted with the QIAquick Miniprep Extraction Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions and linearized with *NotI* enzyme (Roche Diagnostics), as described in Mieszkin *et al.* (2009). Dilutions ranged from  $1.6 \times 10^7$  to 1.6 copies of 16S RNA per PCR. Standard curves were generated by plotting threshold cycles (Ct) against cells or 16S rRNA genes, depending on the marker. PCR amplifications were performed using the Chromo4 real-time detection system associated with Bio-Rad Opticon Manager software version 3.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The reaction mixtures run a final volume of 25 µL with appropriate final concentrations of primers and probe, and a PCR program was used for the quantification of *L. amylovorus*, Pig-2-Bac and Rum-2-Bac markers (Konstantinov *et al.*, 2005); Marti *et al.*, 2010; Mieszkin *et al.*, 2009, 2010). Each reaction was run in duplicate. The presence/absence of PCR inhibitors was verified using an Internal Positive Control (IPC; AppliedBiosystem, France). Samples were diluted if inhibitors were present. Negative controls (no template DNA) were performed in triplicate for each run.

### ***Chemical methods***

#### **Dissolved organic carbon**

The dissolved organic carbon (DOC) content was measured on a Shimadzu TOC 5050 A total carbon analyzer. Accuracy on DOC measurements is  $\pm 5\%$ , based on repeated measurements of standard solutions (K-phtalate).

### Steroid analyses

For the steroids, 100 g of swine slurry and cattle manure samples were kept frozen for 2 days at  $-10^{\circ}\text{C}$ , and then freeze-dried for 3 days before analysis. 400 ml of runoff water sample were filtered at  $0.7\ \mu\text{m}$  and the filtrate was then freeze-dried during 3 days before analysis.

Steroid concentrations in animal manures and runoff water were determined using the method published previously by Jardé *et al.* (2009). Briefly, freeze-dried samples of animal manure and runoff water samples were extracted by dichloromethane using an automated extractor (Dionex, ASE200). The conditions of automatic sample extraction (ASE) were as follows: 11 mL cells,  $100^{\circ}\text{C}$ , 130 bar, 5 min heat-up time, two cycles of 5 min, static time, 150% flush, 300 s purge with nitrogen. Hydrocarbons and polar molecules were separated by liquid chromatography on a silica column, yielding aliphatic hydrocarbons, aromatic hydrocarbons, and polar compounds by three successive elutions with cyclohexane, then a mixture of cyclohexane and dichloromethane (2:1,v/v), and, finally, a mixture of methanol/dichloromethane (1:1, v/v). At each fractionation step, the mass of organic matter in the different fractions was weighed. Steroid compounds are present in the polar fraction. After derivatization using N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) - trimethylchlorosilane (TMSC) (99/1, v/v), quantitative analyses of steroid compounds were performed on a Shimadzu QP2010+ gas chromatograph mass spectrometer. The injector was used in splitless mode and maintained at a temperature of  $310^{\circ}\text{C}$ . The chromatographic separation was performed on a capillary fused silica SLBTM-5ms (from Supelco, length: 60 m; diameter:  $0.25\ \text{mm}$ ; film thickness:  $0.25\ \mu\text{m}$ ) under the following heating program:  $70^{\circ}\text{C}$  (held for 1 min) to  $130^{\circ}\text{C}$  at  $15^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$ , then  $130^{\circ}\text{C}$  to  $300^{\circ}\text{C}$  (held for 15 min) at  $3^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$ . The flow of helium was maintained at  $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The chromatograph was coupled to the mass spectrometer by a transfer line heated at  $250^{\circ}\text{C}$ .  $1\ \mu\text{l}$  of the polar fraction was injected into the GC-MS. The steroid compounds were quantified by adding  $^2\text{H}_6$ -cholestane as internal standard in the solution.

### Fluorescence

Swine slurry, cattle manure and soil were air dried and analysed for fluorescence properties the day following storage at  $4^{\circ}\text{C}$ . Dissolved organic matter was extracted from a suspension made up of ultra pure water and cattle manure or swine slurry (1g) in a ratio of 40:1. Each cattle manure or swine slurry water suspension was kept in a refrigerator at  $4^{\circ}\text{C}$  for 16 hours with periodic manual shaking. For the soil samples, dissolved organic matter was extracted using an ultra pure water to soil ratio of 2:1 (50 mL / 25 g soil). Then, the water suspension was centrifuged at 3,000 rpm for 30 min and subsequently filtered through  $0.7$  and  $0.22\ \mu\text{m}$  nitrocellulose filters. To avoid any contamination, all the filters were rinsed with ultra pure water and dried overnight before vacuum filtration. Fluorescence measurements were performed using a Perkin-Elmer LS-55B luminescence spectrometer. The protocol has been described previously in detail (Bilal *et al.*, 2010). A regional integration of the fluorescence intensities adapted from Chen *et al.* (2003) was applied to the signal obtained from  $5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  C-normalized solution. With this technique, the EEM is divided into biochemical (bio) (I, II, IV) and geochemical (geo) (III, V) regions. The ratio between the III and V region is called Geochemical Fluorescence Index (GFI) (see Fig. 2). Fluorescence intensities are relative to the instrument conditions during the measurement and are a function of source intensity, optical efficiency and detector efficiency (Ohno, 2002). Thus, data were normalized to a daily-determined Raman intensity obtained on water (excitation 350 nm, emission 395 nm, averaged Raman emission intensity  $10.5\pm 0.5$  ( $n=10$ )).

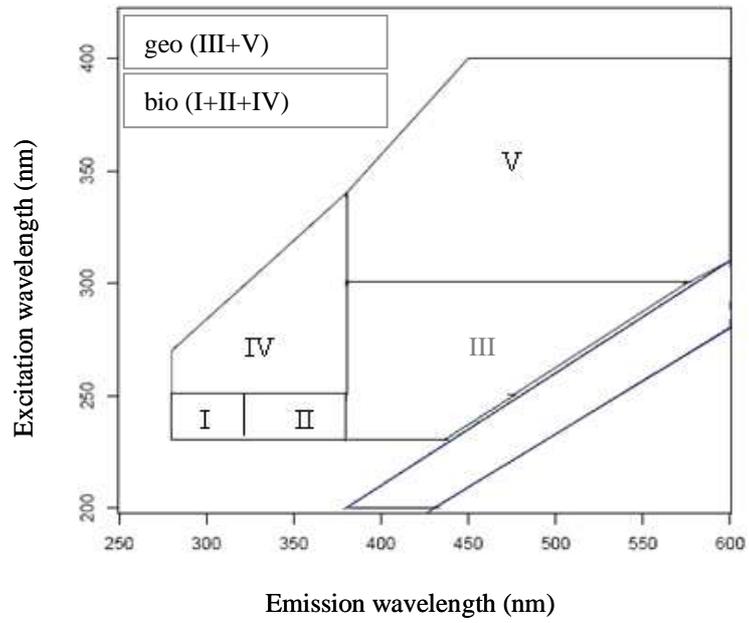


Figure 2: 3-D fluorescence regions

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Swine slurry, cattle manure and soil*

None of the faecal indicators, microbiological markers or steroid compounds were detected in the soil sampled prior to the experiment.

The average concentrations of faecal indicators are  $3 \times 10^4$  *E. coli*/g and  $3.5 \times 10^4$  enterococci /g in the swine slurry and  $5.1 \times 10^4$  *E. coli*/g and  $8.5 \times 10^4$  enterococci/g in the cattle manure (Table 2). These values are in the range of those previously reported. Indeed, according to the literature, swine slurry and cattle manure display variable concentrations of faecal indicators ranging between  $10$  and  $10^6$  faecal indicators/g (Hill and Sobsey, 1998 and 2003; Chinivasagam *et al.*, 2004; Vanotti *et al.*, 2005; Côté *et al.*, 2006; Meals and Braun, 2006; Mishra *et al.*, 2008; Hodgson *et al.*, 2009).

**Table 2: Faecal indicators, microbiological and chemical markers in swine slurry and cattle manure**

	Pig Slurry	Cattle manure
<b>Faecal indicator</b>		
<i>E. coli</i> (CFU/g)	$3 \times 10^4 \pm 7.1 \times 10^3$	$5.1 \times 10^4 \pm 4.5 \times 10^4$
Enterococci (CFU/g)	$3.5 \times 10^4 \pm 9.5 \times 10^3$	$8.5 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$
F-specific coliphages (UFP/g)*	$1.5 \times 10^3$	$8.5 \times 10^2$
<b>Host-specific bacterial markers</b>		
<i>L. amylovorus</i> (cells/g)	$1.8 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^7$	< LQ
Pig-2-bac (copies/g)	$8.5 \times 10^6 \pm 7.1 \times 10^6$	<LQ
Rum-2-bac (copies/g)	<LQ	$2.4 \times 10^7 \pm 2.4 \times 10^6$
<b>Chemical markers</b>		
Coprostanol/(Cop+24-ethylcop), in %	$58.8 \pm 1.5$	$45.4 \pm 1.0$
Sitostanol/Coprostanol	$0.22 \pm 0.02$	$2.70 \pm 0.13$
Bio/Geo	$0.47 \pm 0.003$	$0.30 \pm 0.003$
Geochemical fluorescence index	$1.33 \pm 0.01$	$1.26 \pm 0.02$

LQ : limit of quantification

\*Pig manure has been artificially spiked with bacteriophages  
mean  $\pm$  SE ( $n=3$ ) except for F-specific coliphages (one analysis)

As no coliphages were detected in the swine slurry prior to the experiment, we chose to inoculate F specific coliphages to obtain a concentration of  $1.5 \times 10^3$  PFU/g. In the cattle manure, the average concentration of F specific coliphages is  $8.5 \times 10^2$  PFU/g. This value is of the same order as results obtained by Schaper *et al.* (2002), who found averages of  $3 \times 10^3$  PFU and  $1.2 \times 10^2$  per g in swine slurry and cattle manure, respectively.

Concerning host-specific bacterial markers, the pig- and the ruminant-specific markers are detected in swine slurry and cattle manure in concentrations 100 to 1,000 times higher than those of bacterial indicators. Average concentrations of the pig-specific markers are  $1.8 \times 10^7$  cells/g and  $8.5 \times 10^6$  copies/g swine slurry for the *L. amylovorus* and the Pig-2-Bac markers, respectively, and  $2.4 \times 10^7$  copies/g cattle manure for the ruminant-specific *Bacteroidales* marker Rum-2-Bac (Table 2). These concentrations are in accordance with levels previously observed in pig and cattle manure by Mieszkina *et al.*, (2009, 2010) and Marti *et al.* (2010).

The steroid profiles of swine slurry and cattle manure are dominated by C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> compounds. The major steroids detected in swine slurry are coprostanol (25.7%), 24-ethylcoprostanol (17.1%) and cholestanol (9.5%), while the dominant sterols in cattle manure are 24-ethylepicoprostanol (16.5%), sitostanol (13.6%) and sitosterol (10.7%). In comparison with the literature, our results are in agreement with the study of (Leeming *et al.*, 1996). As

previously described (Leeming *et al.*, 1996 ; Jardé *et al.*, 2007 ; Tyagi *et al.*, 2007 ; Tyagi *et al.*, 2008 ; Jardé *et al.*, 2009), the steroid fingerprint of animal manures is defined by the animal's diet, endogenous sterols biosynthesised by higher animals and the presence of anaerobic bacteria able to biohydrogenate sterols to stanols of various isomeric configurations. In brief, C<sub>27</sub> steroids are major compounds of omnivorous and carnivorous animal faeces, while C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> steroids are major compounds of herbivorous animal faeces (Leeming *et al.*, 1996 ; Shah *et al.*, 2007). To illustrate this point, we calculated the proportions of C<sub>27</sub> steroid compounds (% C<sub>27</sub> steroids) and C<sub>28</sub>+C<sub>29</sub> steroid compounds (%C<sub>28</sub>+C<sub>29</sub> steroids) in our samples. The results show that swine slurry has similar proportions of C<sub>27</sub> (47.4%) and C<sub>28</sub>+C<sub>29</sub> steroids (44.2%), whereas cattle manure is enriched in C<sub>28</sub>+C<sub>29</sub> (63.8%) compared to C<sub>27</sub> steroids (28.1%). Moreover, several ratios between sterol and stanol can be used to discriminate between the sources of steroid compounds (Takada et Eganhouse, 1998 ; Standley *et al.*, 2000 ; Bull *et al.*, 2002 ; Shah *et al.*, 2007 ; Tyagi *et al.*, 2009). Two ratios are calculated in the present study: the ratio of coprostanol to coprostanol+24-ethylcoprostanol (R1, expressed in percentage) and sitostanol to coprostanol (R2). The R1 ratio has been used by Bull *et al.* (2002) and Shah *et al.* (2007) to express the proportion of stanol derived from omnivorous animals (porcine contribution) versus the proportion of stanol from herbivorous animals (cattle contribution). The R2 ratio expresses the proportion of faecal stanol (coprostanol) versus natural stanol derived from the reduction of higher plant phytosterol (sitostanol). Table 2 reports the ratios obtained in the present study. Swine slurry is characterised by an R1 ratio of 59% whereas cattle manure has a R1 ratio < 50%. Moreover, swine slurry samples have an R2 <1, whereas cattle manure are characterised by R2 ratios >1. These two ratios (R1 and R2) allow us to distinguish the two types of animal manures, as well as define their steroid fingerprints.

The Bio/Geo ratio and the Geochemical Fluorescence Index (GFI) of swine slurry (0.47 and 1.33, respectively) and cattle manure (0.30 and 1.26, respectively) are in the range of values previously reported by Bilal *et al.* (2010). The intense biochemical fingerprint in farm wastes is due to the presence of a soluble microbial product. Livestock faeces typically comprise 15-25% protein in wet manure (poultry, cattle and pigs), with 3g/16g of the true protein being made up of tryptophan and tyrosine (Day, 1977). Hence, the fluorescence intensity is high in the protein or biochemical region. Fluorescence markers are detected in the soil used for the experiment. Nevertheless, the fluorescence fingerprint measured in the animal manures is different from that measured in the soil (Bio/Geo: 0.10; GFI: 1.11).

### ***Rainfall event***

#### **Dynamics of faecal indicators and dissolved organic carbon concentrations in runoff waters**

Figure 3 presents the concentrations of bacterial indicators, F specific coliphages and DOC in runoff waters sampled in the three experiments (control soil and after spreading of swine slurry and cattle manure). *E. coli*, enterococci and F specific coliphages are not detected in runoff water from the control soil. In these samples, concentrations of DOC are very low and range from 3 to 4 mg L<sup>-1</sup>. After spreading of swine slurry, both faecal indicators are carried away in the runoff water. Their average concentrations in runoff waters ranges from 7×10<sup>4</sup> *E. coli* and 5×10<sup>4</sup> enterococci /100 mL in the first sample to 8×10<sup>3</sup> *E. coli* and 5×10<sup>3</sup> enterococci /100 mL in the second sample.

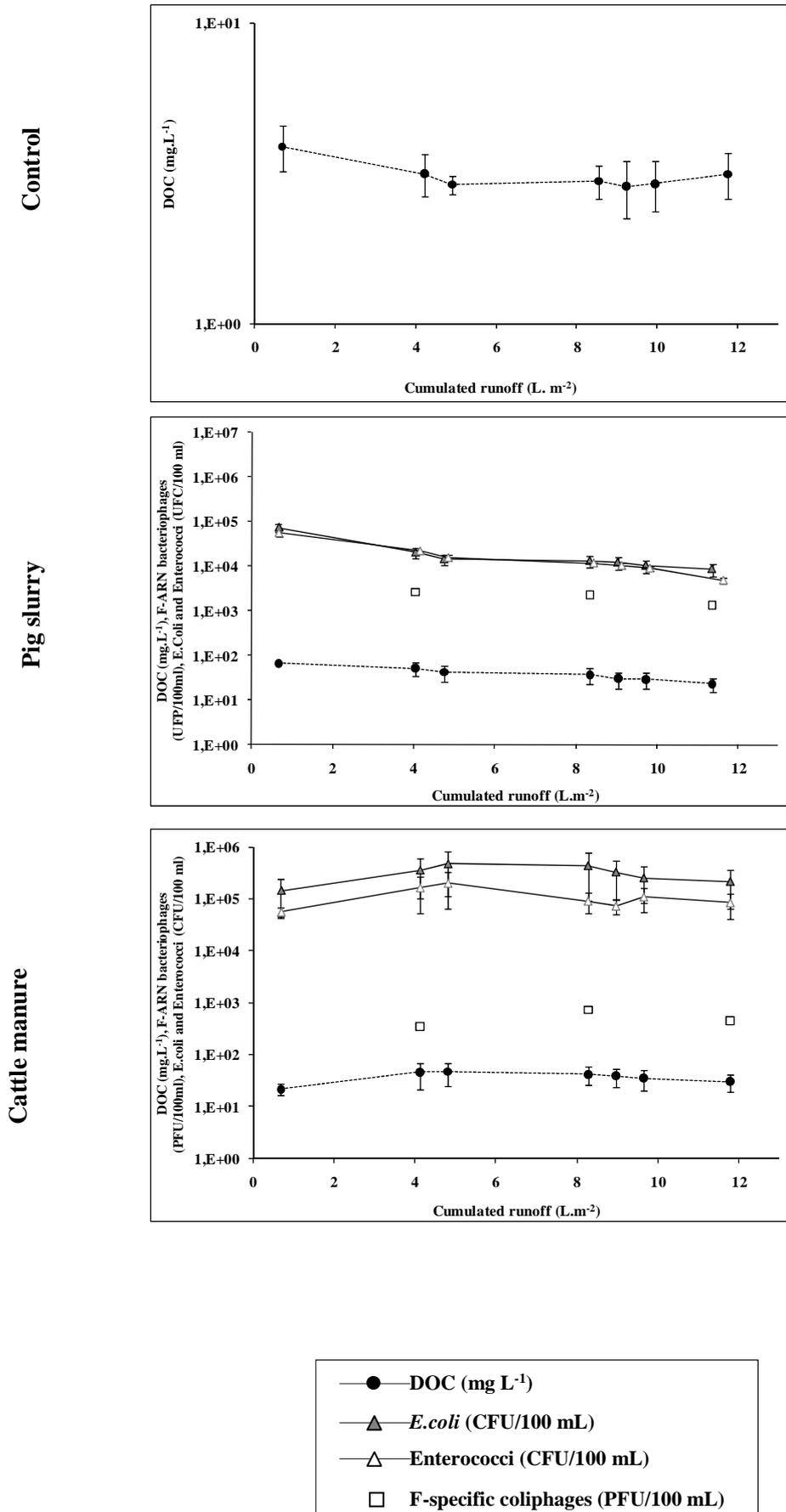


Figure 3: Faecal indicators and chemical parameters in the runoff water

Concentrations of F specific coliphages exhibit a similar pattern, and DOC concentrations decrease from 67 to 23 mg L<sup>-1</sup> in runoff waters. After spreading of cattle manure, the time-evolution of the bacterial indicators, F specific coliphages and DOC differ from the pattern observed for runoff samples from swine-slurry-amended soils. Indeed, average bacterial indicator concentrations firstly increase in the first five litres of cumulated runoff from 1×10<sup>5</sup> to 5×10<sup>5</sup> CFU/100 mL, and then decrease slightly to 8×10<sup>4</sup> CFU/100 mL at the end of the experiment. DOC concentrations follow the same trend throughout the experiment on cattle-manure-amended soils.

They firstly increase from 22 to 47 mg L<sup>-1</sup> in the first five litres of cumulated runoff, then decreased to 30 mg L<sup>-1</sup> at the end of the experiment.

These results are consistent with previous studies (Culley and Philipps, 1982; Thurston-Enriquez *et al.*, 2005; Soupir *et al.*, 2006, Mishra *et al.*, 2008), and show that, regardless of the type of microorganism (bacteria or virus), a rainfall event occurring after spreading of slurry or manure on an agricultural soil can lead to release of the microbial indicator into the runoff water. The concentrations of *E coli* and Enterococci found in the runoff water are in the range of levels previously reported in rainfall simulation studies: 10<sup>9</sup> to 10<sup>5</sup> CFU/100 mL and 10<sup>8</sup> to 10<sup>3</sup> CFU/100 mL, respectively, for a rainfall intensity of 90 mm.h<sup>-1</sup> lasting 30 min (Soupir *et al.*, 2006) or 10<sup>7</sup> to 10<sup>6</sup> CFU/100 mL in the case of enterococci for a rainfall intensity of 27 mm.h<sup>-1</sup> lasting 30 min (Brooks *et al.*, 2009). As described by Heinonen-Tanski and Uusi-Kämpä (2001), there can be a huge runoff of faecal microorganisms if the soil is wet and if there are heavy rains after the animal manure application. These results also indicate that the application of animal manure strongly increases (by an average factor of 10) the amount of DOC concentrations in runoff water. Those results are in agreement with previous studies on the effect of animal manure on water-extractable organic carbon (Zsolnay and Görlitz, 1994; Rochette and Gregorich, 1998; Chantigny, 2003; Royer *et al.*, 2007).

The results show different trends in the time-evolution of the bacterial and viral indicators, as well as DOC concentrations, according to the type of animal manure. This difference is mainly due to the different nature of swine slurry and cattle manure, especially in terms of its structure. Swine slurry is a homogeneous mixture of urine and faeces. The DOC along with the bacterial and viral indicators present in the soil surface after swine slurry amendment are probably mobilized in the first few litres of runoff water. The concentrations regularly decrease during the course of the experiment. Cattle manure is a heterogeneous mixture of cowpat and straw. During the rain simulation experiment, [we propose that] the rain firstly washes the cow manure by preferentially carrying away cowpat in the runoff water. This hypothesis is supported by visual observation during the experiment, and is illustrated by the increase in the concentrations of bacterial indicators and DOC in the first five litres of cumulated runoff. Our results are in agreement with previous studies showing that the nature of the effluent has an impact on the runoff. Thus, runoff is greatly stimulated when the effluent is in liquid form, such as swine slurry (Heinonen-Tanski and Uusi-Kämpä, 2001; Berry *et al.*, 2007; Lapen *et al.*, 2008), whereas solid wastes enhance retention of the microorganisms by the soil surface (Chetochine *et al.*, 2006; Gottschall *et al.*, 2009; Horswell *et al.*, 2010).

During the rainfall experiment, the entire runoff event was collected. Table 3 presents the cumulative quantities of faecal indicators transferred in runoff water as measured for each replicate. The percentage of *E. coli* and enterococci released into runoff water after spreading of swine slurry ranges from 2.0 to 4.7 % and from 1.9 to 2.9 %, respectively. The proportions ranged from 5.2 to 28.3 % and from 1.1 to 8.7 %, respectively after spreading of cattle

manure. Except for replicate 1 of the experiment with cattle manure, these results are in accordance with those obtained by Thurston-Enriquez *et al.* (2005) and Ferguson *et al.* (2007), who studied runoff produced by rainfall events onto fresh cattle faecal pats and poultry manure treated soils. The high quantity of faecal indicator released from replicate 1 in the cattle manure treatment is probably linked to the heterogeneity of this effluent. For F specific coliphages, the small quantity released (0.45 to 2.9%) into runoff water from cattle manure-amended soils is probably due to the heterogeneous mixture of cowpat and straw. On the contrary, in the swine slurry treatment, F specific coliphages are not retained in the surface, and they are released in runoff water in higher proportions ranging from 4.1 to 15.5%.

**Table 3: Cumulative amounts of faecal indicators and F specific coliphages transferred into the runoff water during the rainfall experiments**

	Pig slurry			Cow manure			Coliphages F-specific	
	L*	% release		L	% release			
		<i>E. coli</i>	Enterococci		<i>E. coli</i>	Enterococci		
<b>Replicate 01</b>	11.7	2.3	1.9	8.0	11.6	28.3	8.7	2.8
<b>Replicate 02</b>	11.9	2.0	2.3	4.1	11.8	5.2	2.6	2.9
<b>Replicate 03</b>	11.9	4.7	2.9	15.5	11.5	5.6	1.1	0.4

\* Cumulated runoff

**Dynamics of host-specific bacterial and chemical markers in runoff waters**

Table 4 shows the concentrations or the values of the faecal markers in runoff samples (control, swine slurry and cattle manure). In the control runoff water samples, the host-specific bacterial markers and steroid markers are below the quantification limit.

**Table 4: Results of the faecal markers for the runoff samples (control, swine slurry and cattle manure)**

		<b>Step 01</b> mean ± SE (n=3)	<b>Step 02</b> mean ± SE (n=3)
<b>Faecal indicators</b>			
<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	Control	< LQ	< LQ
	Pig slurry	2.1x10 <sup>4</sup> ±5.5x10 <sup>3</sup>	1.3x10 <sup>4</sup> ±3.9x10 <sup>3</sup>
	Cattle manure	3.6x10 <sup>5</sup> ±2.6x10 <sup>5</sup>	4.3x10 <sup>5</sup> ±3.4x10 <sup>5</sup>
Enterococci (UFC/100 mL)	Control	< LQ	< LQ
	Pig slurry	2.2x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>4</sup> ±1.7x10 <sup>2</sup>
	Cattle manure	1.6x10 <sup>5</sup> ±1.1x10 <sup>5</sup>	9.1x10 <sup>4</sup> ±3.8x10 <sup>4</sup>
<b>Host-specific bacterial markers</b>			
<i>L. amylovorus</i> (cells/100 mL)	Control	n.d	n.d
	Pig slurry	4.8x10 <sup>7</sup> ±1.2x10 <sup>7</sup>	3.5x10 <sup>7</sup> ±5.3x10 <sup>6</sup>
	Cattle manure	< LQ	< LQ
Pig-2-Bac (copies/100 mL)	Control	n.d	n.d
	Pig slurry	1.3x10 <sup>6</sup> ±3.7x10 <sup>5</sup>	7.1x10 <sup>5</sup> ±1.4x10 <sup>5</sup>
	Cattle manure	< LQ	< LQ
Rum-2-Bac (copies/100 mL)	Control	n.d	n.d
	Pig slurry	< LQ	< LQ
	Cattle manure	1.2x10 <sup>7</sup> ±2.7x10 <sup>6</sup>	7.1x10 <sup>6</sup> ±2.3x10 <sup>6</sup>
<b>Chemical markers</b>			
Cop/(Cop+24ethylcop), in %	Control	n.d	n.d
	Pig slurry	57.9±0.5	56.6±0.7
	Cattle manure	49.0±0.3	48.9±0.2
Sitostanol/Coprostanol	Control	n.d	n.d
	Pig slurry	0.58±0.01	0.61±0.02
	Cattle manure	1.90±0.11	1.95±0.11
Bio/Geo	Control	0.11±0.01	0.11±0.01
	Pig slurry	0.30±0.01	0.25±0.03
	Cattle manure	0.27±0.07	0.24±0.05
Geochemical fluorescence index	Control	1.21±0.04	1.19±0.02
	Pig slurry	1.38±0.03	1.35±0.03
	Cattle manure	1.28±0.11	1.22±0.08

n.d: not detected

LQ: limit of quantification

After spreading of swine slurry or cattle manure, *L. amylovorus*, the Pig-2-Bac and the Rum-2-Bac markers are quantified at a level ranging between  $7.1 \times 10^5$  and  $4.8 \times 10^7$  cells or copies/100 mL in the runoff waters samples. It is noteworthy that the difference of concentrations observed for *E. coli* and the enterococci, on the one hand, in manure or slurry, and, on the other hand, in the runoff waters (about 2 log<sub>10</sub> units) is also observed for the host specific markers, indicating that they have a similar transfer compared to the faecal indicators. The steroid profile in runoff samples from swine slurry and cattle manure-amended soils is quite similar to that observed in corresponding raw animal manures. In order of decreasing abundance, the main steroid compounds present in runoff water from swine slurry-amended soils are: coprostanol (10.9 to 15.2%), 24-ethylcoprostanol (9.1 to 10.4%), sitosterol (8.1 to 9.1%) and cholestanol (7.9 to 8.4%). In runoff water from cattle manure-amended soils, the main steroids are: sitostanol (10.4 to 15.2%), 24-ethylepicoprostanol (8.7 to 10.8%) and sitosterol (8.5 to 9.1%). R1 (coprostanol/coprostanol+24-ethylcoprostanol, expressed in %) and R2 (sitostanol/coprostanol) ratio were calculated for the runoff sample from swine slurry and cattle manure-amended soils. The results presented in Table 4 show that average R1 and R2 ratios range from 56.6 to 57.9% and from 0.56 to 0.61, respectively, in step 01 and step 02 of runoff water from soils treated with swine slurry. Average R1 and R2 ratios range from 48.9 to 49.0% and from 1.90 to 1.95, respectively, in step 01 and step 02 of runoff water from soils treated with cattle manure. The results do not show any significant variation in the steroid content from step 01 to step 02 in runoff water derived from swine slurry and cattle manure-amended soils. The results also show that R1 and R2 ratios in runoff samples from animal manure-amended soils are close to the values obtained for the corresponding raw animal manure. These results are in agreement with the previous study of Tyagi *et al.* (2009), suggesting that the steroid fingerprint of animal manure can be transferred into the runoff water from amended soils.

The Bio/Geo fluorescence indexes of the runoff samples collected from control, swine slurry and cattle manure-amended soils are quite similar to those measured on the soil or the raw faeces. In runoff samples from step 1 and 2, Bio/Geo values for the swine slurry treatment (0.30 to 0.25) and cattle manure treatment (0.27 to 0.24) remain twice as high as in the runoff water from the control soil (Bio/Geo: 0.11). Based on these results, we can conclude that Bio/Geo markers of animal manure are transferred to runoff water from animal manure-amended soils. The Geochemical Fluorescence Index (GFI) of swine slurry treatment for Step 1 (1.38) or Step 2 (1.35) is identical to the values measured on swine slurry raw faeces (1.33). GFIs in runoff from the cattle manure treatment (1.28 - 1.22) are similar to the values measured in cattle manure raw faeces (1.26), while runoff waters from swine slurry and cattle manure treatments yield values close to those measured in the runoff from the control soil (1.21 and 1.19). Our results confirm the potential of natural fluorescence as a tracer of dissolved organic matter in farm waste as proposed by Baker (2002) and Naden *et al.* (2010). Our results show for the first time that natural fluorescence cannot help to discriminate between pig or cattle origin. The Bio/Geo fluorescence tracer is sufficient to trace dissolved organic matter from farm waste. While the GFI index is inappropriate for discriminating between soil and farm waste, it could be important to distinguish farm waste from human waste.

The specific objective of this study is to compare the transfer of both microbial and chemical host-specific markers in runoff waters after a simulated rainfall event on animal manure-amended soils. Moreover, we aim to provide data on the ability of these MST markers to discriminate pig and cattle faecal contamination in the environment via runoff after manure spreading.

The microbial and chemical markers are recovered in the runoff water. The main result of this study is that both microbial and chemical host-specific markers are transferred into runoff

water. The use of microbial and chemical detection is an original approach and will be developed in the future to find the minimum data set to discriminate bovine from porcine or human faecal contamination in river catchments.

## **CONCLUSION**

Swine slurry and cattle manure application is linked to increased microbial and dissolved organic carbon in runoff after storm events. Our study demonstrates the transfer of microbial and chemical markers from animal manure to runoff water during rainfall simulation on agricultural soils. To the best of our knowledge, this study presents the first quantification of host-specific bacterial and chemical markers in runoff water samples after experimental spreading of swine slurry or cattle manure. Our study implies that MST markers are able to discriminate pig and cattle faecal contamination in the environment *via* runoff after manure spreading.

Further studies are in progress to assess the co-transfer kinetics of microbial and chemical markers and their persistence under experimental conditions. Once validated, the microbial and chemical markers will be applied to the identification of faecal contamination in catchment areas in order to comply with the requirements of the new Water Framework Directive.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work received funding from AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale et du Travail, EST-2006/1/36). Romain Marti, Sophie Mieszkina and Morgane Derrien received fellowships from Cemagref-Ademe, Ifremer-Région Bretagne and CNRS-Région Bretagne, respectively. The Higher Education Commission of Pakistan provided a Ph.D scholarship for M. Bilal. We also thank B. Gandubert Y. Hamon, O Hénin, C. Le Mennec, P. Petitjean, A. Racapé and C. Ziebal for their technical assistance. Michael Carpenter post-edited the English style.

## REFERENCES

- Baker, A. 2002. Fluorescence properties of some farm wastes: implications for water quality monitoring. *Water Res.* 36:189–195.
- Bilal, M., A. Jaffrezic, Y. Dudal, C. Le Guillou, S. Menasseri and C. Walter. 2010. Discrimination of farm waste contamination by fluorescence coupled with multivariate analysis during biodegradation study. *J. Agric. Food Chem.* 58:3093–3100.
- Bernhard, A.E., and K.G. Field. 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4571–4574.
- Berry, E.D., B.L. Woodbury, J.A. Nienaber, R.A. Eigenberg, J.A. Thurston, and J.E. Wells. 2007. Incidence and persistence of zoonotic bacterial and protozoan pathogens in a beef cattle feedlot runoff control-vegetative treatment system. *J. Environ. Qual.* 36:1873–1882.
- Bower, P.A., C.O. Scopel, E.T. Jensen, M.M. Depas, and S.L. McLellan. 2005. Detection of genetic markers of fecal indicator bacteria in Lake Michigan and determination of their relationship to *Escherichia coli* densities using standard microbiological methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8305–8313.
- Brooks, P.B., A. Adeli, J.J. Read, M.R. McLaughlin. 2009. Rainfall simulation in greenhouse microcosms to assess bacterial-associated runoff from land-applied poultry litter. *J. Environ. Qual.* 38:218–229.
- Bull, I.D., M.J. Lockheart, M.M. Elhmmali, D.J. Roberts and R.P. Evershed. 2002. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environ. Inter.* 27:647–654.
- Chen, W., P. Westerhoff, J.A. Leenheer, and K. Booksh. 2003. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 37:5701–5710.
- Chetochine, A.S., M.L. Brusseau, C.P. Gerba, and I.L. Pepper. 2006. Leaching of phage from class B biosolids and potential transport through soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:665–671.
- Chinivasagam, H.N., R.J. Thomas, K. Casey, E. McGahan, E.A. Gardner, M. Rafiee, and P.J. Blackall. 2004. Microbiological status of piggery effluent from 13 piggeries in the south east Queensland region of Australia. *J. Appl. Microbiol.* 97:883–891.
- Cole, D., S.C. Long, and M.D. Sobsey. 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6507–6514.
- Côté, C., A. Villeneuve, L. Lessard, and S. Quessy. 2006. Fate of pathogenic and nonpathogenic microorganisms during storage of liquid hog manure in Quebec. *Livestock Sci.* 102: 204–210
- Culley, J.L.B. and P.A. Phillips. 1982. Bacteriological quality of surface and subsurface runoff from manured sandy clay loam soil. *J. Environ. Qual.* 11:155–158.
- Chantigny, M.H. 2003. Dissolved and water-extractable organic matter in soils: a review on the influence of land use and management practices. *Geoderma* 113:357–380.
- Campbell, P.G.C, H.J. Hansen, B. Dubreuil, and W.O. Nelson. 1992. Geochemistry of Quebec North Shore salmon rivers during snowmelt-organic-acid pulse and aluminium mobilization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49:1938–1952.

- Day, D., 1977. Utilisation of livestock wastes as feed and other dietary products. In: Taiganides EP, editor. Animal wastes. Barking. Applied Science Publishers, 295-329.
- Dick, L.K., A.E. Bernhard, T.J. Brodeur, J.W. Santo Domingo, J.M. Simpson, S.P. Walters, and K.G. Field. 2005. Host distributions of uncultivated faecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for faecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3184–3191.
- Duffy, G. 2003. Verocytotoxicogenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J. Appl. Microbiol.* 94:94S–103S.
- Ferguson, C.M., C.M. Davies, C. Kaucner, M. Krogh, J. Rodehutsors, D.A. Deere, and N.J. Ashbolt. 2007. Field scale quantification of microbial transport from bovine faeces under simulated rainfall events. *J. Water Health* 5:83–95.
- Fidskal, L., J.S. Maki, S.J. La Croix, and J.T. Staley. 1985. Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:148–150.
- Gerba, C.P. and J.E. Smith. 2005. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J. Environ. Qual.* 34:42–48.
- Gottschall, N., M. Edwards, E. Topp, P. Bolton, M. Payne, W.E. Curnoe, B.B. Coelho, and D.R. Lapen. 2009. Nitrogen, phosphorus, and bacteria tile and groundwater quality following direct injection of dewatered municipal biosolids into soil. *J. Environ. Qual.* 38:1066–1075
- Gourmelon, M., M. P. Caprais, R Segura, C. Le Menec, S. Lozach, J. Y Piriou, and A.Rince, (2007). Evaluation of Two Library-Independent Microbial Source Tracking Methods To Identify Sources of Fecal Contamination in French Estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4857-4866.
- Graves, A.K., C. Hagedorn, A. Brooks, R.L. Hagedorn and E. Martin. 2007. Microbial source tracking in a rural watershed dominated by cattle. *Water Research.* 41(16): 3729-3739.
- Guan, T.Y. and R.A. Holley. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness - A Review. *J. Environ. Qual.* 32:383–392.
- Guber, A.K., D.R. Shelton, Y.A. Pachepsky, A.M. Sadeghi, and L.J. Sikora. 2006. Rainfall-induced release of faecal coliforms and other manure constituents: comparaisn and modeling. *Appl. Environ. Microbiol* 72:7531–7539.
- Haack, S. K., J.W. Duris, L.R. Fogarty, D.W. Kolpin, M.J. Focazio, E.T. Furlong, and M.T. Meyer. 2009. Comparing Wastewater Chemicals, Indicator Bacteria Concentrations, and Bacterial Pathogen Genes as Fecal Pollution Indicators. *J. Environ. Qual.* 38:248–258.
- Hagedorn, C., and S.B. Weisberg 2009. Chemical-based faecal source tracking methods: current status and guidelines for evaluation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 8:275–287.
- Hill, V.R., and M.D. Sobsey. 1998. Microbial indicator reductions in alternative treatment systems for swine wastewater. *Water Sci. Technol.* 38:119–122.
- Hill, V. R., and M.D. Sobsey. 2003. Performance of swine waste lagoons for removing *Salmonella* and enteric microbial indicators. *Trans. Asae* 46:781–788.
- Heinonen-Tanski, H., J. Uusi-Kämpä. 2001. Runoff of faecal microorganisms and nutrients from perennial grass ley after application of slurry and mineral fertiliser. *Water Sci. Technol.* 43: 143-146.
- Hodgson C.J., N. Bulmer, D.R. Chadwick, D.M. Oliver, A.L. Heathwaite, R.D. Fish and M. Winter. 2009. Establishing relative release kinetics of faecal indicator organisms from different faecal matrices. *Lett. Appl. Microbiol.* 49:124–130.
- Horswell, J., J. Hewitt, J. Prosser, A. Van Schaik, D. Croucher, C. Macdonald, P. Burford, P. Susarla, P. Bickers, and T. Speir. 2010. Mobility and survival of *Salmonella* Typhimurium and human adenovirus from spiked sewage sludge applied to soil columns. *J. Appl. Microbiol.* 108:104–114.
- Jardé, E., G. Gruau, L. Mansuy-Huault, P. Peu, and J. Martinez. 2007 5 $\beta$ -cholestanol/C27-sterol to monitor pig slurry in amended soils. *Water Air Soil Poll.* 178:169–178.
- Jardé, E., G. Gruau, and A. Jaffrezic. 2009. Tracing and quantifying sources of fatty acids and steroids in amended cultivated soils. *J. Agric. Food Chem.* 57:6950–6956.
- Kildare, B.J., C.M. Leutenegger, B.S. McSwain, D.G. Bambic, V.B. Rajal, and S. Wuertz. 2007. 16S-RNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific faecal *Bacteroidales*: A Bayesian approach. *Water Res.* 41:3701–3715.

- Konstantinov, S.R., A. Awati, H. Smidt, and B.A. Williams, A.D. Akkermans, and W.M.D. Vos. 2004. Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3821–3830.
- Kreader, C.A. 1998. Persistence of PCR-Detectable *Bacteroides distasonis* from Human Feces in River Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4103–4105.
- Lapen, D.R., E. Topp, M. Edwards, L. Sabourin, W. Curnoe, N. Gottschall, P. Botton, S. Rahman, B. Ball-Coelho, M. Payne, S. Kleywegt, and N. McLaughlin et al. 2008. Effect of liquid municipal biosolid application method on tile and ground water quality. *J. Environ. Qual.* 37:925–936
- Leeming, R., A. Ball, N. Asholt, and P.D. Nichols. 1996. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Res.* 30:2893–2900.
- Marti, R., P. Dabert, C. Ziebal, and A.-M. Pourcher. 2010. Evaluation of *Lactobacillus sobrius*/*L. amylovorus* as a new microbial marker of pig manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1456–1461.
- Meals, D.W., and D.C. Braun. 2006. Demonstration of methods to reduce E-coli runoff from dairy manure application sites. *J. Environ. Qual.* 35:1088–1100.
- Mendez, J., A. Audicana, A. Isern, J. Llana, B. Moreno, M.L. Tarancon, J. Jofre, and F. Lucena. 2004. Standardised evaluation of the performance of a simple membrane filtration-elution method to concentrate bacteriophages from drinking water. *J. Virol. Methods.* 117:19–25.
- Mieszkin, S., J.-P. Furet, G. Corthier, and M. Gourmelon. 2009. Estimation of Pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3045–3054.
- Mieszkin, S., J.F. Yala, R. Joubrel, and M. Gourmelon. 2010. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 108:974–984.
- Mishra, A., B.L. Benham and S. Mostaghimi. 2008. Bacterial transport from agricultural lands fertilized with animal manure. *Water Air Soil Pollut.* 189:127–134.
- Miskimmin, B.M., J.W.M. Rudd, and C.A. Kelly. 1992. Influence of dissolved organic-carbon, pH, and microbial respiration rates on mercury methylation and demethylation in lake water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49:17–22.
- Naden, P.S., G.H. Old, C. Eliot-Laize, S.J. Granger, J.M.B. Hawkins, R. Bol, and P. Haygarth. 2010. Assessment of natural fluorescence as a tracer of diffuse agricultural pollution from slurry spreading in intensively-farmed grasslands. *Water Res.* 44:1701–1712
- Omisakin, F., M. MacRae, I.D. Ogden, and N.J.C. Strachan. 2003. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2444–2447.
- Ohno, T. 2002. Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 36:742–746.
- Reuter J.H., E.M. Perdue. 1977. Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural-waters. *Geoch Cosmo Acta* 41:325–334.
- Royer, I., D.A. Angers, M.H., Chantigny, R.R., Simard and D., Cluis. 2007. Dissolved organic carbon in runoff and tile-drain water under corn and forage fertilized with hog manure. *J. Environ. Qual.* 36:855–863
- Rochette, P., and E.G. Gregorich. 1998. Dynamics of soil microbial biomass C, soluble organic C, and CO<sub>2</sub> evolution after three years of manure application. *Can. J. Soil Sci.* 78:283–290.
- Schaper, M., J. Jofre, M. Uys, and W.O. Grabow. 2002. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J. Appl. Microbiol.* 92:657–667.
- Scott, T. M., J.B. Rose, T.M. Jenkins, S.R. Farrah, and J. Lukasik. 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5796–5803.
- Seurinck, S., W. Verstraete, and S.D. Siciliano. 2005. Microbial source tracking for identification of faecal pollution. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 4:19–37.
- Shah, V.G., R. Hugh Dunstan, P.M. Geary, P. Coombes, T.K. Roberts, and E. Von Nagy-Felsobuki. 2007. Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. *Water Res.* 41:3691–3700.
- Sinton, L.W. and R.K. Finlay. 1998. Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *New Zeala. Mar. Freshwater Res.* 32:323–348.

- Soupir, M.L., S. Mostaghimi., E.R. Yagow, C. Hagedorn and D.H. Vaughan. 2006. Transport of faecal bacteria from poultry litter and cattle manures applied to pastureland. *Water Air Soil Poll.* 169:125–136.
- Standley, L.J., L.A. Kaplan, and D. Smith. 2000. Molecular tracers of organic matter sources to surface water resources. *Environ. Sci. Technol.* 34:3124–3130.
- Takada, H. and R.P. Eganhouse. 1998. Molecular markers of anthropogenic waste. In: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of environmental analysis and remediation* (Ed. by R.A. Meyers), pp. 2883–2940. Wiley, J.
- Thurston-Enriquez, J.A., J.E. Gilley and B. Eghball. 2005. Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. *J. Water Health.* 157–171
- Tyagi, P., D.R. Edwards, and M.S. Coyne. 2008. Use of sterol and bile acid biomarkers to identify domesticated animal sources of faecal pollution. *Water Air Soil Poll.* 187:263–274.
- Tyagi, P., D.R. Edwards, and M.S. Coyne. 2009. Fecal sterol and bile acid biomarkers: runoff concentrations in animal waste-amended pastures. *Water Air Soil Poll.* 198:45–54.
- Ufnar, J.A., D.F. Ufnar, S.Y. Wang, and R.D. Ellender. 2007. Development of a swine-specific faecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5209–5217.
- Vanotti, M.B., J.M. Rice, A.Q. Ellison, P.G. Hunt, F.J. Humenik, and C.L. Baird. 2005. Solid-liquid separation of swine manure with polymer treatment and sand filtration. *Trans. Asae*, 48:1567–1574.
- Zsolnay, A., and H. Görlitz. 1994. Water-extractable organic matter in arable soils: Effects of drought and long-term fertilization. *Soil Biol. Biochem.* 26:1257–1261.



## **CHAPITRE V**

---

**Discrimination des contaminations fécales d'origine humaine, porcine et ruminant dans des eaux de rivière d'un bassin versant par PCR quantitative en temps réel en utilisant des marqueurs hôte-spécifiques**

-

**Résumé**

## **CONTEXTE ET OBJECTIFS**

Il était opportun d'accroître notre panel de marqueurs *Bacteroidales* spécifiques des contaminations fécales porcines et des ruminants, en développant un marqueur *Bacteroidales* spécifique des contaminations fécales humaines et d'appliquer l'ensemble de ces marqueurs sur des eaux de rivière présentant des niveaux de contaminations fécales variables.

Ainsi, les objectifs de cette étude étaient (i) de développer à partir de l'analyse phylogénétique un marqueur *Bacteroidales* de qPCR ciblant les contaminations fécales humaines, (ii) de valider la sensibilité et la spécificité de ce marqueur sur des ADN cibles et non cibles, (iii) de le comparer à un autre marqueur humain pertinent (HF183, Seurinck *et al.*, 2005), et (iii) d'appliquer notre panel de marqueurs, Hum-1-Bac, nouvellement développé, Pig-2-Bac et Rum-2-Bac sur des eaux de l'environnement pour évaluer le niveau de contamination fécale d'origine humaine, porcine et par les ruminant à l'échelle d'un bassin versant.

## **METHODES**

Le marqueur humain Hum-1-Bac de qPCR utilisant la chimie SybrGreen®, a été dessiné à partir de l'analyse phylogénétique décrite précédemment. La spécificité des amorces a été vérifiée *in silico* et un plasmide en vue de sa quantification a été obtenu. La limite de détection du marqueur était de 1,6 copies dans le puits de PCR.

La sensibilité et la spécificité de ce marqueur ont été testées sur 20 ADN cibles (selles humaines et eaux en sortie de STEP) et sur 60 ADN non cibles constitués de fèces porcines, bovines, ovines et équinés et de lisiers de porcs et fumiers de bovins puis ensuite comparées à celles du marqueur HF183.

Les marqueurs Hum-1-Bac, Rum-2-Bac, Pig-2-Bac et HF183 ont ensuite été appliqués dans des eaux de rivière (huit sites ;  $n=33$ ) du bassin versant de Daoulas (Bretagne, Finistère). Trois sites ont été sélectionnés pour leur proximité avec des élevages porcins, quatre sites pour leur proximité avec des élevages bovins et un site en zone urbaine en aval du bassin versant.

## **RESULTATS**

Les amorces du marqueur *Bacteroidales* Hum-1-Bac ont été dessinées à partir du groupe d'OTU précédemment appelé HUMAN II. Les analyses dans des échantillons issus de selles humaines et d'eaux en sortie de STEP ont permis d'obtenir des concentrations moyennes de ce marqueur de  $7,3 \pm 1,4$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/g de selles humaines et de  $7,7 \pm 1,3$  U.

Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau en sortie de STEP. Seul un échantillon de selles humaines n'a pas été amplifié ( $n=10$ ). Concernant les ADN non cibles, trois échantillons de fèces porcines ont été amplifiées à des concentrations variant de 4,7 à 5,2 U. Log<sub>10</sub> copies/g de fèces. Lors de nos essais, le marqueur HF183 n'a pas été amplifié dans trois échantillons de selles humaines ( $n=10$ ) et a été amplifié dans un échantillon de fèces ovines. D'une façon générale, nous avons montré que les marqueurs humains Hum-1-Bac et HF183 présentaient des sensibilités respectives de 95 et 85 % et des spécificités de 95 et 98 %.

Testés dans les eaux de rivière, les marqueurs Hum-1-Bac, Rum-2-Bac, Pig-2-Bac et HF183 ont été quantifiés à des concentrations variant de 2,7 à 5,7 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau. Dans les eaux collectées en aval du bassin versant à proximité de la commune de Daoulas, où des contaminations mixtes étaient attendues, les marqueurs Hum-1-Bac et HF183 ont été quantifiés à des concentrations similaires dans 62,5 % des échantillons (2,7 à 4,1 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau). Les marqueurs Rum-2-Bac et Pig-2-Bac ont été quantifiés respectivement dans 50 et 37,5 % des mêmes échantillons (respectivement 3,4 à 5 et de 3,4 à 3,7 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau). Dans les échantillons d'eau collectés à proximité des élevages de bovins, le marqueur Rum-2-Bac a été quantifié dans tous les échantillons (3,5 à 5,7 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau). Les marqueurs Hum-1-Bac et HF183 ont été quantifiés respectivement dans 50 et 42 % des échantillons (3,2 à 5,4 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau) et le marqueur Pig-2-Bac n'a été quantifié qu'une seule fois (3,9 U. Log<sub>10</sub> copies / 100 ml d'eau). Dans les échantillons d'eau collectés à proximité des élevages de porcs, le marqueur Pig-2-Bac a été quantifié dans 50 % de ces échantillons (3,2 à 4,1 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau). Les marqueurs Rum-2-Bac, Hum-1-Bac et HF183 ont été quantifiés dans 30, 40 et 38 % des échantillons d'eau (respectivement 3,9 à 4,9 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau et 3,2 à 4,9 log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau).

## CONCLUSIONS

L'analyse phylogénétique des séquences de gènes codant les ARNr 16S des *Bacteroidales* a permis de développer un marqueur *Bacteroidales* Hum-1-Bac qui permet d'identifier sensiblement et spécifiquement les contaminations fécales humaines. Le développement de ce troisième marqueur permet l'obtention d'un panel de marqueurs pour la détection des contaminations d'origine humaine, porcine et ruminant. Ces trois marqueurs ont été détectés à plusieurs niveaux de contamination de la source initiale à l'environnement : (i) les fèces, (ii) les effluents, (iii) les eaux de ruissellement, et (iv) les eaux de l'environnement

et semblent donc être assez pertinents pour identifier avec succès l'origine des contaminations.

Enfin, la comparaison des deux marqueurs humains testés dans cette étude montre que le marqueur Hum-1-Bac est tout aussi pertinent que le marqueur HF183.

**PUBLICATION V**

**Discrimination between human, pig and ruminant faecal  
contaminations in a river catchment by real-time  
PCR using host-specific markers**

**Sophie Mieszkin<sup>1</sup>, Jean-Pierre Furet<sup>2</sup>, Gérard Corthier<sup>2</sup>, Monique Pommepuy<sup>1</sup>,  
Jean Claude Le Saux<sup>1</sup>, Morgane Bougeard<sup>1</sup>, Dominique Hervio-Heath<sup>1</sup>  
and Michèle Gourmelon<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*EMP, Laboratoire de Microbiologie, Ifremer, 29280 Plouzané, France,*

<sup>2</sup>*Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif (UEPSD), INRA, 78352 Jouy-en-  
Josas cedex, France*

**Proceedings of the 7th. Conf. on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS), 2010**

## ABSTRACT

The microbiological quality of coastal waters and shellfish harvesting areas in Brittany (France) can be affected by faecal pollutions from human activities and animal breeding (especially pigs and cattle). To discriminate among faecal pollutions of human and animal origin, a library-independent microbial source tracking method was selected: *Bacteroidales* host-specific 16S rRNA gene markers by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR). A human-specific *Bacteroidales* marker (Hum-1-Bac) was designed. Tested on faecal samples, the Hum-1-Bac marker showed 95 % sensitivity and 95 % specificity ( $n=80$ ). Average values ( $\pm$  STD) of the Hum-1-Bac marker were found to be  $7.3 \pm 1.4$  16S rRNA gene copies per g wet faeces in human faeces samples ( $n=10$ ) and  $5.7 \pm 1.3$   $\log_{10}$  copies per 100 ml water in Sewage Treatment Plant (STP) water samples ( $n=10$ ). These results highlight that the human-specific marker present in individual faeces was still present in the effluents.

The human-specific marker developed in this study (Hum-1-Bac) and the human- (HF183), the pig- (Pig-2-Bac) and the ruminant- (Rum-2-Bac) specific *Bacteroidales* markers previously described by Seurinck *et al.* (2005) and Mieszkin *et al.* (2009, 2010) were then applied to river water samples ( $n=33$ ) collected in 2008-2009 from the catchment of the Daoulas river estuary (Brittany, France), upstream of shellfish harvesting areas. For all sites, at least two host-specific markers were detected. The ruminant-specific *Bacteroidales* marker was more often quantified (60.6 %) than the human- or pig-specific *Bacteroidales* markers (Hum-1-Bac, 45.5 %; HF183, 48.5 % and Pig-2-Bac, 30.3 %) in river water samples. These results show that fecal pollution came generally from multiple origins and that host-specific *Bacteroidales* markers are promising as a quantitative microbial source tracking method to determine sources of faecal pollution in environmental water.

**Keywords:** Microbial Source Tracking, Host-Specific *Bacteroidales* Marker, 16S rRNA Gene, Real-Time PCR, Faecal Contamination

## INTRODUCTION

Coastal and river waters are an important resource for both shellfish farming and bathing areas. However faecal contamination from point source discharges, such as effluents from sewage treatment plants (STP), or from non point source discharges, such as effluents from animal rearing can affect the microbial quality of waters and shellfish. Furthermore, human enteric bacteria and viruses, such as *Salmonella*, norovirus and hepatitis A virus, have been isolated from coastal waters and shellfish in recent incidents where they were implicated in shellfish-borne disease outbreaks following oyster consumption (Le Guyader and Atmar, 2007). Management techniques have been proposed to correctly identify the origin of faecal pollution and distinguish between animal and human sources. For example, in response to health risks in recreational waters, the revised European Bathing Water Directive (2006/7/EC) changed the bathing water classification system and introduced more stringent standards. One important change was the requirement to produce bathing water profiles, meaning that the origin of the faecal contamination now has to be identified. For shellfish farming areas, the revision of the EU directive (Hygiene 3 regulation N°854/2004) also requires that assessment be made of the potential faecal sources upstream of shellfish farming areas. However, current standard techniques, which enumerate culturable *Escherichia coli* and enterococci, are not sufficient to determine the origin of contamination, as these bacteria are found in the faeces of both humans and warm-blooded animals. Alternative microbial and chemical (Microbial Source Tracking: MST) methods have been developed to distinguish between human and animal faecal pollution, targeting microorganisms such as bacteria, viruses or protozoa, and chemical compounds such as caffeine, sterols and stanols (Bernhard and Field 2000; Glassmeyer *et al.* 2005). Several approaches exist to identify the origin of faecal pollution in a complex catchment: (1) microbial source apportionment studies, (2) catchment modelling or (3) application of MST methods to water samples.

In the present study, a library-independent MST method was selected using host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers (human-, ruminant- and pig-specific markers already published and a human-specific marker developed in this study) by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) to discriminate the origin of faecal contamination from the catchment of the Daoulas river estuary in France. This selected catchment is mainly characterised by intensive livestock farming (dairy cows, pigs and poultry) with the total number of inhabitants estimated at 15 000 (Pommepuy *et al.*, 2008). The coastal shellfish harvesting areas are classified in the B-category according to European legislation (European Directive 91/492/EEC). This means that the shellfish have been found to contain between 230 and 4 600 *E. coli* per 100 g of total flesh and intravalvular fluid and must be depurated for  $\geq 48$  h in good quality water prior to sale.

The objective of this study was to use data obtained from a microbial source apportionment study on the Daoulas river catchment (Brittany, France) to test the relevance of the host-specific *Bacteroidales* markers developed or selected in our laboratory.

## MATERIALS AND METHODS

### *Development of a human-specific Bacteroidales marker*

#### Faecal sample collection and DNA extraction

Twenty samples of human origin (faeces and sewage treatment plant (STP) water) and 60 samples of animal origin (pig faeces and liquid manure, bovine faeces and manure, ovine and equine faeces) were collected. DNA was extracted from faecal samples using the Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedical, Illkirsh, France). For STP water samples, 25-200 ml were 0.22 µm-filtered and DNA was extracted using the DNeasy Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) as described in Mieszkin *et al.* (2009).

#### Oligonucleotide primers and probe

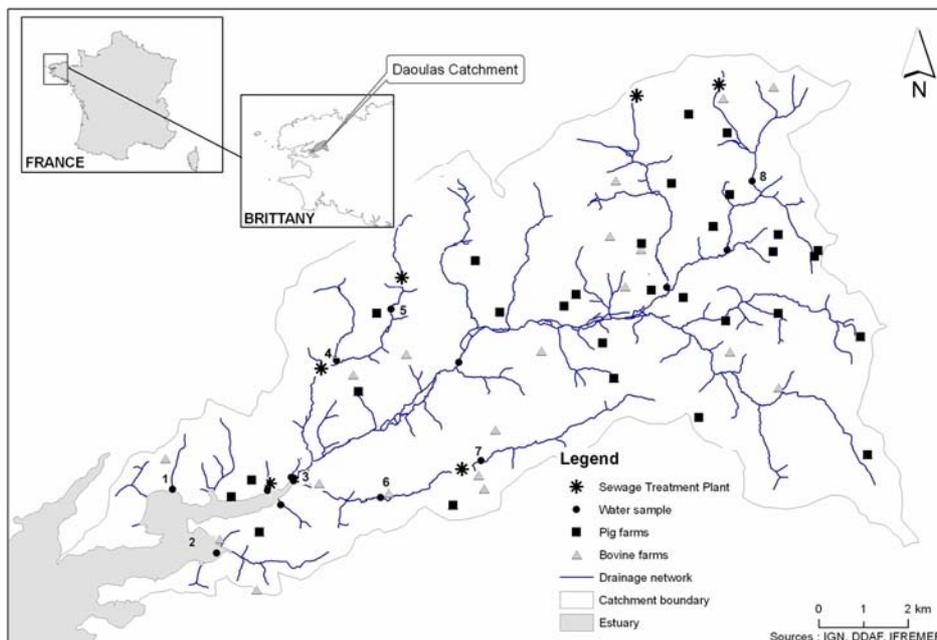
Human-specific *Bacteroidales* primers (Hum-1-Bac) were designed from multiple alignments of partial *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences obtained by Mieszkin *et al.* (2010) from human faeces and STP water samples. The HF183 set of primers was used to amplify human-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes (Seurinck *et al.*, 2005). The primers and probe AllBac, Pig-2-Bac and Rum-2-Bac were used to amplify all *Bacteroidales*, pig- and ruminant-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes, respectively (Layton *et al.* 2006; Mieszkin *et al.* 2009, 2010).

Oligonucleotide specificity for human-associated *Bacteroidales* 16S rRNA genes was verified using the BLAST (NCBI) and Probe Match (Ribosomal Database Project: RDP II) programs.

### *Application of host-specific Bacteroidales markers in river water*

#### River water samples collection and DNA extraction

River water samples were collected on the catchment of the Daoulas river estuary. Thirty-three river water samples were collected at 8 different sites. Three sites (N<sup>o</sup>s 2, 4 and 5) were selected for their proximity to pig farming activities, 4 sites (N<sup>o</sup>s 1, 6, 7 and 8) for their proximity to cattle farming and 1 site (N<sup>o</sup> 3) downstream, close to an urban area (Daoulas) (Fig. 1).



**Figure 1: Location of water sampling sites, pig and cattle farms and sewage treatment plants on the catchment of the Daoulas river estuary, Brittany, France**

For river water samples, 200 ml were 0.22 µm-filtered and DNA was extracted using the DNeasy Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

### Real-time PCR assays

All amplifications were performed using the Chromo4 real-time detection system associated with Bio-Rad Opticon Manager software version 3.1 (Bio-Rad, Hercules, CA). Real-time PCR for the Hum-1-Bac and HF183 markers were performed using the Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene, Massy, France). Real-time PCR for the AllBac, Pig-2-Bac and Rum-2-Bac markers were performed using the TaqMan® Brilliant II QPCR Master Mix kit (Stratagene, Massy, France). Each reaction was run in duplicate with cycle conditions as described in Mieszkin *et al.* (2009, 2010). For the Hum-1-Bac marker, the PCR mixture contained 200 nM of each primer and a dissociation step was added to control amplification specificity. The presence/absence of PCR inhibitors was verified using an Internal Positive Control (IPC; Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Samples were diluted if inhibitors were present. Negative controls (no template DNA) were performed in triplicate for each run. The sensitivity and the specificity of the human-specific *Bacteroidales* markers (Hum-1-Bac and HF183) were tested on target DNA ( $n=20$ ) and on non target DNA ( $n=60$ ).

### DNA standard curves and quantification

Linear plasmid DNA used to generate standard curves was obtained as described in Mieszkin *et al.* (2009). For the quantification of *Bacteroidales* markers, standard curves were generated from serial dilutions of a known concentration of plasmid DNA. Standard curves were generated by plotting threshold cycles (Ct) against 16S rRNA gene copy numbers.

### Enumeration of *E. coli*

*E. coli* enumerations were performed by the microplate method (EN ISO 9308-3. 1999) with a detection limit of < 15 MPN (Most Probable Number) per 100 ml water.

### Data treatment

The results of general and host-specific *Bacteroidales* marker quantifications were expressed in numbers of 16S rRNA gene copies per g faeces and per 100 ml water.

To evaluate the performance of the MST methods on faecal samples, sensitivity ( $r$ ) and specificity ( $s$ ) were defined as  $r = a/(a+c)$  and  $s = d/(b+d)$ , where  $a$ , corresponded to a faecal samples positive for the marker of its own species (true positive);  $b$ , corresponded to a faecal samples positive for a marker of another species (false positive);  $c$ , corresponded to a faecal samples negative for a marker of its own species (false negative); and  $d$ , corresponded to a faecal samples was negative for a marker of another species (true negative) (Fisher and Van Bell 1993).

## RESULTS

### *Design and validation of a new human-specific Bacteroidales marker*

Human-specific *Bacteroidales* sequences were identified from *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human faeces and STP water samples obtained by Mieszkin *et al.* (2010). They were used to design PCR primers (Hum-1-Bac marker: Hum-1-Bac32F-AACGCTAGCTACAGGCTTAAC and Hum-1-Bac169R-CATGCGGACATGTGAACTCATG) to identify a human source of faecal pollution in water. For the Hum-1-Bac marker, plasmid DNA containing a 16S rRNA gene sequence insert was run as a standard, using 10-fold dilutions ranging from  $1.6 \times 10^7$  to  $1.6 \times 10^0$  copies per PCR mixture with a quantification limit of 1.6 target copies per reaction. Consequently, the lower limits of quantification were  $4.5 \log_{10}$  copies per g faeces and manure and  $2.6 \log_{10}$  copies per 100 ml water.

The primers of the Hum-1-Bac marker were found to be both sensitive (95 %) and specific (95 %). Indeed, on 20 samples of human origin, only one DNA sample extracted from human faeces was not amplified. Hum-1-Bac marker concentrations were  $7.3 \pm 1.4 \log_{10}$  copies per g in human faeces and  $5.7 \pm 1.3 \log_{10}$  copies per 100 ml in STP water samples (Table 1). Concerning non target DNA ( $n=60$ ), three pig faeces samples were amplified but at weak concentrations (from 4.7 to  $5.2 \log_{10}$  copies per g) (Table 1).

**Table 1: Percentage of sensitivity and specificity of host-specific *Bacteroidales* markers and their quantification in faecal and effluent samples; percentage of positive results and concentrations**

Source of sample (n = 10)	Host-specific <i>Bacteroidales</i> markers							
	Human marker: Hum-1-Bac		Human marker: HF183 <sup>1</sup>		Ruminant marker: Rum-2-Bac <sup>1</sup>		Pig marker: Pig-2-Bac <sup>1</sup>	
	Positive samples (%)	Concentrations <sup>2</sup>	Positive samples (%)	Concentrations	Positive samples (%)	Concentrations	Positive samples (%)	Concentrations
<b>Faeces</b>								
Human	90	7.3 ± 1.4	70	8.4 ± 1	0	<4.5 <sup>4</sup>	0	<4.5
Pig	30	4.7 to 5.2	0	<4.5	0	<4.5	100	8.6 ± 0.8
Bovine	0	<4.5	0	<4.5	100	8.2 ± 0.5	0	<4.5
Ovine	0	<4.5	10	4.8	100	8.4 ± 1.3	0	<4.5
Equine	0	<4.5	0	<4.5	0	<4.5	0	<4.5
<b>Effluent</b>								
STP <sup>3</sup> water	100	5.7 ± 1.4	100	7.7 ± 1.1	20	3.1 ; 4	0	<2.6
Pig liquid manure	0	<4.5	0	<4.5	0	<4.5	100	7.2 ± 0.7
Bovine manure	0	<4.5	0	<4.5	100	7 ± 0.5	0	<4.5
<b>Sensitivity (%)</b>	<b>95</b>		<b>85</b>		<b>100</b>		<b>100</b>	
<b>Specificity (%)</b>	<b>95</b>		<b>98</b>		<b>96</b>		<b>100</b>	

<sup>1</sup> Results published in Mieszkin *et al.* (2009, 2010), <sup>2</sup> Concentrations are expressed in log<sub>10</sub> copies per gram faeces or manure and in log<sub>10</sub> copies per 100 ml pig liquid manure and STP water samples, <sup>3</sup> STP: sewage treatment plant, <sup>4</sup> Quantification limit of *Bacteroidales* markers

### *Application of E. coli and Bacteroidales markers to river waters*

*Escherichia coli* was enumerated in all river water samples at concentrations that varied with sampling point from <1.6 to 4.3 log<sub>10</sub> MPN per 100 ml river water. The AllBac marker was also found in all samples at concentrations varying from 5.1 to 6.9 log<sub>10</sub> copies per 100 ml water between samples (Table 2).

For all sites, at least two host-specific markers were detected with concentrations ranging from 2.7 to 5.7 log<sub>10</sub> copies per 100 ml water.

In river water samples collected downstream and near the urban area of Daoulas (site 3), both human-specific markers were quantified in 62.5 % of samples, with similar concentrations ranging from 2.7 to 4.1 log<sub>10</sub> copies per 100 ml water, respectively. The Rum-2-Bac and Pig-2-Bac markers were weakly quantified (50 and 37.5 % of water samples, respectively), with concentrations ranging from 3.4 to 5 and from 3.4 to 3.5 log<sub>10</sub> copies per 100 ml water, respectively (Table 2).

In river water samples collected near cattle farms (sites 1, 6, 7 and 8), the Rum-2-Bac marker was quantified in all samples, with concentrations ranging from 3.5 to 5.7 log<sub>10</sub> copies per 100 ml water. Both human-specific markers were quantified in 42-50 % of water samples, with similar concentrations, ranging from 3.2 to 5.4 log<sub>10</sub> copies per 100 ml water. The Pig-2-Bac marker was only quantified twice (at concentrations of 3.5 and 3.9 log<sub>10</sub> copies per 100 ml water).

In river water samples collected near pig farms (sites 2, 4 and 5), the Pig-2-Bac marker was quantified in 50 % of water samples, with concentrations ranging from 3.2 to 4.4 log<sub>10</sub> copies per 100 ml water. The Rum-2-Bac, Hum-1-Bac and HF183 markers were quantified in 30, 40 and 38 % of water samples with concentrations ranging from 3.9 to 4.9, from 3.2 to 4.9 and from 3.7 to 5.1 log<sub>10</sub> copies per 100 ml water, respectively (Table 2).

**Table 2: Concentration medians and ranges of general and host-specific *Bacteroidales* markers and *E. coli* in river water samples taken from the catchment of the Daoulas river estuary**

Site	Faecal contamination expected		<i>E. coli</i> <sup>1</sup>	General <i>Bacteroidales</i> (AllBac) <sup>1</sup>	Human-specific <i>Bacteroidales</i> (Hum-1-Bac) <sup>1</sup>	Human-specific <i>Bacteroidales</i> (HF183) <sup>1</sup>	Ruminant-specific <i>Bacteroidales</i> (Rum-2-Bac) <sup>1</sup>	Pig-specific <i>Bacteroidales</i> (Pig-2-Bac) <sup>1</sup>
<b>1</b> <i>n</i> = 4	Urban and rural (bovine, ovine and poultry)	Median	3.2	6	<2.6 <sup>2</sup>	<2.6	4.8	<2.6
		Range	1.9 - 4.3	5.5 - 6.7	<2.6 - 3.7	<2.6 - 3.9	4.4 - 5.4	<2.6
		N <sup>3</sup>	4	4	1	1	4	0
<b>2</b> <i>n</i> = 3	Urban and rural (bovine and pig)	Median	3	5.8	<2.6	<2.6	4.3	3.2
		Range	2.3 - 3.5	5.6 - 6.8	<2.6	<2.6	<2.6 - 4.9	<2.6 - 4.1
		N	3	3	0	0	2	2
<b>3</b> <i>n</i> = 8	Urban and rural (pig, bovine and poultry)	Median	2.8	5.9	3	3.1	3	<2.6
		Range	1.9 - 3.3	5.1 - 6.5	<2.6 - 3.9	<2.6 - 4.1	<2.6 - 5	<2.6 - 3.5
		N	8	8	5	5	4	3
<b>4</b> <i>n</i> = 3	Rural (pig)	Median	2.9	5.6	3.2	3.7	<2.6	<2.6
		Range	2.2 - 3.1	5.1 - 5.8	D <sup>4</sup> - 4.2	<2.6 - 4.4	<2.6 - 3.9	<2.6 - 3.9
		N	3	3	2	2	1	1
<b>5</b> <i>n</i> = 4	Rural (pig and poultry)	Median	3.7	6.6	4.5	4.7	<2.6	3.5
		Range	2.9 - 4.3	6.1 - 6.6	<2.6 - 4.9	<2.6 - 5.1	<2.6	<2.6 - 4.4
		N	4	4	3	3	0	2
<b>6</b> <i>n</i> = 4	Urban and rural (pig and bovine)	Median	3.8	6.2	4.1	4.3	5	<2.6
		Range	2.9 - 4.1	5.2 - 6.9	3.2 - 5.2	3.2 - 5.4	4.5 - 5.7	<2.6 - 3.9
		N	4	4	4	4	4	1
<b>7</b> <i>n</i> = 4	Rural (bovine)	Median	2.6	6	<2.6	<2.6	4.5	<2.6
		Range	2.1 - 3	5.6 - 6.4	<2.6	<2.6 - 4.3	3.5 - 4.9	<2.6
		N	4	4	0	1	4	0
<b>8</b> <i>n</i> = 3	Rural (pig and bovine)	Median	2.3	5.6	<2.6	<2.6	<2.6	<2.6
		Range	<1.6 - 3.5	5.5 - 5.8	<2.6	<2.6	<2.6 - 4.4	<2.6 - 3.5
		N	3	3	0	0	1	1

<sup>1</sup> Concentrations of *Bacteroidales* markers are expressed in log<sub>10</sub> copies per 100 ml and *E. coli* in log<sub>10</sub> MPN per 100 ml. <sup>2</sup> Quantification limit of *Bacteroidales* markers. <sup>3</sup> Numbers of results > quantification limit for each *Bacteroidales* marker and *E. coli*. <sup>4</sup> Detected: positive results were obtained in three repeated experiments

## DISCUSSION AND CONCLUSION

This study illustrates the difficulty of obtaining a human-specific *Bacteroidales* marker that is highly specific and sensitive. Sensitivity (95 %) of the Hum-1-Bac marker was better than the sensitivity of the human-specific marker HF183 (85 %) developed by Seurinck *et al.* (2005), but concentrations were 1 and 2 log units weaker than the concentrations of the HF183 marker in human faeces and STP water samples, respectively. However, for the Hum-1-Bac marker, amplifications were obtained with DNA extracts from pig faeces, although these concentrations were 100 to 1000 fold weaker than those obtained with target DNA. In river water samples, similar concentrations of the two human markers were obtained. Further sampling and analyses on faeces and effluent samples from this catchment could be useful to understand the concentration differences between these two human markers in human faeces and STP waters, and the similar results in river water samples. Comparisons of several human-specific *Bacteroidales* markers with the HF183 marker were performed by Kildare *et al.* (2007) and Ahmed *et al.* (2009). These studies also showed the difficulty of obtaining a human-specific *Bacteroidales* marker that is both specific and sensitive. However, among the different human-specific *Bacteroidales* markers tested, the HF183 marker had the best performance.

In the second part of this study, human, pig and ruminant faecal pollution were discriminated in river water samples from the Daoulas catchment using host-specific *Bacteroidales* markers and real-time PCR. For all sites, at least two host-specific markers were detected, implying that faecal pollution generally came from multiple origins. The ruminant-specific *Bacteroidales* marker was more often quantified (60.6 %) than the human or the pig-specific *Bacteroidales* markers (Hum-1-Bac, 45.5 %; HF185, 48.5 % and Pig-2-Bac, 30.3 %). These results correspond to the large number of cattle (3 300 animals) over the catchment sites as a whole. Indeed, bovine grazing or drinking near rivers was observed near the sites. Furthermore, cattle production could lead to faecal pollution entering the river due to bad manure spreading practices on arable land. Human faecal pollution was also high in this catchment and could be due to the presence of 6 STP and of numerous individual houses. For example, the subcatchment with the sites 6 and 7 is mainly characterised by cattle farming (500 animals) and there is a STP located between these two sites. Ruminant and human faecal pollution were detected, with ruminant-specific marker quantified in all the water samples from the two sites and human-specific marker mainly detected at site 6, downstream of the STP. Furthermore, on site 1, which is near a farm with 50 bovines and also near sheep farms, the ruminant-specific marker could be quantified in all the river water samples collected. Sites 4 and 5 are characterised by high pig production, indeed site 5 is located near a farm with about 7 000 pigs and a STP is located upstream. Detection of pig- and human-specific markers at these sites revealed pig and human faecal contamination. Human, ruminant and pig pollution were all observed at the site 3 located downstream in the catchment, in the Daoulas town (1 770 inhabitants), which represents a subcatchment with 60 000 pigs and 2 400 cattle. The human-, ruminant- and pig-specific markers were detected in five, four and three out of eight samples, respectively, underlining the importance of human and animal faecal pollution at this site.

Interestingly in this study, the results we obtained with host-specific *Bacteroidales* markers in river waters were in accordance with the description of the potential sources of faecal contamination in the catchment. However, additional sampling should be carried out to improve identification of faecal pollution origin. For the Daoulas catchment, it could be interesting to develop a domestic bird-specific marker (turkey and chicken) due to the importance of poultry production (383 000 birds) on the catchment.

## ACKNOWLEDGEMENTS

S. Mieszkin is the recipient of an Ifremer-Région Bretagne fellowship.

## REFERENCES

- Ahmed W., Goonetilleke A., Powell D., Chauhan K., Gardner T., 2009. Comparison of molecular markers to detect fresh sewage in environmental waters. *Water Research*, 43, 4908-4917.
- Bernhard A.E., Field K.G., 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4571-457.
- Fisher L. D., Van Belle G., 1993. Biostatistics: a methodology for health sciences. Wiley, New York, NY.
- Glassmeyer S.T., Furlong E.T., Kolpin D.W., Cahill J.D., Zaugg S.D., Werner S.L., Meyer M.T., Kryak D.D., 2005. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination, *Environmental Science and Technology*, 39, 5157-5169.
- Kildare B.J., Leutenegger C.M., McSwain B.S., Bambic D.G., Rajal V.B., Wuertz. S., 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: A Bayesian approach, *Water Research*, 41, 3701-3715.
- Layton A., McKay L., Williams D., Garrett V., Gentry R., Saylor G., 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-Based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4214-4224.
- Le Guyader F. S., Atmar R. L., 2007. Viruses in shellfish, *Perspectives in Medical Virology*, 17, 205-226.
- Mieszkin S., Furet J.P., Corthier G., Gourmelon M., 2009. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3045-3054.
- Mieszkin S., Yala J.F., Joubrel R., Gourmelon M., 2010. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR, *Journal of Applied Microbiology*, 108, 974-984
- Pommepuy M., Le Guyader F.S., Le Saux J.C., Guilfoyle F., Doré, B., Kershaw S., Lees D., Lowther J.A., Morgan O.C., Romalde J.L., Furones D., Roque A., 2008. Reducing microbial risk associated with shellfish in European countries. Borresen T., Improving seafood products for the consumer. England, Woodhead publishing in *food science, technology and nutrition*, pp. 212-246.
- Seurinck S., Defoirdt T., Verstraete W., Siciliano S.D., 2005. Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater, *Environmental Microbiology*, 7, 249-259.



## **CHAPITRE VI**

---

**Développement de marqueurs microbiens et chimiques  
pour identifier l'origine des pollutions fécales dans les eaux  
de baignades et les eaux conchylicoles en France**

-

**Résumé**

### CONTEXTE ET OBJECTIFS

Après avoir développé et validé des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques des contaminations fécales porcines et ruminants à petite échelle (eaux de ruissellement) et validé des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques des contaminations fécales humaines, porcines et ruminants à grande échelle (eaux de rivière d'un bassin versant), il était intéressant d'évaluer l'intérêt d'intégrer ces marqueurs dans une « boîte à outils » en les « confrontant » à d'autres marqueurs bactériens, viraux et/ou chimiques, pour identifier avec succès l'origine des contaminations fécales dans les eaux et les coquillages.

Les objectifs de cette étude étaient (i) de développer ou sélectionner, puis de tester des marqueurs chimiques (rapports de stéroïdes fécaux, caféine et molécules de synthèse), viraux (bactériophages F-ARN spécifiques) et bactériens (*Bifidobacterium adolescentis*) sur des échantillons de fèces et d'effluents, (ii) de comparer ces marqueurs à d'autres marqueurs bactériens (*Bacteroidales* et *Lactobacillus amylovorus*) sur des échantillons d'effluents et d'eaux de l'environnement (effluents de station d'épuration, eaux de ruissellement et eaux de rivière plus ou moins contaminées), et enfin (iii) de sélectionner les marqueurs les plus pertinents pour proposer une « boîte à outils ».

Cette étude a été réalisée avec nos partenaires scientifiques des projets Trace 1 et 2.

### METHODES

Concernant les marqueurs chimiques, les stéroïdes, ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) suivie d'une analyse multi-résidus. La caféine et les molécules de synthèse, ont été analysées par une extraction liquide-solide sur cartouche Oasis HLB couplée à une analyse par GC-MS-MS. Pour les marqueurs viraux, une numération des bactériophages F-ARN spécifiques (génogroupes I, II, III et IV) a été réalisée puis les isolats ont été génotypés par une technique d'hybridation moléculaire. Enfin, les marqueurs bactériens *Bacteroidales*, *L. amylovorus* et *B. adolescentis* ont été détectés et quantifiés par qPCR.

Après sélection et validation des marqueurs chimiques et microbiens les plus performants à partir d'essais sur des fèces et des effluents, une comparaison a été effectuée sur des eaux en sortie de STEP ( $n=4$ ), des eaux de ruissellement impactées par des effluents d'origine bovine ou porcine ( $n=6$ ), des eaux de rivière impactées par des effluents d'origine bovine ( $n=3$ ), et par des contaminations multiples ( $n=23$ ).

### RESULTATS

Les marqueurs chimiques retenus à partir de tests sur des fèces et des effluents étaient les ratios de stéroïdes exprimés en pourcentage, R1 ( $[\text{coprostanol}/\text{coprostanol}+24\text{-ethycoprostanol}]\times 100$ ) et R2 ( $\text{sitostanol}/\text{coprostanol}$ ). Le ratio R1 permet de différencier les contaminations par les effluents d'origine animale ( $R1 < 60\%$ ) des contaminations par les effluents d'origine urbaine ( $R1 > 60\%$ ). Le ratio R2 permet de différencier les contaminations par les effluents d'origine bovine ( $R2 > 1$ ) des contaminations par les effluents d'origine porcine et urbaine ( $R2 < 1$ ). La caféine et les molécules de synthèse : diphenylhydramine, benzophenone, tri(2-chloroethyl)phosphate (TCEP) et tri(dichloroisopropyl)phosphate (TDCP) ont permis de caractériser des contaminations fécales humaines.

Les marqueurs viraux retenus sont les génogroupes II et III des bactériophages F-ARN spécifiques pour l'identification des contaminations fécales humaines et les génogroupes I et IV pour l'identification des contaminations fécales animales.

Enfin chez les marqueurs bactériens, les marqueurs *Bacteroidales* HF183 pour les contaminations fécales humaines, Rum-2-Bac pour les contaminations fécales par les ruminants et Pig-1-Bac et Pig-2-Bac et *L. amylovorus* pour les contaminations fécales porcines et le marqueur de contaminations fécales humaines *B. adolescentis* ont été retenus.

Après l'analyse de l'ensemble de ces marqueurs pour identifier l'origine des contaminations fécales sur des eaux de l'environnement impactées par des contaminations humaines et animales à des concentrations variables en *E. coli*, 11 marqueurs chimiques et microbiens ont été sélectionnés. Les marqueurs humains retenus étaient la caféine, le TCEP, la benzophenone, les ratios de stéroïdes R1 et R2, le génogroupe II des bactériophages F-ARN spécifiques et les marqueurs HF183 et *B. adolescentis*. Les marqueurs porcins sélectionnés étaient le ratio R2 et les marqueurs Pig-2-Bac et *L. amylovorus*. Enfin, le marqueur ruminant retenu était Rum-2-Bac.

### CONCLUSIONS

La comparaison de plusieurs marqueurs chimiques et microbiens sélectionnés ou développés dans le cadre des projets Trace 1 et 2 a permis de réunir les marqueurs les plus performants pour identifier avec plus de certitude l'origine des contaminations fécales dans l'environnement quand les concentrations en *E. coli* sont supérieures à 500 *E. coli*/100 ml et de proposer ainsi une « boîte à outils ».

## **Chapitre VI – Comparaison des marqueurs *Bacteroidales* à d'autres marqueurs MST**

Cette comparaison a également mis en évidence la pertinence des marqueurs *Bacteroidales* car trois des quatre marqueurs *Bacteroidales* proposés dans cette étude - Pig-2-Bac, Rum-2-Bac et HF183 - ont été sélectionnés dans la « boîte à outils ».

**PUBLICATION VI**

**Development of microbial and chemical MST tools to identify  
the origin of the faecal pollution in bathing and  
shellfish harvesting waters in France**

**Michèle Gourmelon<sup>1</sup>, Marie-Paule Caprais<sup>1</sup>, Sophie Mieszkin<sup>1</sup>, Romain Marti<sup>2,3</sup>,  
Nathalie Wéry<sup>4</sup>, Emilie Jardé<sup>5</sup>, Morgane Derrien<sup>5</sup>, Alain Jédas-Hécart<sup>6</sup>, Pierre-Yves  
Communal<sup>6</sup>, Anne Jaffrezic<sup>7</sup>, and Anne-Marie Pourcher<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>*EMP, Laboratoire de Microbiologie, Ifremer, 29280 Plouzané, France,*

<sup>2</sup>*Cemagref, Rennes, France,*

<sup>3</sup>*Université Européenne de Bretagne, Rennes, France,*

<sup>4</sup>*INRA, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Narbonne, France,*

<sup>5</sup>*CNRS Géosciences Rennes, France,*

<sup>6</sup>*Université d'Angers, France,*

<sup>7</sup>*INRA AgroCampus, Rennes, France*

**Water Research (2010) 44 (16); 4812-4824**

## **ABSTRACT**

The microbiological quality of coastal or river waters can be affected by faecal pollution from human or animal sources. An efficient MST (Microbial Source Tracking) toolbox consisting of several host-specific markers would therefore be valuable for identifying the origin of the faecal pollution in the environment and thus for effective resource management and remediation. In this multidisciplinary study, after having tested some MST markers on faecal samples, we compared a selection of 17 parameters corresponding to chemical (steroid ratios, caffeine, and synthetic compounds), bacterial (host-specific *Bacteroidales*, *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium adolescentis*) and viral (genotypes I-IV of F-specific bacteriophages, FRNAPH) markers on environmental water samples ( $n=33$ ; wastewater, runoff and river waters) with variable *Escherichia coli* concentrations. Eleven microbial and chemical parameters were finally chosen for our MST toolbox, based on their specificity for particular pollution sources represented by our samples and their detection in river waters impacted by human or animal pollution; these were: the human-specific chemical compounds caffeine, TCEP (tri(2-chloroethyl)phosphate) and benzophenone; the ratios of sitostanol/coprostanol and coprostanol/(coprostanol+24-ethylcoprostanol); real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) human-specific (HF183 and *Bifidobacterium adolescentis*), pig-specific (Pig-2-Bac and *L. amylovorus*) and ruminant-specific (Rum-2-Bac) markers; and human FRNAPH genogroup II.

**Keywords:** Microbial Source Tracking, faecal pollution, *Bacteroidales*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus*, F-RNA bacteriophages, steroids and caffeine

## **INTRODUCTION**

Human and animal faecal pollution may affect inland and coastal water with negative effects on recreational uses, public safety or shellfish sanitary status (Feldhusen 2000; Dorfman and Sinclair Rosselot 2008) and can lead to economic losses due to shellfish bed closures or bathing prohibition (Rabinovici et al., 2004).

In order to improve water quality, management and remediation plans need methods of identifying faecal pollution sources. Indeed, the introduction of the Water Framework Directive (WFD, 2000/60/EC) in the EU has provided a framework for integrated water management by river basin, and this requires the consideration of point- or diffuse-pollution sources. More especially, one of its daughter directives, the revised Bathing Water European Directive (2006/7/EC), sets more stringent microbiological quality targets and requires that Member States establish bathing water profiles that assess pollution risks. These profiles are an inventory and study of the pollution sources likely to affect water quality, and are drawn up for each bathing water zone. In addition, the revised EU Shellfish Directive (Hygiene 3 Regulation N°854/2004) goes through the best means of assessment for potential faecal pollution sources upstream of shellfish farming areas.

A major shortcoming of such evaluations at present is that the faecal microbiological indicators used as standards in these regulations *i.e.* *Escherichia coli* and enterococci cannot distinguish between human and animal faecal pollution. As identification of nonpoint-source or multiple pollutions is difficult, Microbial Source Tracking (MST) methods have been developed to discriminate between human and nonhuman sources of faecal pollution, and between different animal species. Microbial or chemical targets associated with human and animal faeces, or their related effluents, have been proposed (Glassmeyer et al., 2005; US EPA 2005; Field and Samadpour 2007). For example, chemical markers such as faecal steroids (Leeming et al., 1996; Shah et al., 2007; Tyagy et al., 2007), caffeine and synthetic compounds released into urban wastewaters (Glassmeyer et al., 2005) have been used to distinguish human and animal pollution. Microbial markers including bacteria, *Archaeobacteria*, viruses and protozoa have also been tested (Bernhard and Field 2000; Jimenez-Clavero et al., 2003; Ufnar et al., 2007).

Until now, no single source tracking microbial or chemical method appears sufficiently discriminatory to identify the origin of faecal pollution in water (Griffith et al., 2003; Blanch et al., 2006; Field and Samadpour, 2007). Although a MST toolbox combining several methods could potentially improve discrimination, only a few studies have been done to develop and compare the combination of several MST methods (Griffith et al., 2003; Blanch et al., 2006; Ahmed et al., 2007; McQuaig et al., 2009).

Given the few data available on combined chemical and microbial source tracking methods, a multidisciplinary study was conducted by six French research Institutes in order to propose an efficient MST toolbox that could differentiate human, pig and bovine pollution in surface waters. In fact, even though pollution from pets, horses and wild animals such as waterfowl birds could contribute to faecal pollution of waters (Savichtcheva et al., 2007; Lu et al., 2008), human wastes (WWTP discharges, autonomous sanitation systems effluents, or sewage sludge spreading), and agricultural runoff containing faecal pollution from pig and bovine manure spreading and pasture are more often responsible for pollution in catchments in France, which is the top cattle producer and the third largest pig producer in the EU.

In the first phase of this project, each laboratory independently developed and validated its chemical or microbial methods on faeces, manure and wastewater treatment plant (WWTP) effluents.

Chemical markers investigated in this study included i) caffeine and seven synthetic compounds selected from the 35 compounds proven useful as indicators of anthropogenic

pollution in the largest study performed to date (Glassmeyer et al. 2005), and ii) faecal sterol and stanol fingerprints, which have been widely used to monitor faecal pollution in water and to distinguish human and animal sources (Leeming et al., 1996; Shah et al., 2007).

The microbiological approach, which included viral and bacterial markers, was based on library-independent methods. The viral markers tested were F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH); these have been classified into four genogroups, two of which (II, and III) predominate in WWTP effluents, and two of which (I and IV) are mainly associated with animal faeces and effluents (Schaper et al., 2002; Ogorzaly et al., 2006). Bacterial markers were selected among *Bacteroidales* and *Bifidobacterium*, two bacterial groups that have been reported to contain host-specific bacterial species (Bernhard and Field, 2000; Delcenserie et al., 2004; Dick et al., 2005; Lamendella et al., 2008). The human-specific *Bacteroidales* HF183, first described by Bernhard and Field (2000) and modified for real-time PCR assay by Seurinck et al. (2005), was selected due to its high specificity (Mieszkin et al., 2010). Three other *Bacteroidales* (two pig-specific and one ruminant-specific) markers were selected according to the results of a previous analysis of 16S rRNA *Bacteroidales* gene sequences of animal faeces and effluents (Mieszkin et al., 2009). A third pig-specific marker, *Lactobacillus amylovorus*, which has been successfully tested by Marti et al. (2010), was also selected. Finally, a phylotype related to *Bifidobacterium adolescentis* was chosen that had been identified as a potential human marker after analyzing the diversity of bifidobacteria in treated WWTP effluents, although its specificity had not been tested (Wéry et al., 2010).

Our aims were therefore (i) to select and test chemical markers, FRNAPH and *B. adolescentis* on faeces and effluent samples; (ii) to evaluate the efficiency of a new toolbox composed of these markers, *Bacteroidales* markers and *L. amylovorus*, for differentiation of human and livestock faecal pollution, by analyzing wastewaters, runoff waters and rivers; and (iii) to select the most effective set of markers for identifying the origin of faecal pollution.

## MATERIALS AND METHODS

### *Adaptation and testing of existing methods on faecal samples*

#### **Steroids**

Fifteen steroids (cholesterol, coprostanol, epicoprostanol, cholestanol,  $\alpha$ -cholestanol, campesterol, campestanol, stigmasterol, stigmastanol,  $5\beta$ -stigmastanol,  $5\beta$ -epistigmastanol, sitosterol, sitostanol, 24-ethylcoprostanol and 24-ethylepicoprostanol) were quantified in 9 bovine and 4 porcine manures and 6 WWTP effluents. These samples were frozen for 2 days at  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  and freeze-dried for 3 days before analyses. Concentrations were determined as in Jardé et al. (2009). Steroid compounds were separated by liquid chromatography. After derivatization using N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide - trimethylchlorosilane (99/1, v/v), quantifications were performed on a Shimadzu QP2010+ gas chromatograph mass spectrometer. The chromatographic separation was performed on a SLBTM-5ms column (Supelco, 60 m, 0.25mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ) with the program:  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (held at 1 min) to  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$  at  $15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , then  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  (held at 15 min) at  $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Helium flow was maintained at 1 mL/min. Quantification of steroid compounds was performed by adding of  $^2\text{H}_6$ -cholestane as an internal standard.

#### **Human faecal chemical pollution markers**

Eight compounds (caffeine, diphenhydramine tri(2-chloroethyl)phosphate (TCEP), tri(dichloroisopropyl)phosphate (TDCP), triclosan, ethyl citrate, galaxolide and tonalide) were selected among the 35 compounds that had been shown to be useful as indicators of anthropogenic pollution in the study by Glassmeyer *et al.* (2005). Except caffeine, which was chosen because of its wide use as chemical tracer, all the other compounds were selected due to their 100 % frequency in wastewater effluents and their potential to be detected using a simple multiresidue method.

Water samples (250 mL) were vacuum filtered through a 1.2  $\mu\text{m}$  GF/C filter (Whatman) and extracted with Oasis HLB<sup>®</sup> cartridges (500 mg, 6  $\text{cm}^3$ ) as in Zaugg et al. (2002). Phenanthrene-d10 was used as surrogate standard.

Sample extracts (1 mL in ethyl acetate) were analysed using a GC/MS/MS system: Varian GC 3800 equipped with a Varian 8400 autosampler, and coupled to a Varian 4000 ion trap mass spectrometer operating in electron impact ionization mode at 70 eV. Separation was performed using a FactorFour VF-5 ms column.

The GC conditions were: splitless injection ( $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 min, 2  $\mu\text{L}$  injection volume, 1 mL/min He) and a temperature program of  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 3 min,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min isothermal,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $280\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The ion trap was maintained at  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the manifold at  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and the line transfer at  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The mass detection parameters were individually optimized for each analysis, as collision energy was required to produce the daughter ions.

The most intense peak(s) of daughter ions were used for quantification.

#### **F-specific RNA bacteriophages**

FRNAPH were enumerated following the ISO 10705 method (Anonymous 2001). FRNAPH genotyping was done on bacteriophage isolates by plaque hybridization with labelled oligonucleotide probes designed by Beekwilder et al. (1996). Faeces of humans, pigs, cows, sheep and birds ( $n=125$ ), and effluent samples ( $n=100$ ; WWTP effluent, porcine and bovine manure) were analysed to evaluate sensitivity and specificity of this method. However, as the plaque hybridization method is time-consuming, a new genotyping method was also carried out based on real-time RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) with a One-Step RT-PCR kit

## Chapitre VI – Comparaison des marqueurs *Bacteroidales* à d'autres marqueurs MST

(QuantiTech Probe RT-PCR, Qiagen; Ogorzaly et al., 2009) using primers and probes described in Ogorzaly and Gantzer (2006, Table 1).

**Table 1: Primer and probe sequences for real-time PCR for detection of bacterial markers and of four F-specific RNA phage genogroups**

Primers and probe	Sequences (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature (°C)	Final concentration (nmol)	Target	References
<u>AllBac</u>						
AllBac296F	GAGAGGAAGGTCCCCAC	106	60	200	All- <i>Bacteroidales</i> général	Layton <i>et al.</i> , (2006)
AllBac467R	CGCTACTTGGCTGGTTCAG			200		
AllBac375Bhqr	<b>(FAM)CCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCT (BHQ-1)</b>			100		
<u>HF183</u>						
HF183f	ATCATGAGTTCACATGTCCG	83	60	200	Human specific <i>Bacteroidales</i>	Seurinck <i>et al.</i> , (2005)
HF183r	TACCCCGCTACTATCTAATG			200		
<u>Rum-2-Bac</u>						
BacB2-590F	ACAGCCCCGCGATTGATACTGGTAA	99	60	200	Ruminant- specific <i>Bacteroidales</i>	Mieszkin <i>et al.</i> , (2010)
Bac708Rm	CAATCGGAGTTCTTCGTGAT			200		
BacB2-626P	<b>(FAM)ATGAGGTGGATGGAATTCGTGGTGT(BHQ-1)</b>			200		
<u>Pig-1-Bac</u>						
Pig-1-Bac32Fm	AACGCTAGCTACAGGCTTAAC	129	60	200	Pig-specific <i>Bacteroidales</i>	Mieszkin <i>et al.</i> , (2009)
Pig-1-Bac108R	CGGGCTATTCCTGACTATGGG			200		
Pig-1-Bac44P	<b>(FAM)ATCGAAGCTTGCTTTGATAGATGGCG(BHQ-1)</b>			200		
<u>Pig-2-Bac</u>						
Pig-2-Bac41F	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT	116	60	300	Pig-specific <i>Bacteroidales</i>	Mieszkin <i>et al.</i> , (2009)
Pig-2-Bac163Rm	ACCTCATACGGTATTAATCCGC			300		
Pig-2Bac113MGB	<b>(VIC)TCCACGGGATAGCC(NFQ-MGB)</b>			200		
<u><i>L. amylovorus</i></u>	TTCTGCCTTTTTGGGATCAA CCTTGTTTATTCAAGTGGGTGA	175	60	200 200	<i>L. amylovorus</i>	Konstantinov <i>et al.</i> , (2006)
<u><i>Bifid. adolescentis</i></u>						
W257F	GGGTGGTAATGCCGGATG	325	60	300	Human- specific <i>Bifidobacteria</i> Phylotype	This study
W255R	GGTGCTTATTCGAAAGGTACACTCA			300		
W256P	<b>(FAM)ATGTCCTTCTGGGAAAGATTCATCGGTATG (TAMRA)</b>			100		
<u>FRNAPH I</u>						
GIF	TCGATGGTCCATACCTTAGATGC	176	60	400	Animal genogroups	
GIR	ACCCCGTTAGCGAAGTTGCT			400		
GIP	<b>(FAM)CTCGTCGACAATGG(MGBNFQ)</b>			150		
<u>FRNAPH II</u>						
GIIIF	TGCAAACCTAACTCGGAATGG	72	60	400	Human genogroups	
GIIR	AGGAGAGAACGCAGGCCTCTA			400		
GIIP	<b>(FAM)TCCCTCTATTTCTC (MGBNFQ)</b>			150		
<u>FRNAPH III</u>						
GIIF	CCGCGTGGGGTAAATCC	115	60	400	Human genogroups	Ogorzaly et Gantzer, (2006)
GIIR	TTCTTACGATTGCGAGAAGGCT			400		
GIIP	<b>(FAM) AAGCGGGTGCAGTT(MGBNFQ)</b>			150		
<u>FRNAPH IV</u>						
GIVF	GCTACTAGCCTTCGTCGCAAGA	62	60	400	Animal genogroups	
GIVR	GAAGGCACTGTCTGAATCCA			400		
GIVP	<b>(FAM)AGGTCGGTACAAAGTG (MGBNFQ)</b>			150		

A comparison was made between the two methods on 60 representative or environmental bacteriophage isolates.

FRNAPH concentrations were expressed in plaque-forming units (PFU) per g faeces or per 100 mL water. The quantification limit is 1 PFU per g faeces and 10 PFU per 100 mL water. Only results with at least 20 successfully-genotyped plaques were considered as valid FRNAPH source tracking results. Indeed, due to the statistical variation of results from FRNAPH tests, those of <20 PFU were considered to be inconclusive (Stapleton et al., 2007). Results are expressed in percentage (%) human (II or III) or animal (I or IV) genogroups/total FRNAPH isolated.

### ***Bifidobacterium adolescentis* marker**

#### Sample collection and DNA extraction

Individual human faecal samples were obtained from 10 healthy adult and child volunteers from Brittany (France). Individual animal faecal samples were collected immediately after excretion from apparently healthy animals (14 pigs, 14 cows, 10 sheep and 10 horses).

Porcine faecal samples were collected from adult sows and boars, young pigs, and piglets mainly housed in stalls on farms in Brittany. Cow faecal samples were collected from animals kept on pasture or housed in stalls, and included samples from adults and heifers on beef and dairy farms in Brittany and Normandy. Samples from sheep were collected from one farm in Brittany and from salt meadows on two farms in Normandy. Samples from horses were collected from stud farms in Brittany and Pays de la Loire. Poultry droppings ( $n=4$ ) were collected from a henhouse in Brittany. Wild bird faeces ( $n=15$ ) were collected on two beaches in Brittany.

Eight WWTP water samples were collected at the outlets of eight independent municipal WWTP (not connected to slaughterhouses) in Pays de la Loire.

Six porcine manure samples were collected from six separate farms in Brittany.

For faeces samples, DNA was extracted from 250 mg wet weight of samples using the Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedical, Illkirsh, France) according to Dick et al. (2005). Porcine manure and WWTP samples were centrifuged at 9000 g for 15 min and DNA extracted from 200 mg of the pellet using the DNA stool mini kit.

#### Real-time PCR

A real-time PCR system was designed to specifically amplify the phylotype SFA 41 related to *Bifid. adolescentis* identified in Wéry et al. (2010) (Table 1). The forward *Bifidobacterium* primer (W257F) was previously published by Germond et al. (2002). The probe (W256P) and reverse primer (W255R) were designed using ARB, BLASTN, Primer BLAST (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Primer Express® (Applied Biosystems).

Real-time PCR were done in 25  $\mu$ L, using 96-well optical reaction plates. PCR of *Bifid. adolescentis* used 12.5  $\mu$ L 2X qPCR Mastermix Plus for probes (Eurogentec, France), 5  $\mu$ L diluted DNA, primers (300 nM) and TaqMan probe (100 nM). Amplifications were run on ABI Prism 7000 SDS equipment (Applied Biosystems). The PCR program was: 10 min at 95 °C, then 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C.

The presence/absence of PCR inhibitors was verified using an Internal Positive Control (IPC) (Applied Biosystem, France). Samples were diluted if inhibitors were present. DNA samples were tested with the IPC at no-dilution (ND), 1/10 and 1/100 dilution. The DNA samples without inhibition were used for the PCR reactions. Negative controls (no template DNA) were performed for each run.

Host-specific PCR assays were tested on faeces and effluent samples. Sensitivity and specificity were calculated according to Gawler et al. (2007).

All samples were tested in triplicate. Plasmid DNA containing partial 16S rRNA gene sequence insert was used as a standard at 10-fold dilutions ranging from  $5 \times 10^7$  to  $5 \times 10^0$  gene copies per real-time PCR, with a quantification limit of 5 target copies per reaction.

Consequently, the lower limit for quantification of *Bifid. adolescentis* marker was  $3 \times 10^4$  copies per g in faeces and  $1 \times 10^3$  copies per 100 ml water.

### ***In situ application of host-specific microbial and chemical markers***

#### **Runoff, WWTP effluent and river water samples**

Independent samples of field runoff were collected after six rainfall simulations on an experimental agricultural plot (Brittany, France) spread with either bovine (samples B1 to B3) or porcine manure (samples P1 to P3).

Four WWTP effluents (WW1 to WW4) from Pays de la Loire (France) were sampled after the secondary sedimentation tank.

Three samples were collected from a river (Brittany, France) flowing through an agricultural area associated with intensive cattle grazing (C1 to C3).

Twenty water samples (R1 to R20) were collected from two rivers in Pays de la Loire, both flowing through agricultural areas and receiving WWTP discharges.

All water samples were collected in plastic bottles and transferred at 4 °C to each laboratory. Samples for chemical analyses were stored at -20°C, whereas samples for microbial analysis were analysed within 24 hours of collection.

*E. coli* was enumerated using TBX medium (Oxoid, France) and concentrations were expressed in colony-forming units (CFU) per 100 mL water. Some blue colonies were transferred into Peptone Water (Oxoid, France) and incubated for 24 h at 44 °C for the confirmation of *E. coli*. After incubation, 0.5 mL Kovac's Indole reagent (Labogros, France) was added. The detection limit is 1 CFU per 100 mL water.

The Table 2 present all MST markers and general indicators tested in environmental waters.

**Table 2: Description of 17 microbial and chemical parameters tested during the *in situ* application of MST markers**

MST Markers / general indicators	Abbreviations	Type of marker(target)	Origin of pollution	Methods	References
<b>Host-specific <i>Bacteroidales</i> markers</b>		Microbial		Real-time PCR	
- HF183	HF183	(anaerobic bacteria – 16S	Human		Mieszkin <i>et al.</i> , (2009)
- Rum-2-Bac	Rum-2	rRNA gene)	Ruminant		Mieszkin <i>et al.</i> , (2010)
- Pig-1-Bac	Pig-1		Porcine		
- Pig-2-Bac	Pig-2		Porcine		
<b>Pig-specific bacterial marker</b>		Microbial		Real-time PCR	Marti <i>et al.</i> , (2010)
- <i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>L. amy</i>	(anaerobic bacteria – genomic RDA fragment)	Porcine		
<b>Human-specific bacterial marker</b>		Microbial		Real-time PCR	This study
- <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>B. ado</i>	(anaerobic bacteria – 16S rRNA gene)	Human		
<b>F-specific RNA bacteriophages</b>		Microbial		Culture/ genotyping by real -time RT-PCR	This study
- FRNAPH I	FR I	(virus of enteric bacteria)	Animal		Ogorzaly <i>et al.</i> , (2009)
- FRNAPH II	FR II		Human		
- FRNAPH III	FR III		Human		
- FRNAPH IV	FR IV		Animal		
<b>Faecal chemical pollution markers</b>		Chemical		Multi-residue procedure and GC/MS/MS	This study
- Caffeine	Caff		Human		Glassmeyer <i>et al.</i> , (2005)
- Diphenylhydramine	Diph		Human		
- Benzophenone	Benzo		Human		
- TCEP – tri(2-chloroethyl)phosphate	TCEP		Human		
- TDCP – tri(dichloroisopropyl)phosphate	TDCP		Human		
<b>Steroids</b>		Chemical		Liquid solid extraction and capillary column	This study
- R1: coprostanol/24-ethylcoprostanol	R1		Human/porcine-bovine	<b>GC/MS</b>	Jardé <i>et al.</i> , (2009)
- R2: sitostanol/coprostanol	R2		Bovine/porcine-human		
<b><i>Escherichia coli</i></b>	<i>E. coli</i>	Microbial		Culture	
<b>All-<i>Bacteroidales</i></b>	AllBac	Microbial		Real-time PCR	
<b>F-specific RNA bacteriophages</b>	FRNAPH	Microbial		Culture	
<b>Total Steroids</b>	T. Steroids	Chemical		Liquid solid extraction and capillary column	
				<b>GC/MS</b>	

### Chemical markers

For steroid compounds, one litre of each water sample was frozen for 2 days at -10 °C after filtration at 0.45 µm, and freeze-dried for 3 days before analyses. Then, 0.01 to 0.2 g of freeze-dried samples were extracted and analysed as described in section 2.1.1

The other chemical markers were quantified on 250 mL-water samples as described in section 2.1.2.

### FRNAPH

FRNAPH were enumerated following the ISO method, directly or after concentration by ultrafiltration with a Centricon Plus-70 (Millipore) for the less contaminated water samples. Bacteriophage isolates were then genotyped by real-time RT-PCR, with the One-Step RT-PCR kit, as in Ogorzaly et al. (2009).

### Bacterial markers

For river water and WWTP effluent samples, 25-200 mL water were filtered on 0.22 µm polycarbonate membrane (Nuclepore) for *Bacteroidales* and *L. amylovorus* marker analyses, and on 0.22 µm polyethersulfone filter (Supor 200; Pall Corporation, Ann Arbor, MI) for *Bifid. adolescentis*. Filters were stored at -20°C. DNA was extracted with a modified DNA mini kit (Qiagen) protocol as in Mieszkin et al. (2009) or by using the DNA stool mini kit (Qiagen) as in Marti et al. (2010). Results from these two protocols were similar (data not shown).

For runoff, approximately 50 mL water were centrifuged at 9000 g for 15 min, and 250 mg of the pellet were transferred into microtubes and stored at -20 °C. DNA was extracted using the Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirsh, France), according to Dick et al. (2005).

Previously described primers-and-probe and primer sets for all-*Bacteroidales* (AllBac), HF183, Pig-1-Bac, Pig-2-Bac, Rum-2-Bac and *L. amylovorus* markers (Seurinck et al., 2005; Layton et al., 2006; Mieszkin et al., 2009, 2010; Marti et al. 2010; Table 1) were used to amplify total *Bacteroidales*; human-, pig-, and ruminant-specific *Bacteroidales* and 16S rRNA genes; and the *L. amylovorus* RDA gene. PCR amplifications of general and host-specific *Bacteroidales* markers, *L. amylovorus* and *Bifid. adolescentis* were performed as in Mieszkin et al. (2009, 2010), Marti et al. (2010) and section 2.1.4.

A standard curve was generated using serial 10-fold dilutions of a plasmid preparation containing the target sequence for *Bacteroidales* and *Bifid. adolescentis* markers or bacterial genomic DNA extracted from a pure-strain culture for the *L. amylovorus* marker. The presence/absence of PCR inhibitors was verified using an Internal Positive Control (IPC) (AppliedBiosystem, France). All samples were tested in triplicate.

The lower limit of quantification of the all-*Bacteroidales*, host-specific *Bacteroidales* and *Bifid. adolescentis* markers was  $1 \times 10^3$  16S RNA gene copies per 100 ml water, and the lower limit of quantification of *L. amylovorus* marker was  $1 \times 10^3$  cells per 100 ml.

### Statistical analysis

To take into account values below the quantification limit, quantitative data were transformed into categorical data (0 = not quantified; 1-3 = relative to concentrations or ratios). Relations between samples and presence of each marker were studied by Multiple Correspondence Analysis (MCA) using FactoMineR and Hierarchical Classification on Principle Components (HCPC) by Ward's method. Euclidean distance was calculated between individuals. All calculations were performed and graphics drawn using R version v.2.9.2.

## RESULTS

### *Development and testing of methods for the selection of chemical and microbial markers on faecal samples*

#### **Steroids**

The 19 samples of animal faeces and WWTP effluents were characterized by the presence of C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> sterol and stanol compounds. The major compounds in the samples of bovine manure were the C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> steroids, which represented between 65 % and 75 % of the steroids quantified. Among C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> steroids, sitostanol (12 to 14 %) and 24-ethylepicoprostanol (14 % to 18 %) were the main compounds present in bovine manure. In porcine manure samples, the distribution of steroids was roughly the same in C<sub>27</sub> compounds (45 to 53 %) as in C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> compounds (46 to 55 %). The major compounds were coprostanol (20 to 27 %), 24-ethylcoprostanol (17 to 19 %), and sitosterol (7 to 8 %). These results are consistent with the previous studies of Leeming et al. (1996) and Jardé et al. (2007). In WWTP effluent samples, C<sub>27</sub> steroids, which are the main compounds, represent between 64 and 73 % of the quantified steroids. They were represented essentially by coprostanol (30 to 41 %), cholesterol (21 to 29 %), 24-ethylcoprostanol (10 to 16 %) and sitostrol (6 to 12 %). According to the distribution of the steroid in the animal manure and WWTP effluent samples, two ratios were calculated to differentiate the samples:

- R1 or  $(\text{cop}/\text{cop}+24\text{-ethylcop}) \times 100$ , *i.e.* coprostanol concentration/sum of coprostanol and 24-ethylcoprostanol, expressed as a percentage.
- R2 or sitostanol/coprostanol, *i.e.* sitostanol concentration/coprostanol concentration. This ratio illustrates the proportion of stanol produced by the degradation of cholesterol over the proportion of stanol derived from phytosterol.

Table 3 displays the mean values of R1 and R2 ratios for bovine and porcine manures and WWTP effluents.

R1 showed different discrete ranges and means for bovine, porcine and human (WWTP) sources. R1 ratio therefore distinguishes animal manures (R1 < 60 %) from WWTP effluents (R1 > 60 %). R2 ratio provides complementary information for sample discrimination. R2 ratios were >1 for bovine manures, and <1 for porcine manures and WWTP effluents.

**Table 3: Steroid ratios for animal manures and WWTP effluents**

Origin	No. samples	$(\text{cop}/(24\text{ethyl}+\text{cop})) \times 100^a$ (R1, in %)	sitostanol/coprostanol (R2)
		Mean ±S.E <sup>b</sup>	Mean ±S.E
<b>Bovine manure</b>	9	41±1	2.8±0.1
<b>Porcine manure</b>	4	57±2	0.3±0.1
<b>WWTP effluent</b>	6	71±2	0.1±0.01

<sup>a</sup> coprostanol/coprostanol+24-ethylcoprostanol; <sup>b</sup> standard error

#### **Human faecal chemical pollution markers**

The instrumental limits of quantification were determined below 10 µg/L according to the AFNOR XP T90-210 standard method, leading us to set an analytical quantification limit of 0.04 µg/L for all compounds in water.

The procedure was validated in tap and surface water according to the SANCO/825/00 rev.7 standard. The majority of compounds gave 70-110 % acceptable recoveries with < 20 % RSD (Relative Standard Deviation); concentrations ranged from 0.04 µg/L to 0.4 µg/L. Matrix effects were observed for ethyl citrate and TDCP, giving unacceptable recoveries, and

diphenhydramine was not recovered at all. These three molecules were excluded from further analyses.

Target compound concentrations were then measured in triplicate in five WWTP effluents from two sampling campaigns to verify that the selected molecules were present in the effluents. Extraction was satisfactory for all samples in the first campaign, since recoveries of the surrogate standard (phenanthrene-d10) were 101-111 %, and the results are reported in table 4. Apart from tonalide, the five molecules were detected in all samples at concentrations above the quantification limit. The value obtained for tonalide is, however, acceptable (individual LQ=0.02 µg/L). Mean levels varied between 0.03 µg/L (tonalide) and 0.51 µg/L (TCEP) and concentrations of the individual compounds were similar among WWTP, as indicated by the RSD. In the second sampling campaign, recovery rate of phenanthrene-d10 was good for WWT2 (96 %) but much lower (52 to 62 %) for the other samples. A correction factor, taking into account the recovery rate of phenanthrene-d10, was therefore applied to results from the 4 other WWTP. Some levels (in italics in Table 4) were out of the range of the calibration curve; the values for this second campaign are therefore estimates. Despite these approximations, it is clear that the selected molecules are present in WWTP effluents and are good candidates for tracing human faecal pollution.

**Table 4: Concentrations (µg/L) of human faecal chemical pollution markers in WWTP effluents during the two sampling campaigns**

WWTP Effluent	Benzophenone	TCEP	Galaxolide	Tonalide	Caffeine
	1 <sup>st</sup> – 2 <sup>nd</sup> <sup>a</sup>	1 <sup>st</sup> – 2 <sup>nd</sup>			
WWTP1	0.2- 1.7	0.85- 0.6	0.4- <i>12.6</i>	0.07- 0.6	0.5- <i>30.1</i>
WWTP2	0.3- 0.3	0.45- 0.6	0.5-1.9	0.03- 0.07	0.4- 0.2
WWTP3	0.15- 1.2	0.35- 0.2	0.4- <i>3.6</i>	0.03- 0.4	0.2 – <i>26.9</i>
WWTP4	0.2- 3.2	0.6- 0.2	0.4- <i>8.6</i>	0.02- 0.4	0.15- <i>21.5</i>
WWTP5	0.3- 1.9	0.35- 0.2	0.6- <i>11.2</i>	0.03 – 0.4	0.2- <i>32.1</i>
Mean	0.2- 1.65	0.5- 0.3	0.5- 7.6	0.03- 0.4	0.3- 22.2
RSD (%) <sup>b</sup>	29 - 54.7	41 - 59.5	20 - 62.1	63 - 34.5	53 - 58.3

<sup>a</sup> First and second sampling campaigns; <sup>b</sup> Related Standard Deviation expressed in percentage Data in bold: out of calibration curve range

### FRNAPH

Among the 121 animal faeces analysed, FRNAPH were only detected in 26.4 % of the faeces: 2 bovine, 18 porcine, 1 ovine and 11 avian faeces samples (at 1 to 5.5 × 10<sup>5</sup> PFU per g of faeces) (Table 5).

**Table 5: Percentages of the four genogroups of FRNAPH in human and animal faeces and effluents**

Samples	No. samples	No. positive samples	Total no. of isolates	% of positive samples	FRNAPH I <sup>a</sup> (%)	FRNAPH II <sup>a</sup> (%)	FRNAPH III <sup>a</sup> (%)	FRNAPH IV <sup>a</sup> (%)	Genotypes not identified (%)
Human faeces	4	0	0	0	–	–	–	–	–
Porcine faeces	48	18	425	37.5	71.5	0	0	28.5	0
Bovine faeces	32	2	24	6.2	52.1	0	0	0	47.9
Ovine faeces	12	1	24	8.3	100	0	0	0	0
Avian faeces	29	11	259	38	72.6	10.4	0	8.2	8.8
WWTP effluent	35	33	810	94.3	6.9	57.9	17.4	1.9	15.9
Porcine manure	35	14	364	40	65.9	0	13.7	15.7	4.7
Bovine manure	30	2	26	6.7	12	30.7	0	0	57.7

<sup>a</sup> Percentages of FRNAPH I, II, III or IV / total FRNAPH isolates

FRNAPH genotypes identified were mainly animal ones *i.e.* FRNAPH I and, to a lesser extent, FRNAPH IV. Human-specific FRNAPH II and FRNAPH III were also detected in avian and porcine faecal samples, respectively. Nevertheless, FRNAPH were more frequently detected in WWTP effluent samples (94.3 %) and porcine manure (40 %) than in faeces samples. FRNAPH I and IV represented 81.6 % of FRNAPH isolated in porcine manure samples whereas FRNAPH II and III represented 75.3 % of those isolated in WWTP samples. FRNAPH I and IV appeared particularly inefficient for tracing bovine pollution, as they were detected in less than 7 % of bovine (faeces and manure) samples.

To improve genotyping, plaque hybridization and real-time RT-PCR were compared in a total of 60 FRNAPH strains for the four genogroups. Results were 97 % concordant (only two FRNAPH isolates differed), showing real-time RT-PCR genotyping to be equivalent to plaque hybridization.

### ***B. adolescentis* marker**

A new real-time PCR system was developed to quantify the phylotype related to *B. adolescentis*, previously identified as a potential human marker (Wéry et al., 2010). Phylotype concentrations in different sample types are given in Table 6. The marker was found in all WWTP effluents and in 9/10 human faeces tested, implying 92 % sensitivity. Concentrations in human faeces ranged from  $5 \times 10^5$  to  $1 \times 10^9$  gene copies/g. As this marker was not found in porcine, avian, equine or ovine faeces but was present in two bovine faeces and two avian faeces, specificity was 94.5 %. Although this new marker was not strictly specific to humans, its presence and concentrations were lower in bovine and avian faeces than in human faeces, and it was not recovered in porcine faeces or manure. It therefore represents an interesting marker for tracing human pollution, but only when combined with other markers.

**Table 6: Specificity of the phylotype 'SFA41' related to *Bifidobacterium adolescentis***

<b>Origin</b>	<b>No. samples</b>	<b>No. positive samples</b>	<b>Concentrations min-max log<sub>10</sub> copies per g</b>
<b>Human faeces</b>	10	9	5.7 - 9
<b>Porcine faeces</b>	14	0	
<b>Bovine faeces</b>	14	2	5.6 - 6.1
<b>Ovine faeces</b>	10	0	
<b>Equine faeces</b>	10	0	
<b>Avian faeces</b>	19	2	4.8 - 6.9
<b>WWTP effluent<sup>a</sup></b>	8	8	4 - 6.9
<b>Porcine manure</b>	6	0	

<sup>a</sup>expressed by 100 mL

### ***In situ* application of host-specific microbial and chemical markers**

Table 7 gives average concentrations for faecal indicators, MST markers and ratios of steroids in 33 water samples including WWTP effluent, runoff and river samples. FRNAPH, and total *Bacteroidales* were significantly correlated ( $p < 0.001$ ) with *E. coli* levels.

Highly contaminated samples (WWTP effluent and runoff waters, with *E. coli* concentrations ranging between  $6.6 \times 10^3$  and  $1.1 \times 10^6$  CFU/ 100 mL), could be differentiated with most of the human and animal MST markers. None of the 5 chemical markers of human pollution selected in the first phase of the study (*i.e.* caffeine, benzophenone, TCEP, tonalide and galaxolide) were detected in runoff waters impacted by livestock manures. However, tonalide was only detected in raw WWTP effluents and galaxolide was never detected in any of the rivers analysed (data not shown). The steroid ratios (R1 (cop/cop+24-ethylcop)×100) and R2

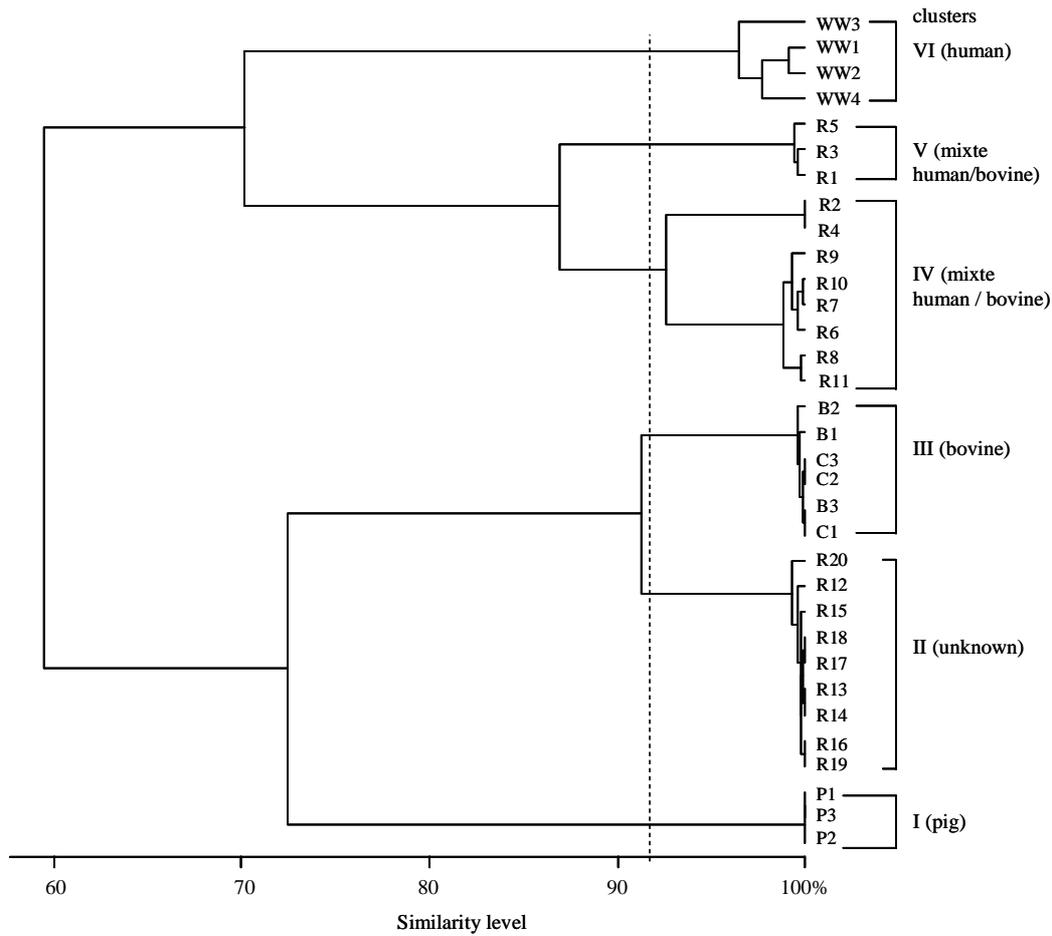
(sistostanol/ coprostanol) clearly differed between waters contaminated by human and animal pollution. Microbial markers Rum-2-Bac, Pig-2-Bac and *L. amylovorus* were only detected in water impacted by the respective manures. The human *Bacteroidales* marker HF183 and *Bifid. adolescentis* were quantified in all the WWTP effluent samples, although HF183 appeared more discriminating since *Bifid. adolescentis* was also quantified in 1/3 of the bovine-contaminated runoff samples. FRNAPH II and III were always present in variable proportions in urban sewage, but were also detected in bovine-impacted runoff waters. Moreover, animal FRNAPH I were not found only in animal effluents but also in 2/4 WWTP effluents.

In the 23 river water samples (C1-C3 and R1-R20), the concentration of *E. coli* ranged between  $3.2 \times 10^1$  and  $1.9 \times 10^4$  CFU / 100 mL. The number of *E. coli* was less or equal to  $5 \times 10^2$  CFU/ 100 mL in 9 water samples. In 11 other water samples, the level of *E. coli* exceeded the limit value of the inland water guidelines of the European Directive on the management of bathing water quality.

The origin of pollution in the river flowing through cattle pasture (samples C1 to C3) was clearly identified by the R1 and R2 ratios, Rum-2-Bac and by the absence of human-specific *Bacteroidales* and the three human chemical faecal markers. *Bifid. adolescentis* was, however, quantified in 2/3 of the water samples. In the 11 river water samples with highest *E. coli* concentrations, our results indicated mixed bovine and human pollution. Faecal pollution sources in the other 9 river water samples with low levels of *E. coli* ( $\leq 5 \times 10^2$  CFU / 100 mL) (i.e. samples R12 to R20) were more difficult to identify. Indeed, apart from caffeine and steroid ratios, the marker levels were below the limits of quantification in 7 of the 9 samples.

Analysis of the data obtained with the MCA gave the dendrogram shown in figure 1, which allows us to separate the water samples into six clusters characterized according to their significant modalities ( $p < 0.05$ ). Three clusters were associated with one specific pollution source: clusters I, III and VI contained water samples contaminated by only porcine, bovine or human pollution, respectively.

The three other clusters corresponded to water samples from rivers where we had no specific knowledge about pollution origin, although human and bovine pollution was suspected. No human or animal markers were quantified in cluster II, and caffeine concentration was  $< 0.16$   $\mu\text{g/L}$ . Cluster IV was characterized by intermediate concentrations of human markers ( $0.17 < \text{caffeine} < 0.29$   $\mu\text{g/L}$ ;  $10^3 < \text{Bifid. adolescentis} < 10^5$  copies / 100 mL;  $10^3 < \text{HF183} < 10^5$  copies / 100 mL). In cluster IV, the presence of human bacteriophages (FRNAPH II) and the ruminant-specific *Bacteroidales* marker Rum-2-Bac suggested mixed pollution. Cluster V results also implied mixed pollution, with a high percentage of FRNAPH I, presence of the Rum-2-Bac marker and of the human chemical faecal markers.



**Figure 1:** Dendrogram showing clustered water samples contaminated by waste water (WW1 to WW4), bovine manure or bovine pasture (B1 to B3 and C1 to C3), porcine manure (P1 to P3) and by undetermined pollution (R1 to R20)

**Legend Table 7:** <sup>a</sup> correspondence between abbreviations and names of markers is presented in Table 1; <sup>b</sup> no quantified. Limit of quantification were  $< 0.04\mu\text{g/L}$  for caffeine, benzophenone and TCEP,  $< 0.01\mu\text{g/L}$  for steroids used to calculate ratios R1 and R2,  $< 10 \text{ PFU}/100 \text{ mL}$  for FRNAPH,  $< 1 \times 10^3$  gene copies or cells/100 mL for bacterial markers; <sup>c</sup> percentage were considered not representative when  $< 20 \text{ PFU}$  isolates; <sup>d</sup> not tested

**Chapitre VI – Comparaison des marqueurs *Bacteroidales* à d'autres marqueurs MST**

**Table 7: Average concentrations of faecal indicators (microorganism /100 mL) and steroid (µ/L), ratios of steroids, percentage of FRNAPH genogroups and average concentrations of chemical markers (µg/ L), of microbial markers (copies or cells/ 100 mL) in WWPT effluent, runoff water and river water samples**

Pollution Origin	Samples	General indicators				MST Markers													
		<i>E. coli</i>	AllBac <sup>a</sup>	FRNAPH	T. Steroids	R1	R2	Caff	Benzo	TCEP	FR I-IV (%)	FR II-III (%)	HF183	B. ado	Pig-1	Pig-2	L. amy	Rum-2	
<b>WWTP effluent</b>	WW1	1.4×10 <sup>5</sup>	1.1×10 <sup>8</sup>	1.2×10 <sup>3</sup>	3213	75.6	0.1	0.83	0.2	0.49	0	100	7.2×10 <sup>5</sup>	1.9×10 <sup>6</sup>	-	-	-	6.1×10 <sup>3</sup>	
	WW2	2.3×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>8</sup>	1.7×10 <sup>3</sup>	2446	79	0.02	0.3	0.16	0.08	0	100	6.3×10 <sup>6</sup>	4.1×10 <sup>5</sup>	9.9×10 <sup>4</sup>	-	-	-	
	WW3	6.3×10 <sup>5</sup>	3.5×10 <sup>7</sup>	1.7×10 <sup>4</sup>	1356	70.5	0.24	1.27	0.2	0.16	21	79	4.4×10 <sup>4</sup>	7.1×10 <sup>6</sup>	1.8×10 <sup>3</sup>	-	-	-	
	WW4	6.9×10 <sup>4</sup>	1.8×10 <sup>6</sup>	3.4×10 <sup>3</sup>	1797	61.4	0.52	0.33	0.27	0.3	71	21	3.1×10 <sup>6</sup>	1.8×10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	
<b>Cattle</b>	C1	1.9×10 <sup>4</sup>	6.1×10 <sup>6</sup>	- <sup>b</sup>	18	42.9	1.4	-	-	-	nd <sup>c</sup>	nd	-	-	-	-	-	3.6×10 <sup>5</sup>	
	C2	1.5×10 <sup>4</sup>	3.8×10 <sup>6</sup>	-	31	38.7	1.76	-	-	-	nd	nd	-	3.2×10 <sup>4</sup>	-	-	-	3.0×10 <sup>5</sup>	
	C3	1.7×10 <sup>4</sup>	8.5×10 <sup>6</sup>	-	30	38.3	1.8	-	-	-	nd	nd	-	4.9×10 <sup>4</sup>	-	-	-	5.9×10 <sup>5</sup>	
	B1	1.1×10 <sup>6</sup>	5.9×10 <sup>9</sup>	4.6×10 <sup>2</sup>	145	49.8	2.3	-	-	-	nt <sup>d</sup>	nt	-	2.8×10 <sup>5</sup>	-	-	-	1.9×10 <sup>7</sup>	
	B2	1.610 <sup>5</sup>	1.2×10 <sup>8</sup>	1.1×10 <sup>3</sup>	118	49	2.35	-	-	-	0	22	-	-	-	-	-	8.8×10 <sup>6</sup>	
<b>Pig</b>	B3	2.9×10 <sup>4</sup>	9.6×10 <sup>8</sup>	1.6×10 <sup>2</sup>	104	48.3	2.13	-	-	-	nt	nt	-	-	-	-	-	5.0×10 <sup>6</sup>	
	P1	1.4×10 <sup>4</sup>	3.8×10 <sup>8</sup>	-	107	57.4	0.59	-	-	-	nd	nd	-	-	1.3×10 <sup>7</sup>	1.0×10 <sup>6</sup>	4.5×10 <sup>7</sup>	-	
	P2	6.6×10 <sup>3</sup>	6.9×10 <sup>8</sup>	-	98	56	0.63	-	-	-	nd	nd	-	-	4.4×10 <sup>6</sup>	7.3×10 <sup>5</sup>	4.2×10 <sup>7</sup>	-	
	P3	2.0×10 <sup>4</sup>	2.4×10 <sup>8</sup>	-	133	56	0.64	-	-	-	nd	nd	-	-	8.1×10 <sup>5</sup>	3.2×10 <sup>5</sup>	1.9×10 <sup>7</sup>	-	
<b>Unknown</b>	R1	1.7×10 <sup>3</sup>	1.7×10 <sup>7</sup>	20	72	45.4	0.64	0.13	0.2	0.06	93	0	-	-	-	-	-	3.9×10 <sup>5</sup>	
	R2	1.1×10 <sup>4</sup>	9.0×10 <sup>6</sup>	20	88	50.5	0.39	0.14	0.17	0.06	44	56	2.0×10 <sup>4</sup>	4.6×10 <sup>4</sup>	-	-	-	1.6×10 <sup>5</sup>	
	R3	1.2×10 <sup>4</sup>	1.1×10 <sup>7</sup>	66	38	45.3	0.76	0.14	0.08	0.08	63	37	3.0×10 <sup>4</sup>	2.9×10 <sup>4</sup>	-	-	-	1.7×10 <sup>5</sup>	
	R4	1.2×10 <sup>4</sup>	2.2×10 <sup>7</sup>	50	41	55	0.53	0.17	0.16	0.09	44	56	3.6×10 <sup>4</sup>	3.3×10 <sup>4</sup>	-	-	-	1.1×10 <sup>5</sup>	
	R5	5.5×10 <sup>3</sup>	6.3×10 <sup>6</sup>	66	55	42.1	0.83	1.99	0.14	0.08	53	47	2.3×10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	2.9×10 <sup>5</sup>	
	R6	1.5×10 <sup>3</sup>	7.5×10 <sup>6</sup>	6.0×10 <sup>2</sup>	39	43.7	0.56	0.13	0.14	-	0	100	1.5×10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	2.3×10 <sup>5</sup>	
	R7	2.2×10 <sup>3</sup>	1.2×10 <sup>7</sup>	4.8×10 <sup>2</sup>	63	49.7	0.48	0.15	-	-	0	100	1.7×10 <sup>4</sup>	3.3×10 <sup>4</sup>	-	-	-	3.9×10 <sup>5</sup>	
	R8	2.5×10 <sup>3</sup>	7.6×10 <sup>6</sup>	5.8×10 <sup>2</sup>	60	50.7	0.45	0.1	0.17	-	0	100	5.1×10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	2.8×10 <sup>5</sup>	
	R9	1.7×10 <sup>3</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>	5.5×10 <sup>2</sup>	38	47	0.45	0.14	0.12	-	0	100	9.6×10 <sup>4</sup>	7.4×10 <sup>3</sup>	-	-	-	3.2×10 <sup>4</sup>	
	R10	3.2×10 <sup>3</sup>	2.1×10 <sup>7</sup>	8.3×10 <sup>2</sup>	40	42	0.53	0.16	0.08	-	0	100	9.2×10 <sup>4</sup>	4.4×10 <sup>4</sup>	-	-	-	8.4×10 <sup>5</sup>	
	R11	3.2×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>6</sup>	3.2×10 <sup>2</sup>	13	45.5	1.01	0.11	-	-	0	96	8.1×10 <sup>4</sup>	8.1×10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	
	R12	53	4.1×10 <sup>4</sup>	-	8	56.2	0.76	0.09	-	-	0	0	nd	-	-	-	-	-	
	R13	5.0×10 <sup>2</sup>	3.3×10 <sup>5</sup>	-	13	51	0.96	0.08	-	-	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	
	R14	3.3×10 <sup>2</sup>	9.0×10 <sup>4</sup>	-	16	53.6	0.86	0.08	-	-	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	
	R15	34	5.1×10 <sup>5</sup>	30	15	50.1	1.03	0.2	-	-	0	0	nd	-	-	-	-	-	
	R16	32	3.5×10 <sup>3</sup>	-	12	-	-	0.07	-	-	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	
R17	63	5.3×10 <sup>3</sup>	-	12	50.9	0.99	0.06	-	-	nd	nd	nd	7.1×10 <sup>4</sup>	-	-	-	-		
R18	55	3.9×10 <sup>3</sup>	20	18	50.1	0.97	0.08	-	-	0	0	nd	9.3×10 <sup>3</sup>	-	-	-	-		
R19	41	5.1×10 <sup>4</sup>	<10	23	50.1	1.03	0.07	-	-	nd	nd	nd	-	-	-	-	-		
R20	41	5.9×10 <sup>3</sup>	10	25	50.6	1.01	0.09	-	-	25	16.7	nd	-	-	-	-	-		

## **DISCUSSION**

An efficient MST toolbox is crucial for identifying the origin of faecal pollution in water and is, therefore, essential for effective resource management and remediation. In this study, we compared a selection of chemical, bacterial and viral markers on water samples characterized by different faecal pollution loads. Some of these markers, such as host-specific *Bacteroidales* and *L. amylovorus*, had previously been described and tested on faecal samples elsewhere (Bernhard and Field, 2000; Seurink et al, 2005; Mieszkin et al, 2009, 2010; Marti et al, 2010), whereas others, such as faecal sterols, chemical synthetic compounds, FRNAPH and *Bifid. adolescentis*, were developed or improved in the present study.

For faecal sterols, rather than considering individual concentrations of the 15 compounds investigated, we found that the use of two derived variables, *i.e.* the R1 and R2 ratios, was more efficient to distinguish human, bovine and porcine pollution. The results obtained with R1 were found similar to those obtained by Shah et al. (2007), who used this ratio to differentiate between animal manure, (R1<45%) dominated by 24-ethylcoprostanol, and human manure (R1>60%), dominated by coprostanol. The difference could be explained by the distributions of steroids: in bovine manure these are dominated by phytosteroids, whereas in WWTP effluents and porcine manures they are dominated by coprostanol (Leeming et al., 1996; Tyagi et al., 2007). The choice of the R2 ratio was based on the distribution of the steroid compounds in our samples of animal manure and WWTP effluents. This ratio allowed us to refine the differentiation between bovine manure (R2>1), porcine manure and WWTP effluent samples (R2<1).

The five selected chemical compounds tested were present in the WWTP effluents at similar levels as those previously reported (Ternes et al., 2001; Weigel et al., 2004; Glassemeyer et al., 2005). Only three chemical markers (caffeine, TCEP and benzophenone) were suitable for identifying human pollution in the environment, as these were detected not only in WWTP effluents but also in river waters impacted by human wastes.

Among the four genogroups of FRNAPH, only human-specific FRNAPH II could be used to trace specific pollution. Indeed, this genogroup, which was not detected in porcine, bovine or ovine faeces, was found in all of the 94.3 % of WWTP effluent samples in which FRNAPH were detected, and made up approximately 60 % of the FRNAPH isolated in these WWTP effluent samples. This group was also detected in some avian faeces, possibly because birds that inhabit beaches, picnic areas, and landfills come into contact with human wastes (Dick et al., 2005) and in 2 of the 30 bovine manure samples tested. The other FRNAPH genogroups were found to be less efficient. Thus, FRNAPH III, which represented only 17.4 % of FRNAPH isolated in WWTP effluent samples, was also detected in porcine manure. Our results are in accordance with the data reported by Blanch et al. (2006), who detected this genogroup in 33 % of animal effluent and farm manure samples. Although FRNAPH I was mainly present in bovine, porcine, ovine and avian faeces and in porcine manure, it was also found in WWTP effluents. This lesser specificity led Stapleton et al. (2007) to exclude FRNAPH I from their analyses. FRNAPH IV were found more specific but also less sensitive as they were only present in porcine faeces and manure and avian faeces samples and at a lot weaker percentages than FRNAPH I. Moreover, animal-specific FRNAPH (FRNAPH I and IV) were found particularly inefficient for tracing bovine pollution, as only 20 FRNAPH I were isolated from the 62 cow faeces and manure samples. A weak prevalence of FRNAPH in cow faeces has already been observed in other studies (Calci et al., 1998 ; Long et al., 2005).

No MST bacterial indicator has yet been demonstrated to be strictly human-specific. The human specificity of *B. adolescentis* has been much debated. Some consider it to be human-specific (King et al., 2007), while others have detected it in pig (Dorai-Raj et al., 2009), cattle (Lamendella et al., 2008; Dorai-Raj et al., 2009) and poultry manure (Bonjoch et al., 2004).

This study confirmed that, although the specificity of *B. adolescentis* for humans is high (94.5 %), it can also be found in some bovine and avian faeces. The new real-time PCR system we developed, however, seems more human-specific than the previous PCR system used for quantification of *Bifid adolescentis* by Dorai-Raj et al. (2009) and Bonjoch et al. (2004), since our results were negative for porcine samples and poultry manure. It should be underlined that *Bifid. adolescentis* was never detected in porcine manures in our study, and the concentrations in bovine manures were lower than those in treated effluents from WWTP urban sewage.

Microbial markers, Rum-2-Bac, Pig-2-Bac and *L. amylovorus* were only detected in water impacted by the respective manures, confirming host specificity, as observed by Mieszkin et al. (2009, 2010) and Marti et al. (2010). Furthermore, it is interesting to note that the human-specific *Bacteroidales* marker HF183 was also found to be highly specific, in line with the successfully testing of specificity obtained in the EU with this marker (Seunrick et al., 2005; Mieszkin et al., 2009), in the USA by Kildare et al (2007) and in Australia by Ahmed et al. (2009).

MST toolboxes tested in previous studies essentially focused on microbial markers (Griffith et al., 2003, Blanch et al., 2006, Ahmed et al., 2007; MacQuaig et al., 2009). Thus, Griffith et al. (2003) compared the efficiency of phenotypic and genotypic analyses on *E. coli*, genotypic analysis on the *Bacteroides / Prevotella* group, typing of FRNAPH, and identification of human viruses. They concluded that the most specific method was the host-specific PCR. Ahmed et al. (2007) compared the efficiency of a library-dependent method using *E. coli* and enterococci with library-independent methods (host-specific PCR of *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers and PCR of a human-specific *Enterococcus* surface protein marker), concluding that the library-independent methods were more sensitive than the library-dependent one. However, these two studies highlight the interest of combining different methods to enhance the identification of the origin of the faecal pollution. In accordance with these data, we selected only library-independent methods and our toolbox combined microbial and chemical markers including steroids. Steroids had been previously tested by Blanch et al. (2006) who found that, while coprostanol and 24-ethylcoprostanol were not sufficiently discriminating, the ratios sitostanol/coprostanol and coprostanol/coprostanol+24-ethylcoprostanol were clearly different between human and animal samples. While Blanch et al. (2006), tested only wastewaters and slurries for their markers, we also evaluated marker efficiency on rivers, without *a priori* knowledge of the *E. coli* level. Our results clearly demonstrate the influence of the faecal pollution loads, as the 11 selected markers were only able to identify the source of pollution in waters when *E. coli* concentration was more than  $5 \times 10^2/100$  mL. Unlike Blanch et al. (2006), who studied the presence of their markers in several geographic areas in Europe, our sampling was performed only in France. It should be noted, however, that many of our markers have been detected in other countries by other studies: *L. amylovorus* (Konstantinov et al, 2006; Pieper et al., 2008, Su et al., 2008), HF183 (Bernard and Field, 2000; Seurink et al, 2005; Ahmed et al, 2007), *B. adolescentis* (King et al., 2007; Lamendella et al., 2008); FRNAPH II (Blanch et al., 2006), the steroids (Leeming et a, 1996; Shah et al., 2007) and the synthetic compounds (Glassmeyer et al, 2005), pointing to the universal distribution of these markers.

## **CONCLUSION**

In conclusion, among the 17 MST markers investigated in this study, seven host-specific markers (caffeine, TCEP, benzophenone and bacterial markers HF183, Pig-2-Bac, Rum-2-Bac and *L. amylovorus*) and the two steroid ratios were found to be the most efficient for discriminating the origin of the faecal pollution. *Bifid. adolescentis* and FRNAPH II, which were slightly less discriminating, could make useful complementary markers.

Although knowledge is lacking on the persistence of the different types of markers (chemical, viral and bacterial) in environmental waters, our results show that when the level of faecal pollution is sufficiently high (i.e. > 500 *E. coli* / 100 mL), the origin of the pollution can be determined using the set of markers tested in this study.

More precisely, to trace the origin of the faecal pollution, we recommend:

- For human pollution, the use of caffeine, TCEP and benzophenone, the steroid ratios sitostanol/coprostanol (R1) <60 % and coprostanol/coprostanol+24-ethylcoprostanol (R2) > 1, real-time PCR bacterial markers (HF183 and *Bifid. adolescentis*) and genotype II of FRNAPH,
- For porcine pollution, the use of steroid ratios (R1<60% and R2<1) and real-time PCR bacterial marker Pig-2-Bac and *L. amylovorus*,
- For ruminant pollution, the use of steroid ratios (R1<60% and R2>1) and real-time PCR bacterial marker Rum-2-Bac.

To improve confidence in these MST markers, the next steps should be to compare their persistence in river or marine waters and to apply them at the level of a catchment with a variety of pollution sources.

Finally, when established, these analysis methods will be transferred to water analysis laboratories. Such laboratories are increasingly required to identify the origin of water pollution, particularly to assist with the management of microbial water quality of bathing and shellfish farming areas and to establish bathing water profiles.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work received funding from AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale et du Travail, EST-2006/1/36). Romain Marti, Sophie Mieszkin and Morgane Derrien received Cemagref-Ademe, Ifremer-Région Bretagne and CNRS-Région Bretagne fellowships, respectively. We thank H. McCombie-Boudry for re-reading the manuscript. We also thank C. Le Mennec and C. Marin for their technical assistance.

## **REFERENCES**

- Ahmed, W., Stewart, J., Gardner, T., Powell, D., Brooks, P., Sullivan, D., Tindale, N., 2007. Sourcing faecal pollution: A combination of library-dependent and library-independent methods to identify human faecal pollution in non-sewered catchments. *Water Research* 41 (16), 3771-3779.
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Gardner, T., Powell, D., 2009. Evaluation of multiple sewage-associated *Bacteroides* PCR markers for sewage pollution tracking. *Water Research* 43 (19), 4872 – 4877.
- Anonyme. 2001. NF EN ISO 10705-1. Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F specific RNA bacteriophages.
- AFNOR, december 1999. Norme XP T 90-210 Protocol for evaluating a chemical method for quantitative comparison with a reference method.
- Beekwilder, J., Nieuwenhuizen, R., Havelaar, A.H. and van Duin, J. (1996) An oligonucleotide hybridization assay for the identification and enumeration of F-specific RNA phages in surface water. *Journal of Applied Bacteriology* 80(2), 179-186.
- Bernhard, A.E. and Field, K.G. (2000) A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10), 4571-4574.
- Blanch, A R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skrabber, S., Papageorgiou, G.T., Taylor, H., Wallis, J. and Jofre, J. (2006) Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9), 5915-5926.
- Bonjoch, X., Ballesté, E. and Blanch, A.R. (2004) Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5), 3171-3175.
- Calci, K.R., Burkhardt, W. III, Watkins, W.D., Rippey, S.R., 1998. Occurrence of male-specific bacteriophages in feral domestic animal wastes, human feces, and human-associated wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (12), 5027–5029.
- Delcenserie, V., Bechoux, N., Leonard, T., China, B. and Daube, G. (2004) Discrimination between *Bifidobacterium* species from human and animal origin by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Food Protection* 67(6), 1284-1288
- Dick, L.K., Bernhard, A.E., Brodeur, T.J., Santo Domingo, J.W., Simpson, J.M., Walters, S.P. and Field, K.G. (2005) Host distribution of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6), 3184-3191.
- Dorai-Raj, S., O’Grady, J. and Colleran, E. (2009) Specificity and sensitivity evaluation of novel and existing *Bacteroidales* and *Bifidobacteria*-specific PCR assays on feces and sewage samples and their application for microbial source tracking in Ireland. *Water Research* 43(19), 4980-4988.
- Dorfman, M. and Sinclair Rosselot, K. (2008) *Testing the Waters 2008: a Guide to Water Quality Testing at Vacation Beaches*. Washington, DC: Natural Resources Defense Council.

- Feldhusen, F. (2000) The role of seafood in bacterial foodborne disease. *Microbes and Infection* 2(13), 1651-1660.
- Field, K.G. and Samadpour, M. (2007). Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research* 41(16), 3517-3538.
- Gawler, A.H., Beecher, J.E., Brandao, J., Carroll, N., Falcao, L., Gourmelon, M., Masterson, B., Nunes, B., Porter, J., Rincé, A., Rodrigues, R., Thorp, M., Walters, J.M. and Meijer, W.G. (2007) Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Research* 41(16), 3780-3784.
- Germond, J.E., Mamin O. and Mollet, B., (2002) Species specific identification of nine human *Bifidobacterium* spp. in feces. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 536-543.
- Glassmeyer S.T., Furlong ET., Kolpin D.W., Cahill J.D., Zaugg S.D., Werner S.L., Meyer M.T. and Kryak, D.D. (2005) Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environmental Science and Technology* 39(14), 5157-5169.
- Griffith, J.F., Weisberg, S.B. and McGee, C.D. (2003) Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. *Journal of Water and Health* 1, 141-151.
- Jardé, E., Gruau, G., Mansuy-Huault, L., 2007. Detection of manure-derived organic compounds in rivers draining agricultural areas of intensive manure spreading. *Applied Geochemistry* 22 (8), 1814-1824
- Jardé, E., Gruau, G. and Jaffrezic, A. (2009) Tracing and quantifying sources of fatty acids and steroids in amended cultivated soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(15), 6950-6956.
- Jimenez-Clavero, M.A., Fernandez, C., Ortiz, J.A., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V., Roblas, N. and Ley, V. (2003) Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. *Applied and Environmental Microbiology* 69(10), 6311-6315.
- Kildare, B.J., Leutenegger, C.M., McSwain, B.S., Bambic, D.G., Rajal, V. and Wuertz, S. (2007) 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific faecal *Bacteroidales*: A Bayesian approach. *Water Research* 41(16), 3701-3715.
- King, E.L., Bachoon, D.S. and Gates, K.W. (2007) Rapid detection of human fecal contamination in estuarine environments by PCR targeting of *Bifidobacterium adolescentis*. *Journal of microbiological methods* 68(1), 76-81.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H. and de Vos, W.M. (2005) Representational Difference Analysis and Real-Time PCR for Strain-Specific Quantification of *Lactobacillus sobrius* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11), 7578-7581.
- Lamendella, R., Santo Domingo, J.W., Kelty, C. and Oerther, D.B. (2008) *Bifidobacteria* in feces and environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology* 74(3), 575- 584.
- Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R. and Sayler, G. (2006) Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6), 4214-4224.
- Leeming, R., Bal, A., Asholt, N. and Nichols, P.D. (1996) Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Research*, 30(12), 2893-2900.
- Long, S. C., El-Khoury, S. S., Oudejans, S.J.G., Sobsey, M.D., Vinje, J., 2005. Assessment of sources and diversity of male-specific coliphages for source tracking. *Environmental Engineering Science* 22 (3) 367–377.
- Lu, J., Santo Domingo, J.W., Lamendella, R., Edge, T., Hill, S., 2008. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (13), 3969–3976.
- Marti, R., Dabert, P. and Pourcher, A.M. (2009) Selection of a pig manure contamination marker based on the influence of biological treatment on the dominant faecal microbial groups. *Applied and Environmental Microbiology* 75(15), 4967-4974.

- Marti, R., Dabert, P., Ziebal, C. and Pourcher, A.M. (2010) Evaluation of *Lactobacillus sobrius/amylovorus* as a new microbial marker of pig manure. *Applied and Environmental Microbiology* 76(5), 1456-1461.
- Mieszkin, S., Furet, J.P., Corthier, G. and Gourmelon, M. (2009) Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by Real-Time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Applied and Environmental Microbiology* 75(10), 3045-3054.
- Mieszkin, S., Yala, J.F., Joubrel, R. and Gourmelon, M. (2010) Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 108(3), 974-984.
- Ogorzaly, L., and Gantzer, C. (2006) Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods* 138(1-2), 131-139.
- Ogorzaly, L., Tissier, A., Bertrand, I., Maul, A. and Gantzer, C. (2009) Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Research* 43(5), 1257-1264.
- Pieper, R., Janczyk, P., Zeyner, A., Smidt, H., Guiard, V., Souffrant, W. B., 2008. Ecophysiology of the developing total bacterial and *Lactobacillus* communities in the terminal small intestine of weaning piglets. *Microbial Ecology* 56 (3) 474-483.
- Rabinovici, S.J., Bernknopf, R.L., Wein, A.M., Coursey, D.L. and Whitman, R.L. (2004) Economic and health risk trade-offs of swim closures at a Lake Michigan beach. *Environmental Science and Technology* 38(10), 2737-2745.
- Regulation (EC) N°854/2004 of European Parliament and of the council of 29 april 2004. Laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Official Journal of the European Union* L139.
- SANCO/825/00 rev.7. Guidance document on residue analytical methods.
- Savichtcheva, O., Okayama, N., Okabe, S., 2007. Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Research* 41 (16) 3615-3628.
- Schaper, M., Jofre, J., Uys, M. and Grabow, W.O. (2002) Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *Journal of Applied Microbiology* 92 (8), 657-667.
- Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W. and Siciliano, S.D. (2005) Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environmental Microbiology* 7(2), 249-259.
- Shah, V.G., Dunstan, R.H., Geary, P.M., Coombes, P., Roberts, T.K. and Von Nagy-Felsobuki, E. (2007) Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. *Water Research* 41(16), 3691-3700.
- Stapleton, C.M., Wyer, M.D., Kay, D., Crowther, J., Mc Donald, A.T., Walters, M., Gawler, A. and Hindle, T. (2007) Microbial source tracking: a forensic technique for microbial source identification? *Journal of Environmental Monitoring* 9, 427-439.
- Su, Y., Yao, W., Perez-Gutierrez, O. N., Smidt, H., Zhu, W. Y., 2008. Changes in abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. *FEMS Microbiology Ecology* 66 (3) 546-555.
- Ternes, T., Bonerz, M. and Schmidt, T. (2001) Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 938 (1-2), 175-185
- Tyagi, P., Edwards, D.R. and Coyne, M.S. (2007) Use of selected chemical markers in combination with a multiple regression model to assess the contribution of domesticated animal sources of faecal pollution in the environment. *Chemosphere* 69(10), 1617-1624.
- Ufnar, J.A., Ufnar, D.F., Wang, S.Y. and Ellender, R.D. (2007) Development of a swine-specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes. *Applied and Environmental Microbiology* 73(16), 5209-5217.
- USEPA. 2005. Microbial Source Tracking Guide Document DC EPA-600/R-05/064. Office of Research and Development.

- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H. and Hühnerfuss, H. (2004). Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere* 56(6), 583-592.
- Wéry, N., Monteil, C., Pourcher, A.M. and Godon, J.J. (2010) Human-specific fecal bacteria in wastewater treatment plant effluents. *Water Research* 44(6), 1873-1883.
- Zaugg, S.D., Smith, S.G., Schroeder, M.P., Barber, L.B., and Burkhardt, M.R., 2002, Methods of analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory--Determination of wastewater compounds by polystyrene-divinylbenzene solid-phase extraction and capillary-column gas chromatography/mass spectrometry: U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations Report 01-4186, 37 p.



## CHAPITRE VII

---

### **Application des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte pour identifier l'origine des contaminations fécales dans les huîtres**

-

#### **Résumé**

### CONTEXTE ET OBJECTIFS

La qualité microbiologique des mollusques bivalves filtreurs tels que les huîtres et les moules peut être altérée par des rejets d'origine fécale dans les eaux de l'environnement. A ce jour, aucune étude n'a réussi à détecter l'origine des contaminations fécales avec succès dans les coquillages avec les marqueurs *Bacteroidales*. Les marqueurs de qPCR, AllBac (Layton *et al.*, 2006), HF183 (Seurinck *et al.*, 2005) et BacR (Reischer *et al.*, 2006) ont été testés au laboratoire sur des échantillons de tissus digestifs (TD) de moules et de coques naturellement contaminées (Gourmelon *et al.*, 2010a). Les résultats se sont avérés peu satisfaisants car bien que le marqueur général ait été détecté à plusieurs reprises, les marqueurs spécifiques de l'hôte n'ont été que rarement détectés. Cette étude a mis en avant la nécessité d'optimiser les méthodes pour la recherche directe de ces marqueurs bactériens dans les coquillages.

Les objectifs de cette étude étaient (i) de comparer et optimiser des protocoles d'extraction d'ADN bactérien à partir des liquides intervalvaires (LI) et de TD d'huîtres artificiellement contaminées, et (ii) d'appliquer les protocoles les plus performants sur des huîtres naturellement contaminées afin de rechercher les marqueurs *Bacteroidales* AllBac, Hum-1-Bac, Pig-2-Bac et Rum-2-Bac dans ces coquillages.

### METHODES

La première étape de cette étude a consisté à comparer plusieurs protocoles d'extraction d'ADN bactérien sur deux fractions de l'huître : tout d'abord sur 200 mg de TD et ensuite sur des culots de centrifugation obtenus à partir de 15 ml de LI. La contamination artificielle des huîtres a été réalisée avec des fèces de porcs à raison de 10 g/l d'eau de mer, puis, plus spécifiquement avec une souche de *Bacteroides vulgatus* à raison de  $10^6$  et  $10^8$  *B. vulgatus*/100 ml d'eau de mer. Dans un premier temps, quatre protocoles d'extraction d'ADN bactérien issus des kits : Fast DNA spin kit for soil (MP Biomedical) ; QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen) ; DNAZOL (Invitrogen) et MagMax Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion) ont été appliqués sur les TD obtenus après dissection des huîtres contaminées par des fèces de porcs, et deux protocoles d'extraction d'ADN bactérien issus des kits : Fast DNA spin kit for soil et QIA amp DNA mini kit (Qiagen) ont été appliqués sur les culots de LI. Les marqueurs AllBac et Pig-2-Bac ont ensuite été recherchés par qPCR dans les différentes préparations d'ADN. Dans un deuxième temps, les protocoles d'extraction d'ADN bactérien sélectionnés lors de la comparaison précédente ont été comparés à d'autres protocoles après

dissection des huîtres contaminées par la souche de *B. vulgatus*. Deux protocoles d'extraction ont ainsi été testés sur les TD (le kit DNAZOL, sélectionné précédemment et le kit GNOME (BIO101)) et trois protocoles ont été testés sur les culots de LI (le kit Fast DNA spin kit for soil, sélectionné précédemment, le kit Fast DNA spin kit for soil et le kit GNOME avec tous les deux une étape de préparation des LI). La qualité des extractions a été évaluée par qPCR à l'aide du marqueur AllBac. Enfin, le protocole sélectionné pour extraire l'ADN bactérien à partir des culots de LI, protocole du kit Fast DNA spin kit for soil, a été optimisé.

La seconde étape a consisté à rechercher à partir d'échantillons de TD et de LI d'huîtres situées sur l'estuaire de l'Elorn (Finistère, Bretagne) les marqueurs AllBac, Hum-1-Bac, Pig-2-Bac et Rum-2-Bac afin d'identifier l'origine des contaminations de ces coquillages. Les ADN bactériens ont été extraits avec les deux protocoles d'extraction retenus à la fin de la première étape, le protocole du kit GNOME pour les TD et le protocole du kit Fast DNA spin kit for soil optimisé pour les culots de LI. Les huîtres provenant de six sites ont été collectés au cours de trois campagnes de prélèvements, soient au total, 18 lots d'huîtres. Afin de compléter l'identification des contaminations sur ce site, des échantillons d'eau (18 eaux estuariennes et six eaux de rivière) ont été également prélevés et les marqueurs *Bacteroidales* ont été recherchés dans ces eaux. En parallèle, des numérations d'*E. coli* ont été réalisées dans les huîtres et les eaux et des mesures des paramètres physico-chimiques (température, salinité, turbidité, pH, oxygène dissous) ont été faites pour les eaux. La pluviométrie a été acquise pour les cinq jours précédents les prélèvements.

## RESULTATS

La comparaison des protocoles d'extraction d'ADN bactérien dans les huîtres contaminées par des fèces de porcs et par la souche de *B. vulgatus* a conduit à la sélection du protocole DNAZOL pour les TD et du protocole Fast DNA spin kit for soil pour les LI. L'adaptation des ces protocoles a permis de retenir une analyse directe des LI sans étape de filtration avant l'obtention du culot par centrifugation.

Les marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte ont ensuite été quantifiés dans les huîtres naturellement contaminées du site de l'Elorn. A partir des LI, le marqueur Hum-1-Bac a été le plus fréquemment retrouvé avec des concentrations comprises entre 3,5 et 5,2 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI tandis que le marqueur Rum-2-Bac a été plus faiblement retrouvé avec des concentrations comprises entre 3,5 et 3,9 Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI. Le marqueur Pig-2-Bac n'a pas été quantifié, toutefois, il a été détecté à sept reprises ( $n=18$ ). Concernant les TD,

seul le marqueur AllBac a été quantifié, et ceci à cinq reprises ( $n=18$ ). Les marqueurs Hum-1-Bac et Rum-2-Bac ont également été quantifiés dans huit échantillons d'eaux estuariennes à des concentrations comprises entre 3 et 4,4 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau. L'étude statistique met en évidence des corrélations significativement positives entre la présence du marqueur Hum-1-Bac dans les LI, la pluviométrie et les concentrations en *E. coli* dans l'huître. Le même type d'observation a pu être fait pour la présence du marqueur AllBac et Hum-1-Bac dans les eaux estuariennes, la pluviométrie et les concentrations en *E. coli* dans les eaux.

### CONCLUSIONS

A notre connaissance, cette étude est la première à comparer des protocoles d'extraction d'ADN bactérien à partir des LI d'huîtres pour rechercher les marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte et identifier l'origine des contaminations fécales dans les coquillages. Dans l'estuaire de l'Elorn, les contaminations les plus fréquentes dans les huîtres, comme dans les eaux, semblent être d'origine humaine. Cette étude confirme également la vulnérabilité des zones conchylicoles soumises aux apports de contaminations fécales, tout particulièrement lors d'événements pluvieux intenses.

Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet franco-anglais AquaManche<sup>6</sup>.

---

<sup>6</sup> Projet franco-anglais AquaManche (2009-2012) - Gestion des eaux des bassins versants pour la santé et l'environnement. Coordinateur du projet : H. Taylor, Université de Brighton, Grande-Bretagne. Participants : Université de Brighton, Eenvironment Agency de Starcross (Grande Bretagne) et Université de Caen. Financement : Europe, projet INTERREG IVa

**Application des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte pour  
identifier l'origine des contaminations  
fécales dans les huîtres**

### INTRODUCTION

La qualité microbiologique des eaux continentales et littorales peut être altérée par des rejets fécaux d'origine humaine ou animale. La contamination de ces eaux est en partie responsable de la présence de microorganismes entériques potentiellement pathogènes pour l'Homme (*E. coli* pathogènes, *Salmonella* spp., *Listeria* spp. ou norovirus) dans les coquillages, entraînant un risque de Toxi Infections Alimentaires Collectives lors de leur consommation. Chez les mollusques bivalves filtreurs, tels que les huîtres et les moules, la contamination est liée à leur physiologie. Pour satisfaire leurs exigences nutritionnelles et respiratoires, ces mollusques peuvent concentrer, par filtration de l'eau, des microorganismes d'origine marine et entérique, sachant qu'une huître creuse filtre de 4 à 20 l et une moule filtre de 0,2 à 5 l d'eau par heure (Monfort, 2006).

A l'échelle européenne, la France est respectivement le premier et le troisième pays producteur d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* et de moules, *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*, avec respectivement une production de 128 000 et 53 000 tonnes en 2008 (<http://www.cnc-france.com>). En plus des problèmes sanitaires que cela engendre, la fermeture ou le déclassement des zones conchylicoles, par application de la réglementation sur les eaux conchylicoles (854/2004/CE), peut entraîner des conséquences économiques graves sachant, que le chiffre d'affaire de l'activité conchylicole en France a été estimé en 2004 à près de 386 millions d'euros (Kalaydjian, 2005).

L'identification de l'origine des contaminations fécales dans les coquillages devrait permettre de mettre en place des mesures préventives et/ou correctives en amont des zones littorales afin d'améliorer leur qualité microbiologique et réduire le nombre de fermeture et de déclassement des zones conchylicoles.

Actuellement, peu d'études ont été réalisées sur l'application des méthodes TSM non culturales aux coquillages (Ley *et al.*, 2002; Roslev *et al.*, 2009; Baker-Austin *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2010). Ces études ont le plus souvent été réalisées en contaminant artificiellement les coquillages et les marqueurs ont été détectés à de faibles concentrations, proches de leur limite de quantification. A notre connaissance, seule l'étude de Gourmelon *et al.* (2010a) a recherché des marqueurs *Bacteroidales* dans les coquillages. Dans cette étude, les marqueurs de qPCR de contamination fécale générale (AllBac), humaine (HF183) et ruminant (BacR) ont été appliqués sur des lots de moules et de coques contaminés naturellement, et classés en catégorie B, c'est-à-dire que les concentrations en *E. coli* dans ces coquillages étaient supérieures à 230 NPP/100 ml de CLI. Ils ont montré que, dans les tissus digestifs, le

marqueur AllBac a été détecté dans plus de la moitié des échantillons, alors que, les marqueurs HF183 et BacR n'ont seulement été quantifiés qu'à une et deux reprises. Cela montre bien la nécessité d'améliorer les techniques pour analyser directement les marqueurs *Bacteroidales* dans les coquillages. Une autre possibilité serait donc de sélectionner et d'optimiser des protocoles d'extraction d'ADN bactérien à partir de différentes fractions du coquillage avant d'appliquer les marqueurs *Bacteroidales* sur des coquillages naturellement contaminés.

Les objectifs de cette étude étaient (i) de comparer et optimiser des protocoles d'extraction d'ADN bactérien à partir d'huîtres artificiellement contaminées, ceci au niveau d'échantillons de liquide intervalvaire (LI) et de TD, (ii) d'appliquer les protocoles les plus performants sur des huîtres naturellement contaminées et de rechercher les marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte, Hum-1-Bac, Pig-2-Bac et Rum-2-Bac dans ces coquillages, et (iii) de déterminer s'il existe des relations entre les concentrations des marqueurs *Bacteroidales* et les concentrations de *E. coli* par culture et/ou les paramètres physico-chimiques de l'environnement dans les eaux et dans les huîtres.

**Mot clés :** gènes codant les ARNr 16S, marqueurs *Bacteroidales*, PCR quantitative en temps réel, contaminations fécales humaines, bovines et porcines, huîtres, eau, estuaire, rivière, pluviométrie

## MATERIELS ET METHODES

### *Comparaison et optimisation des protocoles d'extraction d'ADN génomique bactérien à partir de deux fractions de l'huître : les tissus digestifs et les liquides intervalvaires*

#### **Huîtres**

Les huîtres creuses ont été prélevées en bassin de purification chez un producteur de Logonna Daoulas (Finistère, Bretagne). Les huîtres testées pour la présence d'*E. coli* et non contaminées, ont ensuite été contaminées artificiellement, en microcosmes d'eau de mer, soit avec des fèces de porcs, soit avec une souche pure de *Bacteroides vulgatus* (référence DSMZ : 1447).

#### **Conditions de culture de *B. vulgatus***

Les conditions de culture de la souche *B. vulgatus* sont présentées en annexe C. Succinctement, 1 l de milieu liquide Brain Heart Infusion a été préparé en présence de 10 ml d'hémine à une concentration initiale de 50 mg/100 ml. Après stérilisation dans des flacons de 25 ml, 20 ml de milieu ont été dégazés pendant 15 à 20 min puis placés dans un bain glacé pendant 10 à 15 min. Deux cent microlitres de L-cystéine (50 mg/ml) ont été ajoutés. Le milieu a ensuite étéensemencé soit avec 1 ml de culture de *B. vulgatus* glycérolée ou soit avec une colonie. Le milieu a ensuite été placé à 37°C sans agitation pendant 24 h en jarre anaérobie.

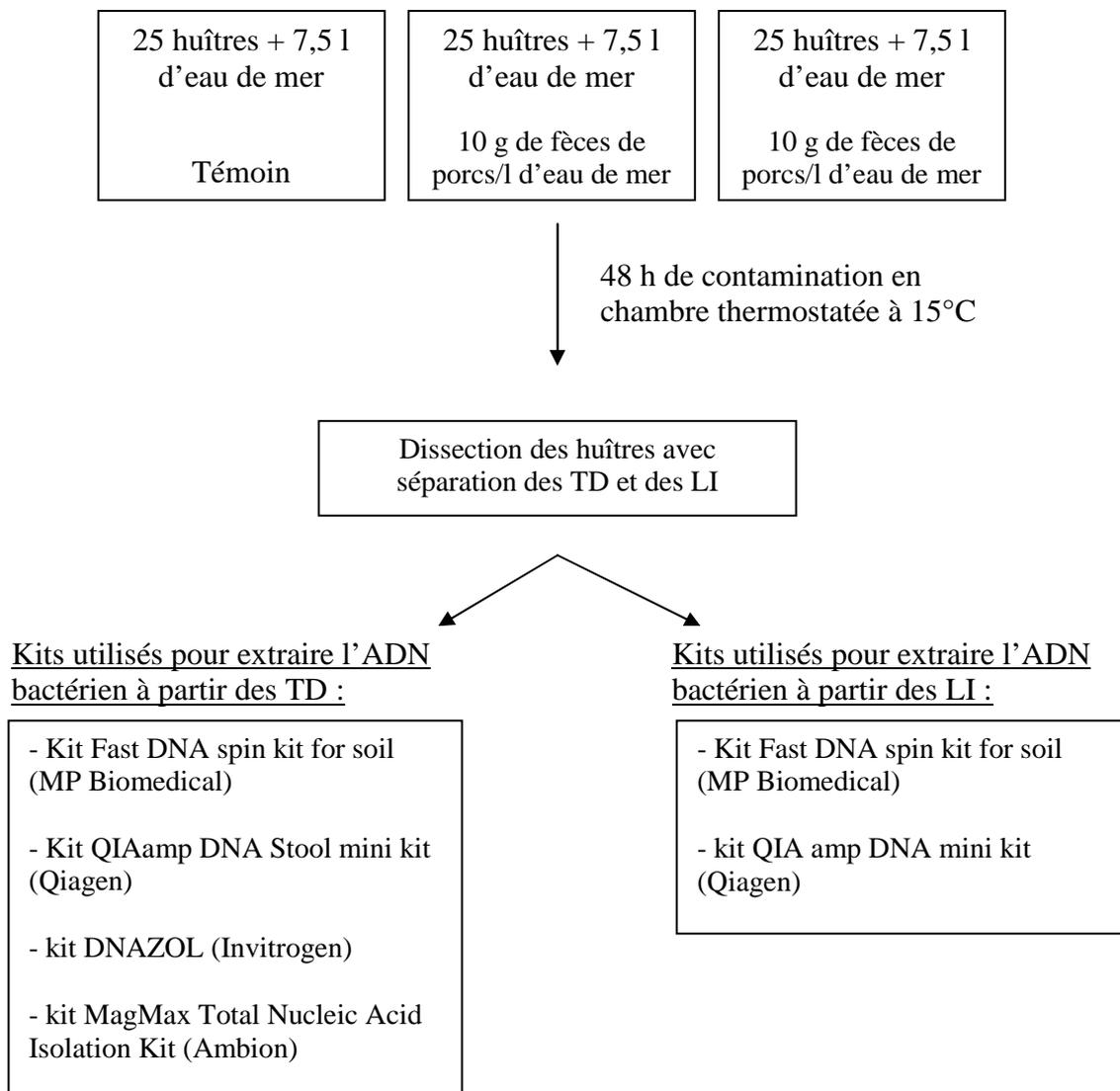
#### **Bioaccumulation à partir de fèces de porcs**

Dans un premier temps, une étape de contamination artificielle a été réalisée sur 75 huîtres. Cinquante ont été réparties dans deux microcosmes de 7,5 litres d'eau de mer contaminée avec des fèces de porcs à raison de 10 g/l d'eau de mer et les 25 restantes ont été placées dans un microcosme témoin de 7,5 litres d'eau de mer non contaminé (Fig. 1). Chaque microcosme a été placé dans une chambre thermostatée à 15°C, avec un renouvellement d'air continu.

Après 48 h de contamination, les huit huîtres de chaque lot ont été collectées et disséquées. Des aliquotes de 600 mg de TD ont été réalisées et conservées à - 20°C jusqu'à l'extraction des ADN. Les échantillons de LI ont été préparés selon deux procédés : (i) 15 ml de LI ont été préalablement filtrés sur membrane Nitrocellulose de porosité 8 µm (Millipore, France), le filtrat a ensuite été centrifugé (2 500 g ; 15 min) à température ambiante et le culot a été conservé à - 20°C jusqu'à l'extraction des ADN, et (ii) 5 ml de LI ont été filtrés sur

membrane Nucléopore de porosité 0,22 µm et les filtres ont ensuite été conservés à - 20°C jusqu'à l'extraction des ADN bactériens.

Quatre protocoles d'extraction d'ADN bactérien ont été appliqués en triplicat sur des échantillons de 200 mg de TD. Chaque protocole associait un kit différent ; Fast DNA spin kit for soil (MP Biomedical), QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen), DNAZOL (Invitrogen) et MagMax Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion). Deux protocoles ont été testés en triplicat sur les culots de 15 ml de LI en utilisant les kits Fast DNA spin kit for soil et QIA amp DNA mini kit (Qiagen) (Fig. 1). La description des protocoles est présentée dans les annexes D - F, H et I.



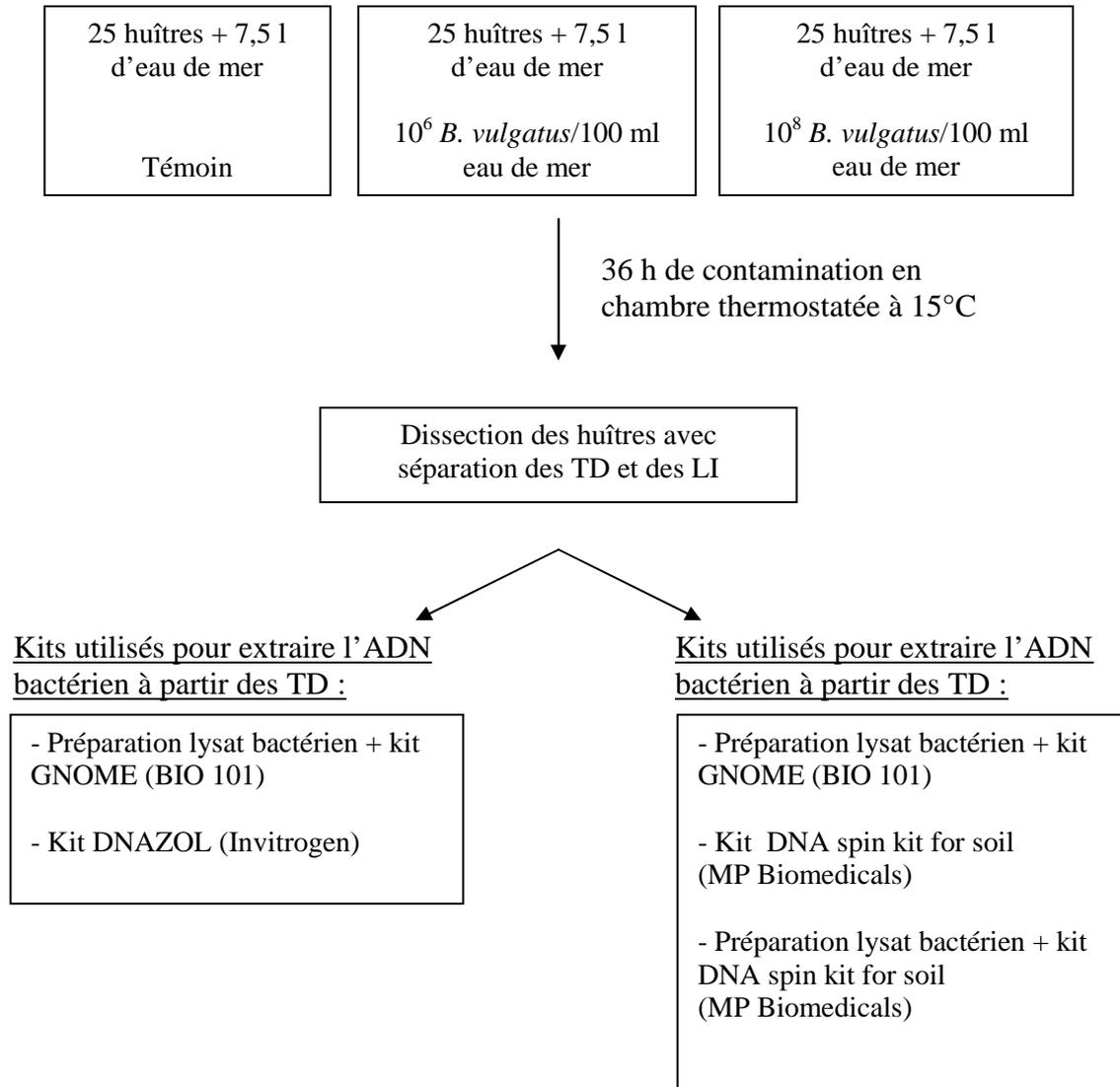
**Figure 1 : Dispositif expérimental des contaminations artificielles d'huîtres en microcosmes d'eau de mer avec des fèces de porcs (10 g/l), ainsi que les différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien testés à partir des TD et des LI des huîtres contaminées**

Tous les ADN ont été aliquotés puis conservés à - 80°C jusqu'à la réalisation des qPCR avec les marqueurs *Bacteroidales* général (AllBac) et *Bacteroidales* spécifique des contaminations fécales porcines (Pig-2-Bac).

### **Bioaccumulation à partir de la souche de *B. vulgatus***

Dans un second temps, une étape de contamination de 50 huîtres placées dans deux microcosmes d'eau de mer (à raison de 300 ml d'eau/huître) contaminée avec une souche de *B. vulgatus* à des concentrations de  $10^6$  et  $10^8$  bactéries/100 ml d'eau de mer et un microcosme témoin non contaminé avec 25 huîtres (à raison de 300 ml d'eau /huître) a été réalisée (Fig. 2). Chaque microcosme a été placé dans une chambre thermostatée à 15°C et a subi un renouvellement d'air continu.

Après 36 h de contamination, les huîtres ont été disséquées. Des aliquotes de 600 mg de TD et des culots de LI ont été réalisés avec les étapes décrites précédemment. Avant extraction des ADN bactériens à partir de 200 mg de TD et des culots de 15 ml de LI des huîtres issus du bac témoin, une quantité connue de bactéries,  $10^8$  *B. vulgatus*, a été ajoutée dans ces échantillons. Les échantillons ont ensuite été conservés à - 20°C jusqu'à l'extraction des ADN bactériens. Deux protocoles d'extraction d'ADN bactérien ont été testés en duplicat sur des échantillons de 200 mg de TD à l'aide des kits G'NOME (BIO101) avec une étape supplémentaire de préparation du lysat bactérien et DNAZOL. Trois protocoles d'extraction d'ADN bactérien utilisant les kits Fast DNA spin kit for soil, Fast DNA spin kit for soil où l'étape de préparation du lysat bactérien du protocole du kit G'NOME a été ajoutée et G'NOME ont été testés en triplicat sur les culots des 15 ml de LI (Fig. 2). La description des protocoles est présentée dans les annexes D, G et H. Tous les ADN ont été aliquotés puis conservés à - 80°C jusqu'à la réalisation des qPCR avec le marqueur *Bacteroidales* général (AllBac).



**Figure 2 : Dispositif expérimental des contaminations artificielles d'huîtres en microcosmes d'eau de mer avec la souche de *B. vulgatus* à deux niveaux de contamination,  $10^6$  et  $10^8$  *B. vulgatus*/100 ml d'eau de mer, ainsi que les différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien testés à partir de TD et de LI des huîtres contaminées**

### Optimisation du protocole d'extraction d'ADN génomique bactérien à partir des LI

Le fait de filtrer ou non les 15 ml de LI avant l'étape de centrifugation a été comparé avec le protocole d'extraction d'ADN génomique bactérien qui a préalablement donné les meilleurs résultats.

Cinquante huîtres ont été contaminées artificiellement en microcosmes d'eau de mer, comme décrit précédemment, pendant 24 h par la souche de *B. vulgatus* à des concentrations de  $10^6$  et  $10^8$  bactéries/100 ml d'eau de mer. Un microcosme témoin non contaminé avec 25 huîtres a également été réalisé. Pour chaque condition, après dissection des huîtres, 15 ml de LI ont été filtrés ou non en triplicat. Après centrifugation, les culots ont été conservés à

- 20°C. L'extraction des ADN a été réalisée en duplicat, avec le protocole du kit Fast DNA spin kit for soil. Les ADN ont été aliquotés puis conservés à -80°C jusqu'à la réalisation des qPCR avec le marqueur *Bacteroidales* général (AllBac).

### *Recherche des marqueurs Bacteroidales spécifiques de l'hôte dans des huîtres naturellement contaminées et dans les eaux environnantes du site d'étude*

L'originalité de cette étude repose sur la recherche des marqueurs *Bacteroidales* dans des coquillages naturellement contaminés et dans les eaux environnantes à l'échelle d'un estuaire comportant des zones conchylicoles.

### **Huîtres**

Des huîtres creuses, prélevées en bassin de purification, chez un producteur de Logonna Daoulas (Finistère, Bretagne), ont été placées directement dans des poches (découvertes à mi-marée de coefficient supérieur à 70) situées sur six sites de l'estuaire de l'Elorn (Finistère, Bretagne). Les sites sont de l'amont à l'aval de l'estuaire : le site de Landerneau, le site de Vervian, le site de Pen an trein, le site de Pouldu, le site de Camfrou et le site Le Passage (Fig. 3).

L'estuaire de l'Elorn est long de 13 km et son embouchure est large de 1 km et se jette dans la rade de Brest. L'estuaire est envasé depuis l'amont jusqu'au niveau du Relecq-Kerhuon puis l'estran devient plus stable vers l'aval (débris schisteux). Il possède un bassin versant de 379 km<sup>2</sup> avec de nombreuses activités agricoles et industrielles ainsi qu'une urbanisation importante. L'estuaire reçoit le rejet de STEP de la ville de Landerneau et de La Forêt Landerneau ainsi que le rejet de la STEP d'une usine de traitement d'algues située entre Landerneau et La Forêt Landerneau. Les zones de production conchylicoles ou de pêche à pied sont classées en B ou en C (pêche à pied interdite) et les zones de baignade sont classées en A ou en B (Fig. 3).

Trois campagnes de prélèvement ont été réalisées en mars et mai 2010 sur les six sites, conduisant au prélèvement de 18 lots d'huîtres (huit huîtres par lot) pour l'ensemble des sites. Toutes les huîtres ont été prélevées dans des sacs stériles et placées rapidement à 4°C dans une glacière. Dès l'arrivée au laboratoire, les lots d'huîtres ont été disséqués. Pour chaque lot, les TD ont été hachés, homogénéisés, pesés et ensuite environ 600 mg de TD ont été aliquotés. Quinze ml de LI de chaque lot ont été directement centrifugés à température ambiante puis le surnageant a été éliminé. Les échantillons de TD et les culots de LI ont été soit analysés immédiatement soit conservés à - 20°C jusqu'à l'extraction des ADN bactériens.

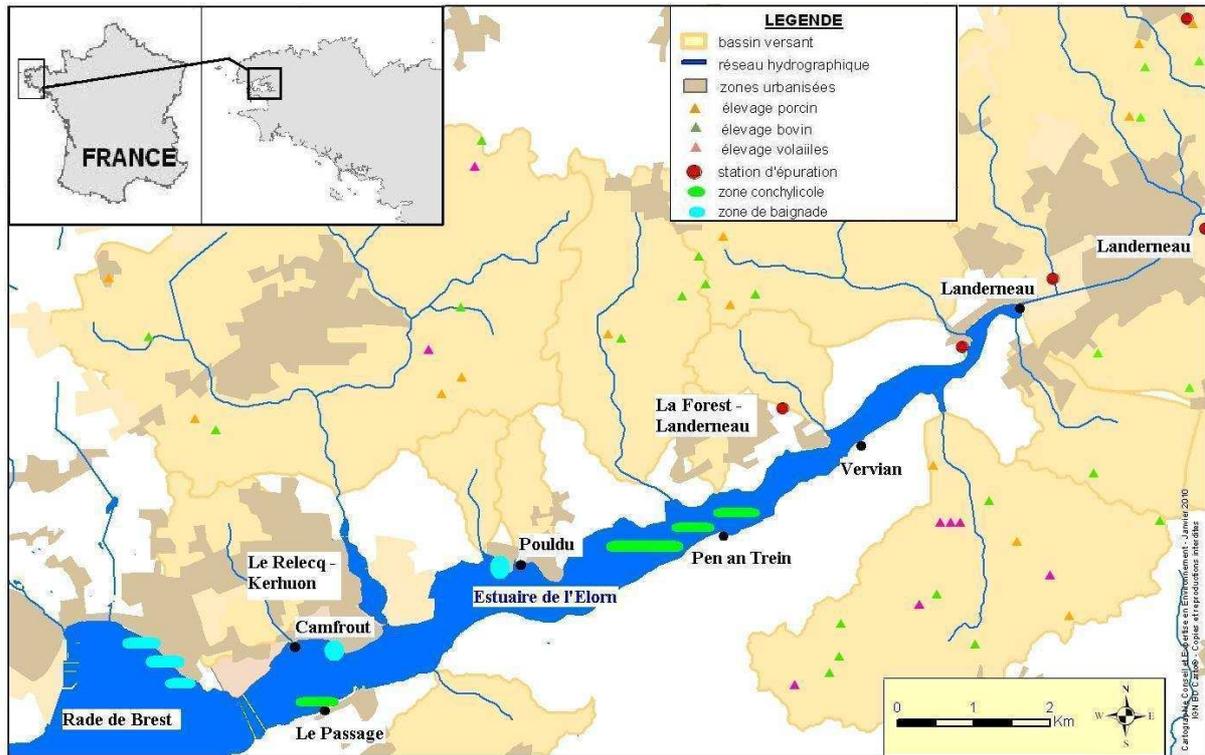


Figure 3 : Localisation des six sites de prélèvement situés sur l'estuaire de l'Elorn (Finistère, Bretagne), des zones urbanisées et des STEP, des élevages porcins, bovins et de volailles et des zones conchylicoles et de baignade

### Eaux estuariennes et eaux de rivière

A proximité de chaque poche d'huîtres, des prélèvements d'eau estuarienne ont été effectués. Pour les sites Pouldu et Camfrout, des prélèvements d'eau de rivière, pouvant potentiellement impacter les sites, ont également été effectués. Ainsi, 24 prélèvements d'eau ont été collectés sur les six sites pour les trois campagnes de prélèvement.

Tous les prélèvements d'eau ont été récoltés dans des flacons stériles de 1 l et placés rapidement à 4°C dans une glacière. Dès l'arrivée au laboratoire, 500 ml d'eau ont été filtrés en duplicat sur des filtres Nuclepore de 0,22 µm (Whatman, Brumath, France). Les filtres ont ensuite été placés dans 0,5 ml de tampon GITC (5 M guanidine isothiocyanate, 100 mM EDTA [pH = 8.0], 0,5 % Sarkosyl). Des blancs de filtration ont été réalisés pour toutes les séries de filtration. Les filtres ont ensuite été conservés à - 20°C jusqu'à l'extraction des ADN.

### Extraction des ADN

Pour les huîtres, l'ADN des bactéries présentes dans les échantillons de 200 mg de TD ou dans les culots de 15 ml de LI a été respectivement extrait à partir des protocoles du kit DNAZOL et Fast DNA spin for soil. Pour les eaux, l'ADN bactérien présent sur les filtres a été extrait à l'aide du kit QIA amp DNA mini kit (Annexe I).

Les préparations d'ADN ont été aliquotées puis conservées à -80°C jusqu'à analyses.

### Réalisation des PCR

#### PCR quantitative en temps réel

Le marqueur AllBac, dessiné par Layton *et al.* (2006), cible les ARNr 16S de l'ensemble des *Bacteroidales* et les marqueurs Pig-2-Bac, Rum-2-Bac et Hum-1-Bac ciblent respectivement les ARNr 16S des *Bacteroidales* spécifiques des porcs, des ruminants et des humains.

Pour les marqueurs AllBac, Pig-2-Bac et Rum-2-Bac, utilisant la chimie TaqMan®, les amplifications ont été réalisées à l'aide du kit « Brillant® II QPCR master mix » et pour le marqueur Hum-1-Bac, utilisant la chimie SybrGreen®, les amplifications ont été réalisées avec le kit « Brillant® SYBR® Green QPCR Master Mix » (Stratagene). Les amplifications ont été réalisées sur le thermocycleur « Chromo4 real-time detection system » associé au logiciel « Bio-Rad Opticon Manager » version 3.1 (Bio-Rad, Hercules, CA), selon les conditions suivantes : activation initiale de l'ADN polymérase à 95°C pendant 10 min suivi de 40 cycles avec une dénaturation à 95°C pendant 15 s et une hybridation/élongation à 60°C pendant 1 min. Pour chaque réaction, 2 µl de solution d'ADN ont été ajoutés dans un volume final de 25 µl. Pour contrôler la spécificité des amplifications pour le marqueur Hum-1-Bac, une étape de dissociation a été ajoutée.

Chaque qPCR a été réalisée en duplicat pour les échantillons artificiellement contaminés et en triplicat pour les échantillons naturellement contaminés. Des contrôles négatifs ont été réalisés en triplicat.

La présence/absence d'inhibiteurs des réactions de PCR a été contrôlée en utilisant un contrôle interne (IPC : Internal Positive Control, Applied-Biosystem, France). Les solutions d'ADN ont été diluées pour s'affranchir de l'effet des inhibiteurs.

#### Préparation des standards

Les ADN plasmidiques utilisés pour réaliser les gammes standard ont été extraits à l'aide du kit « QIAquick Miniprep Extraction Kit » (Qiagen, France) selon les instructions du

fournisseur. Les plasmides ont été ensuite linéarisés par l'enzyme de restriction Not I (Roche Diagnostics, France) dans un volume final de 50 µl pendant 3 h à 37°C. Pour la quantification des marqueurs *Bacteroidales*, des gammes standard ont été générées à partir de dilutions au 10<sup>ème</sup> de plasmide dont la concentration initiale était connue. Les gammes standard ont été générées en associant la valeur du cycle seuil (Ct) au nombre de copies de gènes codant l'ARNr 16S.

### PCR nichée

Afin de s'assurer de la présence des marqueurs dans les LI et les TD des huîtres, une PCR nichée a également été réalisée sur ces échantillons.

Les PCR nichées ont été réalisées sur les ADN bactériens issus des culots des LI et des TD des huîtres naturellement contaminées. Cela a consisté à réaliser successivement deux PCR : une PCR conventionnelle de 25 cycles suivie d'une qPCR. La PCR conventionnelle a été réalisée avec les amorces *Bacteroidales* générales Bac32F/Bac708R (Bernhard and Field 2000a), puis 2 µl des produits d'amplification ont été utilisés pour réaliser une qPCR avec les amorces et sondes des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte Hum-1-Bac, Rum-2-Bac et Pig-2-Bac. Chaque PCR nichée a été réalisée en triplicat et des contrôles négatifs ont été réalisés en triplicat.

Pour la seconde PCR, le marqueur Hum-1-Bac a été utilisé en ajoutant aux amorces une sonde TaqMan® ((FAM)TGGTCTTAGCTTGCTAAGGC(BHQ-1)). En effet, lorsque ce marqueur a été utilisé en SybrGreen® après la PCR conventionnelle, les résultats étaient ininterprétables. Ce marqueur est uniquement utilisé en TaqMan® pour la PCR nichée car sinon en qPCR ses résultats de sensibilité ne sont pas aussi élevés qu'en SybrGreen®.

### Expression des résultats

Pour la qPCR, les résultats de quantification des marqueurs *Bacteroidales* ont été exprimés en U. Log<sub>10</sub> copies de gène codant les ARNr 16S par g de TD ou par 100 ml d'eau ou de LI. Pour la PCR nichée, les résultats obtenus ont été exprimés en présence/absence des marqueurs dans l'échantillon.

### Numération des *E. coli* dans les eaux et les huîtres

Dans les eaux estuariennes et de rivière, la numération des *E. coli* a été réalisée par la méthode de microplaque (standard NF IN ISO 9308-3 1999) avec une limite de détection <15 NPP (Nombre le Plus Probable)/100 ml d'eau. Dans les huîtres, la numération des *E. coli* a été

réalisée par la méthode NPP cinq tubes sur des lots de huit huîtres (standard NF EN ISO 16649-3) avec une limite de détection <15 NPP/100 g de chair et liquide intervalvaire (CLI).

### *Paramètres physico-chimiques*

Pour tous les prélèvements d'eau, des mesures *in situ* de paramètres physico-chimiques ont été réalisées. Les mesures de température (T°C) et d'oxygène (mg/l) ont été réalisées à l'aide d'un oxymètre (HACH, HQ30d flexi). Les mesures de salinité (‰) ont été réalisées à l'aide d'un salinomètre (WTW, Cond 340i) et les mesures de turbidité (NTU) ont été réalisées à l'aide d'un turbidimètre (Neotek-Ponsel, Odeon). La mesure du pH a été réalisée au laboratoire à l'aide d'un pH mètre (WPA biowave, CO8000 cell density meter).

### *Pluviométrie*

Les données de pluviométrie, pour les cinq jours précédents les trois campagnes de prélèvement, ont été obtenues par la station météo-France de Guipavas (Finistère, Bretagne). Les trois campagnes de prélèvement reflètent trois conditions de pluviométrie : (i) une condition de forte pluviométrie pour la première campagne : 70 mm de pluie ont été obtenus sur les cinq jours précédents le prélèvement dont environ 30 mm 24 h avant le prélèvement, (ii) une condition de pluviométrie moyenne pour la seconde campagne : 25 mm de pluie ont été obtenus sur les cinq jours précédents le prélèvement dont environ 7 mm 24 h avant le prélèvement, et (iii) une condition de très faible pluviométrie pour la dernière campagne : 6 mm de pluie ont été obtenus sur les cinq jours précédents le prélèvement dont environ 6 mm 24 h avant le prélèvement.

### *Statistiques*

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel STATISTICA version 6.1 (StatSoft, France). Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée pour obtenir une vue globale de la structure des données (paramètres microbiologiques et physico-chimiques). De plus, une matrice de corrélations de Pearson a été générée pour étudier les corrélations des variables deux à deux.

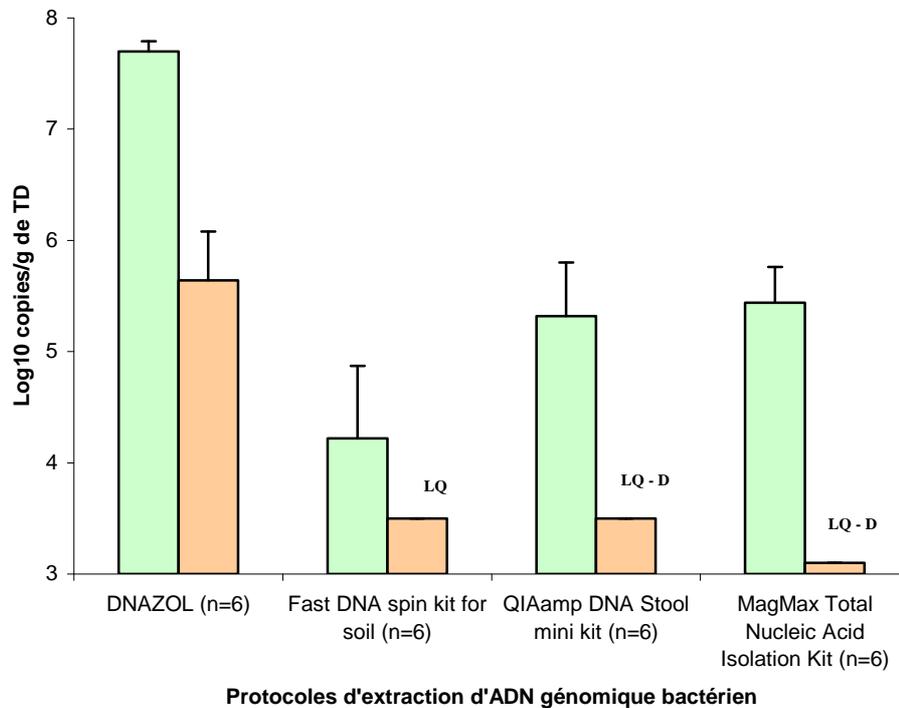
## RESULTATS

### *Comparaison et optimisation des protocoles d'extraction d'ADN génomique bactérien à partir de deux fractions de l'huître : les tissus digestifs et les liquides intervalvaires*

#### Bioaccumulation à partir de fèces de porcs

##### Tissus digestifs

L'application du marqueur *Bacteroidales* général (AllBac) sur les extraits d'ADN provenant des TD d'huîtres artificiellement contaminées avec des fèces de porcs a permis de mettre en évidence des différences de concentrations de ce marqueur suivant les protocoles utilisés. En effet, malgré la forte contamination en *E. coli* ( $> 4,3$  U.  $\text{Log}_{10}$  NPP/100 g CLI) dans les huîtres, les concentrations moyennes variaient de  $4,2 \pm 0,5$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/g de TD pour le protocole du kit Fast DNA spin kit for soil, à  $7,7 \pm 0,1$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/g de TD pour le protocole du kit DNAZOL (Fig. 4).



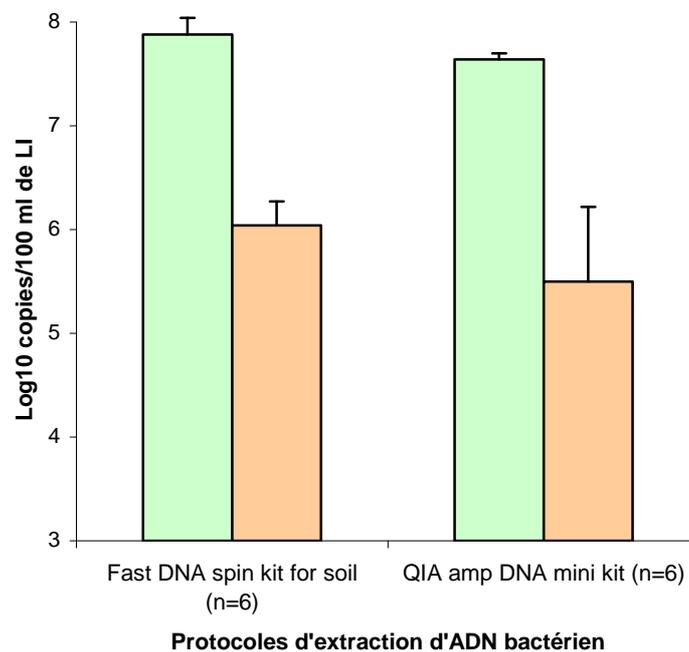
**Figure 4 :** Concentrations des marqueurs AllBac █ et Pig-2-Bac █ dans les échantillons d'ADN bactérien issus de TD d'huîtres artificiellement contaminés avec des fèces de porcs en fonction de différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien. LQ = Limite de Quantification, D = Détecté, résultat positif en duplicat avec une ou deux amplifications en dehors de la gamme

Concernant le marqueur Pig-2-Bac, des résultats quantitatifs ont été obtenus uniquement avec le protocole DNAZOL, à une concentration moyenne de  $5,6 \pm 0,6$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/g de TD. Ce marqueur a également été détecté dans les échantillons de TD avec les protocoles des kits QIAamp DNA Stool mini kit et MagMax Total Nucleic Acid Isolation Kit (Fig. 4).

La limite de quantification des marqueurs AllBac et Pig-2-Bac variait de 3,1 U. Log<sub>10</sub> copies/g de TD pour le protocole du kit MagMax Total Nucleic Acid Isolation Kit à 3,5 U. Log<sub>10</sub> copies/g de TD pour le protocole du kit DNAZOL.

### Liquides intervalvaires

L'application du marqueur AllBac sur les extraits d'ADN provenant des culots de LI d'huîtres artificiellement contaminées avec des fèces de porcs a permis d'obtenir des concentrations moyennes respectives de  $7,9 \pm 0,2$  et  $7,6 \pm 0,1$  U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI avec les protocoles des kits Fast DNA spin kit for soil et QIAamp DNA mini kit (Fig. 5).



**Figure 5 : Concentrations des marqueurs AllBac █ et Pig-2-Bac █ dans les échantillons d'ADN bactérien issus des LI d'huîtres artificiellement contaminées (bioaccumulation) avec des fèces de porcs, en fonction de différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien**

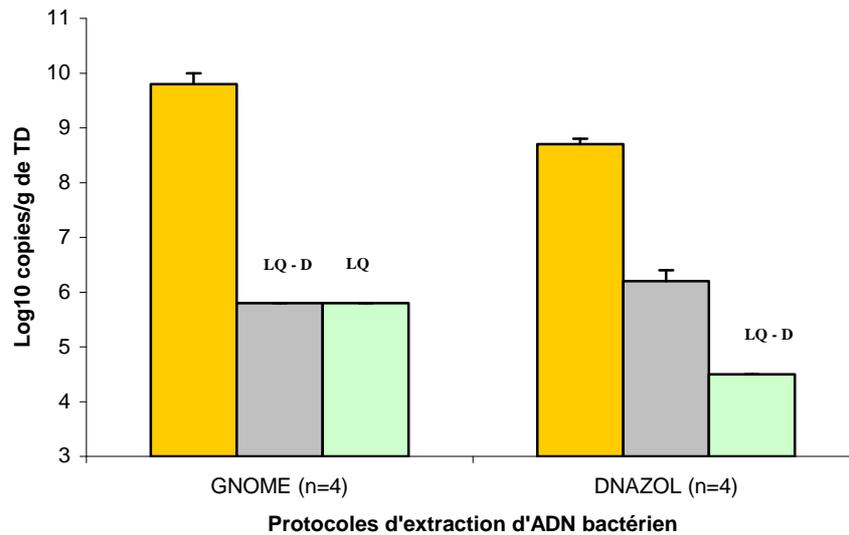
Concernant le marqueur Pig-2-Bac, des concentrations moyennes de  $6 \pm 0,2$  et de  $5,5 \pm 0,7$  U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI ont été obtenues respectivement avec le protocole des kits Fast DNA spin kit for soil et QIAamp DNA mini kit (Fig. 5).

La limite de quantification des marqueurs AllBac et Pig-2-Bac était de 3,5 et 4,2 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI à partir respectivement des kits Fast DNA spin kit for soil et QIAamp DNA mini kit.

**Bioaccumulation à partir de la souche de *B. vulgatus***

Tissus digestifs

Une étape préliminaire, en ajoutant  $10^8$  *B. vulgatus*, par échantillon de 200 mg de TD non contaminés a été réalisée avant d’effectuer l’extraction des ADN bactériens. Les résultats obtenus ont montré que quelque soit le protocole testé, les concentrations du marqueur AllBac étaient élevées ( $> 8,7$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/g de TD) (Fig. 6).



**Figure 6 : Concentrations du marqueur AllBac dans les échantillons d’ADN bactérien issus de TD d’huîtres où ont été ajoutés  $10^8$  *B. vulgatus*/200 mg de TD ou de TD provenant d’huîtres artificiellement contaminés (bioaccumulation) avec  $10^8$  et  $10^6$  *B. vulgatus*/100 ml d’eau de mer en fonction de deux protocoles d’extraction d’ADN bactérien. LQ = Limite de Quantification, D = Détecté, résultat positif en duplicat avec une ou deux amplifications en dehors de la gamme**

A partir d’échantillons contaminés par bioaccumulation, les concentrations obtenues avec le marqueur AllBac étaient faibles. En effet, pour les échantillons de TD, seul le protocole du kit DNAZOL a permis d’obtenir un résultat quantitatif avec  $6,2 \pm 0,2$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/g de TD après bioaccumulation de  $10^8$  *B. vulgatus*/100 ml d’eau de mer. Pour les autres conditions, TD obtenus après bioaccumulation de  $10^6$  *B. vulgatus*/100 ml d’eau de mer et application du protocole d’extraction d’ADN bactérien du kit DNAZOL et TD obtenus après bioaccumulation de  $10^6$  et  $10^8$  *Bacteroidales*/100 ml d’eau de mer et application du protocole d’extraction d’ADN bactérien du kit G’NOME, les résultats étaient inférieurs aux limites de quantification du marqueur qui étaient respectivement de 4,5 et 5,8 U.  $\text{Log}_{10}$  copies/g de TD (Fig. 6).

Liquides intervalvaires

Des concentrations, supérieures à 9,6 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI, ont été obtenues pour les culots de 15 ml de LI dans lesquels 10<sup>8</sup> *B. vulgatus* ont été ajoutés, avant l'étape d'extraction des ADN bactériens. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec les échantillons de TD.

Pour les culots de LI obtenus après bioaccumulation de 10<sup>8</sup> et 10<sup>6</sup> *B. vulgatus*/100 ml d'eau de mer, les concentrations moyennes du marqueur AllBac variaient respectivement de 5,1 ± 0,3 à 6 ± 0,1 et de 4,7 à 6,4 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI entre les protocoles (Fig. 7). Le protocole qui utilise le kit Fast DNA spin kit for soil a été plus performant aux vues des concentrations plus élevées du marqueur AllBac et d'une limite de quantification plus faible (<3,5 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI) par rapport aux deux autres protocoles testés.

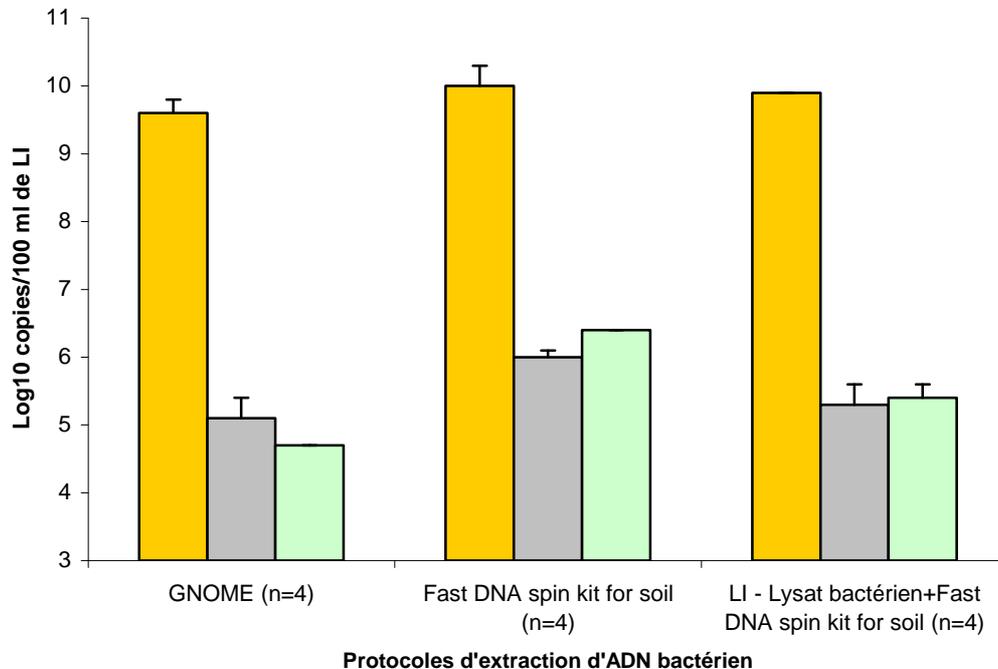
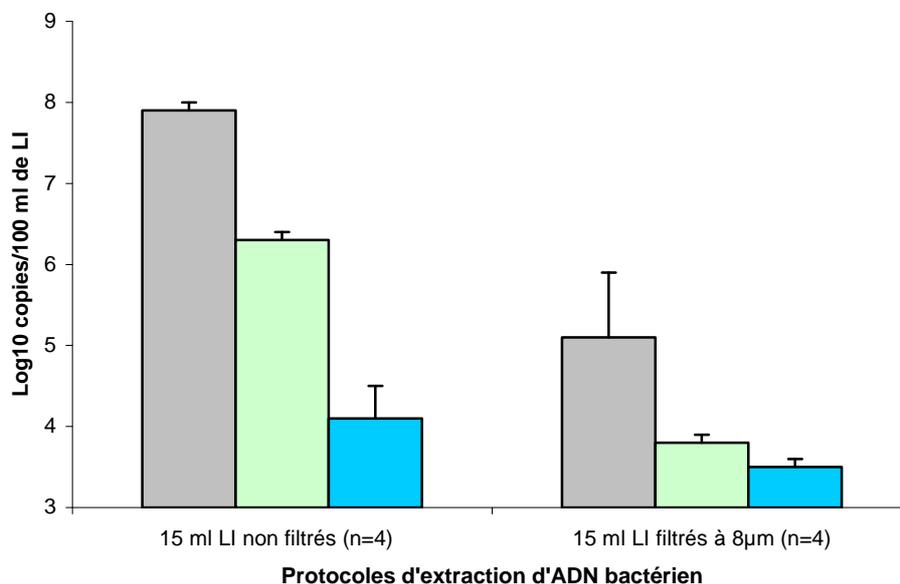


Figure 7 : Concentrations du marqueur AllBac dans les échantillons d'ADN bactérien issus des LI d'huîtres où a été ajouté 10<sup>8</sup> *B. vulgatus* ou des LI provenant d'huîtres artificiellement contaminées (bioaccumulation) avec 10<sup>8</sup> et 10<sup>6</sup> *B. vulgatus*/100 ml d'eau de mer en fonction de différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien

**Optimisation du protocole d'extraction d'ADN génomique bactérien à partir des liquides intervalvaires**

Parmi les différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien testés sur les TD et les culots de LI, le protocole du kit Fast DNA spin kit for soil appliqué sur les culots de LI a permis d'obtenir les résultats les plus prometteurs. Afin d'améliorer ce protocole, 2 méthodes de préparation des LI ont été testées après contamination artificielle des huîtres avec  $10^8$  et  $10^6$  *B. vulgatus*/100 ml d'eau de mer.

Les concentrations du marqueur AllBac les plus importantes ont été obtenues lorsque 15 ml de LI étaient directement centrifugés sans passer par l'étape de filtration sur membrane. Les concentrations moyennes étaient respectivement de  $7,9 \pm 0,1$  et  $6,3 \pm 0,1$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/100 ml de LI pour des huîtres contaminées avec  $10^8$  et  $10^6$  *B. vulgatus*/100 ml d'eau de mer. Quand 15 ml de LI ont été centrifugés après filtration sur membrane de 8  $\mu\text{m}$ , les concentrations moyennes étaient respectivement de  $5,1 \pm 0,8$  et  $3,8 \pm 0,1$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/100 ml de LI pour des huîtres contaminées avec  $10^8$  et  $10^6$  *B. vulgatus*/100 ml d'eau de mer (Fig. 8). Dans les huîtres des lots témoins, le marqueur AllBac a été faiblement quantifié à des concentrations moyennes respectives de  $3,2 \pm 0,1$  et  $4,1 \pm 0,4$  U.  $\text{Log}_{10}$  copies/100 ml de LI lorsque les LI étaient filtrés et non filtrés (Fig. 8).



**Figure 8 : Concentrations du marqueur AllBac dans les échantillons d'ADN bactérien issus des LI d'huîtres artificiellement contaminées avec  $10^8$   $\square$  et  $10^6$   $\square$  *B. vulgatus*/100 ml d'eau de mer (bioaccumulation) et dans les échantillons témoins non contaminés  $\square$ , en fonction de 2 méthodes de préparations des LI avant extraction d'ADN bactérien avec le protocole du kit Fast DNA spin kit for soil**

*Identification de l'origine de la contamination dans les huîtres naturellement contaminées et les eaux environnantes du site de l'Elorn - Application des marqueurs Bacteroidales spécifiques de l'hôte*

**Huîtres naturellement contaminées**

Liquides intervalvaires

Si l'on considère les 3 campagnes, des concentrations en *E. coli* de 1,7 à 3,5 U. Log<sub>10</sub> NPP/100 g de CLI pour les 18 lots d'huîtres prélevés ont été obtenues (Tab. 1).

Recherchés dans les LI des huîtres, le marqueur AllBac a été quantifié à des concentrations comprises entre 4,3 et 5,8 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI excepté dans les LI des huîtres du site de Vervian lors de la 3<sup>ème</sup> campagne où il a seulement été détecté (Tab. 1).

**Tableau 1 : Quantification des marqueurs *Bacteroidales* général (AllBac) et *Bacteroidales* spécifiques des contaminations fécales humaines (Hum-1-Bac), par les ruminants (Rum-2-Bac) et porcines (Pig-2-Bac) dans les LI d'huîtres naturellement contaminées provenant de l'estuaire de l'Elorn**

Sites	<i>E.coli</i> (U. Log <sub>10</sub> NPP/100g de CLI <sup>a</sup> )	Marqueurs <i>Bacteroidales</i> (U. Log <sub>10</sub> copies/100 ml de LI)			
		AllBac	Hum-1-Bac	Rum-2-Bac	Pig-2-Bac
1 <sup>ère</sup> campagne :					
01/03/2010					
Le passage	3,2	5,6	4,2	<3,2 D	<3,2
Pen an Tren	3,4	5,8	4,2	3,9	<3,2 D
Vervian	3,1	4,8	3,8	<3,2 D	<3,2 D
Landerneau	3,1	5	3,5	<3,2	<3,2
Pouldu	3,5	5,5	4,3	3,9	<3,2
Camfrou	3,2	5,8	4,6	3,6	<3,2
2 <sup>ème</sup> campagne :					
29/03/2010					
Le passage	2,7	4,9	<3,2 D	<3,2	<3,2
Pen an Tren	3,1	5,8	3,8	<3,2 D	<3,2 D
Vervian	2,8	5,3	3,4	<3,2 D	<3,2
Landerneau	2,8	5,6	4	3,5	<3,2 D
Pouldu	2,9	4,9	<3,2 D	<3,2	<3,2
Camfrou	3,0	4,4	<3,2	<3,2	<3,2
3 <sup>ème</sup> campagne :					
16/05/2010					
Le passage	1,7	4,9	<3,2 D	<3,2	<3,2 D
Pen an Tren	2,1	4,6	<3,2	<3,2	<3,2
Vervian	2,4	<3,2 <sup>b</sup> D <sup>c</sup>	<3,2	<3,2	<3,2
Landerneau	3,5	4,3	<3,2	<3,2	<3,2
Pouldu	1,7	4,7	<3,2	<3,2	<3,2
Camfrou	3,4	5,7	5,2	<3,2	<3,2

<sup>a</sup> CLI = Chair et Liquide Intervalvaire, <sup>b</sup> Limite de Quantification, <sup>c</sup> Détecté : résultats positifs en triplicat avec une ou deux amplifications en dehors de la gamme

Le marqueur *Bacteroidales* Hum-1-Bac a été quantifié dans tous les échantillons de LI des lots d'huîtres prélevés lors de la 1<sup>ère</sup> campagne, puis dans respectivement 3 et 1 échantillons de LI provenant de lots d'huîtres prélevés lors de la 2<sup>ème</sup> (sites de Pen an Trein, Vervian et Landerneau) et 3<sup>ème</sup> (site de Camfrou) campagne. Les concentrations étaient comprises entre 3,5 et 5,2 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI. Pour les lots d'huîtres prélevés sur le site de Camfrou lors des trois campagnes, le marqueur Hum-1-Bac a toujours été quantifié. Le marqueur a également été détecté à deux et une reprises dans les LI des huîtres prélevées lors de la 2<sup>ème</sup> (sites Le Passage et Pouldu) et 3<sup>ème</sup> (site le Passage) campagne (Tab. 1).

Le marqueur Rum-2-Bac a été plus faiblement quantifié. En effet, il a été respectivement quantifié à trois et une reprises dans les LI des huîtres prélevées lors de la 1<sup>ère</sup> (sites de Pen an Trein, Pouldu et Camfrou) et 2<sup>ème</sup> (site de Landerneau) campagne avec des concentrations comprises entre 3,5 et 3,9 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml de LI. Le marqueur a également été détecté à deux reprises dans les LI des huîtres prélevées lors de la 1<sup>ère</sup> (sites Le Passage et Vervian) et 2<sup>ème</sup> (sites de Pen an Trein et Vervian) campagne. Le marqueur n'a jamais été quantifié ou détecté lors de la 3<sup>ème</sup> campagne.

Le marqueur Pig-2-Bac n'a été quantifié dans aucun des échantillons analysés. Il a cependant été détecté respectivement à deux, deux et une reprises dans les LI des huîtres prélevées lors de la 1<sup>ère</sup> (sites de Pen an Trein et Vervian), 2<sup>ème</sup> (sites de Pen an Trein et Landerneau) et 3<sup>ème</sup> (site Le Passage) campagne (Tab. 1).

### Tissus digestifs

Pour la 1<sup>ère</sup> campagne, le marqueur AllBac a été quantifié à quatre reprises (sites Le Passage, Vervian, Landerneau et Pouldu) à des concentrations comprises entre 4,4 et 5,2 U. Log<sub>10</sub> copies/g de TD et a été détecté à deux reprises (sites de Pen an Trein et Camfrou). Pour la 2<sup>ème</sup> campagne, il a été détecté à trois reprises (sites de Vervian, Landerneau et Camfrou). Enfin, pour la 3<sup>ème</sup> campagne, il a été quantifié uniquement dans les TD du lot d'huître prélevé sur le site de Camfrou, ceci à une concentration de 5,5 U. Log<sub>10</sub> copies/g de TD. Il a été également détecté à quatre reprises (sites Le Passage, Pen an Trein, Vervian et Pouldu) (données non présentées).

Les marqueurs Hum-1-Bac, Rum-2-Bac et Pig-2-Bac n'ont pas été quantifiés ou détectés dans les TD des lots d'huîtres prélevés lors des trois campagnes (données non présentées).

### PCR nichées

Pour les 12 extraits d'ADN issus des LI où un signal positif a été détecté avec les marqueurs Hum-1-Bac, Rum-2-Bac et Pig-2-Bac par qPCR, la présence de ces marqueurs, par PCR nichée, a été confirmée pour 10 extraits d'ADN. Les deux échantillons de LI prélevés lors de la 3<sup>ème</sup> campagne sur le site Le passage n'ont pas permis de confirmer les résultats obtenus par qPCR avec les marqueurs Hum-1-Bac et Pig-2-Bac (données non présentées).

Concernant le marqueur Pig-2-Bac, 5 échantillons, prélevés aux sites Le passage, Landerneau, Pouldu et Camfroul lors de la 1<sup>ère</sup> campagne et au site de Camfroul lors de la 3<sup>ème</sup> campagne étaient inférieurs à la limite de quantification par qPCR puis positifs par PCR nichée. Pour le marqueur Rum-2-Bac, seulement un échantillon, prélevé au site Pouldu était inférieur à la limite de quantification par qPCR puis positif par PCR nichée.

Pour l'ensemble des extraits d'ADN issus des TD, les PCR nichées n'ont pas permis d'obtenir de résultats positifs avec les trois marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte (données non présentées).

### Eaux estuariennes et eaux de rivière

Sur l'ensemble des 3 campagnes de prélèvements, des concentrations en *E. coli* variant de <1,6 à 5 U. Log<sub>10</sub> NPP/100 ml d'eau estuarienne ( $n=18$ ) et de 2,4 à 4,8 U. Log<sub>10</sub> NPP/100 ml d'eau de rivière ( $n=6$ ) ont été obtenues.

Recherchés dans les eaux estuariennes et les eaux de rivière de l'ensemble des trois campagnes, le marqueur AllBac a été respectivement quantifié à des concentrations comprises entre 2,8 et 5,8 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau estuarienne et entre 6,2 et 7,4 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau de rivière. Le marqueur AllBac a également été détecté à une et deux reprises dans les échantillons d'eaux estuariennes collectées lors de la 2<sup>ème</sup> (site de Camfroul) et 3<sup>ème</sup> (sites de Pouldu et Camfroul) campagne (Tab. 2).

Concernant les marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte, le marqueur Hum-1-Bac a été quantifié à quatre reprises (sites de Pen an Trein, Vervian, Landerneau et Camfroul) lors de la 1<sup>ère</sup> campagne, à des concentrations comprises entre 3,1 et 4,4 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau estuarienne. Il a ensuite été seulement quantifié dans les échantillons d'eaux estuariennes du site de Landerneau lors des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> campagnes à des concentrations respectives de 4,1 et 3,8 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eaux estuariennes. Le marqueur Hum-1-Bac a également été détecté à deux et quatre reprises lors de la 1<sup>ère</sup> (sites Le Passage et Pouldu) et 2<sup>ème</sup> (sites Le Passage, Pen an Trein, Vervian et Pouldu) campagne. Enfin, il a été détecté et quantifié à des

## Chapitre VII – Application des marqueurs *Bacteroidales* dans les huîtres

concentrations comprises entre 3,3 et 6,5 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau dans la totalité des eaux de rivière analysées (Tab. 2).

Le marqueur Rum-2-Bac n'a été quantifié qu'à deux reprises dans des eaux estuariennes lors de la 1<sup>ère</sup> (site de Pen an Trein) et 2<sup>ème</sup> (site de Landerneau) campagne à des concentrations de 3 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eaux estuariennes (Tab. 2).

Le marqueur Pig-2-Bac n'a pas été quantifié ou détecté dans les eaux estuariennes et les eaux de rivière (Tab. 2).

**Tableau 2 : Quantification des marqueurs *Bacteroidales* général (AllBac) et *Bacteroidales* spécifiques des contaminations fécales humaines (Hum-1-Bac), par les ruminants (Rum-2-Bac) et porcines (Pig-2-Bac) dans les eaux estuariennes de l'Elorn et dans eaux de rivière impactant les sites de Pouldu et Camfrouit**

Sites	<i>E.coli</i> (U. Log <sub>10</sub> NPP/100 ml d'eau)	Marqueurs <i>Bacteroidales</i> (U. Log <sub>10</sub> copies/100 ml d'eau)			
		AllBac	Hum-1-Bac	Rum-2-Bac	Pig-2-Bac
1 <sup>ère</sup> campagne :					
01/03/2010					
Le passage	2,7	4,2	<2,7 D	<2,7	<2,7
Pen an Trein	3,0	4,8	3,3	3	<2,7
Vervian	5,0	4,8	3,1	<2,7 D	<2,7
Landerneau	3,3	5,8	4,4	<2,7	<2,7
Pouldu estuaire	3,4	4,4	<2,7 D	<2,7	<2,7
Pouldu rivière	3,7	6,5	3,3	<2,7	<2,7
Camfrouit estuaire	3,8	4,8	3,6	<2,7	<2,7
Camfrouit rivière	3,8	7	5,3	<2,7	<2,7
2 <sup>ème</sup> campagne :					
29/03/2010					
Le passage	1,9	4,5	<2,7 D	<2,7	<2,7
Pen an Trein	1,9	4,4	<2,7 D	<2,7	<2,7
Vervian	2,8	3,8	<2,7 D	<2,7	<2,7
Landerneau	3,3	5,4	4,1	3	<2,7
Pouldu estuaire	1,9	4,5	<2,7 D	<2,7	<2,7
Pouldu rivière	2,4	6,2	4,2	<2,7	<2,7
Camfrouit estuaire	3,0	<2,7 D <sup>b</sup>	<2,7	<2,7	<2,7
Camfrouit rivière	4,6	7,3	5,9	<2,7	<2,7
3 <sup>ème</sup> campagne :					
16/05/2010					
Le passage	2,4	4,1	<2,7	<2,7	<2,7
Pen an Trein	<1,6 <sup>a</sup>	2,8	<2,7	<2,7	<2,7
Vervian	2,9	3,8	<2,7	<2,7	<2,7
Landerneau	3,4	4,6	3,8	<2,7	<2,7
Pouldu estuaire	<1,6	<2,7 D	<2,7	<2,7	<2,7
Pouldu rivière	3,5	6,5	4,4	<2,7	<2,7
Camfrouit estuaire	1,9	<2,7 D	<2,7	<2,7	<2,7
Camfrouit rivière	4,8	7,4	6,5	<2,7	<2,7

<sup>a</sup> Limite de quantification, <sup>b</sup> Détecté : résultats positifs en triplicat avec une ou deux amplifications en dehors de la gamme

### Relation entre *E. coli*, les marqueurs *Bacteroidales* et les paramètres physico-chimiques

Les relations entre les concentrations en *E. coli*, les concentrations en marqueurs *Bacteroidales* et les paramètres physico-chimiques (Tab. 3) ont été analysées par une Analyse en Composantes Principales (Fig. 9). Cette analyse a été réalisée avec les données des marqueurs AllBac et Hum-1-Bac car les données des marqueurs Rum-2-Bac et Pig-2-Bac comportaient peu de valeurs quantifiables.

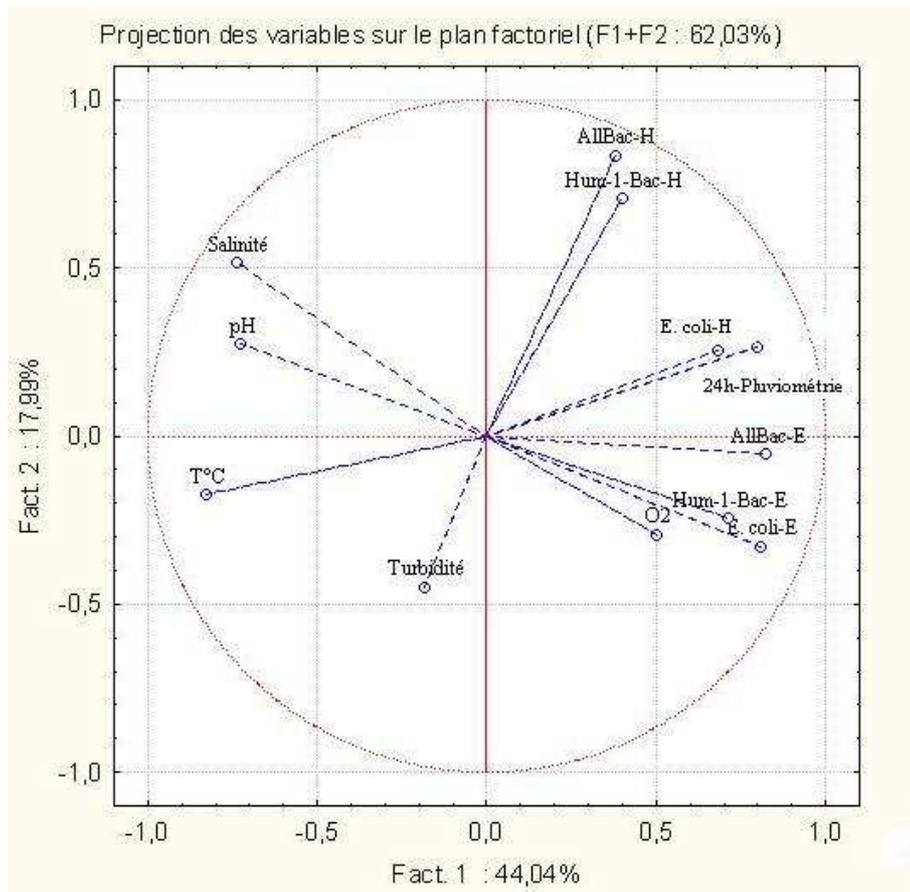
La somme des deux composantes (F1) et (F2) a expliqué plus de 62 % de la variance ou de l'information totale des données. Le cercle de corrélations des variables sur la plan (F1, F2) a montré que les variables étaient bien représentées sur le cercle (excepté pour les variables turbidité et l'oxygène dissous (O<sub>2</sub>) qui étaient respectivement mieux représentées sur les troisième (F3) et quatrième (F4) composantes) permettant une interprétation fiable des corrélations entre les paramètres. La première composante (F1) était positivement corrélée avec six variables : AllBac, Hum-1-Bac et *E. coli* dans les eaux estuariennes, O<sub>2</sub>, *E. coli* dans les huîtres et la pluviométrie 24 h avant le prélèvement. Elle était également anti-corrélée avec trois variables : la salinité, le pH et la température. La seconde composante (F2) était positivement corrélée avec deux variables : AllBac et Hum-1-Bac dans les LI. L'angle formé par les variables AllBac et Hum-1-Bac dans les LI avec les variables AllBac, Hum-1-Bac et *E. coli* dans les eaux démontre que ces variables étaient indépendantes.

Les résultats de l'ACP ont été confirmés par l'analyse des corrélations *via* une matrice de corrélations de Pearson (Tab. 4).

Dans les huîtres, les concentrations du marqueur Hum-1-Bac obtenues dans les LI et la pluviométrie 24 h avant le prélèvement étaient significativement corrélées ( $p < 0,05$ ) avec les concentrations en *E. coli*. Les concentrations des marqueurs AllBac et Hum-1-Bac obtenues à partir des LI étaient également significativement corrélées entre elles.

Les concentrations en *E. coli* dans les huîtres étaient significativement anti-corrélées avec la température.

Dans les eaux estuariennes, les concentrations des marqueurs AllBac et Hum-1-Bac, les valeurs de l'oxygène dissous et la pluviométrie 24 h avant le prélèvement étaient significativement corrélées ( $p < 0,05$ ) avec les concentrations en *E. coli* dans les eaux.



**Figure 9 :** Représentation graphique de corrélations entre variables microbiologiques (*E. coli*, marqueur *Bacteroidales* général (AllBac) et marqueur *Bacteroidales* spécifique des contaminations fécales humaines (Hum-1-Bac)) et physico-chimiques (salinité, température (T°C), pH, turbidité et la pluviométrie 24h avant le prélèvement) par Analyse en Composantes Principales (ACP). Les variables microbiologiques dans l'eau et les huîtres ont été distinguées (-E : eau ; -H : huîtres)

Les concentrations en *E. coli* dans les huîtres étaient significativement corrélées avec les concentrations en *E. coli* dans les eaux. Les concentrations du marqueur Hum-1-Bac dans les eaux estuariennes étaient significativement corrélées avec les concentrations en *E. coli* et les concentrations du marqueur AllBac dans les eaux estuariennes et avec l'oxygène dissous.

Les concentrations du marqueur AllBac dans les eaux estuariennes étaient à l'inverse significativement anti-corrélées avec la température, la salinité, la turbidité et le pH. Les concentrations du marqueur Hum-1-Bac dans les eaux estuariennes étaient également anti-corrélées avec la salinité et le pH. Les concentrations en *E. coli* étaient significativement anti-corrélées avec la température, la salinité et le pH.

**Tableau 3 : Etendue et moyenne des valeurs ou concentrations des paramètres physico-chimiques : température, oxygène dissous, salinité, pH et turbidité dans les eaux estuariennes des 6 sites de l'Elorn**

	Température (T°C)		Oxygène dissous (mg/l)		Salinité (‰)		pH		Turbidité (NTU)	
	Etendue (min-max)	Moyenne	Etendue (min-max)	Moyenne	Etendue (min-max)	Moyenne	Etendue (min-max)	Moyenne	Etendue (min-max)	Moyenne
<b>1<sup>ère</sup> campagne (n=6)</b>	7,4 - 9,8	8,1	8,5 - 11,4	10,2	0 - 25,5	8	7,4 - 8	7,6	19 - 86,1	41,9
<b>2<sup>ème</sup> campagne (n=6)</b>	10,3 - 11,5	10,7	7,5 - 11	9,8	0 - 28,8	15,7	7,1 - 8	7,8	3,4 - 193	69,5
<b>3<sup>ème</sup> campagne (n=6)</b>	12,8 - 14,8	13,8	9,3 - 11,6	9,6	0 - 32,2	18,5	7,6 - 8,2	7,9	12,1 - 67,6	57,3

**Tableau 4 : Matrice de corrélations de Pearson. Les corrélations positives ou négatives sont marquées d'une étoile (p<0,05\*). Les variables microbiologiques dans l'eau et les huîtres ont été distinguées (-E : eau ; -H : huîtres)**

Variables	<i>E. coli</i> -E	<i>E. coli</i> -H	AllBac -E	AllBac-H	Hum-1-Bac-E	Hum-1-Bac-H	T°C	O2	Salinité	Turbidité	pH	24h-pluviométrie
<i>E. coli</i> -E	1											
<i>E. coli</i> -H	0,48*	1										
AllBac-E	0,55*	0,40	1									
AllBac-H	0,02	0,42	0,28	1								
Hum-1-Bac-E	0,52*	0,33	0,71*	0,14	1							
Hum-1-Bac-H	0,23	0,57*	0,10	0,71*	0,12	1						
T°C	-0,59*	-0,57*	-0,72*	-0,43	-0,36	-0,25	1					
O2	0,61*	0,27	0,41	-0,07	0,53*	0,11	-0,26	1				
Salinité	-0,69*	-0,40	-0,63*	0,12	-0,65*	0	0,46	-0,34	1			
Turbidité	0,22	0,08	-0,49*	-0,38	-0,25	-0,14	0,19	0,02	-0,09	1		
pH	-0,60*	-0,41	-0,54*	-0,09	-0,51*	-0,06	0,54*	-0,05	0,79*	-0,01	1	
24h-pluviométrie	0,64*	0,50*	0,52*	0,41	0,34	0,48*	-0,83*	0,30	-0,37	-0,21	-0,53*	1

### DISCUSSION

Les marqueurs *Bacteroidales* de qPCR représentent une alternative intéressante par rapport aux indicateurs classiques pour identifier l'origine humaine et animale des contaminations fécales dans les eaux et les coquillages (Okabe *et al.*, 2007; Reischer *et al.*, 2008; Gourmelon *et al.*, 2010c). Cependant, si les microorganismes pathogènes présents en faible quantité dans les coquillages, peuvent être détectés par des méthodes culturales et moléculaires en appliquant au préalable une étape d'enrichissement (Bej *et al.*, 1994; Panicker *et al.*, 2004; Vázquez-Novelle *et al.*, 2005), les marqueurs *Bacteroidales* ne peuvent pas être détectés ou quantifiés après cette étape préalable d'enrichissement. Cela s'explique par le fait que ce sont des bactéries anaérobies strictes et qu'en conséquence, elles sont difficiles voire impossibles à cultiver pour certaines d'entre elles. De plus, si cette étape d'enrichissement, qui modifie la quantité initiale de bactéries dans l'échantillon, était réalisée par des cultures en jarres anaérobies ou en chambre de Freter, les résultats seraient semi-quantitatifs et les contributions relatives de chaque marqueur seraient difficiles à discerner. Pour rechercher les marqueurs *Bacteroidales* de l'origine des contaminations fécales, Hum-1-Bac, Rum-2-Bac et Pig-2-Bac, dans des huîtres naturellement contaminées, il était essentiel de disposer de protocoles d'extraction d'ADN génomique bactérien, pour quantifier ces marqueurs directement. Dans cette étude, deux fractions du coquillage, les TD, connus pour concentrer les microorganismes (Le Guyader *et al.*, 2000; Hervio-Heath *et al.*, 2002) et les LI ont été retenues pour rechercher les marqueurs. Les étapes de comparaison des protocoles d'extraction d'ADN bactérien à partir des TD et des LI d'huîtres artificiellement contaminées ont conduit à sélectionner respectivement les protocoles utilisés avec les kits DNAZOL (Invitrogen) et Fast DNA spin kit for soil (Qiagen). Les expérimentations d'ajout de la bactérie *B. vulgatus* dans des échantillons de TD et de LI d'huîtres non contaminées au préalable ont permis d'obtenir des concentrations élevées du marqueur de contamination fécale général, AllBac, avec les protocoles sélectionnés. Cependant, le protocole utilisé avec le kit DNAZOL n'a pas permis d'obtenir de résultats quantitatifs lorsque le marqueur AllBac était appliqué sur des extraits d'ADN issus de TD où les huîtres avaient été contaminées avec  $10^6$  *B. vulgatus*/100 ml d'eau de mer. Ce résultat peut être expliqué en partie par la limite de quantification élevée (4,5 U.  $\text{Log}_{10}$  bactéries/g de TD). Au contraire, les résultats obtenus à partir des LI sont intéressants. Cette piste a donc été privilégiée et optimisée, ce qui a permis d'obtenir des concentrations du marqueur AllBac 100 à 1 000 fois plus élevées par rapport au protocole non optimisé.

Dans la littérature, la recherche des marqueurs de l'origine des contaminations humaine et/ou animale dans les coquillages issus de l'environnement a été essentiellement réalisée avec des marqueurs viraux. Les cibles recherchées étaient principalement représentées par les bactériophages F-ARN spécifiques et les norovirus (Vantarakis *et al.*, 2006; Love *et al.*, 2008; Le Guyader *et al.*, 2009; Wolf *et al.*, 2010). Dans les études de Wolf *et al.* (2010) et Baker-Austin *et al.* (2010), les marqueurs spécifiques de l'hôte ciblant les virus ou les mitochondries, ont été faiblement quantifiés dans les coquillages. Au contraire, nos résultats concernant les protocoles mis au point dans cette présente étude, ont permis de détecter et de quantifier le marqueur de contamination fécale général (AllBac) et les marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte (Hum-1-Bac, Rum-2-Bac et Pig-2-Bac) dans des huîtres naturellement contaminées par les eaux de l'estuaire de l'Elorn (Bretagne, Finistère). Les concentrations en *E. coli* déterminées par culture dans les huîtres étaient supérieures à 230 NPP/100 g de CLI pour tous les échantillons. Ces concentrations étaient toutefois plus faibles pour les huîtres prélevées sur les sites Le Passage, Pen an Trein, Vervian et Pouldu lors de la 3<sup>ème</sup> campagne. Le marqueur AllBac a été quantifié ou détecté dans tous les échantillons de LI. Lors d'événements pluvieux (c. à d. > à 25 mm de pluie les 5 jours précédents les prélèvements), au moins un marqueur *Bacteroidales* spécifique de l'hôte a été quantifié ou détecté quand les concentrations en *E. coli* par culture étaient supérieures à 3 U. Log<sub>10</sub> NPP/100 g de CLI. L'importance des contaminations fécales d'origine humaine impactant cet estuaire lors d'événements pluvieux a été mise en évidence par la quantification du marqueur Hum-1-Bac dans 75 % des échantillons de LI d'huîtres ( $n=12$ ) lors des 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> campagnes alors que le marqueur Rum-2-Bac a été quantifié dans seulement 22 % des échantillons et le marqueur Pig-2-Bac n'a pas été quantifié au cours de ces campagnes. Wolf *et al.* en 2010, ont également sélectionnés des marqueurs viraux (adénovirus et atadénovirus) pour discriminer les contaminations fécales d'origine humaine, porcine et ruminant dans les coquillages ( $n=15$ ). Cependant, les marqueurs ont été détectés dans peu d'échantillons (de 0 à 20 % selon les marqueurs) à des concentrations comprises entre 1,8 et 3,4 U. Log<sub>10</sub> copies de génome/échantillon.

Pour la première fois, à partir d'échantillons de LI, une corrélation significativement positive ( $p<0,05$ ) a été obtenue entre les marqueurs AllBac et Hum-1-Bac. De la même façon, une corrélation significativement positive du marqueur Hum-1-Bac dans les LI avec les concentrations en *E. coli* dans l'huître et la pluviométrie a été obtenue. Ces résultats suggèrent que la pluviométrie favorise les apports en *E. coli* dans les coquillages et plus particulièrement, dans le cadre de cette étude, les apports d'origine humaine. L'effet de la

pluviométrie sur les concentrations en *E. coli* dans les huîtres plates (*Ostrea edulis*) a également été mise en évidence par Lee et Morgan en 2003 en Grande-Bretagne. Ces auteurs ont également montré que les saisons et le cycle des marées avaient une influence significative sur les concentrations en *E. coli*, avec des concentrations dans les huîtres plus élevées en hiver et lors de la basse mer.

Nos résultats concernant la recherche des marqueurs *Bacteroidales* à partir des TD de l'huître n'ont pas été satisfaisants et étaient proches des résultats obtenus par Gourmelon *et al.* (2010a). Le marqueur AllBac a été quantifié à seulement quatre reprises et les marqueurs spécifiques n'ont pas été détectés. Nous pouvons donc en déduire que nos conditions d'extractions des ADN bactériens à partir de TD d'huîtres pour la recherche de nos marqueurs ne semblent pas être adaptées contrairement à celles appliquées pour les LI.

Les résultats obtenus dans les eaux estuariennes ont confirmé la dominance des contaminations fécales d'origine humaine par rapport aux contaminations fécales d'origine animale même si le marqueur Hum-1-Bac a été moins quantifié dans les eaux estuariennes (33 % des échantillons ( $n=18$ )) que dans les LI des huîtres. Cependant, les marqueurs AllBac et Hum-1-Bac, quantifiés simultanément dans les huîtres et dans les eaux, étaient statistiquement indépendants. Nous pouvons en conclure que les marqueurs détectés dans les huîtres ne reflètent pas systématiquement la contamination présente dans les eaux environnantes et réciproquement. Cela peut s'expliquer par la différence des matrices. En effet, l'échantillon d'eau est prélevé à un instant donné tandis que l'huître, par ses propriétés de bioaccumulation, peut mettre en évidence des contaminations plus anciennes. Les apports de contaminations fécales d'origine humaine dans l'estuaire de l'Elorn par les rivières du bassin versant ont nettement été mis en évidence par la quantification du marqueur Hum-1-Bac dans les rivières impactant les sites de Camfrout et Pouldu avec des concentrations élevées comprises entre 6,2 et 7,4 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau de rivière ainsi qu'au site de Landerneau, réceptacle des eaux du bassin versant situé en amont de l'estuaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Pommepuy *et al.* en 1987 qui ont montré que dans les eaux de cet estuaire, les sources principales de contamination fécale étaient la rivière de l'Elorn, les effluents de la STEP de Landerneau et également en période de vives eaux, la remise en suspension du sédiment. Dans cette étude, les concentrations du marqueur AllBac, Hum-1-Bac et en *E. coli* dans les eaux estuariennes étaient corrélées avec la pluviométrie. Ces résultats confortent que les apports de contaminations fécales d'origine humaine sont favorisés par le ruissellement, lors d'épisodes pluvieux. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Riou *et al.* (2007) qui a montré que les concentrations en *E. coli* dans les eaux de

rivière, situées à proximité de zones conchylicoles, étaient 50 fois plus élevées quand la pluviométrie était supérieure à 10mm/jour par rapport aux concentrations obtenues lorsque la pluviométrie était inférieure à cette valeur.

De plus, il est intéressant de noter que les paramètres physico-chimiques mesurés (température, salinité, turbidité et pH) n'étaient pas corrélés ou anti-corrélés avec les marqueurs *Bacteroidales* ou l'indicateur *E. coli*. L'absence de corrélations peut être expliquée par la ponctualité des mesures car il existe une variabilité cyclique de ces paramètres sur une période de 24 h ou sur un cycle de marée (Pommepuy *et al.*, 1987; Villeneuve *et al.*, 2006). Les résultats montrant des « corrélations négatives » sont plus difficilement interprétables car les campagnes ont été réalisées en fonction de 3 conditions de pluviométries différentes dans le temps. La première campagne a été réalisée lors de fortes pluies lorsque les températures étaient faibles (7,9 - 9,8°C) et la dernière lors de très faibles pluies lorsque les températures étaient plus élevées (12,8 - 14,8°C). A notre connaissance, seulement deux études ont obtenu une relation entre un paramètre physico-chimique et un marqueur TSM (Reischer *et al.*, 2008 ; Ogorzaly *et al.*, 2009). Reischer *et al.* (2008) ont montré que le marqueur de qPCR, BacR, était préférentiellement retrouvé lors d'événements pluvieux et Ogorzaly *et al.* (2009) ont obtenu une corrélation significativement positive entre les concentrations du génogroupe I des bactériophages F-ARN spécifiques par RT-qPCR et la turbidité.

### CONCLUSION

Les marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte Hum-1-Bac, Rum-2-Bac et Pig-2-Bac ont, pour la première fois, été détectés et quantifiés dans les LI d'huîtres naturellement contaminées. L'importance des contaminations fécales d'origine humaine au niveau de l'estuaire de l'Elorn a été mise en évidence par la quantification du marqueur Hum-1-Bac dans respectivement 55, 33 et 100 % des échantillons de LI d'huîtres, d'eaux estuariennes et d'eau de rivière. Cette étude a également permis de mettre en évidence le rôle important de la pluviométrie qui peut entraîner des rejets d'eaux usées et/ou pluviales vers le milieu naturel, et du ruissellement par le lessivage sur les terres agricoles, les routes et les toitures, dans la contamination des eaux et des coquillages démontrant ainsi la vulnérabilité des zones conchylicoles lors d'événements pluvieux intenses.

Afin de valider l'application des marqueurs *Bacteroidales* à l'ensemble des coquillages commercialisés ou ramassés lors de pêches récréatives, des validations devront être réalisées sur d'autres types de coquillages, notamment des moules, des coques ou des palourdes. De

plus, l'application d'autres marqueurs TSM prometteurs sur les coquillages, tels que les marqueurs viraux (bactériophages F-ARN spécifiques ou adénovirus) couplés aux marqueurs *Bacteroidales* permettrait d'identifier avec plus de certitude l'origine des contaminations à l'image de la boîte à outils présentée dans le chapitre 6. Enfin, l'utilisation de marqueurs de contaminations fécales permettant d'identifier les contaminations émises par les oiseaux de bord de mer (par exemple, goélands ou mouettes) permettrait de mettre en évidence ces contaminations qui peuvent être importantes en zone estuarienne et littorale.

## REFERENCES

- Baker-Austin, C., R. Rangdale, J. Lowther and D. Lees (2010). "Application of mitochondrial DNA analysis for microbial source tracking purposes in shellfish harvesting waters." *Water Science and Technology* **61**(1): 1-7.
- Bej, A. K., M. H. Mahbubani, M. J. Boyce and R. M. Atlas (1994). "Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(1): 368-373.
- Bernhard, A. E. and K. G. Field (2000a). "Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4): 1587-94.
- Gourmelon, M., M. P. Caprais, D. Kay and C. Stapleton (2010a). "Techniques de dépistage des sources de pollution microbiennes." *Techniques Sciences et Méthodes* **4**: 54-64.
- Gourmelon, M., M. P. Caprais, C. Le Mennec, S. Mieszkin, C. Ponthoreau and M. Gendronneau (2010b). "Application of library-independent microbial source tracking methods for identifying the sources of faecal contamination in coastal areas." *Water Sciences and Technology* **61**(6): 1401-1409.
- Hervio-Heath, D., R. R. Colwell, A. Derrien, A. Robert-Pillot, J. M. Fournier and M. Pommepuy (2002). "Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France." *Journal of Applied Microbiology* **92**(6): 1123-1135.
- Kalaydjian, R. (2005). "Données économiques françaises 2005." Ifremer: 61 p.
- Layton, A., L. McKay, D. Williams, V. Garrett, R. Gentry and G. Saylor (2006). "Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6): 4214-24.
- Le Guyader, F., L. Haugarreau, L. Miossec, E. Dubois and M. Pommepuy (2000). "Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8): 3241-3248.
- Le Guyader, F. S., S. Parnaudeau, J. Schaeffer, A. Bosch, F. Loisy, M. Pommepuy and R. L. Atmar (2009). "Detection and Quantification of Noroviruses in Shellfish." *Applied and Environmental Microbiology* **75**(3): 618-624.
- Lee, R. J. and O. C. Morgan (2003). "Environmental factors influencing the microbiological contamination of commercially harvested shellfish." *Water Science and Technology* **47**(3): 65-70.
- Ley, V., J. Higgins and R. Fayer (2002). "Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(7): 3455-61.
- Love, D. C., J. Vinjé, S. M. Khalil, J. Murphy, G. L. Lovelace and M. D. Sobsey (2008). "Evaluation of RT-PCR and reverse line blot hybridization for detection and genotyping F+ RNA coliphages from estuarine waters and molluscan shellfish." *Journal of Applied Microbiology* **104**(4): 1203-1212.
- Monfort, P. (2006). "Microbiologie et coquillages." note technique: 16 p.
- Ogorzaly, L., A. Tissier, I. Bertrand, A. Maul and C. Gantzer (2009). "Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water." *Water Research* **43**(5): 1257-1264.
- Okabe, S., N. Okayama, O. Savichtcheva and T. Ito (2007). "Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater." *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(4): 890-901.
- Panicker, G., M. L. Myers and A. K. Bej (2004). "Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and gulf of Mexico water by Real-Time PCR." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(1): 498-507.
- Pommepuy, M., M. Cormier, L. Brunel and M. Breton (1987). "Etude de la flore bactérienne d'un estuaire breton." *Oceanologica Acta* **10**(2): 187-196.
- Reischer, G. H., J. M. Haider, R. Sommer, H. Stadler, K. M. Keiblinger, R. Hornek, W. Zerobin, R. L. Mach and A. H. Farnleitner (2008). "Quantitative microbial faecal source tracking with

- sampling guided by hydrological catchment dynamics." *Environmental Microbiology* **10**(10): 2598-2608.
- Reischer, G. H., D. C. Kasper, R. Steinborn, R. L. Mach and A. H. Farnleitner (2006). "Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(8): 5610-5614.
- Riou, P., J. C. Le Saux, F. Dumas, M. P. Caprais, S. F. Le Guyader and M. Pommeputy (2007). "Microbial impact of small tributaries on water and shellfish quality in shallow coastal areas." *Water Research* **41**(12): 2774-2786.
- Roslev, P., L. Iversen, H. L. Sønderbo, N. Iversen and S. Bastholm (2009). "Uptake and persistence of human associated *Enterococcus* in the mussel *Mytilus edulis*: relevance for faecal pollution source tracking." *Journal of Applied Microbiology* **107**(3): 944-953.
- Seurinck, S., T. Defoirdt, W. Verstraete and S. D. Siciliano (2005). "Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater." *Environmental Microbiology* **7**(2): 249-59.
- Vantarakis, A., D. Venieri, G. Kominou and M. Papapetropoulou (2006). "Hybridisation of F+ RNA coliphages detected in shellfish samples with oligonucleotide probes to assess the origin of microbiological pollution of shellfish." *Water Science and Technology* **54**(3): 219 - 223.
- Vázquez-Novelle, M. D., A. J. Pazos, M. Abad, J. L. Sánchez and M. L. Pérez-Parallé (2005). "Eight-hour PCR-based procedure for the detection of *Salmonella* in raw oysters." *FEMS Microbiology Letters* **243**(1): 279-283.
- Villeneuve, V., S. Légaré, J. Painchaud and W. Vincent (2006). "Dynamique et modélisation de l'oxygène dissous en rivière." *Revue des sciences de l'eau* **19**(4): 259-274.
- Wolf, S., J. Hewitt and G. E. Greening (2010). "Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(5): 1388-1394.



## **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---



La réalisation des cinq étapes majeures de ce travail de thèse a permis d'une part, de développer à partir de la cible *Bacteroidales* des marqueurs pour l'identification des contaminations fécales d'origine humaine, porcine et ruminant dans les eaux de l'environnement et les coquillages et d'autre part, d'étudier la persistance des marqueurs de contamination fécale d'origine porcine en microcosmes d'eau de rivière sous l'influence de l'oxygène dissous et de la température.

A travers ces étapes, notre connaissance des marqueurs *Bacteroidales* a été approfondie et renforcée. Cela nous permet à présent de répondre aux interrogations globales posées au début de ce travail de thèse concernant : (i) la piste *Bacteroidales* et sa pertinence pour identifier les contaminations fécales ainsi que l'origine des contaminations dans l'environnement, (ii) le devenir des marqueurs *Bacteroidales* dans l'environnement, (iii) la détection des marqueurs *Bacteroidales* en zone littorale et tout particulièrement dans les coquillages, et (iv) la relation entre les indicateurs classiques de contamination et les marqueurs *Bacteroidales*.

Les *Bacteroidales* apparaissent aujourd'hui comme de potentiels marqueurs de contaminations fécales par rapport aux indicateurs classiques tels que *E. coli* et les entérocoques par culture. En effet, les bactéries appartenant à l'ordre des *Bacteroidales* sont abondantes dans le tractus digestif à des concentrations 10 à 100 fois supérieures à celles des indicateurs et dans les selles de l'homme et les fèces des animaux à sang chaud (9 à 11 U. Log<sub>10</sub> *Bacteroidales*/g de fèces). Elles ne peuvent pas se multiplier dans l'environnement car ce sont des bactéries anaérobies strictes (Allsop et Stickler, 1985 ; Fiksdal *et al.*, 1985 ; Dick et Field, 2004). Toutefois, en raison des difficultés à les cultiver, les marqueurs correspondant ont été peu recherchés dans l'environnement pour identifier une contamination fécale. L'émergence des techniques de biologie moléculaire telle que la PCR a permis de pallier les problèmes liés à leur culture et de mettre en évidence la particularité de certaines espèces à posséder une répartition spécifique de l'hôte et par conséquent une capacité à identifier l'origine des contaminations dans l'environnement (Kreider, 1995 ; Bernhard et Field, 2000a ; Bernhard et Field, 2000b ; Dick *et al.*, 2005).

Il existe plusieurs marqueurs de PCR ciblant l'ensemble des *Bacteroidales* pour identifier des contaminations fécales : Bac32F/Bac708R (Bernhard et Field, 2000a) utilisés en PCR conventionnelle et TotBac (Dick et Field, 2004), AllBac (Layton *et al.*, 2006), BacUni-UCD (Kildare *et al.*, 2007), BacPre1 (Okabe *et al.*, 2007) et Bacter (Furet *et al.*, 2009) en PCR quantitative en temps réel (qPCR). Dans notre étude, les marqueurs Bac32F/Bac708R et AllBac ont été utilisés pour obtenir un fragment de gène codant les ARNr 16S des

*Bacteroidales* issues d'échantillons de fèces et d'effluents d'origine humaine et animale et pour quantifier l'ensemble des *Bacteroidales* présents dans les échantillons de fèces, d'effluents et d'eaux de l'environnement.

L'analyse *in silico* par BLAST et l'analyse phylogénétique des 185 OTU de gène codant les ARNr 16S des *Bacteroidales* ont montré que les OTU obtenues à partir de fèces d'un hôte particulier ou d'effluents pouvaient être, pour la plupart d'entre elles, similaires à des séquences isolées à partir de la même origine fécale enregistrées dans Genbank. Dans notre étude, 92 % des OTU issues des fèces d'origine bovine étaient similaires à 100 % à des séquences issues de fèces d'origine bovine déposées dans cette base de données. Ces analyses ont également confirmé que certaines OTU de *Bacteroidales* issues de fèces et d'effluents possédaient une répartition spécifique de l'hôte, car six groupes d'OTU spécifiques de l'hôte ont été identifiés par l'analyse phylogénétique. Ces résultats confirment qu'au sein des *Bacteroidales*, des bactéries sont spécifiques d'une contamination fécale provenant d'un hôte particulier (humain, porc ou ruminant). L'existence de *Bacteroidales* spécifiques d'un hôte peut s'expliquer par les régimes alimentaires différents. Chez les ruminants, le rumen est plutôt colonisé par des microorganismes qui participent à la dégradation des matières végétales. Ces microorganismes, au contraire, sont peu ou pas présents chez l'Homme ou le porc (Dick *et al.*, 2005). Ainsi, la particularité de chaque régime alimentaire et les contacts limités entre certains hôtes permettent d'acquérir une spécificité d'hôte pour les microorganismes et plus particulièrement pour les *Bacteroidales*.

On peut noter également qu'une autre partie des OTU était présente à la fois chez l'Homme et les animaux et que certaines de ces OTU étaient identiques à des séquences issues d'échantillons de l'environnement déposées dans GenBank. Respectivement 8 et 22 % des OTU issues des fèces et fumiers d'origine bovine étaient similaires à 100 % à des séquences issues principalement d'eaux de l'environnement. Toutefois, il est difficile d'affirmer une origine «environnementale ou non fécale» pour une OTU avec une analyse BLAST car dans notre étude les séquences de Genbank provenant de l'environnement étaient généralement issues d'échantillons d'eau de rivière pour lesquels une absence de contamination fécale ne pouvait pas totalement être exclue. L'étude de Wéry *et al.* (2010) concernant l'évaluation de la diversité des groupes *Bacteroidales*, *Clostridiaceae*, *Bifidobacterium* et *Bacillus–Streptococcus–Lactobacillus* présents dans des eaux en sortie de STEP pour définir un marqueur de contamination fécale humaine a conduit à l'identification de séquences de *Bacteroidales* ayant une origine non fécale. En effet, parmi les 13 OTU appartenant aux *Bacteroidales*, obtenues avec des amorces ciblant les *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp. et

*Porphyromonas* spp., trois OTU sont apparues comme non apparentées à une origine fécale et plutôt proches de séquences de *Bacteroidales* issues d'écosystèmes variés tels que des hydrocarbures, des résidus pharmaceutiques ou des bioréacteurs. Enfin, l'espèce *Prevotella paludivivens*, identifiée par Ueki *et al.* (2007), n'a pas été isolée à partir du tractus digestif de l'Homme ou des animaux à sang chaud, mais à partir de racines de plant de riz issus d'un sol de rizière. Il est également reconnu que certaines espèces de *Bacteroides* spp. sont présentes dans le système digestif des insectes comme les termites ou les criquets (Santo Domingo *et al.*, 1998 ; Ohkuma *et al.*, 2002 ; Van der Wielen et Medema, 2010) et des poissons d'eau douce ou d'eau saumâtre comme les saumons, les poissons chats, les truites arc-en-ciel ou les tilapias (Kim *et al.*, 2007 ; McLain *et al.*, 2009). Ceci implique que les *Bacteroidales* ne sont pas uniquement restreints au tractus digestif de l'Homme et des animaux à sang chaud mais que leur niche écologique est bien plus vaste.

Dans notre étude, le marqueur de l'ensemble des *Bacteroidales* AllBac et l'indicateur de contamination fécale *E. coli* ont été recherchés dans des échantillons de différents types d'eau de l'environnement (eaux de forage, eaux de ruissellement et eaux de rivière). Il est intéressant de noter que le marqueur AllBac a été quantifié ou détecté à des concentrations faibles variant de 4,1 à 5,6 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau de rivière et de forage, où *E. coli* n'était pas détecté par des méthodes culturales. Ces résultats suggèrent que soit l'indicateur classique était en limite de détection soit que le marqueur AllBac permet d'amplifier des séquences de *Bacteroidales* issues de l'environnement n'ayant pas subi au préalable une contamination fécale. Ce qui souligne la possible existence d'espèces ayant une origine non fécale. Cette seconde hypothèse est appuyée par les récents travaux de Van der Wielen et Medema (2010) qui ont recherché trois marqueurs de l'ensemble des *Bacteroidales* (AllBac, TotBac et BacUni-UCD) dans des échantillons d'eau potable ( $n=11$ ) n'ayant pas été au contact de contaminations fécales et dont les dénombrements en *E. coli*, bactériophages F-ARN spécifiques et coliphages somatiques étaient inférieurs à la limite de détection. Paradoxalement, le marqueur AllBac a été quantifié dans tous les échantillons d'eau potable à des concentrations faibles variant de 2,2 à 3,9 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau. La présence de *Bacteroidales* a été confirmée par les deux autres marqueurs testés, TotBac et BacUni-UCD, conduisant respectivement à des résultats positifs dans neuf et 10 des 11 échantillons analysés. Le séquençage des produits PCR obtenus dans les eaux a permis d'obtenir au total 22 séquences de gènes codant l'ARNr 16S des *Bacteroidales*. La comparaison de ces séquences avec les séquences déposées dans GenBank a montré que si ces séquences étaient majoritairement proches de séquences isolées de source fécale, quatre séquences d'entre elles

proches de séquences isolées à partir d'une source non fécale (système digestif d'insectes, rhizosphère ou phyllosphère). Ce qui confirme que des *Bacteroidales* pourraient être présents dans un environnement n'étant pas sous l'influence de contaminations d'origine fécale.

*Ainsi, en prenant en compte les données de la littérature et nos propres résultats, l'utilisation exclusive des Bacteroidales, et plus particulièrement des genres Bacteroides et Prevotella, pour identifier des contaminations fécales dans l'environnement peut être remise en cause. Une faible partie des séquences détectées par les marqueurs ciblant l'ensemble des Bacteroidales tels que AllBac, TotBac et BacUni-UCD seraient d'origine non fécale.*

A partir des groupes d'OTU spécifiques de l'hôte, identifiés lors de l'analyse phylogénétique, un panel de quatre marqueurs *Bacteroidales* de qPCR a été développé : Hum-1-Bac, marqueur ciblant les contaminations fécales d'origine humaine, Rum-2-Bac, marqueur ciblant les contaminations fécales d'origine ruminant (bovins et ovins) et Pig-1-Bac et Pig-2-Bac, marqueurs ciblant les contaminations fécales d'origine porcine.

Les tests de sensibilité et de spécificité ont montré que ces marqueurs étaient hautement sensibles (92,3 et 100 % ;  $n = 39$  et  $48$ ) et spécifiques (93,4 et 98,9 % ;  $n = 91$  et  $98$ ) (Annexe B). Cependant, il n'existe actuellement aucune étude qui permet d'obtenir une idée du nombre d'échantillons cibles et non cibles qu'il faudrait tester pour s'assurer correctement de la bonne sensibilité et spécificité des marqueurs TSM (Santo Domingo *et al.*, 2007). Dans la littérature, ces tests ont été effectués sur seulement quelques échantillons ou sur des centaines. Par exemple, Okabe *et al.* (2007) ont validé la sensibilité et la spécificité de leurs marqueurs sur moins de 12 échantillons de fèces tandis que Frémaux *et al.* (2010) ont testé la spécificité de leurs marqueurs sur 291 échantillons de fèces. Parmi les deux marqueurs porcs, le marqueur Pig-2-Bac semble le plus prometteur car il n'a été retrouvé que dans un seul échantillon d'eau en sortie de STEP alors que le marqueur Pig-1-Bac a été faiblement quantifié dans 10 échantillons d'eaux en sortie de STEP ( $n=17$ ). Les résultats concernant le marqueur Pig-2-Bac seront donc privilégiés au cours de cette discussion.

Les tests de sensibilité ont également permis d'obtenir une estimation de leur quantification dans les échantillons d'effluents cibles, principales sources de contaminations fécales dans l'environnement. Pour les marqueurs Hum-1-Bac, Rum-2-Bac et Pig-2-Bac, des concentrations moyennes respectives de 5,8 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml, 6,8 U. Log<sub>10</sub> copies/g et 6,9 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml ont été obtenues dans des eaux en sorties de STEP ( $n=17$ ), des

fumiers de bovins ( $n=15$ ) et des lisiers de porcs ( $n=23$ ). Ces trois marqueurs ont également été quantifiés dans des eaux de l'environnement à des concentrations comprises entre 2,7 et 6,5 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau (Annexe B). Il est intéressant de remarquer que dans les fèces et les effluents cibles, les marqueurs spécifiques de l'hôte représentaient moins de 1 à 10 % des *Bacteroidales* ciblés par le marqueur AllBac (Annexe B). Cette proportion similaire entre tous les marqueurs spécifiques de l'hôte par rapport au marqueur AllBac pourrait permettre d'estimer les contributions relatives entre chaque marqueur dans un échantillon de l'environnement lors de la présence de contaminations sont mixtes.

Ainsi, si le panel de marqueurs développé au cours de cette thèse semble prometteur, il est également intéressant de le comparer aux autres marqueurs *Bacteroidales* et aux marqueurs privilégiant d'autres cibles développés jusqu'à présent. A notre connaissance, seulement trois équipes ont développé un panel de marqueur *Bacteroidales* pour la PCR conventionnelle : Bernhard et Field (2000b) avec deux marqueurs humains (HF183F/Bac708R et HF134F/HF654R) et deux marqueurs ruminants (CF128F/Bac708R et CF193F/Bac708R), Shanks *et al.* (2006, 2007) avec trois marqueurs humains (Hum19, 22 et 30) et trois marqueurs ruminants (Bac1F, 2F et 3F) et Dick *et al.* (2005) avec un marqueur porcin (PF163F/Bac708R) et un marqueur équin (HoF597F/Bac708R). Ces marqueurs, et tout particulièrement les marqueurs développés par Bernhard et Field (2000b) et Dick *et al.* (2005), se sont révélés assez sensibles et spécifiques lorsqu'ils ont été testés sur des échantillons provenant de différents lieux géographiques aux Etats-Unis, en Australie et en Europe. Cependant, ces marqueurs n'ont pas toujours été détectés dans des eaux de l'environnement où des contaminations étaient suspectées et les résultats ne sont exprimés qu'en terme de présence/absence (Gourmelon *et al.*, 2007). Le passage à la qPCR a permis de s'affranchir de certaines limites. En effet, cette technique qui associe les propriétés de la PCR et la quantification, permet de dénombrer des cibles présentes dans l'échantillon de départ. De plus, l'addition d'une sonde TaqMan® aux deux amorces permet d'assurer une plus haute spécificité. Pour appliquer cette technique, plusieurs panels de marqueur *Bacteroidales* ont récemment été développés. Layton *et al.* (2006) et Reischer *et al.* (2006, 2007) ont développé des marqueurs humains (respectivement HuBac et BacH) et ruminants (respectivement BoBac et BacR). Kildare *et al.* (2007) ont dessiné un marqueur humain (BacHum), un ruminant (BacCow) et un canin (BacCan) et Okabe *et al.* (2007) ont développé un marqueur humain (Human-Bac). Okabe *et al.* (2007) ont également proposé trois marqueurs ruminants (Cow-Bac1, 2 et 3) en chimie TaqMan® et les deux premiers marqueurs porcs (PigBac1 et PigBac2) en chimie SybrGreen®. Cependant, la spécificité de ces deux marqueurs, testée sur un faible

nombre d'échantillons, peut être remise en question. En effet, le marqueur PigBac2 a été amplifié dans des échantillons de selles humaines et de fèces bovines ( $n=11$ ) (Okabe *et al.*, 2007), et le marqueur PigBac1, testé en PCR conventionnelle par Lamendella *et al.* (2009), a été amplifié dans des échantillons de selles humaines et des fèces bovines, équinaires et de rats laveurs, conduisant à seulement 67,2 % de spécificité ( $n=119$ ). Ces résultats nous amènent à dire que les marqueurs porcs utilisant la chimie TaqMan® développés lors de ce travail de thèse et plus particulièrement le marqueur Pig-2-Bac constituent une avancée importante pour l'identification des contaminations fécales d'origine porcine.

Les marqueurs *Bacteroidales* de contamination fécale par les ruminants sont plus nombreux que les marqueurs porcs. Cependant, contrairement au marqueur Rum-2-Bac, la plupart d'entre eux ont été peu testés dans des eaux de l'environnement (Layton *et al.*, 2006 ; Reischer *et al.*, 2006 ; Kildare *et al.*, 2007 ; Okabe *et al.*, 2007 ; Shanks *et al.*, 2008). Le marqueur BacR développé par Reischer *et al.* (2006) qui possède déjà une forte sensibilité (100 %,  $n=57$ ) et spécificité (100 %,  $n=146$ ) dans les fèces et les effluents, présente une fréquente détection dans les eaux en zone alpine ( $>95$  %,  $n=42$ ) (Reischer *et al.*, 2008). Ce marqueur, testé au laboratoire, a été amplifié dans cinq échantillons de selles humaines ( $n=27$ ) à des concentrations comprises entre 4,2 et 6,3 U. Log<sub>10</sub> copies/g de selles.

A notre connaissance, au moins sept marqueurs *Bacteroidales* de qPCR ciblant les contaminations fécales d'origine humaine ont également été développés. Les marqueurs HF183 et BacHum-UCD développés respectivement par Seurinck *et al.* (2005) et Kildare *et al.* (2007) se sont révélés les plus sensibles et spécifiques lorsqu'ils ont été comparés à d'autres marqueurs (Kildare *et al.*, 2007, Ahmed *et al.*, 2009a). Comparé au marqueur HF183, le marqueur Hum-1-Bac s'est révélé moins spécifique mais plus sensible en détectant des concentrations plus faibles dans les échantillons cibles (7,3 *versus* 8,3 U. Log<sub>10</sub> copies/g de selles et 5,8 *versus* 6,5 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau en sortie de STEP). Dans des échantillons d'eau de l'environnement, leurs concentrations étaient toutefois similaires (environ 4 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau). De plus, la spécificité du marqueur Hum-1-Bac a été accrue en ajoutant aux amorces une sonde TaqMan®. Si en TaqMan®, les résultats de sensibilité n'étaient pas aussi élevés qu'en SybrGreen®, l'association des amorces et de la sonde a permis d'obtenir des résultats satisfaisants en PCR nichée (PCR conventionnelle avec les amorces Bac32F/Bac708R suivie d'une qPCR avec le marqueur Hum-1-Bac en TaqMan®) pour valider la présence du marqueur dans les liquides intervalvaires des huîtres, résultats qui n'étaient pas interprétables lorsque le marqueur était utilisé en SybrGreen®.

La mise en évidence des contaminations d'origine porcine, ruminant ou humaine a également été réalisée par l'intermédiaire de cibles différentes des *Bacteroidales* tels que les virus, les archaeobactéries, les gènes de virulence ou les ADN mitochondriaux des cellules eucaryotes (Khatib *et al.*, 2002 ; Caldwell *et al.*, 2007 ; Ufnar *et al.*, 2007a ; Hundesa *et al.*, 2009). Cependant, comme cela a été présenté dans l'étude bibliographique, ces marqueurs peuvent manquer de sensibilité et de spécificité et ils ont été rarement détectés dans l'environnement. Les amorces de PCR conventionnelle du marqueur porc, P23-2, développé par Ufnar *et al.* (2007a), qui permettent de cibler une archaeobactérie méthanogène, ont été testées au laboratoire. Si ce marqueur s'est révélé relativement sensible (>86% ;  $n=30$ ) et spécifique (>99 % ;  $n=260$ ) lorsqu'il a été testé aux Etats-Unis sur des fèces et des effluents, il s'est montré moins sensible lorsqu'il a été testé en France (70 % ;  $n=25$ ) sur des échantillons cibles de fèces et lisiers de porcs. Appliqué ensuite dans des eaux de rivière où le marqueur Pig-2-Bac avait été quantifié, ce marqueur n'a jamais été détecté. Le marqueur ciblant la bactérie *Lactobacillus amylovorus*, développé par Marti *et al.* (2010), semble être également un marqueur de contaminations fécales porcines pertinent puisqu'il s'est montré sensible, spécifique lorsqu'il a été testé dans des échantillons de fèces et d'effluents et qu'il a été quantifié dans les eaux de l'environnement où le marqueur Pig-2-Bac avait été quantifié.

Ainsi, de nombreux marqueurs spécifiques de l'hôte ont été développés ces dernières années. Si les marqueurs qui ciblent les *Bacteroidales* semblent se distinguer des marqueurs d'autres cibles, il est cependant difficile de l'affirmer. Il existe néanmoins des études comparatives où plusieurs méthodes et marqueurs ont été comparés à partir d'effluents ou d'échantillons artificiellement contaminés (Griffith *et al.*, 2003 ; Blanch *et al.*, 2004 ; Blanch *et al.*, 2006 ; Griffith *et al.*, 2009). Blanch et ses collaborateurs (2004, 2006), ont comparé dans leur étude plus de 26 méthodes sur 230 échantillons impactés par des pollutions humaines et animales sans y inclure les marqueurs *Bacteroidales*. Dans les études réalisées aux Etats-Unis par l'équipe de Griffith en 2003 et en 2009, où des méthodes culturales et moléculaires associées à différents marqueurs ont été confrontées, les marqueurs *Bacteroidales* ont donné les résultats les plus intéressants. Ces marqueurs *Bacteroidales* ont été comparés à d'autres marqueurs bactériens, *Lactobacillus amylovorus*, *Bifidobacterium adolescentis*, ou viraux, bactériophages F-ARN spécifiques, et également à des marqueurs chimiques, rapports de stéroïdes, caféine et molécules de synthèse, dans des échantillons d'effluents mais également dans des échantillons d'eaux de rivière plus faiblement contaminés (Gourmelon *et al.*, 2010c). Cette étude a permis de sélectionner, parmi 17 paramètres testés, les marqueurs les plus discriminants, dont les marqueurs *Bacteroidales*, afin de proposer une « boîte à outils » pour

identifier avec plus de certitude l'origine des contaminations fécales dans les eaux de l'environnement.

*Si les marqueurs de l'ensemble des Bacteroidales ne mettent pas exclusivement en évidence une contamination d'origine fécale, les marqueurs spécifiques de l'hôte défini dans cette étude permettent de mettre en évidence une contamination d'origine humaine, porcine et par les ruminants pour une application dans l'environnement. Ils constituent un panel de marqueurs pertinents, qui peut être associé à d'autres marqueurs microbiologiques ou chimiques, pour identifier l'origine des contaminations lorsqu'elles sont multiples.*

L'originalité de ce travail réside dans la validation de nos marqueurs à partir d'échantillons représentant les sources principales de contamination. Les selles humaines et les fèces porcines et bovines ainsi que différents types d'effluents, *i.e* : les eaux en sortie de STEP, les lisiers de porcs et fumiers de bovins ont été analysés au cours de ce travail. Ce panel de marqueurs a ensuite été appliqué dans des échantillons d'eaux de ruissellement, d'eaux de rivière, d'eaux estuariennes et de coquillages. L'ensemble des résultats obtenus dans les fèces, les effluents, les eaux et les coquillages apporte des éléments essentiels pour suivre le devenir de ces marqueurs des fèces à l'environnement.

Si les marqueurs ont été quantifiés dans les fèces à des concentrations importantes, ils ont toujours été retrouvés dans les effluents cibles, plus faiblement contaminés en *E. coli*, quelque soient les traitements appliqués et les temps de séjour des effluents (Mieszkin *et al.*, 2009 ; Mieszkin *et al.*, 2010). Le marqueur Pig-2-Bac a été quantifié dans les lisiers à des concentrations de 6,9 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml et a également été retrouvé dans des refus de centrifugation ou des eaux de lagune à des concentrations moyennes de 5,1 U. Log<sub>10</sub> copies/g de refus de centrifugation et 4,4 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau. Il est important de noter que le temps de séjour des refus de centrifugation et des lisiers traités peut s'échelonner de 40 à 50 jours, voire jusqu'à neuf mois pour les eaux de lagune ou les lisiers non traités présents dans les fosses. Une observation similaire peut être faite avec le marqueur humain Hum-1-Bac dont les concentrations dans les eaux en sortie de STEP après traitement par boues activées sont 100 fois inférieures à celles obtenues dans les selles (6,5 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau). Après un traitement des effluents, les marqueurs *Bacteroidales* qui subissent une diminution importante sont toujours détectés même après un temps de séjour important. Il a également été montré que les *Bacteroidales* étaient résistants au traitement tertiaire par UV des eaux de

STEP (Stapleton *et al.*, 2009). Avant et après ce traitement, les concentrations des marqueurs *Bacteroidales* étaient similaires alors qu'une perte de 2 à 3 U. Log<sub>10</sub> avait été montrée pour les concentrations de coliformes thermotolérants.

La recherche des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques des contaminations fécales porcines et ruminants dans les eaux de ruissellement impactées par des effluents porcins et bovins constituait également une étape avant de les rechercher dans les eaux de l'environnement. Les marqueurs Pig-2-Bac et Rum-2-Bac ont été testés dans des échantillons d'eaux de ruissellement après une simulation de pluie sur une parcelle après un épandage de lisier de porcs ou de fumier de bovins. Les résultats de quantification ont confirmé que ces marqueurs initialement présents dans les lisiers et les fumiers, étaient transférés dans les eaux de ruissellement (Jaffrezic *et al.*, accepté).

Ces validations sous différentes conditions, nous ont permis de confirmer la présence des marqueurs *Bacteroidales* dans toutes les sources possibles de contamination de l'environnement. Il était donc intéressant ensuite de rechercher les marqueurs dans les eaux de l'environnement où ils subissent une forte dilution associée à des pressions biotiques, essentiellement l'effet de la prédation, et à des pressions abiotiques avec l'effet de la température, de l'oxygène dissous, de la lumière, de l'oligotrophie ou de la salinité. L'étude de la persistance des marqueurs *Bacteroidales* et Pig-2-Bac, en microcosmes d'eau de rivière impactés par des lisiers de porcs, nous apporte des informations sur le devenir des marqueurs dans les eaux de l'environnement sous l'influence de l'oxygène dissous (saturation en oxygène - microaérophilie) et de la température (4 et 20°C). Ces facteurs ont été choisis car ils représentent les différentes conditions rencontrées dans l'environnement. Les températures correspondent à celles observées en hiver et en été dans les eaux de rivière en Bretagne, tandis que les conditions d'oxygène simulent les conditions d'eau vives (eaux de rivière) ou d'hypoxie (eaux stagnantes). Sous des conditions plus extrêmes, c'est-à-dire : saturation en oxygène couplée à une température de 20°C, les concentrations du marqueur Pig-2-Bac ont diminué de 3,5 U. Log<sub>10</sub> pour atteindre la limite de quantification après 16 jours. Dans les autres conditions, la persistance du marqueur était supérieure à la durée de l'expérience qui était de 43 jours. Une perte de 1,5 U. Log<sub>10</sub> a été observée pour les concentrations du marqueur porc sous des conditions de saturation en oxygène à 4°C alors que pour les conditions de microaérophilie, les concentrations du marqueur au 43<sup>ème</sup> jour de l'expérience étaient similaires à celle du début de l'expérience, c'est-à-dire d'environ 5,5 U. Log<sub>10</sub>/100 ml d'eau. Il faut toutefois mentionner que la persistance du marqueur Pig-2-Bac dans cette étude est probablement surestimée, car les facteurs tels que la lumière ou la prédation, dont l'effet

négalif sur la persistance a déjà été décrit, n'ont pas été pris en compte (Saunders *et al.*, 2009 ; Walters et Field, 2009 ; Walters *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que ces marqueurs peuvent être retrouvés dans les eaux de l'environnement et que leur persistance serait plus faible en été qu'en hiver dans des eaux de rivière saturées en oxygène.

Ces résultats ont été confirmés par la détection et la quantification des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte dans les eaux de l'environnement où des concentrations moyennes comprises entre 2,7 et 6,5 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml d'eau ont été obtenues. Si les marqueurs Hum-1-Bac et Rum-2-Bac ont été quantifiés dans respectivement 43,3 (*n*=60) et 46,3 % (*n*=67) des échantillons d'eau testés, le marqueur Pig-2-Bac n'a été quantifié que dans 16,9 % (*n*=77) des échantillons d'eau (Annexe B). Cependant, si l'on considère uniquement les échantillons d'eau collectés à proximité des élevages porcins (*n*=8), la fréquence de détection du marqueur Pig-2-Bac a été augmentée (62,5 % des échantillons d'eau). D'une façon plus générale, les marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte ont été retrouvés dans les eaux de l'environnement quand les concentrations en *E. coli* étaient supérieures à 500 NPP/100 ml. Toutefois, des données supplémentaires de ces marqueurs dans les eaux sont nécessaires afin d'obtenir une estimation du seuil de concentration en *E. coli* pour lequel les marqueurs *Bacteroidales* seraient toujours quantifiés dans les eaux.

Le panel de marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte développé dans cette étude a permis de différencier l'origine humaine, porcine et ruminant des contaminations fécales dans les eaux de l'environnement. Il était également intéressant de les rechercher dans les coquillages tels que les mollusques bivalves filtreurs (essentiellement les huîtres et les moules). En effet, ces coquillages filtrent la colonne d'eau et en conséquence peuvent bioaccumuler des microorganismes d'origine marine ou entérique dans leurs tissus. L'identification de nos marqueurs dans ces coquillages est une étape essentielle afin de mettre en évidence ces contaminations au niveau des zones conchylicoles et ainsi réduire le risque sanitaire lié à leur consommation. Jusqu'à présent, peu d'études ont été réalisées sur l'application des méthodes TSM aux coquillages. Une étude a été réalisée en contaminant artificiellement des moules avec des effluents de STEP pour rechercher les marqueurs de contamination humaine *esp* et M66 ciblant respectivement *Enterococcus faecium* et *E. faecalis* (Roslev *et al.*, 2009). Une autre étude a été également réalisée sur des huîtres contaminées par des fèces pour rechercher les marqueurs de contamination porcine, ovine et bovine ciblant l'ADN mitochondrial (Baker-Austin *et al.*, 2010). Si l'étude de Roslev *et al.* (2009) a permis de montrer que les marqueurs de la cible *Enterococcus* spp. étaient plus fréquemment retrouvés dans les moules que dans l'eau de mer, Baker-Austin *et al.* (2010) ont

obtenu des résultats en limite de quantification dans les huîtres et les eaux de mer. Deux études ont appliqué des marqueurs TSM sur des coquillages naturellement contaminés. Wolf *et al.* (2010) ont recherché six marqueurs viraux, adénovirus et atadénovirus, pour identifier les contaminations humaines, bovines et porcines sur des lots d'huîtres ( $n=15$ ). Ces marqueurs ont été faiblement détectés avec 7 à 20 % de résultats positifs pour les marqueurs de contaminations humaines, 0 à 13 % de résultats positifs pour les marqueurs de contaminations porcines et 7 à 20 % de résultats positifs pour les marqueurs de contaminations ruminants. Gourmelon *et al.* (2010a) ont pour la première fois recherché les marqueurs *Bacteroidales* de qPCR ciblant les contaminations fécales générales (AllBac), les contaminations fécales d'origine humaine (HF183) et les contaminations fécales d'origine ruminant (BacR), à partir des tissus digestifs de 80 lots de moules et de coques. Pour ces échantillons, les concentrations en *E. coli* étaient supérieures à 230 NPP/100 g de CLI. Si le marqueur AllBac a été quantifié dans la majorité des lots, les marqueurs HF183 et BacR ont respectivement été quantifiés à seulement une et deux reprises. Les résultats obtenus par Gourmelon *et al.* (2010a) ont été confirmés par les résultats obtenus dans notre étude où les marqueurs AllBac, Hum-1-Bac, Pig-2-Bac et Rum-2-Bac ont été très peu détectés dans les tissus digestifs de lots d'huîtres naturellement contaminées ( $n=18$ ). Au contraire, l'approche innovante qui était de rechercher les marqueurs *Bacteroidales* dans une autre fraction de l'huître, les liquides intervalvaires, en appliquant un protocole d'extraction d'ADN bactérien génomique approprié, a permis d'obtenir des résultats très satisfaisants. Les marqueurs AllBac, Hum-1-Bac et Rum-2-Bac ont été quantifiés dans respectivement 17, 10 et quatre échantillons de liquides intervalvaires d'huîtres et ces marqueurs étaient présents dans tous les lots de coquillages présentant des concentrations en *E. coli* supérieures à 3 U. Log<sub>10</sub> NPP/100 g de CLI. Dans les mêmes circonstances, le marqueur Pig-2-Bac n'a été détecté qu'à 5 reprises ( $n=18$ ). Pour les six sites de l'estuaire de l'Elorn étudiés, le nombre d'échantillons quantifiés était plus important parmi les échantillons de liquides intervalvaires d'huîtres que parmi les eaux estuariennes environnantes. En effet, les marqueurs AllBac, Hum-1-Bac et Rum-2-Bac ont été quantifiés dans respectivement 15, 6 et 2 échantillons d'eaux estuariennes ( $n=18$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux de Roslev *et al.* (2009), qui ont montré que les marqueurs TSM étaient plus souvent détectés dans les moules que dans les eaux de mer. Cela montre que les mollusques bivalves filtreurs, de par leur propriétés de bioaccumulation, sont des cibles intéressantes pour identifier les contaminations fécales au niveau des zones conchylicoles.

*Le panel de marqueurs Bacteroidales spécifiques de l'hôte a été quantifié dans les échantillons issus des sources principales de contamination de l'environnement : les fèces, les effluents et les eaux de ruissellement. Les marqueurs ont également été quantifiés dans les eaux de l'environnement et les coquillages malgré leur forte dilution (concentrations 100 à 1 000 fois plus faibles dans l'environnement que dans les effluents). De plus, les effets de deux facteurs abiotiques, l'oxygène dissous et la température, ont été estimés sur leur persistance. Les résultats, obtenus dans les eaux et les coquillages, confirment l'importance des contaminations fécales d'origine humaine et ruminant par rapport aux contaminations d'origine porcine en Bretagne et plus généralement en France. Ce résultat suggère que les apports via les eaux en sortie de STEP, les assainissements autonomes insuffisants ou défectueux des habitations isolées ou le pâturage par les ruminants à proximité des cours d'eau pourraient être des sources plus importantes de contaminations que les épandages des effluents porcins sur les terres agricoles. Cependant, cette hypothèse demande à être confirmée par une application des marqueurs plus fréquente et sur un nombre plus élevé de sites. Nous avons pu confirmer la pertinence de ces marqueurs Bacteroidales spécifiques de l'hôte développés dans cette étude pour identifier l'origine des contaminations fécales dans les eaux et les coquillages. Cependant, ces marqueurs, mis en évidence par des méthodes moléculaires, donnent-ils des résultats qui peuvent être corrélés avec ceux des indicateurs classiques, tel que *E. coli* qui est mis en évidence par des méthodes culturales ?*

Si l'on considère l'ensemble des résultats acquis au cours de cette étude dans les eaux de l'environnement, de faibles corrélations ont été obtenues entre *E. coli* et les marqueurs AllBac, Pig-2-Bac, Rum-2-Bac et Hum-1-Bac (respectivement  $R^2 = 0,29$  -  $n=74$  ;  $R^2 = 0,29$  -  $n=13$  ;  $R^2 = 0,35$  -  $n=31$  et  $R^2 = 0,25$  -  $n=26$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Okabe *et al.* (2007), Gourmelon *et al.* (2010b) et Jeong *et al.* (2010) où les corrélations entre les marqueurs de contamination fécale générale et *E. coli* dans les eaux variaient de 0,24 ( $n=20$ ) à 0,49 ( $n=15$ ). Concernant les marqueurs spécifiques de l'hôte, Okabe *et al.* (2007), Ahmed *et al.* (2008a) et Jeong *et al.* (2010) ont recherché dans les eaux si la présence des marqueurs spécifiques des contaminations fécales humaines était corrélée avec celle des coliformes thermotolérants. Ces études ont montré de faibles corrélations ( $R^2 = 0,12$  (Okabe *et al.*, 2007) et  $R^2 = 0,37$  Jeong *et al.*, 2010) exceptée pour l'étude de Ahmed *et al.* (2008a) où des corrélations significatives ont été obtenues entre les marqueurs de PCR conventionnelle HF183 et HF134 et les indicateurs *E. coli* et les entérocoques ( $p<0,004$ ).

Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer ce manque de corrélation entre les indicateurs et les marqueurs, (i) le mode de détection : les indicateurs classiques sont dénombrés par des méthodes culturales qui ne permettent pas la mise en évidence des bactéries viables non cultivables (VNC) tandis que les marqueurs *Bacteroidales*, quantifiés par des méthodes moléculaires telle que la qPCR, ne permettent pas de différencier les bactéries mortes des bactéries vivantes, cultivables ou non, (ii) le dénombrement des indicateurs classiques, tels que les entérocoques, peut comprendre non seulement des entérocoques d'origine fécale mais également des entérocoques de l'environnement, (iii) la présence de contaminations multiples dans les eaux plutôt que la présence d'une seule source de contamination, et (iv) la persistance des marqueurs au cours des traitements des effluents et dans l'environnement qui peut être différente de celle des indicateurs (Stapleton *et al.*, 2009 ; Jeong *et al.*, 2010).

Des corrélations positives entre *E. coli* et les marqueurs *Bacteroidales* ont été obtenues quand on analyse des échantillons qui présentent un gradient de contamination. Des corrélations élevées ( $R^2 = 0,88$  ;  $n=20$ ) ont été obtenues entre *E. coli* déterminé par culture et le marqueur de contamination fécale porcine Pig-2-Bac dans des échantillons de la chaîne de traitement du lisier. Dans ce type d'échantillons que sont les fèces, les lisiers, les refus de centrifugation et les eaux de lagune, prélevés à différents stades de la chaîne de traitement, il existe un gradient décroissant de concentration en *E. coli*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Savichtcheva *et al.* (2007) où des fortes corrélations entre le marqueur de contamination fécale BacPre1 et les coliformes thermotolérants ont été obtenues en considérant à la fois des échantillons d'effluents et de rivière qui présentaient également un gradient de contamination.

Des corrélations significativement positives ont été obtenues entre les concentrations en *E. coli* et les marqueurs AllBac et Hum-1-Bac dans des eaux estuariennes et des huîtres avec également un effet de la pluviométrie. Une corrélation positive ( $p < 0,05$ ) a également été obtenue entre les concentrations en *E. coli* et le marqueur Hum-1-Bac dans les liquides intervalvaires. Nos résultats de corrélation montrent également que les apports de contaminations fécales sont fortement liés aux conditions de pluviométrie. Les eaux de ruissellement générées pendant ces épisodes pluvieux participeraient à la contamination des eaux et des coquillages situés à proximité des sources d'apports.

*De fortes corrélations ont été obtenues entre les indicateurs classiques et les marqueurs Bacteroidales lorsque l'on considère des échantillons d'effluents et d'eaux où il existe un gradient de contamination. Les corrélations positives obtenues entre E. coli et les marqueurs Bacteroidales dans les eaux et les huîtres de l'estuaire de l'Elorn suite à différentes conditions de pluviométrie, soulignent la vulnérabilité des zones de baignade et des zones conchylicoles aux contaminations fécales. Il est néanmoins plus difficile d'observer des corrélations entre les indicateurs classiques et les marqueurs Bacteroidales dans les eaux de l'environnement lorsque l'on considère que les contaminations sont à des niveaux variables et d'origines multiples et la persistance des indicateurs et des marqueurs peut être différente dans les effluents et les eaux de l'environnement.*

### Conclusion et perspectives :

Pour conclure, ce travail de thèse a montré l'intérêt d'avoir sélectionné la cible *Bacteroidales*, couplée à la PCR quantitative en temps réel, pour identifier l'origine humaine, porcine et ruminant (bovine/ovine) des contaminations fécales dans les eaux de l'environnement et dans les coquillages. Par rapport à la technique de PCR conventionnelle, la qPCR a permis d'accroître la spécificité des résultats en associant des sondes TaqMan® et de fournir des résultats quantitatifs pour chaque marqueur dans des échantillons où les contaminations étaient mixtes. Un panel de quatre marqueurs *Bacteroidales* spécifiques des contaminations fécales humaines (Hum-1-Bac), porcines (Pig-1-Bac et Pig-2-Bac) et ruminant (Rum-2-Bac) a été développé et validé pour évaluer leur sensibilité et spécificité sur des échantillons de fèces et d'effluents. L'originalité de notre travail a consisté à appliquer notre panel sur différents types échantillons de l'environnement. Nous avons analysé des eaux de ruissellement puis des eaux de rivière jusqu'aux eaux estuariennes et *in fine* dans des huîtres. Les résultats que nous avons obtenus sur la détection et la quantification des marqueurs dans ces échantillons suggèrent que notre panel de marqueurs est un outil pertinent pour identifier l'origine des contaminations fécales dans les zones de baignade et les zones conchylicoles.

Ce travail de thèse ouvre de nombreuses perspectives dans l'interprétation des résultats de détection et de quantification de nos marqueurs dans des échantillons de l'environnement. A court terme, la poursuite de l'étude de la persistance de nos marqueurs et la recherche d'un marqueur de contamination fécale aviaire me semblent être aujourd'hui des objectifs

prioritaires. Une étude plus complète sur la persistance des marqueurs Hum-1-Bac, Pig-2-Bac et Rum-2-Bac dans l'environnement, en comparaison avec l'indicateur classique *E. coli*, devrait être réalisée afin de mieux interpréter l'effet des paramètres physico-chimiques. Les résultats obtenus pourraient être comparés à ceux obtenus dans le cadre du projet Marquopoleau (projet national ; fonds FUI, Pôle mer Bretagne, Région Bretagne et collectivités) qui vise à évaluer l'effet de la salinité (microcosmes d'eau douce *versus* microcosmes d'eau de mer) sur la persistance des marqueurs. Il serait également intéressant de sélectionner ou de développer un marqueur de contamination fécale aviaire. Nous avons pu observer que les fientes d'oiseaux sauvages et notamment les oiseaux de bord de mer en colonies (goélands, mouettes...), représentent en zone littorale un risque important de contamination des eaux. De plus, les tables conchylicoles constituent souvent des dortoirs pour ces oiseaux où les densités animales sont très fortes et où les coquillages sont également soumis à un fort risque de contamination. Il nous paraît donc important de posséder également un marqueur de contamination fécale aviaire qui ciblerait plus particulièrement les oiseaux de bord de mer. Toutefois, la piste *Bacteroidales* ne semble pas appropriée pour identifier les contaminations par les oiseaux comme nous avons pu l'observer lors de l'analyse des OTU de *Bacteroidales* obtenues à partir de fientes d'oiseaux et lors de l'application du marqueur *Bacteroidales* général dans les échantillons de fientes aviaires (Derolez *et al.*, 2010). Suite aux travaux de Lu *et al.* (2008), il en ressort que la bactérie *Catellibacterium marimammalium* pourrait être une piste d'investigation intéressante. Le marqueur Gull-2, identifié par ces auteurs, a été testé au laboratoire et s'est avéré uniquement spécifique des contaminations par les goélands et les mouettes (Caprais *et al.*, 2010b). Aux vues des résultats préliminaires, il me semble que des développements supplémentaires de ce marqueur sont encore nécessaires avant de pouvoir l'appliquer dans sur des échantillons d'eaux et de coquillages de l'environnement et d'obtenir des résultats quantitatifs en France.

A moyen terme, il serait nécessaire de valider, à partir des liquides intervalvaires, l'application des marqueurs *Bacteroidales* à l'ensemble des coquillages commercialisés ou ramassés lors de pêches récréatives (moules, coques et palourdes). Il serait également intéressant de comprendre pourquoi les marqueurs ont été peu détectés dans les tissus digestifs par rapport aux liquides intervalvaires. La localisation *in situ* des *Bacteroidales* dans les différents compartiments de l'huître : branchies, tissus digestifs ou gonades, pourrait être étudiée par hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), en s'inspirant de l'étude menée par Hernández-Zárate et Olmos-Soto (2006) qui consistait à étudier la diversité bactérienne présente dans l'huître creuse. L'étude de la persistance des marqueurs dans les coquillages,

toujours en comparaison avec l'indicateur *E. coli*, est une information importante qui devrait aider à mieux comprendre les évènements de contamination. L'objectif final serait de posséder une « boîte à outils eaux-coquillages » avec un panel de marqueurs bactériens, viraux et chimiques pour identifier l'origine des contaminations fécales dans les eaux et les coquillages.

Une autre approche innovante concernant l'utilisation des marqueurs *Bacteroidales* serait à plus long terme de les utiliser afin d'acquérir des données qui alimenteraient des modèles de prédiction pour l'évaluation quantitative du risque sanitaire (QMRA, Quantitative Microbial Risk Assessment). Des données supplémentaires concernant les relations entre les marqueurs *Bacteroidales* et les pathogènes dans les eaux et les coquillages seraient nécessaires. En effet, ces modèles concourent à prédire les concentrations des indicateurs et des pathogènes dans des eaux de baignades et des eaux de consommation selon différents scénarii d'apport de contamination (épandage, STEP...) et d'en déduire le risque pour la santé humaine (Pettersen *et al.*, 2009 ; Schoen et Ashbolt, 2010). L'intégration des marqueurs *Bacteroidales* dans de tels modèles devrait nous permettre de prédire l'origine des contaminations et d'évaluer les risques sanitaires.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- Agreste Scees (2007). "Statistique agricole annuelle : résultats 2006." Chiffres et données Agriculture **191**.
- Ahmed, W., A. Goonetilleke, D. Powell, K. Chauhan and T. Gardner (2009b). "Comparison of molecular markers to detect fresh sewage in environmental waters." Water Research **43**(19): 4908-4917.
- Ahmed, W., A. Goonetilleke, D. Powell and T. Gardner (2009a). "Evaluation of multiple sewage-associated *Bacteroides* PCR markers for sewage pollution tracking." Water Research **43**(19): 4872-4877.
- Ahmed, W., D. Powell, A. Goonetilleke and T. Gardner (2008a). "Detection and source identification of faecal pollution in non-sewered catchment by means of host-specific molecular markers." Water Science and Technology **58**(3): 579-586.
- Ahmed, W., C. S. Stewart, E. A. Gardner and D. Powell (2008c). "A real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of the human-specific *enterococci* surface protein marker in sewage and environmental waters." Environmental Microbiology **10**(12): 3255-3264.
- Ahmed, W., J. Stewart, T. Gardner, D. Powell, P. Brooks, D. Sullivan and N. Tindale (2007). "Sourcing faecal pollution: A combination of library-dependent and library-independent methods to identify human faecal pollution in non-sewered catchments." Water Research **41**(16): 3771-3779.
- Ahmed, W., J. Stewart, D. Powell and T. Gardner (2008b). "Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution." Letters in Applied Microbiology **46**(2): 237-242.
- Allsop, K. and D. J. Stickler (1985). "An assessment of *Bacteroides fragilis* group organisms as indicators of human faecal pollution." Journal of Applied Bacteriology **58**(1): 95-99.
- Amouroux, I. (2009). "Bilan national REMI 2008." Ifremer: 61 p.
- Backhed, F., R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson and J. I. Gordon (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." Science **307**: 1915-1920.
- Bae, S. and S. Wuertz (2009a). "Discrimination of viable and dead fecal *Bacteroidales* bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide." Applied and Environmental Microbiology **75**(9): 2940-2944.
- Bae, S. and S. Wuertz (2009b). "Rapid decay of host-specific fecal *Bacteroidales* cells in seawater as measured by quantitative PCR with propidium monoazide." Water Research **43**(19): 4850-4859.
- Baker-Austin, C., R. Rangdale, J. Lowther and D. Lees (2010). "Application of mitochondrial DNA analysis for microbial source tracking purposes in shellfish harvesting waters." Water Science and Technology **61**(1): 1-7.
- Baker, A. (2002). "Fluorescence properties of some farm wastes: implications for water quality monitoring." Water Research **36**(1): 189-195.
- Baker, A. and R. G. M. Spencer (2004). "Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy." Science of The Total Environment **333**(1-3): 217-232.
- Bakir, M. A., M. Sakamoto, M. Kitahara, M. Matsumoto and Y. Benno (2006). "*Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**(7): 1639-1643
- Barataud, D., A. Doyle, A. Gallay, J. M. Thiolet, F. Le Guyader, E. Kholi and V. Vaillant (2003). "Toxi-infections alimentaires collectives à Norovirus, liées à la consommation d'huitres de l'étang de Thau, France, décembre 2002." Bulletin épidémiologique hebdomadaire, Institut de Veille sanitaire **38**: 177-179.
- Barnes, E. M., G. C. Mead and E. G. Harry (1972). "The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria." British Poultry Science **13**(3): 311-326.
- Baughn, A. D. and M. H. Malamy (2004). "The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen." Nature **427**: 441-444.

- Beekwilder, J., R. Nieuwenhuizen, A. Havelaar and J. Van Duin Leiden (1996). "An oligonucleotide hybridization assay for the identification and enumeration of F-specific RNA phages in surface water." *Journal of Applied Microbiology* **80**(2): 179-186.
- Bell, A., A. Layton, L. McKay, D. Williams, R. Gentry and G. Sayler (2009). "Factors influencing the persistence of fecal *Bacteroides* in stream water." *Journal of Environmental Quality* **38**(3): 1224-1232.
- Bernhard, A. E. and K. G. Field (2000a). "Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4): 1587-94.
- Bernhard, A. E. and K. G. Field (2000b). "A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(10): 4571-4574.
- Blanch, A. R., L. Belanche-Munoz, X. Bonjoch, J. Ebdon, C. Gantzer, F. Lucena, J. Ottoson, C. Kourtis, A. Iversen, I. Kuhn, L. Moce, M. Muniesa, J. Schwartzbrod, S. Skraber, G. Papageorgiou, H. D. Taylor, J. Wallis and J. Jofre (2004). "Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme." *Journal of Water and Health* **2**(4): 249-60.
- Blanch, A. R., L. Belanche-Munoz, X. Bonjoch, J. Ebdon, C. Gantzer, F. Lucena, J. Ottoson, C. Kourtis, A. Iversen, I. Kuhn, L. Moce, M. Muniesa, J. Schwartzbrod, S. Skraber, G. T. Papageorgiou, H. Taylor, J. Wallis and J. Jofre (2006). "Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(9): 5915-5926.
- Bonjoch, X., E. Ballesté and A. R. Blanch (2004). "Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(5): 3171-3175.
- Buchan, A., M. Alber and R. E. Hodson (2001). "Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16S-23S intergenic spacer region." *FEMS Microbiology Ecology* **35**(3): 313-321.
- Buerge, II, T. Poiger, M. D. Muller and H. R. Buser (2003). "Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters." *Environmental Science and Technology* **37**(4): 691-700.
- Bull, I. D., M. J. Lockheart, M. M. Elhmmali, D. J. Roberts and R. P. Evershed (2002). "The origin of faeces by means of biomarker detection." *Environment International* **27**(8): 647-654.
- Caldwell, J. M. and J. F. Levine (2009). "Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination." *Journal of Microbiological Methods* **77**(1): 17-22.
- Caldwell, J. M., M. E. Raley and J. F. Levine (2007). "Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated effluents." *Environmental Science and Technology* **41**(9): 3277-83.
- Caprais, M. P., M. Gourmelon and C. Le Mennec (2010a). "Identification de l'origine de la contamination observée en baie de La Baule." *Rapport final Cap Atlantique*: 60 p.
- Caprais, M. P., C. Le Mennec, S. Lozach, L. Leroi, C. Marin and M. Gourmelon (2010b). "Evaluation of library-independent microbial source tracking methods to identify seabird faecal contamination of the coastal environment in France " Poster, The Water Research Conference 11-14 April 2010. Marriott Lisbon, Portugal.
- Carson, C. A., J. M. Christiansen, H. Yampara-Iquise, V. W. Benson, C. Baffaut, J. V. Davis, R. R. Broz, W. B. Kurtz, W. M. Rogers and W. H. Fales (2005). "Specificity of a *Bacteroides thetaiotaomicron* marker for human feces." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(8): 4945-4949.
- Carson, C. A., B. L. Shear, M. R. Eilersieck and A. Asfaw (2001). "Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping." *Applied and Environmental Microbiology* **67**(4): 1503-7.

- Carson, C. A., B. L. Shear, M. R. Ellersieck and J. D. Schnell (2003). "Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from human and animals." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(3): 1836-9.
- Chinivasagam, H. N., R. J. Thomas, K. Casey, E. McGahan, E. A. Gardner, M. Rafiee and P. J. Blackall (2004). "Microbiological status of piggery effluent from 13 piggeries in the south east Queensland region of Australia." *Journal of Applied Microbiology* **97**(5): 883-891.
- Cole, D., S. C. Long and M. D. Sobsey (2003). "Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(11): 6507-14.
- Cotta, M. A., T. R. Whitehead and R. L. Zeltwanger (2003). "Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits." *Environmental Microbiology* **5**(9): 737-754.
- Craun, G. F., J. M. Brunkard, J. S. Yoder, V. A. Roberts, J. Carpenter, T. Wade, R. L. Calderon, J. M. Roberts, M. J. Beach and S. L. Roy (2010). "Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006." *Clinical Microbiology Reviews* **23**(3): 507-528.
- Crowther, J., D. Kay and M. D. Wyer (2002). "Faecal-indicator concentrations in waters draining lowland pastoral catchments in the UK: relationships with land use and farming practices." *Water Research* **36**(7): 1725-1734.
- Dehority, B. A. and C. G. Orpin (1997). "Development of, and natural fluctuations in rumen microbial populations." Hobson, P. N. and Stewart, C. S. (ed.), *The Rumen Microbial Ecosystems*, 2nd ed., Blackie Academic and Professional, London: 196-245.
- Delmas (2010). "Toxi infections alimentaires, le risque coquillage." Journées LNR microbiologie des coquillages, Nantes, le 16 mars 2010.
- Delmas, G., A. Gallay, E. Espié, S. Haeghebaert, N. Pihier, F. X. Weill, H. De Valk, V. Vaillant and J. C. Désenclos (2006). "Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005." *Bulletin épidémiologique hebdomadaire, Institut de Veille sanitaire* **51-52**: 418-422.
- DePaola, A., J. L. Jones, J. Woods, W. Burkhardt, III, K. R. Calci, J. A. Krantz, J. C. Bowers, K. Kasturi, R. H. Byars, E. Jacobs, D. Williams-Hill and K. Nabe (2010). "Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(9): 2754-2768.
- Derolez, V., O. Serais, M. P. Caprais, J. C. Le Saux and G. Messiaen (2010). "Investigating an avian source of shellfish faecal contamination in the Thau lagoon." 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, June 2009, 14-19, Nantes (France).
- Devane, M. L., B. Robson, F. Nourozi, P. Scholes and B. J. Gilpin (2007). "A PCR marker for detection in surface waters of faecal pollution derived from ducks." *Water Research* **41**(16): 3553-3560.
- Dick, L. K., A. E. Bernhard, T. J. Brodeur, J. W. Santo Domingo, J. M. Simpson, S. P. Walters and K. G. Field (2005). "Host distribution of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(6): 3184-3191.
- Dick, L. K. and K. G. Field (2004). "Rapid estimation of numbers of fecal *Bacteroidetes* by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(9): 5695-5697.
- Dick, L. K., E. A. Stelzer, E. E. Bertke, D. L. Fong and D. M. Stoeckel (2010). "Relative decay of *Bacteroidales* microbial source tracking markers and cultivated *Escherichia coli* in freshwater microcosms." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(10): 3255-3262.
- Dombek, P. E., L. K. Johnson, S. T. Zimmerley and M. J. Sadowsky (2000). "Use of repetitive DNA sequences and the PCR To differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(6): 2572-2577.
- Dorai-Raj, S., J. O. Grady and E. Colleran (2009). "Specificity and sensitivity evaluation of novel and existing *Bacteroidales* and *Bifidobacteria*-specific PCR assays on feces and sewage

- samples and their application for microbial source tracking in Ireland." *Water Research* **43**(19): 4980-4988.
- Dowd, S. E., T. R. Callaway, R. D. Wolcott, Y. Sun, T. McKeegan, R. G. Hagevoort and T. S. Edrington (2008). "Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP)." *BMC Microbiology* **8**(125).
- Downes, J., M. Liu, E. Kononen and W. G. Wade (2009). "*Prevotella micans* sp. nov., isolated from the human oral cavity." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(4): 771-774
- Duncan, S. H., P. Louis and H. J. Flint (2007). "Cultivable bacterial diversity from the human colon." *Letters in Applied Microbiology* **44**(4): 343-50.
- Ebdon, J. E. and H. D. Taylor (2006). "Geographical stability of enterococcal antibiotic resistance profiles in Europe and its implications for the identification of fecal sources." *Environmental Science and Technology* **40**(17): 5327-32.
- Edge, T. A. and S. Hill (2007). "Multiple lines of evidence to identify the sources of fecal pollution at a freshwater beach in Hamilton Harbour, Lake Ontario." *Water Research* **41**(16): 3585-3594.
- Edwards, J. E., N. R. McEwan, A. J. Travis and R. J. Wallace (2004). "16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity." *Antonie van Leeuwenhoek* **86**(3): 263-281.
- Farnleitner, A. H., N. Kreuzinger, G. G. Kavka, S. Grillenberger, J. Rath and R. L. Mach (2000). "Simultaneous detection and differentiation of *Escherichia coli* populations from environmental freshwaters by means of sequence variations in a fragment of the beta-D-glucuronidase gene." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4): 1340-1346.
- Feldhusen, F. (2000). "The role of seafood in bacterial foodborne diseases." *Microbes and Infection* **2**(13): 1651-1660.
- Field, K. G., A. E. Bernhard and T. J. Brodeur (2003). "Molecular approaches to microbiological monitoring: fecal source detection." *Environmental Monitoring and Assessment* **81**(1-3): 313-326.
- Field, K. G. and M. Samadpour (2007). "Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality." *Water Research* **41**(16): 3517-38.
- Fiksdal, L., J. S. Maki, S. J. LaCroix and J. T. Staley (1985). "Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **49**(1): 148-50.
- Fleisher, J. M., D. Kay, M. D. Wyer and A. F. Godfree (1998). "Estimates of the severity of illnesses associated with bathing in marine recreational waters contaminated with domestic sewage." *International Journal of Epidemiology* **27**(4): 722-726.
- Flint, H. J. (1997). "The rumen microbial ecosystem-some recent developments." *Trends in Microbiology* **5**(12): 483-488.
- Fogarty, L. R. and M. A. Voytek (2005). "Comparison of *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(10): 5999-6007.
- Fremaux, B., T. Boa and C. K. Yost (2010). "Quantitative real-time PCR assays for sensitive detection of Canada goose-specific fecal pollution in water sources." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(14): 4886-4889.
- Fremaux, B., J. Gritzfeld, T. Boa and C. K. Yost (2009). "Evaluation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed." *Water Research* **43**(19): 4838-4849.
- Furet, J. P., O. Firmesse, M. Gourmelon, C. Bridonneau, J. Tap, S. Mondot, J. Dore and G. Corthier (2009). "Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR." *FEMS Microbiology Ecology*.
- Gawler, A. H., J. E. Beecher, J. Brandão, N. M. Carroll, L. Falcão, M. Gourmelon, B. Masterson, B. Nunes, J. Porter, A. Rincé, R. Rodrigues, M. Thorp, J. Martin Walters and W. G. Meijer (2007). "Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine

- the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union." *Water Research* **41**(16): 3780-3784.
- Geldreich, E. (1966). "Sanitary significance of fecal coliforms in the environment." Robert A. Taft Sanitary Engineering Center-Cincinnati Ohio.
- Geldreich, E. and B. A. Kenner (1969). "Concepts of faecal streptococci in stream pollution." *Journal Water Pollution Control Federation* **41**(8): 336-352.
- Gilpin, B., T. James, F. Nourozi, D. Saunders, P. Scholes and M. Savill (2003). "The use of chemical and molecular microbial indicators for faecal source identification." *Water Science and Technology* **47**(3): 39-43.
- Gilpin, B. J., J. E. Gregor and M. G. Savill (2002). "Identification of the source of faecal pollution in contaminated rivers." *Water Science and Technology* **46**(3): 9-15.
- Given, S., L. H. Pendleton and A. B. Boehm (2006). "Regional public health cost estimates of contaminated coastal waters: a case study of gastroenteritis at southern california beaches." *Environmental Science and Technology* **40**(16): 4851-4858.
- Glassmeyer, S. T., E. T. Furlong, D. W. Kolpin, J. D. Cahill, S. D. Zaugg, S. L. Werner, M. T. Meyer and D. D. Kryak (2005). "Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination." *Environmental Science and Technology* **39**(14): 5157-5169.
- Gourmelon, M., M. P. Caprais, D. Kay and C. Stapleton (2010a). "Techniques de dépistage des sources de pollution microbiennes." *Techniques Sciences et Méthodes* **4**: 54-64.
- Gourmelon, M., M. P. Caprais, C. Le Mennec, S. Mieszkin, C. Ponthoreau and M. Gendronneau (2010b). "Application of library-independent microbial source tracking methods for identifying the sources of faecal contamination in coastal areas." *Water Sciences and Technology* **61**(6): 1401-1409.
- Gourmelon, M., M. P. Caprais, S. Mieszkin, R. Marti, N. Wéry, E. Jardé, M. Derrien, A. Jadas-Hécart, P. Y. Communal, A. Jaffrezic and A. M. Pourcher (2010c). "Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France." *Water Research* **44** (16): 4812-4824.
- Gourmelon, M., M. P. Caprais, R. Segura, C. Le Mennec, S. Lozach, J. Y. Piriou and A. Rince (2007). "Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(15): 4857-4866.
- Gourmelon, M., J. Cillard and M. Pommepuy (1994). "Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis." *Journal of Applied Bacteriology* **77**(1): 105-112.
- Griffith, J. F., Y. Cao, C. D. McGee and S. B. Weisberg (2009). "Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality." *Water Research* **43**(19): 4900-4907.
- Griffith, J. F., S. B. Weisberg and C. D. McGee (2003). "Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples." *Journal of Water and Health* **1**(4): 141-51.
- Guan, S., R. Xu, S. Chen, J. Odumeru and C. Gyles (2002). "Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animal and human sources." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(6): 2690-8.
- Guillois-Bécel, Y., E. Couturier, J. C. Le Saux, A. M. Roque-Afonso, F. Le Guyader, A. Le Goas, J. Pernès, S. Le Behec, A. Briand, R. C., E. Dussaix, M. Pommepuy and V. Vaillant (2009). "An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007." *Eurosurveillance* **14**(10): 1-6.
- Hagedorn, C., J. B. Crozier, K. A. Mentz, A. M. Booth, A. K. Graves, N. J. Nelson and R. B. Reneau, Jr. (2003). "Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water." *Journal of Applied Microbiology* **94**(5): 792-9.
- Hagedorn, C. and S. B. Weisberg (2009). "Chemical-based fecal source tracking methods: current status and guidelines for evaluation." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **8**(3): 275-287.

- Harwood, V. J., M. Brownell, S. Wang, J. Lepo, R. D. Ellender, A. Ajidahun, K. N. Hellein, E. Kennedy, X. Ye and C. Flood (2009). "Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico." *Water Research* **43**(19): 4812-4819.
- Harwood, V. J., B. Wiggins, C. Hagedorn, R. D. Ellender, J. Gooch, J. Kern, M. Samadpour, A. C. Chapman, B. J. Robinson and B. C. Thompson (2003). "Phenotypic library-based microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study." *J Water Health* **1**(4): 153-66.
- Herbert, T., K. Reddersen and A. Mechlinski (2002). "From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas." *Water Science and Technology* **46**(3): 81-88.
- Hernández-Zárate, G. and J. Olmos-Soto (2006). "Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent *in situ* hybridization and polymerase chain reaction." *Journal of Applied Microbiology* **100**(4): 664-672.
- Hill, V. R. and M. Sobsey (2003). "Performance of swine waste lagoons for removing *Salmonella* and enteric microbial indicators." *Transactions of the Asae* **46**(3): 781-788.
- Hold, G. L., S. E. Pryde, V. J. Russell, E. Furrrie and H. J. Flint (2002). "Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis." *FEMS Microbiology Ecology* **39**(1): 33-39.
- Hsu, F. C., Y. S. Shieh, J. van Duin, M. J. Beekwilder and M. D. Sobsey (1995). "Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(11): 3960-3966.
- Hubbard, R. K., G. L. Newton and G. M. Hill (2004). "Water quality and the grazing animal." *Journal of Animal Science* **82**(13\_suppl): E255-263.
- Hudson, N., A. Baker and D. Reynolds (2007). "Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters—a review." *River Research and Applications* **23**(6): 631-649.
- Hundesda, A., S. Bofill-Mas, C. Maluquer de Motes, J. Rodriguez-Manzano, A. Bach, M. Casas and R. Girones (2010). "Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool." *Journal of Virological Methods* **163**(2): 385-389.
- Hundesda, A., C. Maluquer de Motes, N. Albinana-Gimenez and R. Girones (2009). "Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment." *Journal of Virological Methods* **158**(1-2): 130-135.
- Hundesda, A., C. Maluquer de Motes, S. Bofill-Mas, N. Albinana-Gimenez and R. Girones (2006). "Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(12): 7886-7893.
- Iannotti, E. L., J. R. Fischer and D. M. Sievers (1982). "Characterization of bacteria from a swine manure digester." *Applied and Environmental Microbiology* **43**(1): 136-143.
- Jaffrezic, A., E. Jardé, A. M. Pourcher, M. Gourmelon, M. P. Caprais, D. Heddadj, P. Cottinet, M. Bilal, M. Derrien, R. Marti and S. Mieszkin (Soumis). "Microbial and chemical markers: runoff transfer in animal manure-amended soils." Soumis à *Journal of Environmental Quality*.
- Jardé, E., G. Gruau and A. Jaffrezic (2009). "Tracing and Quantifying Sources of Fatty Acids and Steroids in Amended Cultivated Soils." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(6950-6956).
- Jardé, E., G. Gruau and L. Mansuy-Huault (2007b). "Detection of manure-derived organic compounds in rivers draining agricultural areas of intensive manure spreading." *Applied Geochemistry* **22**(8): 1814-1824.
- Jardé, E., G. Gruau, L. Mansuy-Huault, P. Peu and J. Martinez (2007a). "5b-Cholestanol/C27-sterol to monitor pig slurry in amended soils." *Water Air and Soil Pollution* **178**(1-4): 169-178.

- Jenkins, M. W., S. Tiwari, M. Lorente, C. M. Gichaba and S. Wuertz (2009). "Identifying human and livestock sources of fecal contamination in Kenya with host-specific *Bacteroidales* assays." *Water Research* **43**(19): 4956-4966.
- Jeong, J. Y., H. D. Park, K. H. Lee, J. H. Hwang and J. O. Ka (2010). "Quantitative analysis of human and cow-specific 16S rRNA gene markers for assessment of fecal pollution in river waters by real-time PCR." *Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**(2): 245-253.
- Jimenez-Clavero, M. A., E. Escribano-Romero, C. Mansilla, N. Gomez, L. Cordoba, N. Roblas, F. Ponz, V. Ley and J.-C. Saiz (2005). "Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive Real-Time Reverse Transcription-PCR." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(7): 3536-3543.
- Jimenez-Clavero, M. A., C. Fernandez, J. A. Ortiz, J. Pro, G. Carbonell, J. V. Tarazona, N. Roblas and V. Ley (2003). "Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(10): 6311-5.
- Johannessen, G. S., R. B. Frøseth, L. Solemdal, J. Jarp, Y. Wasteson and L. M. Rørvik (2004). "Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic Iceberg lettuce." *Journal of Applied Microbiology* **96**(4): 787-794.
- Kay, D., F. Jones, M. D. Wyer, J. M. Fleisher, R. L. Salmon, A. F. Godfree, A. Zelenauch-Jacquotte and R. Shore (1994). "Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure." *The Lancet* **344**(8927): 905-909.
- Khatib, L. A., Y. L. Tsai and B. H. Olson (2002). "A biomarker for the identification of cattle fecal pollution in water using the LTIIa toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**(1): 97-104.
- Khatib, L. A., Y. L. Tsai and B. H. Olson (2003). "A biomarker for the identification of swine fecal pollution in water, using the STII toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**(2): 231-238.
- Kildare, B. J., C. M. Leutenegger, B. S. McSwain, D. G. Bambic, V. B. Rajal and S. Wuertz (2007). "16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: a Bayesian approach." *Water Research* **41**(16): 3701-3715.
- Kim, D. H., J. Brunt and B. Austin (2007). "Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Journal of Applied Microbiology* **102**(6): 1654-1664.
- Kim, G., E. Choi and D. Lee (2005). "Diffuse and point pollution impacts on the pathogen indicator organism level in the Geum river, Korea." *Science of the Total Environment*. **350**(1-3): 94-105.
- Kim, S.-Y., J. E. Lee, S. Lee, H. T. Lee, H.-G. Hur and G. Ko (2010). "Characterization of *Enterococcus* spp. from human and animal feces using 16S rRNA sequences, the *esp* gene, and PFGE for microbial source tracking in Korea." *Environmental Science and Technology* **44**(9): 3423-3428.
- King, E. L., D. S. Bacheon and K. W. Gates (2007). "Rapid detection of human fecal contamination in estuarine environments by PCR targeting of *Bifidobacterium adolescentis*." *Journal of Microbiological Methods* **68**(1): 76-81.
- Klappenbach, J. A., P. R. Saxman, J. R. Cole and T. M. Schmidt (2001). "rrndb: the ribosomal RNA operon copy Number database." *Nucleic Acids Research* **29**(1): 181-184.
- Konstantinov, S. R., H. Smidt and W. M. d. Vos (2005). "Representational difference analysis and real-time PCR for strain-specific quantification of *Lactobacillus sobrius* sp. nov." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(11): 7578-7581.
- Kreider, C. A. (1995). "Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(4): 1171-9.
- Kreider, C. A. (1998). "Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water." *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10): 4103-4105.
- Lamendella, R., J. W. Domingo, D. B. Oerther, J. R. Vogel and D. M. Stoeckel (2007). "Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and

- phylogenetic analyses of *Bacteroidetes* 16S rRNA gene." *FEMS Microbiology Ecology* **59**(3): 651-660.
- Lamendella, R., J. W. Santo Domingo, A. C. Yannarell, S. Ghosh, G. Di Giovanni, R. I. Mackie and D. B. Oerther (2009). "Evaluation of swine-specific PCR assays used for fecal source tracking and analysis of molecular diversity of swine-specific "*Bacteroidales*" populations." *Applied and Environmental Microbiology* **75**(18): 5787-5796.
- Lan, P. T. N., M. Sakamoto, S. Sakata and Y. Benno (2006). "*Bacteroides barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov., isolated from chicken caecum." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(12): 2853-2859.
- Lang, N., M. Bellett-Travers and S. Smith (2007). "Field investigations on the survival of *Escherichia coli* and presence of other enteric micro-organisms in biosolids-amended agricultural soil." *Journal of Applied Microbiology* **103**(5): 1868-1882.
- Larney, F. J., L. J. Yanke, J. J. Miller and T. A. McAllister (2003). "Fate of coliform bacteria in composted beef cattle feedlot manure." *Journal of Environmental Quality* **32**(4): 1508-1515.
- Lawson, P. A., M. D. Collins, E. Falsen and G. Foster (2006). "*Catelicoccus marimammalium* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-positive, catalase-negative, coccus-shaped bacterium from porpoise and grey seal." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(2): 429-432.
- Lay, C., L. Rigottier-Gois, K. Holmstrom, M. Rajilic, E. E. Vaughan, W. M. de Vos, M. D. Collins, R. Thiel, P. Namsolleck, M. Blaut and J. Dore (2005). "Colonic microbiota signatures across five northern european countries." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(7): 4153-4155.
- Layton, A., L. McKay, D. Williams, V. Garrett, R. Gentry and G. Sayler (2006). "Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6): 4214-24.
- Layton, A., S. P. Walters, L. H. Lam and A. B. Boehm (2009). "*Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR." *Journal of Applied Microbiology* **109**(2): 539-547.
- Le Guyader, F. S., J. Krol, K. Ambert-Balay, N. Ruvoen-Clouet, B. Desaubliaux, S. Parnaudeau, J.-C. Le Saux, A. Ponge, P. Pothier, R. L. Atmar and J. Le Pendu (2010). "Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer." *Journal of Clinical Microbiology* **48**(3): 915-920.
- Lee, Y.-J., M. Molina, J. W. Santo Domingo, J. D. Willis, M. Cyterski, D. M. Endale and O. C. Shanks (2008). "Temporal assessment of the impact of exposure to cow feces in two watersheds by multiple host-specific PCR assays." *Applied and Environmental Microbiology* **74**(22): 6839-6847.
- Leeming, R., A. Ball, N. Ashbolt and P. Nichols (1996). "Using fecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollutoin in receiving waters." *Water Research* **30**(12): 2893-2900.
- Leser, T. D., J. Z. Amenuvor, T. K. Jensen, R. H. Lindecrona, M. Boye and K. Moller (2002). "Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(2): 673-690.
- Leung, K. T., R. Mackereth, Y. Tien and E. Topp (2004). "A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources." *FEMS Microbiology Ecology* **47**: 111-119.
- Levesque, B., P. Brousseau, P. Simard, E. Dewailly, M. Meisels, D. Ramsay and J. Joly (1993). "Impact of the ring-billed gull (*Larus delawarensis*) on the microbiological quality of recreational water." *Applied and Environmental Microbiology* **59**(4): 1228-1230.
- Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, S. Klein and J. I. Gordon (2006). "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." *Nature* **444**: 1022-1023.

- Ley, V., J. Higgins and R. Fayer (2002). "Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(7): 3455-61.
- Lu, J. and J. S. Domingo (2008). "Turkey fecal microbial community structure and functional gene diversity revealed by 16S rRNA gene and metagenomic sequences." *Journal of Microbiology* **46**(5): 469-77.
- Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer and M. D. Lee (2003). "Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(11): 6816-24.
- Lu, J., J. W. Santo Domingo, S. Hill and T. A. Edge (2009). "Microbial diversity and host-specific sequences of Canada goose feces." *Applied and Environmental Microbiology* **75**(18): 5919-5926.
- Lu, J., J. W. Santo Domingo, R. Lamendella, T. Edge and S. Hill (2008). "Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces." *Applied and Environmental Microbiology* **74**(13): 3969-3976.
- Ludwing, W., J. Euzéby and W. B. Whitman (2008). "Draft taxonomic outline of the *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Dictyoglomi*, and *Gemmatimonadetes*." In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 4. Edited by N. R. Krieg, J. T. Staley, B. Hedlund, B. J. Paster, N. Ward, W. Ludwig & W. B. Whitman. New York: Springer.
- Lynch, P. A., B. J. Gilpin, L. W. Sinton and M. G. Savill (2002). "The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridation as an indicator of human faecal pollution." *Journal of Applied Microbiology* **92**(3): 526-533.
- Maluquer de Motes, C., P. Clemente-Casares, A. Hundesa, M. Martin and R. Girones (2004). "Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(3): 1448-54.
- Mara, D. D. and J. I. Oragui (1983). "Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution." *Journal of Applied Bacteriology* **55**(2): 349-57.
- Martel, A. (1996). "Etude de la pollution microbiologique d'origine animale sur le littoral Normand." Mémoire de stage de fin d'études - Institut Supérieur d'Agriculture: 59 p.
- Martellini, A., P. Payment and R. Villemur (2005). "Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water." *Water Research* **39**(4): 541-548.
- Marti, R., P. Dabert and A.-M. Pourcher (2009). "Pig manure contamination marker selection based on the influence of biological treatment on the dominant fecal microbial groups." *Applied and Environmental Microbiology* **75**(15): 4967-4974.
- Marti, R., P. Dabert, C. Ziebal and A.-M. Pourcher (2010). "Evaluation of *Lactobacillus sobrius*/*L. amylovorus* as a new microbial marker of pig manure." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(5): 1456-1461.
- Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, T. Takada and R. Tanaka (2004). "Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(12): 7220-7228.
- McLain, J. E., H. Ryu, L. Kabiri-Badr, C. M. Rock and M. Abbaszadegan (2009). "Lack of specificity for PCR assays targeting human *Bacteroides* 16S rRNA gene: cross-amplification with fish feces." *FEMS Microbiology Letters* **299**(1): 38-43.
- McLaughlin, J. G., A. DePaola, C. A. Bopp, K. A. Martinek, N. P. Napolilli, C. G. Allison, S. L. Murray, E. C. Thompson, M. M. Bird and J. P. Middaugh (2005). "Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters." *The new england journal of medicine* **353**(14): 1463-1470.
- McQuaig, S. M., T. M. Scott, V. J. Harwood, S. R. Farrah and J. O. Lukasik (2006). "Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(12): 7567-74.
- McQuaig, S. M., T. M. Scott, J. O. Lukasik, J. H. Paul and V. J. Harwood (2009). "Quantification of human Polyomaviruses JC virus and BK Vvirus by TaqMan quantitative PCR and

- comparison to other water quality indicators in water and fecal samples." *Applied and Environmental Microbiology* **75**(11): 3379-3388.
- Mead, G. C. (1989). "Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized." *Journal of Experimental Zoology (Suppl)* **3**(1): 48-54.
- Mieszkin, S. (2007). "Identification de l'origine humaine ou animale d'une contamination fécale de l'environnement : recherche par PCR en temps réel de marqueurs hôte-spécifiques de *Bacteroidetes*." Rapport de master II recherche UBO/IUEM/Ifremer Brest: 33p.
- Mieszkin, S., J. P. Furet, G. Corthier and M. Gourmelon (2009). "Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by Real-Time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers." *Applied and Environmental Microbiology*.
- Mieszkin, S., J. F. Yala, R. Joubrel and M. Gourmelon (2010). "Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR." *Journal of Applied Microbiology* **108**(3): 974-984.
- Mishra, A., B. L. Benham and S. Mostaghimi (2008). "Bacterial Transport from Agricultural Lands Fertilized with Animal Manure." *Water, Air, and Soil Pollution* **189**(1-4): 127-134.
- Monfort, P. (2006). "Microbiologie et coquillages." note technique: 16 p.
- Moore, W. E. C., E. P. Cato and L. V. H. Moore (1985). "Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 Approved Lists of Bacterial Names (1 January 1980 to 1 January 1985)." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **35**(3): 382-407.
- Myoda, S. P., C. A. Carson, J. J. Fuhrmann, B. K. Hahm, P. G. Hartel, H. Yampara-Lquise, L. Johnson, R. L. Kuntz, C. H. Nakatsu, M. J. Sadowsky and M. Samadpour (2003). "Comparison of genotypic-based microbial source tracking methods requiring a host origin database." *Journal of Water and Health* **1**(4): 167-80.
- Naden, P. S., G. H. Old, C. Eliot-Laize, S. J. Granger, J. M. B. Hawkins, R. Bol and P. Haygarth (2010). "Assessment of natural fluorescence as a tracer of diffuse agricultural pollution from slurry spreading on intensely-farmed grasslands." *Water Research* **44**(6): 1701-1712.
- Nebra, Y. and A. R. Blanch (1999). "A new selective medium for *Bifidobacterium* spp." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(11): 5173-5176.
- Nishiyama, T., A. Ueki, N. Kaku, K. Watanabe and K. Ueki (2009). "*Bacteroides graminisolvens* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(8): 1901-1907
- Ogorzaly, L. and C. Gantzer (2006). "Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater." *Journal of Virological Methods* **138**(1-2): 131-139.
- Ogorzaly, L., A. Tissier, I. Bertrand, A. Maul and C. Gantzer (2009). "Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water." *Water Research* **43**(5): 1257-1264.
- Ohkuma, M., Noda, S, Hongoh, Y and T. Kudo (2002). "Diverse bacteria related to the *Bacteroides* subgroup of the CFB phylum within the gut symbiotic communities of various termites." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **66**(1): 78-84.
- Okabe, S., N. Okayama, O. Savichtcheva and T. Ito (2007). "Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater." *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(4): 890-901.
- Okabe, S. and Y. Shimazu (2007). "Persistence of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity." *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**(4): 935-944.
- Oliver, D. M., P. M. Haygarth, C. D. Clegg and A. L. Heatwaite (2006). "Differential *E. coli* die-off patterns associated with agricultural matrices." *Environmental Science and Technology* **40**(18): 5710-5716.

- Ozutsumi, Y., H. Hayashi, M. Sakamoto, H. Itabashi and Y. Benno (2005). "Culture-independent analysis of fecal microbiota in cattle." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **69**(9): 1793-1797.
- Pappas, A. E., R. S. Kanwar, J. L. Baker, J. C. Lorimor and S. Mickelson (2008). "Fecal indicator bacteria in subsurface drain water following swine manure application." *Transactions of the Asae* **51**(5): 1567-1573.
- Parveen, S., N. C. Hodge, R. E. Stall, S. R. Farrah and M. L. Tamplin (2001). "Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherichia coli*." *Water Research* **35**(2): 379-86.
- Parveen, S., K. M. Portier, K. Robinson, L. Edmiston and M. L. Tamplin (1999). "Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(7): 3142-3147.
- Payan, A., J. Ebdon, H. Taylor, C. Gantzer, J. Ottoson, G. T. Papageorgiou, A. R. Blanch, F. Lucena, J. Jofre and M. Muniesa (2005). "Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(9): 5659-62.
- Perra, A., V. Servas, G. Terrier, D. Postic, G. Baranton, G. André-Fontaine, V. Vaillant and I. Capek (2002). "Cas groupés de leptospirose à Rochefort, juin 2001." *Bulletin épidémiologique hebdomadaire, Institut de Veille sanitaire* **35**: 169-171.
- Petterson, S. R., N. Dumoutier, J. F. Loret and N. Ashbolt (2009). "Quantitative Bayesian predictions of source water concentration for QMRA from presence/absence data for *E. coli* O157:H7." *Water Science and Technology* **59**(11): 2245-2252
- Plummer, J. D. and S. C. Long (2007). "Monitoring source water for microbial contamination: evaluation of water quality measures." *Water Research* **41**(16): 3716-28.
- Pompey, M., D. Hervio-Heath, M. P. Caprais, M. Gourmelon, J. C. Le Saux and F. Le Guyader (2005). "Fecal contamination in coastal areas: an engineering approach." *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*, Book chapter: 331-359.
- Pourcher, A. M. (1991a). "Contribution à l'étude de l'origine (humaine ou animal) de la contamination fécale des eaux de surface." Thèse de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois: 125 p.
- Pourcher, A. M., L. A. Devriese, J. F. Hernandez and J. M. Delattre (1991b). "Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and *enterococci* as indicators of the origin of faecal pollution of waters." *Journal of Applied Microbiology* **70**(6): 525-530.
- Pourcher, A. M., A. Gosinska, F. Picard-Bonnaud, P. Morand, V. Ferré, S. Monpoeho, M. Federighi, V. Stan and G. Moguedet (2005). "Land application and composting: a comparative sanitary study of two routes of sludge." *International conference on engineering for waste treatment*, Albi, France: 8 p.
- Pourcher, A. M., F. Picard-Bonnaud, V. Ferré, A. Gosinska, V. Stan and G. Moguedet (2007). "Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge." *Applied Soil Ecology* **35**(3): 473-479.
- Pruss, A. (1998). "Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water." *International Journal of Epidemiology* **27**(1): 1-9.
- Puig, A., N. Queralt, J. Jofre and R. Araujo (1999). "Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(4): 1772-6.
- Rambaud, J. C., J. P. Buts, G. Corthier and B. Flourié (2004). "Flore microbienne intestinale, physiologie et pathologie digestives." *John Libbey Eurotext*: 247 p.
- Reischer, G. H., J. M. Haider, R. Sommer, H. Stadler, K. M. Keiblinger, R. Hornek, W. Zerobin, R. L. Mach and A. H. Farnleitner (2008). "Quantitative microbial faecal source tracking with sampling guided by hydrological catchment dynamics." *Environmental Microbiology* **10**(10): 2598-2608.
- Reischer, G. H., D. C. Kasper, R. Steinborn, A. H. Farnleitner and R. L. Mach (2007). "A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human

- faecal influence in spring water from a large alpine catchment area." *Letter Applied Microbiology* **44**(4): 351-6.
- Reischer, G. H., D. C. Kasper, R. Steinborn, R. L. Mach and A. H. Farnleitner (2006). "Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(8): 5610-5614.
- Resnick, I. G. and M. A. Levin (1981). "Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution." *Applied and Environmental Microbiology* **42**(3): 433-438.
- Rigottier-Gois, L., V. Rochet, N. Garrec, A. Suau and J. Dore (2003). "Enumeration of *Bacteroides* species in human faeces by fluorescent *in situ* hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes." *Systematic and Applied Microbiology* **26**(1): 110-118.
- Roberts, P. J. and N. Williams (1992). "Modeling of ocean outfall discharges." *Water Science and Technology* **25**(9): 155-164.
- Rocha, E. R., C. D. Herren, D. J. Smalley and C. J. Smith (2003). "The complex oxidative stress response of *Bacteroides fragilis*: the role of OxyR in control of gene expression." *Anaerobe* **9**(4): 165-73.
- Roslev, P., L. Iversen, H. L. S nderbo, N. Iversen and S. Bastholm (2009). "Uptake and persistence of human associated *Enterococcus* in the mussel *Mytilus edulis*: relevance for faecal pollution source tracking." *Journal of Applied Microbiology* **107**(3): 944-953.
- Rowbotham, T. J. and T. Cross (1977). "*Rhodococcus coprophilus* sp. nov.: an aerobic nocardioform actinomycete belonging to the 'rhodochrous' complex." *Journal of General Microbiology* **100**(1): 123-138.
- Rozen, Y. and S. Belkin (2001). "Survival of enteric bacteria in seawater." *FEMS Microbiology Reviews* **25**(5): 513-529.
- Sakamoto, M., H. Kumada, N. Hamada, Y. Takahashi, M. Okamoto, M. A. Bakir and Y. Benno (2009). "*Prevotella falsenii* sp. nov., a *Prevotella* intermedia-like organism isolated from monkey dental plaque." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(2): 319-322.
- Salanitro, J. P., I. G. Blake and P. A. Muirhead (1977). "Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine." *Applied and Environmental Microbiology* **33**(1): 79-84.
- Salomon, J. C. and M. Pommepuy (1990). "Mathematical model of bacterial contamination of the morlaix estuary (france)." *Water Research* **24**(8): 983-994.
- Salyers, A. A. (1984). "*Bacteroides* of the human lower intestinal tract." *Annual Review of Microbiology* **38**(2): 293-313.
- Santo Domingo, J. W., D. G. Bambic, T. A. Edge and S. Wuertz (2007). "Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution." *Water Research* **41**(16): 3539-52.
- Santo Domingo, J. W., M. G. Kaufman, M. J. Klug and J. M. Tiedje (1998). "Characterization of the cricket hindgut microbiota with fluorescently labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes." *Applied and Environmental Microbiology* **64**(2): 752-755.
- Saunders, A. M., A. Kristiansen, M. B. Lund, N. P. Revsbech and A. Schramm (2009). "Detection and persistence of fecal *Bacteroidales* as water quality indicators in unchlorinated drinking water." *Systematic and Applied Microbiology* **32**(5): 362-370.
- Savage, D. C. (1977). "Microbial ecology of the gastrointestinal tract." *Annual Review of Microbiology* **31**: 107-133.
- Savichtcheva, O., N. Okayama, T. Ito and S. Okabe (2005). "Application of a direct fluorescence-based live/dead staining combined with fluorescence *in situ* hybridization for assessment of survival rate of *Bacteroides* spp. in drinking water." *Biotechnology and Bioengineering* **92**(3): 356-363.
- Savichtcheva, O., N. Okayama and S. Okabe (2007). "Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators." *Water Research* **41**(16): 3615-3628.

- Savill, M. G., S. R. Murray, P. Scholes, E. W. Maas, R. E. McCormick, E. B. Moore and B. J. Gilpin (2001). "Application of polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan PCR techniques to the detection and identification of *Rhodococcus coprophilus* in faecal samples." *Journal of Microbiological Methods* **47**(3): 355-68.
- Schoen, M. E. and N. J. Ashbolt (2010). "Assessing pathogen risk to swimmers at non-sewage impacted recreational beaches." *Environmental Science and Technology* **44**(7): 2286-2291.
- Scott, T. M., T. M. Jenkins, J. Lukasik and J. B. Rose (2005). "Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution." *Environmental Science and Technology* **39**(1): 283-7.
- Scott, T. M., S. Parveen, K. M. Portier, J. B. Rose, M. L. Tamplin, S. R. Farrah, A. Koo and J. Lukasik (2003). "Geographical variation in ribotype profiles of *Escherichia coli* isolates from humans, swine, poultry, beef, and dairy cattle in Florida." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(2): 1089-92.
- Scott, T. M., J. B. Rose, T. M. Jenkins, S. R. Farrah and J. Lukasik (2002). "Microbial source tracking: current methodology and future directions." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(12): 5796-5803.
- Seurinck, S., T. Defoirdt, W. Verstraete and S. D. Siciliano (2005). "Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater." *Environmental Microbiology* **7**(2): 249-59.
- Seyfried, P. L., R. S. Tobin, N. E. Brown and P. F. Ness (1985a). "A prospective study of swimming-related illness. I. Swimming-associated health risk." *American Journal of Public Health* **75**(9): 1068-1070.
- Seyfried, P. L., R. S. Tobin, N. E. Brown and P. F. Ness (1985b). "A prospective study of swimming-related illness. II. Morbidity and the microbiological quality of water." *American Journal of Public Health* **75**(9): 1071-1075.
- Sezgin, M., M. P. Lechevalier and P. R. Karr (1988). "Isolation and identification of actinomycetes present in activated sludge scum." *Water Science and Technology* **20**(11-12): 257-263.
- Sghir, A., G. Gramet, A. Suau, V. Rochet, P. Pochart and J. Dore (2000). "Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(5): 2263-2266.
- Shah, H. N. and M. D. Collins (1989). "Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **39**(1): 85-87.
- Shah, H. N. and M. D. Collins (1990). "*Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*." *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**(2): 205-208
- Shanks, O. C., E. Atikovic, A. D. Blackwood, J. Lu, R. T. Noble, J. S. Domingo, S. Seifring, M. Sivaganesan and R. A. Haugland (2008). "Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution." *Applied and Environmental Microbiology* **74**(3): 745-752.
- Shanks, O. C., J. W. Domingo, J. Lu, C. A. Kelty and J. E. Graham (2007). "Identification of bacterial DNA markers for the detection of human fecal pollution in water." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(8): 2416-2422.
- Shanks, O. C., J. W. Santo Domingo, R. Lamendella, C. A. Kelty and J. E. Graham (2006). "Competitive metagenomic DNA hybridization identifies host-specific microbial genetic markers in cow fecal samples." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6): 4054-4060.
- Shanks, O. C., K. White, C. A. Kelty, S. Hayes, M. Sivaganesan, M. Jenkins, M. Varma and R. A. Haugland (2010). "Performance assessment PCR-based assays targeting *Bacteroidales* genetic markers of bovine fecal pollution." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(5): 1359-1366.

- Silkie, S. S. and K. L. Nelson (2009). "Concentrations of host-specific and generic fecal markers measured by quantitative PCR in raw sewage and fresh animal feces." *Water Research* **43**(19): 4860-4871.
- Simpson, J. M., J. W. Santo Domingo and D. J. Reasoner (2002). "Microbial source tracking: state of the science." *Environmental Science and Technology* **36**(24): 5279-5288.
- Sistani, K. R., C. H. Bolster, T. R. Way, H. A. Tobert, D. H. Pote and D. B. Watts (2010). "Influence of poultry litter application methods on the longevity of nutrient and *E. coli* in runoff from Tall Fescue pasture." *Water, Air and Soil Pollution* **206**(1-4): 3-12.
- Snell-Castro, R., J. J. Godon, J. P. Delgenès and P. Dabert (2005). "Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis." *FEMS Microbiology Ecology* **52**(2): 229-242.
- Somarelli, J. A., J. C. Makarewicz, R. Sia and R. Simon (2007). "Wildlife identified as major source of *Escherichia coli* in agriculturally dominated watersheds by BOX A1R-derived genetic fingerprints." *Journal of Environmental Management* **82**(1): 60-65.
- Soupir, M. L., S. Mostaghimi, E. R. Yagow, C. Hagedorn and D. H. Vaughan (2006). "Transport of fecal bacteria from poultry litter and cattle manures applied to pastureland." *Water, Air and Soil Pollution* **169**(1-4): 135-136.
- Spoelstra, S. F. (1978). "Enumeration and isolation of anaerobic microbiota of piggery wastes." *Applied and Environmental Microbiology* **35**(5): 841-846.
- Standley, L. J., L. A. Kaplan and D. Smith (2000). "Molecular tracers of organic matter sources to surface water resources." *Environmental Science and Technology* **34**(15): 3124-3130.
- Stapleton, C. M., D. Kay, M. D. Wyer, C. Davies, J. Watkins, C. Kay, A. T. McDonald, J. Porter and A. Gawler (2009). "Evaluating the operational utility of a *Bacteroidales* quantitative PCR-based MST approach in determining the source of faecal indicator organisms at a UK bathing water." *Water Research* **43**(19): 4888-4899.
- Stevenson, D. M. and P. J. Weimer (2007). "Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR." *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**(1): 165-174.
- Stewart-Pullaro, J., J. Daugomah, D. Chestnut, D. Graves, M. Sobsey and G. Scott (2006). "F+RNA coliphage typing for microbial source tracking in surface waters." *Journal of Applied Microbiology* **101**(5): 1015-1026.
- Su, Y., W. Yao, O. N. Perez-Gutierrez, H. Smidt and W. Y. Zhu (2008). "Changes in abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning." *FEMS Microbiology Ecology* **66**(3): 546-55.
- Suau, A., R. Boonet, M. Sutren, J. J. Godon, G. Gibson, M. Collins and J. Doré (1999). "Direct analysis of gene encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(11): 4799-4807.
- Tajima, K., R. I. Aminov, T. Nagamine, K. Ogata, M. Nakamura, H. Matsui and Y. Benno (1999). "Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries." *FEMS Microbiology Ecology* **29**(2): 159-169.
- Takada, H. and R. P. Eganhouse (1998). Molecular markers of anthropogenic waste. *Encyclopedia of environmental analysis and remediation*. R. A. Meyers, Wiley, J.: 2883-2940.
- Tap, J., S. Mondot, F. Levenez, E. Pelletier, C. Caron, J. P. Furet, E. Ugarte, R. Muñoz-Tamayo, D. L. E. Paslier, R. Nalin, J. Doré and M. Leclerc (2009). "Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core." *Environmental Microbiology* **11**(10): 2574-2584.
- Tartera, C. and J. Jofre (1987). "Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters." *Applied and Environmental Microbiology* **53**(7): 1632-7.
- Templier, C. and O. Barriere (2009). "Simulation de la qualité des eaux de baignade en mer, impact de la nouvelle directive Européenne 2006/7/CE sur le classement des plages françaises pour la saison 2008." *Rapport de la Surfriider foundation Europe*: 87 p.
- Ternes, T. A. (1998). "Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers." *Water Research* **32**(11): 3245-3260.

- Therre, H., H. De Valk, V. Vaillant, P. Beaudou and D. Mouly (2009). "Bilan des épidémies d'origine hydrique investiguées en France depuis 1998 et principales recommandations." Institut de Veille sanitaire: 5 p.
- Thurston-Enriquez, J. A., J. E. Gilley and B. Eghball (2005). "Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry." *Journal of Water and Health* **3**(2): 157-71.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis and J. I. Gordon (2006). "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." *Nature* **444**: 1027-1131.
- Tyagi, P., D. R. Edwards and M. S. Coyne (2007). "Use of selected chemical markers in combination with a multiple regression model to assess the contribution of domesticated animal sources of fecal pollution in the environment." *Chemosphere* **69**: 1617-1624.
- Tyagi, P., D. R. Edwards and M. S. Coyne (2008). "Use of sterol and bile acid biomarkers to identify domesticated animal sources of fecal pollution." *Water Air and Soil Pollution* **187**: 263-274.
- Tyagi, P., D. R. Edwards and M. S. Coyne (2009). "Distinguishing between human and animal sources of fecal pollution in waters; a review." *International Journal of Water* **5**(1): 15-34.
- Tzianabos, A. O., D. L. Kasper and A. B. Onderdonk (1995). "Structure and function of *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharides: relationship to induction and prevention of abscesses." *Clinical Infectious Diseases* **20**(Suppl. 2): 132-140.
- U.S. Environmental Protection Agency (2005). "Microbial source tracking guide document." EPA Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Ueki, A., H. Akasaka, A. Satoh, D. Suzuki and K. Ueki (2007). "*Prevotella paludivivens* sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, hemicellulose-decomposing bacterium isolated from plant residue and rice roots in irrigated rice-field soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(8): 1803-1809.
- Ufnar, J. A., D. F. Ufnar, S. Y. Wang and R. D. Ellender (2007a). "Development of a swine-specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(16): 5209-5217.
- Ufnar, J. A., S. Y. Wang, J. M. Christiansen, H. Yampara-Iquise, C. A. Carson and R. D. Ellender (2006). "Detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters." *Journal of Applied Microbiology* **101**: 44-52.
- Ufnar, J. A., S. Y. Wang, D. F. Ufnar and R. D. Ellender (2007b). "*Methanobrevibacter ruminantium* as an Indicator of domesticated-ruminant fecal pollution in surface waters." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(21): 7118-7121.
- Unc, A. and M. J. Goss (2004). "Transport of bacteria from manure and protection of water resources." *Applied Soil Ecology* **25**(1): 1-18.
- Van der Wielen, P. W. J. J. and G. Medema (2010). "Quantitative assays for *Bacteroidales* 16S rRNA genes are unsuitable to discern fecal contamination in drinking water." *Applied and Environmental Microbiology*: AEM.03090-09.
- Vanotti, M. B., M. P.D., H. P.G. and E. A.Q. (2005). "Removal of pathogen and indicator microorganisms from liquid swine manure in multi-step biological and chemical treatment." *Bioresource Technology* **96**(2): 209-214.
- Venieri, D., A. Vantarakis, G. Komninou and M. Papapetropoulou (2004). "Differentiation of faecal *Escherichia coli* from human and animal sources by random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)." *Water Science and Technology* **50**(1): 193-193.
- Wallis, J. L. and H. D. Taylor (2003). "Phenotypic population characteristics of the enterococci in wastewater and animal faeces: implications for the new European directive on the quality of bathing waters." *Water Science and Technology* **47**(3): 27-32.

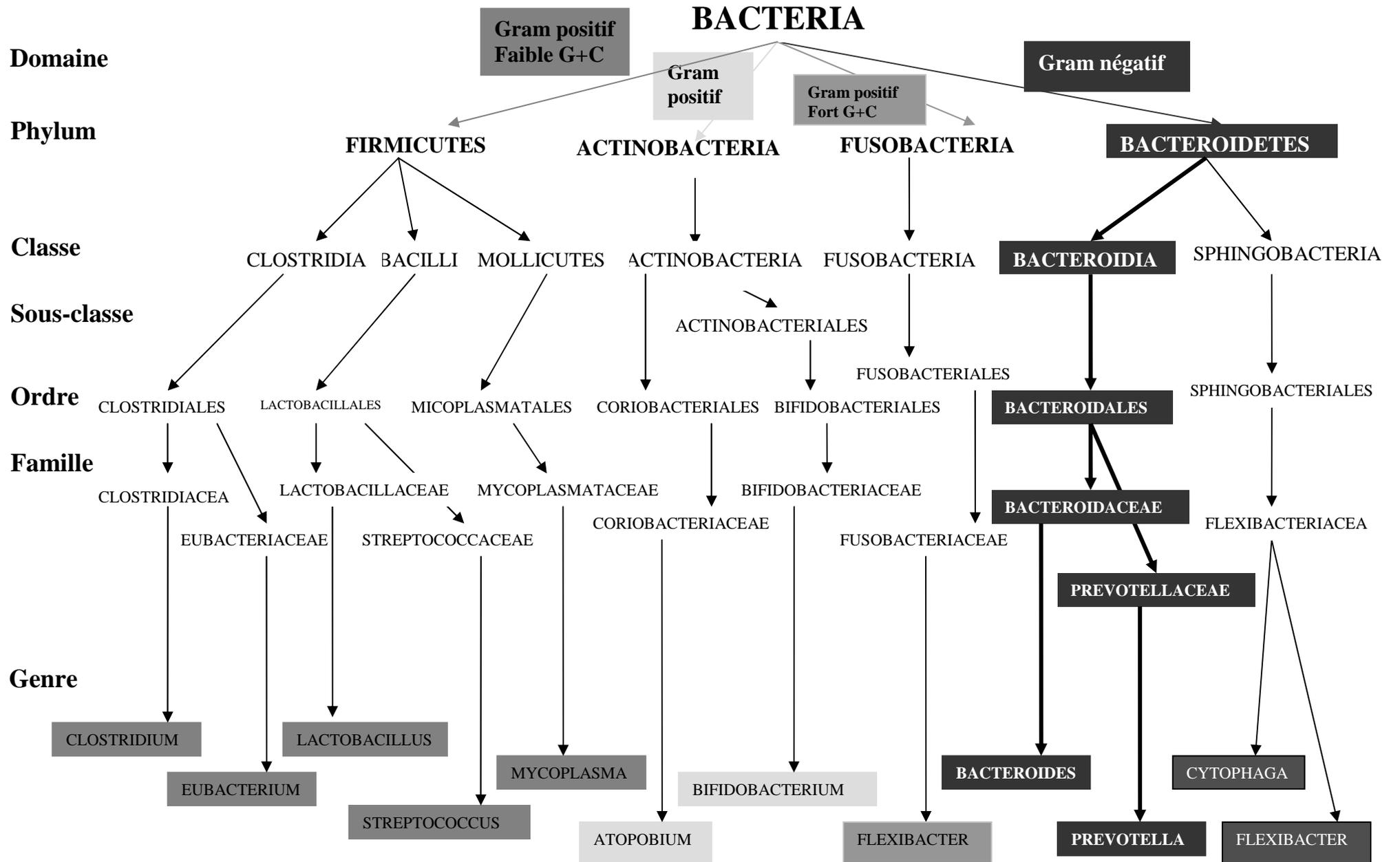
- Walters, S. P. and K. G. Field (2009). "Survival and persistence of human and ruminant-specific faecal *Bacteroidales* in freshwater microcosms." *Environmental Microbiology* **11**(6): 1410-1421.
- Walters, S. P., K. M. Yamahara and A. B. Boehm (2009). "Persistence of nucleic acid markers of health-relevant organisms in seawater microcosms: Implications for their use in assessing risk in recreational waters." *Water Research* **43**(19): 4929-4939.
- Weidhaas, J. L., T. W. Macbeth, R. L. Olsen, M. J. Sadowsky, D. Norat and V. J. Harwood (2010). "Identification of *Brevibacterium* marker gene specific to poultry litter and development of a quantitative PCR assay" *Journal of Applied Microbiology* **109**(2010) 334-347.
- Wéry, N., C. Lhoutellier, F. Ducray, J. P. Delgenes and J. J. Godon (2008). "Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR." *Water Research* **42**(1-2): 53-62.
- Wéry, N., C. Monteil, A.-M. Pourcher and J.-J. Godon (2010). "Human-specific fecal bacteria in wastewater treatment plant effluents." *Water Research* **44**(6): 1873-1883.
- Wexler, H. M. (2007). "*Bacteroides* : the good, the bad and the nitty-grity." *Clinical Microbiology Reviews* **20**(4): 593-621.
- Whitford, M. F., R. J. Forster, C. E. Beard, J. Gong and R. M. Teather (1998). "Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes." *Anaerobe* **4**(3): 153-63.
- WHO (2001). "Bathing water quality and human health; protection of the human environment water, sanitation and health." *Bathing water quality and human health faecal pollution, Outcome of an expert consultation, Farnham, UK, April 2001.*
- Wiggins, B. A. (1996). "Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters." *Applied and Environmental Microbiology* **62**(11): 3997-4002.
- Wolf, S., J. Hewitt and G. E. Greening (2010). "Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(5): 1388-1394.
- Wood, J., K. P. Scott, G. Avgustin, C. J. Newbold and H. J. Flint (1998). "Estimation of the relative abundance of different *Bacteroides* and *Prevotella* ribotypes in gut samples by enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences." *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10): 3683-3689.
- Wright, M. E., H. M. Solo-Gabriele, S. Elmira and L. E. Fleming (2009). "Microbial load from animal feces at a recreational beach." *Marine Pollution Bulletin* **58**(11): 1649-1656.
- Xiao, L., K. Alderisio, J. Limor, M. Royer and A. A. Lal (2000). "Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(12): 5492-5498.
- Xiao, L., A. Singh, J. Limor, T. K. Graczyk, S. Gradus and A. Lal (2001). "Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater." *Applied and Environmental Microbiology* **67**(3): 1097-1101.
- Yala, J. F. (2006). "Détermination de l'origine de la contamination fécale dans l'environnement : détection des marqueurs *Bacteroidetes* par PCR et recherche de souches de *Bacteroides*." *Rapport de master II recherche UBO/Ifremer Brest: 36p.*
- Yampara-Iquise, H., G. Zheng, E. J. Jones and C. A. Carson (2008). "Use of a *Bacteroides thetaiotaomicron*-specific alpha 1-6, mannase quantitative PCR to detect human faecal pollution in water." *Journal of Applied Microbiology* **105**(5): 1686-1693.
- Yoder, J., M. Hlavsa, G. Craun, V. Hill, V. Roberts, P. Yu, L. Hicks, N. Alexander, R. Calderon, S. Roy and M. Beach (2008a). "Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events - united states, 2005-2006." *MMWR Surveill Summ* **57**(9): 1-29.
- Yoder, J., V. Roberts, G. Craun, V. Hill, L. Hicks, N. Alexander, V. Radke, R. Calderon, M. Hlavsa, M. Beach and S. Roy (2008b). "Surveillance for waterborne disease and outbreaks

- associated with drinking water and water not intended for drinking-United States, 2005-2006." *MMWR Surveill Summ* **57**(9): 39-62.
- Yokohama, M. T. and K. A. Johnson (1988). "Microbiology of the rumen and intestine. Ch. 7. Page 125 in *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition.*" D. C. Church, ed. Waveland Press, Inc., Prospect Heights, IL.
- Zhu, X. Y., T. Zhong, Y. Pandya and R. D. Joerger (2002). "16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(1): 124-37.
- Zoetendal, E. G., C. T. Collier, S. Koke, R. I. Mackie and H. R. Gaskins (2004). "Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota." *Journal of Nutrition* **134**(2): 465-472.

# ANNEXES

---





**Annexe A : Arbre taxinomique des principaux genres bactériens présents dans le tractus digestif de l'Homme et des animaux**

**Annexe B : Sensibilité et spécificité du marqueur *Bacteroidales* général AllBac et des marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte, Hum-1-Bac, HF183, Rum-2-Bac, Pig-1-Bac et Pig-1-Bac dans des échantillons de fèces (humaines, porcines, bovines, ovines et équines) et d'effluents (lisiers de porcs, fumiers de bovins et eaux en sortie de STEP).**

Origine des échantillons	Marqueur Général AllBac		Marqueurs Humains Hum-1-Bac		HF183	
	Nbre d'éch. Positifs/Nbre d'éch. testés	Etendue des concentrations <sup>a</sup> [Moyenne]	Nbre d'éch. Positifs/Nbre d'éch. testés	Etendue des concentrations [Moyenne]	Nbre d'éch. Positifs/Nbre d'éch. testés	Etendue des concentrations [Moyenne]
<b><u>Fèces</u></b>						
Humaines	24/24	8,1 – 11 [9,8]	21+2/24	4,6-8,6 [7,3]	15+6/24	6,6 – 9,3 [8,3]
Porcines	25/25	8,4 – 11 [10,1]	6+4/25	4,4 – 5,6 [5]	0+4/25	
Bovines	15/15	8,6 – 10,2 [9,8]	0/15		1/15	[4,8]
Ovines	10/10	7,3 – 10,4 [9,9]	0+1/10		0/10	
Équines	10/10	8,6 – 9,7 [8,8]	0/10		0/10	
<b><u>Effluents</u></b>						
Eaux en sortie de STEP	17/17	5,1 – 9,4 [7,6]	15/15	4,4 – 7 [5,8]	17/17	4 – 8,8 [6,5]
Lisiers de porcs	23/23	6,6 – 11 [8,9]	0+1/23		0+1/23	
Fumiers de bovins	15/15	5,1 – 10 [9,1]	0/15		0/15	
Sensibilité/Spécificité (%)	<b>100 (n=139)/NT<sup>b</sup></b>		<b>92,3 (n=39)/ 93,4 (n=98)</b>		<b>78 (n=41)/ 98,9 (n=98)</b>	
<b><u>Eaux de l'environnement</u></b>	74+3 <sup>c</sup> /77	3,8 – 8 [5,9]	26+6/60	2,7 – 6,5 [4,1]	26+2/53	2,7 – 5,4 [3,9]
<b><u>Huîtres</u></b>	17+1/18	4,3 – 5,8 [5,2]	10+3/18	3,5 – 5,2 [4,1]	NT	NT
Origine des échantillons	Marqueur Bovins Rum-2-Bac		Marqueurs Porcins Pig-1-Bac		Pig-2-Bac	
	Nbre d'éch. Positifs/Nbre d'éch. testés	Etendue des concentrations [Moyenne]	Nbre d'éch. Positifs/Nbre d'éch. testés	Etendue des concentrations [Moyenne]	Nbre d'éch. Positifs/Nbre d'éch. testés	Etendue des concentrations [Moyenne]
<b><u>Fèces</u></b>						
Humaines	1+1/24	[4,8]	0+1/24		0+1/24	
Porcines	0/25		25/25	6,8 – 9,5 [8,6]	25/25	6,8 – 9,5 [8,5]
Bovines	15/15	6,9 – 9 [8,4]	0/15		0/15	
Ovines	10/10	5 – 9,9 [8,4]	0/10		0/10	

<b>Equines</b>	0/10		0+1/10		0/10	
<b><u>Effluents</u></b>						
<b>Eaux en sortie de STEP</b>	5/15	2,9 – 4 [3,5]	10/17	1,3 – 5 [3,3]	1/17	[2,4]
<b>Lisiers de porcs</b>	0+2/23		23/23	5,5 – 8,5 [6,8]	23/23	5,6 – 8,1 [6,9]
<b>Fumiers de bovins</b>	14/15	5,1 – 8,2 [6,8]	0/15		0+1/15	
<b>Sensibilité/Spécificité (%)</b>	<b>97,5 (n=40)/</b> <b>93,8 (n=97)</b>		<b>100 (n=48)/</b> <b>89 (n=91)</b>		<b>100 (n=48)/</b> <b>98,9 (n=91)</b>	
<b><u>Eaux de l'environnement</u></b>	31+2/67	3 – 6,5 [4,6]	2+4/24	3,9 – 4	13+1 <sup>b</sup> /77	3,2 – 4,1 [3,7]
<b><u>Huîtres</u></b>	4+4/18	3,5 – 3,9 [3,7]	NT	NT	0+5/18	<2,7

<sup>a</sup> Les résultats de quantification de ces marqueurs dans des échantillons d'eaux de l'environnement et de liquide intervalvaire d'huîtres sont également présentés. Les concentrations sont exprimées en U. Log<sub>10</sub> copies/g dans les échantillons de fèces et de fumiers de bovins et en U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml dans les échantillons de lisiers de porcs, d'eaux en sortie de STEP, d'eaux de l'environnement et de liquide intervalvaire d'huîtres.

<sup>b</sup> Non Testé, <sup>c</sup> Nombre d'échantillon détecté (duplicats positifs : 1 (le deuxième est dans la gamme) ou 2 résultats positifs en dehors de la gamme de quantification

## Annexe C

 <p>Centre de Brest Laboratoire EMP-MIC</p>	<p style="text-align: center;"><b>MODE OPERATOIRE :</b></p> <p style="text-align: center;"><b>PREPARATION DE MILIEU DE CULTURE LIQUIDE (LYHBHI) pour <i>Bacteroides vulgatus</i></b></p>
--	--

- 1) Dissoudre les produits suivants dans un volume d'eau désionisée inférieur au volume final :

Pour 1l de milieu :

Brain Heart Infusion : 37 g

Yeast Extract : 5 g

- 2) Ajouter la quantité finale d'eau milliQ : 1 l
- 3) Ajuster le pH à 6,8 – 7,0 ; si pH<7 rajouter de la solution de NaCl et si pH>7 rajouter de la solution de HCl
- 4) Ajouter 10 ml d'hémine sous agitation avant la stérilisation
- 5) Répartir 500 ml dans 2 flacons de 1 l
- 6) Stériliser à 120°C pendant 20 min

### Pré-culture :

- 7) Dégazer le milieu de culture : faire bouillir 20 ml de milieu dans des flacons de 25 ml, 25 min à 100°C dans un bain marie et dévisser le bouchon d'un quart de tour
- 8) Placer le flacon dans un bain glacé pendant 10 à 15 min (pour stopper l'entrée d'O<sub>2</sub> dans le milieu)
- 9) Ajouter 200 µl de L-cystéine
- 10) Ajouter un tube nunc de 1 ml de culture ou une colonie
- 11) Placer le milieu à 37°C sans agitation dans une jarre avec 1 générateur de CO<sub>2</sub> et un indicateur de présence d'O<sub>2</sub> pendant environ 20h

### Culture :

- 12) Dégazer le milieu de culture : faire bouillir 20 ml de milieu dans des flacons de 25 ml, 25 min à 100°C dans un bain marie
- 13) Placer le flacon dans un bain glacé pendant 10 à 15 min
- 14) Ajouter de la L-cystéine (50 mg/ml) : 200 µl pour 20 ml de milieu
- 15) Ajouter 100 µl de la pré-culture
- 16) Placer le milieu à 37°C sans agitation dans une jarre avec 1 générateur de CO<sub>2</sub> et un indicateur de présence d'O<sub>2</sub> pendant environ 20h

### **Réactifs**

- Brain Heart Infusion
- Yeast Extract
- HCl et NaCl
- Hémine
- L-Cystéine
- Souche *B. vulgatus*, DSMZ 1447

Hémine : Dissoudre 50 mg avec quelques gouttes de soude à 5N puis ajouter puis ajouter 100 ml d'eau milliQ

L-Cystéine : Dissoudre 50 mg dans 1 ml d'eau milliQ, puis stériliser sur filtre de 0,22  $\mu\text{m}$

### **Equipement**

- Ballon de 1 l
- Agitateur magnétique + barreau aimanté
- Eprouvette de 1 l

## Annexe D

 <p>Centre de Brest Laboratoire EMP-MIC</p>	<p><b>MODE OPERATOIRE :</b></p> <p><b>EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE BACTERIEN à partir de TD d'huîtres : DNAZOL (Invitrogen)</b></p>
--	---

Après dissection des TD, environ 200 mg de TD sont aliquotés dans des eppendorfs de 2 ml puis congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Précaution

- Placer les pipettes et les cônes sous UV pendant 15 min et javelliser la paillasse avant toute manipulation. Aliquoter toutes les solutions (DNAZOL, Ethanol 100%, Ethanol 75%) en début d'extraction afin d'éviter de contaminer des solutions.

### Procédure

- 1) Allumer le bain sec et régler la température à  $60^{\circ}\text{C}$
- 2) Décongeler les échantillons et placer environ 200-250 mg de GD dans un tube Lysing E Matrix
- 3) Ajouter 1 ml de Dnazol dans le tube Lysing E Matrix
- 4) Agiter les tubes à l'aide d'un Fast Prep Instrument pendant 30 sec, vitesse 5,5
- 5) Recommencer l'étape 4
- 6) Centrifuger 5 min à 10 000 g et transférer le surnageant dans un nouveau tube de 2 ml
- 7) Centrifuger de nouveau 5 min à 14 000g (pour supprimer le culot de billes) et transférer le surnageant dans un nouveau tube de 2 ml
- 8) Ajouter 500  $\mu\text{l}$  d'éthanol 100% et agiter par retournement
- 9) Laisser précipiter 3 min à température ambiante
- 10) Centrifuger 2 min à 2 900 g et vider le surnageant (si le culot n'est pas formé centrifuger de nouveau 2 min à 5 700 g)
- 11) Reprendre le culot avec 1 ml d'éthanol à 75%, agiter par retournement puis centrifuger 2 min à 2 900 g et vider le surnageant (si le culot n'est pas formé centrifuger de nouveau 2 min à 5 700 g)
- 12) Sécher le culot au bain sec de 20 à 30 min.
- 13) Décongeler la solution NaOH 8mM + Hepes 0,1 M, conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$
- 14) Ajouter 110  $\mu\text{l}$  de NaOH 8mM + Hepes 0,1 M, pour remettre en suspension le culot (solution finale avec un pH = 8). Ne pas hésiter à remettre en suspension le culot en utilisant le cône et le vortex même si le culot ne se dissout pas totalement
- 15) Centrifuger 2 min à 2 900 g (si le culot n'est pas formé, centrifuger de nouveau 2 min à 5 700 g)
- 16) Récupérer le surnageant (ADN) et le placer dans un nouveau tube de 0,5 ml
- 17) La qualité et la quantité d'ADN peuvent être vérifiées par spectrométrie UV
- 18) Congeler l'ADN à  $-20^{\circ}\text{C}$

## Réactifs

- DNAZOL (Invitrogen, référence Fisher : 10503027)
- Ethanol 75 et 100 %
- NaOH 8 mM
- Hepes 0,1 M

NaOH 8 mM : Dissoudre 8g de pastilles de NaOH dans 100 ml d'eau milliQ pour obtenir une solution à 2 M. Autoclaver 10 à 20 min. Mélanger 400 µl de NaOH à 2 M dans 100 ml d'eau milliQ autoclavée pour obtenir une solution à 8 mM.

Hepes 0,1 mM : Dissoudre 2,4 g dans 100 ml d'eau milliQ

## Equipements

- Tube Lysing E Matrix
- Surgélateur  $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Congélateur  $-20^{\circ}\text{C}$
- Centrifugeuse accélération max. 11 000 g
- Pipettes variables 0,5 – 1 000 µl
- Vortex
- Fast Prep Instrument
- Bain sec
- Spectrophotomètre

## Annexe E

 <p>Centre de Brest Laboratoire EMP-MIC</p>	<p><b>MODE OPERATOIRE :</b></p> <p><b>EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE BACTERIEN à partir de TD d'huîtres :</b> <b>QIAamp DNA Stool Mini Kit</b> (QIAGEN ; Protocole modifié)</p>
--	---

Après dissection des TD, environ 200 mg de TD sont aliquotés dans des eppendorfs de 2 ml puis congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Précaution

- Placer les pipettes et les cônes sous UV pendant 15 min et javelliser la paillasse avant toute manipulation. Aliquoter toutes les solutions du kit en début d'extraction afin d'éviter de contaminer des solutions.
- Il est recommandé de réaliser également un blanc d'extraction (eau milliQ au lieu de l'échantillon) pour chaque série d'extraction pour s'assurer qu'il n'y a pas de contaminations lors des différentes étapes d'extraction des ADN bactériens.

### Procédure

- 1) Décongeler l'Eppendorf de 2 ml contenant le ou les filtres obtenus au cours de l'étape de filtration des échantillons d'eaux
- 2) Agiter au Vortex 1 min puis placer le tube Eppendorf au bain marie à  $90^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min
- 3) Agiter au Vortex 1 min puis centrifuger 10 min à 2 500 g
- 4) Récupérer le maximum de surnageant et le placer dans un tube Eppendorf de 2 ml
- 5) Centrifuger 5 min à 2 500 g puis récupérer le maximum de surnageant et le placer dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml
- 6) Centrifuger 1 min à 10 000 g
- 7) Récupérer le surnageant en s'assurant de ne plus avoir de particules en suspension et le placer dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml
- 8) Centrifuger 1 min à 10 000 g (facultatif, si toujours présence de particules en suspension)
- 9) Récupérer le maximum de surnageant et le placer dans un nouvel tube Eppendorf de 2 ml
- 10) Ajouter le cachet d'inhibitex (ne pas le toucher)
- 11) Vortexer jusqu'à dissolution du cachet
- 12) Laisser agir 1 min
- 13) Centrifuger 5 min à 10 000 g
- 14) Récupérer le max de surnageant et le placer dans un tube Eppendorf de 1,5 ml
- 15) Re-centrifuger 3 min à 10 000 g le tube Eppendorf de 2 ml avec le cachet d'inhibitex (pour récupérer le max de surnageant) et le placer dans le tube Eppendorf de 1,5 ml
- 16) Centrifuger le tube Eppendorf de 1,5 ml 3 min à 10 000 g. Pendant ce temps préparer la protéinase K (25  $\mu\text{l}$  dans un nouvel tube Eppendorf de 2 ml)
- 17) Récupérer le max de surnageant et le placer dans le tube Eppendorf de 2 ml avec la protéinase K

- 18) Ajouter 600 µl de tampon AL et agiter au Vortex 15 s
- 19) Incuber à 70°C pendant 10 min
- 20) Ajouter 600 µl d'éthanol et vortexer 15 s
- 21) Ajouter 600 µl sur une colonne et centrifuger 1 min à 10 000 g ; Faire passer tout le surnageant sur la colonne (environ 3 passages), remplacer le tube collecteur et vider son contenu dans une poubelle
- 22) Ajouter 500 µl de tampon AW1 et centrifuger 1 min à 10 000 g ; Remplacer le tube collecteur et vider son contenu dans une poubelle
- 23) Ajouter 500 µl de tampon AW2 et centrifuger 1 min à 10 000 g ; Remplacer le tube collecteur et vider son contenu dans une poubelle
- 24) Centrifuger 1 min à 10 000 g à vide ; Remplacer le tube collecteur et vider son contenu dans une poubelle
- 25) Ajouter 25 µl de tampon d'élution AE sur la colonne et laisser agir 1 min
- 26) Centrifuger 1 min à 10 000 g
- 27) Placer l'ADN dans un tube Eppendorf de 2 ml
- 28) Refaire une deuxième élution de 25 µl
- 29) Placer la solution dans le tube Eppendorf de 2 ml
- 30) Congeler les échantillons d'ADN à -80°C

### **Réactifs**

- Réactifs du kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, référence : 51504)

### **Equipements**

- Surgélateur -80 ±5°C
- Bain-marie
- Congélateur à -20°C
- Centrifugeuse accélération max. 11 000 g
- Pipettes variables 0,5 – 1 000 µl
- Vortex

## Annexe F

 <p>Centre de Brest Laboratoire EMP-MIC</p>	<p style="text-align: center;"><b>MODE OPERATOIRE :</b></p> <p style="text-align: center;"><b>EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE BACTERIEN à partir de TD d'huître : MagMax Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion)</b></p>
--	---

Après dissection des TD, environ 200 mg de TD sont aliquotés dans des eppendorfs de 2 ml puis congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Précaution

- Placer les pipettes et les cônes sous UV pendant 15 min et javelliser la paillasse avant toute manipulation. Aliquoter toutes les solutions du kit en début d'extraction afin d'éviter de contaminer des solutions.

### Procédure

- 1) Ajouter 235  $\mu\text{l}$  de solution Lysis/Binding dans un Bead Tube et le mettre de côté
- 2) Placer 1 ml de PBS dans un eppendorf de 2 ml et ajouter 0,3 g de glande digestive dans l'eppendorf et vortexer à vitesse modérée pendant 3 min
- 3) Centrifuger l'eppendorf à faible vitesse pendant 1 min à 100 g et transférer 175  $\mu\text{l}$  du surnageant dans le Bead Tube
- 4) Vortexer fortement le Bead Tube avec le FastPrep®-24 Instrument : 2 cycles de 1 min avec une pause de 2 min entre les 2
- 5) Centrifuger le Bead Tube 3 min à 16 000 g, transférer 300  $\mu\text{l}$  du lysat dans un eppendorf de 1,5 ml (ne pas transférer de billes)
- 6) Centrifuger de nouveau le Bead Tube 6 min à 16 000 g
- 7) Placer le tampon d'éluion à  $65^{\circ}\text{C}$  pour son utilisation en fin de protocole
- 8) Transférer 115  $\mu\text{l}$  du surnageant dans un eppendorf de 2 ml
- 9) Ajouter 65  $\mu\text{l}$  d'isopropanol 100% et mélanger sur plaque agitante pendant 1 min
- 10) Vortexer le Bead Mix préparé au début du protocole pour avoir une suspension uniforme puis ajouter 20  $\mu\text{l}$  de Bead Mix et placer sur plaque agitante pendant 5 min
- 11) Placer l'eppendorf sur la barre magnétique pendant 3 à 5 min → capture des billes est réalisée (ADN est lié aux billes), éliminer délicatement le surnageant et enlever l'eppendorf de la barre magnétique
- 12) Enlever de la plaque agitante et ajouter 150  $\mu\text{l}$  de solution de lavage 1 et placer sur plaque agitante pendant 1 min. Placer l'eppendorf sur la barre magnétique pendant 1 min ou jusqu'à la capture totale des billes et éliminer délicatement le surnageant et enlever l'eppendorf de la barre magnétique
- 13) Recommencer une seconde fois cette dernière étape (lavage avec 150  $\mu\text{l}$  de solution 1)
- 14) Enlever de la plaque agitante et ajouter 150  $\mu\text{l}$  de solution de lavage 2 et placer sur plaque agitante pendant 1 min. Placer l'eppendorf sur la barre magnétique pendant 1 min ou jusqu'à la capture totale des billes et éliminer délicatement le surnageant et enlever l'eppendorf de la barre magnétique

- 15) Recommencer une seconde fois cette dernière étape (lavage avec 150 µl de solution 2)
- 16) Placer l'éppendorf sur la plaque agitante et agiter pendant 2 min pour faire évaporer l'alcool, si il reste de la solution, agiter jusqu'à évaporation mais pas plus de 5 min
- 17) Ajouter 20-50 µl de tampon d'élution à 65°C et agiter vigoureusement pendant 3 min. Regarder si les billes sont suspendues de manière homogène, sinon faire des allers et retours avec la pipette.
- 18) Placer l'éppendorf sur la barre magnétique pendant 1 à 3 min puis transférer le surnageant dans un nouvel eppendorf et le placer à -80°C

### **Réactifs**

- Réactifs du kit « MagMax Total Nucleic Acid Isolation Kit » (Ambion, référence AppliedBiosystems : AM1840)
- Isopropanol 100 %

### **Equipements**

- Surgélateur -80 ±5°C
- Congélateur à -20°C
- Centrifugeuse accélération max. 16 000 g
- Pipettes variables 0,5 – 1 000 µl
- Vortex
- FastPrep®-24 Instrument
- Plaque agitante
- Barre magnétique

## Annexe G

 <p>Centre de Brest Laboratoire EMP-MIC</p>	<p style="text-align: center;"><b>MODE OPERATOIRE :</b></p> <p style="text-align: center;"><b>EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE BACTERIEN à partir de TD et d'un culot de LI d'huîtres : GNOME modifié (BIO101, Furet <i>et al.</i>, 2009)</b></p>
--	---

Après dissection des TD, environ 200 mg de TD sont aliquotés dans des eppendorfs de 2 ml puis congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Pour les LI, 15 ml sont filtrés sur un filtre de  $8\ \mu\text{m}$  puis le filtrat est placé dans un Falcon de 15 ml qui est centrifugé 15 min à 2 500 g. Le surnageant est enlevé et le culot est congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Précaution

- Placer les pipettes et les cônes sous UV pendant 15 min et javelliser la paillasse avant toute manipulation. Aliquoter toutes les solutions du kit en début d'extraction afin d'éviter de contaminer des solutions.
- Il est recommandé de réaliser également un blanc d'extraction (eau milliQ au lieu de l'échantillon) pour chaque série d'extraction pour s'assurer qu'il n'y a pas de contaminations lors des différentes étapes d'extraction des ADN bactériens.

### Procédure

#### Préparation du lysat bactérien :

- 1) Ajouter 550  $\mu\text{l}$  de Cell Suspension Solution. Bien homogénéiser (utiliser un cure-dent et vortexer)
- 2) Ajouter 50  $\mu\text{l}$  de RNase Mix. Vortexer vigoureusement
- 3) Ajouter 100  $\mu\text{l}$  de Cell Lysis/Denaturing Solution. Bien mélanger au vortex
- 4) Incuber à  $55^{\circ}\text{C}$  pendant 30 min dans le Thermomixer à  $55^{\circ}\text{C}$  avec une agitation de 600 g
- 5) Ajouter 25  $\mu\text{l}$  de Protease Mix et bien homogénéiser au vortex
- 6) Incuber à  $55^{\circ}\text{C}$  pendant 120 min - Thermomixer à  $55^{\circ}\text{C}$  avec une agitation de 600 g
- 7) Ajouter 750  $\mu\text{l}$  de billes de verre 0,1 mm dans chaque échantillon
- 8) Mettre les échantillons pendant 5 min au Bead-Beater™. Laisser le Bead-Beater™ au repos pendant 5 min. Remettre l'échantillon pendant 5 min au Bead-Beater™
- 9) Centrifuger 15-20 s pour éliminer la mousse

#### Obtention du lysat bactérien :

- 10) Ajouter 15 mg de PVPP dans le tube et bien homogénéiser au vortex
- 11) Centrifuger 3 min à 20 000 g
- 12) Récupérer le surnageant dans un nouveau tube stérile de 2,2 ml
- 13) Au culot restant, ajouter 400  $\mu\text{l}$  de TENP et bien homogénéiser au vortex (remettre le culot en suspension)
- 14) Centrifuger 3 min à 20 000 g
- 15) Pooler le surnageant avec le premier

- 16) Centrifuger 3 min à 20 000 g la totalité du surnageant puis récupérer le surnageant dans un nouveau tube de 2,2ml pour éliminer les dernières suspensions. Volume total environ 850 µl.

Préparation de l'ADN bactérien :

- 17) Ajouter 1 ml d'Isopropanol froid (stocké à - 20°C) et mélanger délicatement, par retournements successifs. Laisser 10 min à - 20°C. Centrifuger 5 min à 20 000 g. Vider le surnageant
- 18) Sécher le culot au Speed-Vac 5 min
- 19) Reprendre le culot d'ADN dans 400 µl d'H<sub>2</sub>O moléculaire
- 20) Ajouter 100 µl de « Salt-Out » Mixture. Mélanger doucement, par retournements successifs. Réfrigérer à 4 °C pendant 10 min. Centrifuger 10 min à 20 000 g. Mettre le surnageant dans un nouveau tube stérile de 2,2 ml. (pour les GD, il y a de la matière en surface, prélever seulement 200 µl puis faire une nouvelle centrifugation de 3 min à 20 000 g et reprélever 200 µl)
- 21) Ajouter 1,5 ml d'Ethanol 100% froid (stocké à - 20 °C) et mélanger délicatement, par retournements successifs. Laisser 5 min à température ambiante
- 22) Centrifuger 5 min à 20 000 g. Vider le surnageant
- 23) Reprendre le culot d'ADN dans 1 ml d'Ethanol 70 %, agiter au vortex. Centrifuger 5 min à 20000 g. Vider le surnageant. L'excès d'éthanol est ensuite éliminé en utilisant un Speed-Vac pendant environ 5 min
- 24) Reprendre chaque culot avec 150 µl de TE Buffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA)
- 25) Transvaser la solution dans un tube avec un bouchon à vis
- 26) Congeler l'ADN à - 80°C jusqu'aux analyses

**Réactifs**

- Réactifs du kit « Fast DNA spin kit for soil » (MPBiomedicals)
- PVPP (PolyVinylPolyPyrrolidone) (Sigma)
- TENP (50 mM Tris pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl, 1 % PVPP)
- Isopropanol
- Ethanol 100 %
- Ethanol 70 %
- TE Buffer 1X (Tris 10 mM pH 8,0 – EDTA 1 mM)

EDTA pH 8 0,5M (chauffer pour dissoudre) :

MM : 372,2 g.mol<sup>-1</sup>

Peser 9,305 g pour 50 ml d'H<sub>2</sub>O stérile.

Ajuster pH avec NaOH

Tris-HCl pH 8 1M :

MM : 121,1 g.mol<sup>-1</sup>

Peser 6,05 g pour 50 ml d'H<sub>2</sub>O stérile.

Ajuster pH avec HCl concentré

NaCl 5M :

MM : 58,44 g.mol<sup>-1</sup>

Peser 14,61 g pour 50 ml d'H<sub>2</sub>O stérile.

TENP pour 30 ml final :

1,5 ml de Tris-HCl pH 8 1M

1,2 ml de EDTA pH8 0,5M

0,6 ml de NaCl 5M

0,3 g de PVPP

H<sub>2</sub>O stérile qsp 30 ml

### **Equipements**

- Surgélateur  $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$
- Centrifugeuse accélération max. 20 000 g
- Pipettes variables 0,5 – 1000  $\mu\text{l}$
- Vortex
- Plaque agitante
- Speed-Vac Concentrator Savant
- Bead-Beater™ (amalgamateur) Biospec Products
- Billes de verre 0,1 mm (Fisher Bioblock Scientific B74471)
- Bain-marie : Thermomixer Comfort Eppendorf (2 ml)
- Cure-dents stériles

## Annexe H

 <p>Centre de Brest Laboratoire EMP-MIC</p>	<p style="text-align: center;"><b>MODE OPERATOIRE :</b> <b>EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE BACTERIEN à</b> <b>partir de TD ou d'un culot de LI d'huîtres :</b> <b>Fast DNA spin kit for soil</b> (MP Biomedicals)</p>
--	--

Après dissection des TD, environ 200 mg de TD sont aliquotés dans des eppendorfs de 2 ml puis congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Pour les LI, 15 ml sont filtrés sur un filtre de  $8\ \mu\text{m}$  puis le filtrat est placé dans un Falcon de 15 ml qui est centrifugé 15 min à 2 500 g. Le surnageant est enlevé et le culot est congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Précaution

- Placer les pipettes et les cônes sous UV pendant 15 min et javelliser la paillasse avant toute manipulation. Aliquoter toutes les solutions du kit en début d'extraction afin d'éviter de contaminer des solutions.
- Il est recommandé de réaliser également un blanc d'extraction (eau milliQ au lieu de l'échantillon) pour chaque série d'extraction pour s'assurer qu'il n'y a pas de contaminations lors des différentes étapes d'extraction des ADN bactériens.

### Procédure

- 1) Décongeler les échantillons à température ambiante
- 2) Ajouter 978  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate de sodium et 122  $\mu\text{l}$  de tampon MT en laissant un volume d'air d'au moins 250  $\mu\text{l}$
- 3) Vortexer pour remettre en suspension le culot
- 4) Transférer dans des tubes Lysing E Matrix
- 5) Faire 2 passages successifs au Fast Prep Instrument pendant 45 s, vitesse 5,5
- 6) Centrifuger 10 min à 10 000 g
- 7) Transférer le surnageant dans un tube de 2 ml et ajouter 300  $\mu\text{l}$  de PPS pour précipiter les protéines
- 8) Homogénéiser le tube 20 fois par retournements manuels puis centrifuger le tube 5min à 10 000 g
- 9) Transférer le surnageant dans un Falcon de 15 ml puis ajouter 1 ml de Binding Matrix Suspension
- 10) Mélanger sur une plaque agitante 15 min pour permettre à l'ADN de se fixer à la matrice
- 11) Laisser décanter 5min sur un portoir
- 12) Prélever 500  $\mu\text{l}$  de surnageant en surface et les jeter dans une poubelle en faisant attention de ne pas prélever le culot
- 13) Vortexer la suspension et en transférer 600  $\mu\text{l}$  dans un Spin filter tube
- 14) Centrifuger 1 min à 10 000 g (si tout n'est pas passé augmenter le temps de centrifugation)
- 15) Jeter ce qui vient d'être filtré et filtrer à nouveau 600  $\mu\text{l}$  de solution dans le même Spin filter tube

- 16) Centrifuger 1 min à 10 000 g (si tout n'est pas passé augmenter le temps de centrifugation)
- 17) Jeter le filtrat
- 18) Filtrer toute la solution de la même façon
- 19) Ajouter 500 µl de solution SEWS-M toujours dans le même Spin filter tube
- 20) Centrifuger 2 min à 10 000 g
- 21) Jeter le filtrat
- 22) Ajouter de nouveau 500 µl de solution SEWS-M toujours dans le même Spin filter tube
- 23) Centrifuger 2 min à 10 000 g
- 24) Jeter le filtrat
- 25) Retirer le filtre et le placer dans un nouveau Catch tube. Laisser sécher le filtre, tube ouvert, 5 min à température ambiante pour que l'éthanol s'évapore
- 26) Ajouter 100 µl d'eau moléculaire, homogénéiser avec un cône en faisant des allers-retours sans percer le filtre
- 27) Centrifuger 2 min à 10 000 g
- 28) Placer l'ADN dans un tube de 2 ml
- 29) La qualité et la quantité d'ADN peuvent être vérifiées par spectrométrie UV
- 30) Congeler l'ADN à -20°C

### **Réactifs**

- Réactifs du kit « Fast DNA spin kit for soil » (MP Biomedicals, référence : 6560 200)

### **Equipements**

- Surgélateur -80 ±5°C
- Congélateur à -20°C
- Centrifugeuse accélération max. 11 000 g
- Pipettes variables 0,5 – 1 000 µl
- Vortex
- Fast Prep Instrument
- Plaque agitante
- Spectrophotomètre

## Annexe I

 <p>Centre de Brest Laboratoire EMP-MIC</p>	<p><b>MODE OPERATOIRE :</b></p> <p><b>EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE BACTERIEN à partir d'un filtre et d'un culot de LI d'huîtres : QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN ; Protocole modifié)</b></p>
--	--

Filtrer les échantillons d'eau (200 ml à 1 L) sur filtre 0,22 µm Nucléopore et réaliser un blanc de filtration (eau milliQ). Placer les filtres dans un Falcon de 15 ml avec 500 µl de tampon GITC. Le Falcon est ensuite congelé à - 20°C.

Pour les LI, 15 ml sont filtrés sur un filtre de 8 µm puis le filtrat est placé dans un Falcon de 15 ml qui est centrifugé 15 min à 2 500 g. Le surnageant est enlevé et le culot est congelé à - 20°C.

### Précaution

- Placer les pipettes et les cônes sous UV pendant 15 min et javelliser la paillasse avant toute manipulation. Aliquoter toutes les solutions du kit en début d'extraction afin d'éviter de contaminer des solutions.
- Il est recommandé de réaliser également un blanc d'extraction (eau milliQ au lieu de l'échantillon) pour chaque série d'extraction pour s'assurer qu'il n'y a pas de contaminations lors des différentes étapes d'extraction des ADN bactériens.

### Procédure

- 1) Décongeler le tube Falcon à température ambiante
- 3) Ajouter 700 µl de tampon AL dans le tube et agiter au vortex pendant 30 s, inverser le tube 5 fois et agiter de nouveau au vortex 30 s
- 4) Laisser reposer 5 min
- 5) Ajouter 200 µl d'éthanol 100% et agiter au vortex 30 s
- 6) Verser le lysat (environ 500 - 600 µl) sur une colonne et centrifuger 30 s à 5 700 g, jeter l'éluât, verser le reste de lysat sur la colonne, centrifuger de nouveau et éliminer l'éluât (environ 3 passages)
- 7) Ajouter 500 µl de tampon AW1 sur la colonne, centrifuger 1 min à 5 700 g, éliminer l'éluât
- 8) Ajouter 500 µl de tampon AW2 sur la colonne, centrifuger 3 min à 10 000 g pour sécher la colonne
- 9) Placer la colonne sur un nouveau tube de 1,5 ml, ajouter 100 µl de tampon AE
- 10) Laisser la colonne 1 min à température ambiante, centrifuger 1 min à 5 700 g pour récupérer l'ADN
- 11) Aliquoter la solution d'ADN
- 12) La qualité et la quantité d'ADN peuvent être vérifiées par spectrométrie UV
- 13) Congeler l'ADN à -20°C jusqu'à l'analyse

### Réactifs

- Réactifs du kit QIAamp DNA MiniKit (QIAGEN, référence : 51304)
- Ethanol 100 %
- Tampon GITC

GITC :

EDTA 100 mM (PM : 372,2 g ; pH = 8) : Dissoudre 1,861 g dans 50 ml d'eau milliQ autoclavée

Guanidine isothiocyanate 5 M (PM : 118,16g) : Dissoudre 29,54 g dans 50 ml d'eau milliQ autoclavée

Sarkosyl : Dissoudre 0,25 g dans 50 ml d'eau milliQ autoclavée

Ajouter dans l'ordre : la solution d'EDTA, la solution de Guanidine isothiocyanate et la solution de Sarkosyl

### **Equipements**

- Surgélateur  $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Congélateur  $-20^{\circ}\text{C}$
- Centrifugeuse accélération max. 11 000 g
- Pipettes variables 0,5 – 1 000  $\mu\text{l}$
- Vortex
- Spectrophotomètre

## Liste des publications

MARTI, R.,\*, **S. MIESZKIN**,\*, O. SOLECKI, D. HERVIO-HEATH, A. M. POURCHER, M. GOURMELON. Effects of oxygen and temperature on persistence of three pig-specific genetic markers and dynamics of two dominant pig manure populations in river water microcosms. **Soumis à *Water Research***

\*Co-premiers auteurs

JAFFREZIC, A., M. GOURMELON, M. P. CAPRAIS, **S. MIESZKIN**, A. M. POURCHER, R. MARTI and E. JARDE. Microbial and chemical markers: runoff transfer in pig and cow manure-amended soils. **Accépté à *Journal of Environmental Quality***

GOURMELON, M., M. P. CAPRAIS, **S. MIESZKIN**, R. MARTI, N. WERY, E. JARDE, M. DERRIEN, A. JEDAS-HECART, P. Y. COMMUNAL, A. JAFFREZIC and A. M. POURCHER. 2010. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the fecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. ***Water Research***, 44 (16): 4812-4824

**MIESZKIN, S.**, J. P. FURET, G. CORTHER, M. POMMEPUY, J. C. LE SAUX, M. BOUGEARD, D. HERVIO-HEATH and M. GOURMELON. 2010. Discrimination between human, pig and ruminant fecal contaminations in a river catchment by real-time PCR using host-specific markers. ***Proceedings ICMSS09***

GOURMELON, M., M. P. CAPRAIS, C. LE MENNEC, **S. MIESZKIN**, C. PONTTHOREAU and M. GENDRONNEAU. 2010. Application of library-independent Microbial Source Tracking methods for identifying the sources of faecal contamination in coastal areas. ***Water Science Technology***, 61: 1401-1409

**MIESZKIN, S.**, J. F. YALA, R. JOUBREL and M. GOURMELON. 2010. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. ***Journal of Applied Microbiology***, 108: 974-984

**MIESZKIN, S.**, J. P. FURET, G. CORTHER and M. GOURMELON. 2009. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. ***Applied and Environmental Microbiology***, 75: 3045-3054

## Liste des communications orales

GOURMELON, M., M. P. CAPRAIS, S. MIESZKIN, R. MARTI, N. WERY, E. JARDE, A. JEDAS-HECART, P. Y. COMMUNAL, A. JAFFREZIC and A. M. POURCHER. Development of Microbial and Chemical MST Tools to Identify the Origin of the Faecal Pollution in Bathing and Shellfish Harvesting Waters in France. *The Water Research Conference*, Lisbonne, Portugal, 11 - 14 April 2010

MIESZKIN, S., J. P. FURET, G. CORTHER and M. GOURMELON. Discrimination between human, pig and ruminant fecal contaminations in a river catchment by real-time PCR using host-specific markers. *7<sup>th</sup> International Conference on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS09)*, Nantes, France, 14 - 19 June 2009

MIESZKIN, S., R. MARTI, A. M. POURCHER, D. HERVIO-HEATH and M. GOURMELON. Effects of oxygen and temperature on persistence of two pig-specific genetic markers in river water microcosms. *The 15<sup>th</sup> Health Related Water Microbiology Symposium*, Naxos, Greece, 31 May - 5 June 2009

MIESZKIN, S., J. P. FURET, G. CORTHER and M. GOURMELON. Estimation of pig contamination in catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *The Third International Meeting of Environmental Biotechnology and engineering* (3 IMEBE), Palma de Mallorca, Spain, 21 - 25 September 2008

GOURMELON, M., J. F. YALA, R. JOUBREL and S. MIESZKIN. Host differences in uncultivated fecal *Bacteroidales* 16S rRNA genes: analysis of human and animal feces and effluent samples. *The Third International Meeting of Environmental Biotechnology and engineering* (3 IMEBE), Palma de Mallorca, Spain, 21 - 25 September 2008

## ABSTRACT

Human and animal faecal pollution affects environmental water in inland and coastal areas, with negative implications for recreational uses, public safety and shellfish sanitary status due to the presence of enteric pathogens. Starting from 2011, the revised Bathing Water European Directive (2006/7/CE) requires the establishment of bathing water profiles with an inventory and study of the pollution sources likely to affect water quality. The faecal microbiological indicators used in these regulations, *Escherichia coli* and enterococci, cannot distinguish between human and animal faecal contamination. Thus, alternative methods, that focus on target microorganisms such as bacteria belonging to the *Bacteroidales* order were developed or are being developed to discriminate between human and animal faecal contamination. The first markers were developed for conventional PCR; however, they were detected in very few environmental waters samples and there were never applied to shellfish.

The main objective of this study was to develop and to validate a molecular approach based on quantitative real-time PCR with the *Bacteroidales* target, in order to identify the origin of faecal contamination in water and shellfish.

Phylogenetic analysis of the partial *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal (bovine, pig and wild birds) faeces and effluents allowed the development of 4 host-specific *Bacteroidales* markers to identify human (Hum-1-Bac), porcine (Pig-1-Bac and Pig-2-Bac) and ruminant (Rum-2-Bac) faecal contaminations. Applied on target and non-target faeces and effluent samples, these markers were highly sensitive (92.3 - 100%) and specific (93.4 - 100%).

The study of the Pig-1-Bac and Pig-2-Bac markers persistence in river water microcosms showed that under unfavourable conditions, aerobic and temperature of 20°C, markers persisted for at least 16 days. These results suggested that the *Bacteroidales* markers could still be identified after an extended period of time in river waters. This hypothesis was confirmed with their detection and quantification in river waters from the Daoulas catchment estuary and the Elorn estuary (Finistère, Brittany) with concentrations ranging from 2.7 to 6.5 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml. Compared with bacterial, viral and chemical markers from runoff and environmental waters, *Bacteroidales* markers were better to identify the origin of the contaminations.

Host-specific *Bacteroidales* markers were also applied for the first time in shellfish. Selection and optimisation of bacterial DNA extraction protocol from intervalvular liquid of oysters artificially contaminated, allowed detection and quantification of the markers in naturally contaminated oysters.

Discrimination of the origin of faecal contamination from samples of water and intervalvular liquid of oysters from 2 different river and estuarine sites, underlined the importance of the human and ruminant faecal contamination more than the porcine contamination.

Thus, this study confirms the interest of the host-specific *Bacteroidales* markers developed from the *Bacteroidales* target to identify faecal contamination in bathing waters and shellfish harvesting areas.

**KEY WORDS:** Human, porcine and ruminant faecal contaminations, *Bacteroidales*, 16S rRNA genes, Quantitative real-time PCR, Water, Persistence, Oyster

## RESUME

Les fèces d'animaux d'élevage et les effluents d'origine urbaine ou agricole sont les principales sources de contamination microbiologique participant à la dégradation de la qualité des eaux et des coquillages et à l'apport de pathogènes entériques dans l'environnement. La nouvelle directive européenne concernant les eaux de baignade (2006/7/CE) impose pour début 2011 la mise en place de profils de baignade avec une identification et une hiérarchisation des sources de contamination fécale des eaux. Les indicateurs classiques de contamination fécale, *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux, permettent de mettre en évidence une contamination mais pas d'en identifier l'origine. Ainsi, des méthodes alternatives, dont celles basées sur la recherche de microorganismes cibles tels que les bactéries appartenant à l'ordre des *Bacteroidales* ont été développées ou sont en cours de développement pour identifier l'origine humaine ou animale des contaminations. Les premiers marqueurs *Bacteroidales*, développés pour la PCR conventionnelle, ont généralement été très peu détectés dans les eaux de l'environnement et ils n'ont, à notre connaissance, pas été appliqués sur des coquillages.

L'objectif principal de ce travail de thèse était de développer et de valider une approche moléculaire basée sur la PCR quantitative en temps réel, pour permettre l'identification de l'origine des contaminations dans les eaux et les coquillages à partir de la cible *Bacteroidales*.

L'analyse phylogénétique des séquences de gène codant les ARNr 16S des *Bacteroidales* issues de fèces et d'effluents d'origine humaine, porcine, bovine et de fientes d'oiseaux sauvages a permis de développer quatre marqueurs *Bacteroidales*, pour identifier les contaminations fécales humaines (Hum-1-Bac), porcines (Pig-1-Bac et Pig-2-Bac) et ruminants (Rum-2-Bac). Appliqués dans des échantillons de fèces et d'effluents, ces marqueurs se sont révélés hautement sensibles (92,3 - 100 %) et spécifiques (93,4 - 100 %). L'étude de la persistance des marqueurs Pig-1-Bac et Pig-2-Bac, en microcosmes d'eau de rivière, a montré que sous les conditions les plus défavorables, saturation en oxygène dissous et température de 20°C, les marqueurs persistaient au moins 16 jours. Ces résultats suggèrent que les marqueurs *Bacteroidales* peuvent persister assez longtemps dans les eaux de rivière pour être identifiés. Cette hypothèse a été confirmée par leur quantification dans des eaux de rivière et des eaux estuariennes provenant du bassin versant de l'estuaire de Daoulas et de l'estuaire de l'Elorn (Finistère, Bretagne) à des concentrations comprises entre 2,7 et 6,5 U. Log<sub>10</sub> copies/100 ml. Comparés à des marqueurs bactériens, viraux et chimiques à partir d'eaux de ruissellement et de l'environnement, les marqueurs *Bacteroidales* se sont avérés pertinents pour identifier l'origine des contaminations.

Les marqueurs *Bacteroidales* spécifiques de l'hôte ont également été recherchés dans les coquillages. La sélection et l'optimisation d'un protocole d'extraction d'ADN génomique bactérien à partir des liquides intervalvaires d'huîtres artificiellement contaminées a ensuite permis de détecter et de quantifier les marqueurs dans des huîtres naturellement contaminées.

La discrimination de l'origine des contaminations fécales à partir d'échantillons d'eaux et de liquides intervalvaires d'huîtres provenant des deux sites sélectionnés dans cette étude a souligné l'importance des contaminations fécales d'origine humaine et ruminant par rapport aux contaminations d'origine porcine. Cette étude, confirme ainsi l'intérêt d'utiliser des marqueurs spécifiques de l'hôte, développés à partir de la cible *Bacteroidales*, pour identifier l'origine des contaminations fécales au niveau des zones de baignade et des zones conchylicoles.

**MOTS CLES :** Contaminations fécales humaines, porcines et ruminants, *Bacteroidales*, Gènes codant les ARNr 16S, PCR quantitative en temps réel, Eaux, Persistance, Huîtres