

Des micro-organismes et des composés chimiques pour identifier les sources de contamination fécale : étude de leur persistance en microcosmes et de leur présence dans les eaux à l'échelle d'un bassin versant

La dégradation de la qualité des eaux par la pollution microbiologique représente un problème majeur de santé publique, notamment dans les eaux où s'exercent des activités humaines. Afin de définir les actions prioritaires à mener, une meilleure connaissance de l'origine des pollutions fécales est nécessaire. Cet article nous présente le développement d'une méthode innovante utilisant des marqueurs chimiques et microbiologiques permettant de différencier trois sources majeures de contamination des eaux de baignade en Bretagne : les déjections humaines, bovines et porcines.

La contamination microbiologique des eaux est particulièrement préoccupante lorsqu'elle atteint des zones sensibles où s'exercent des activités de baignade, de conchyliculture ou de pêches récréatives.

Afin de réduire le risque sanitaire lié à la présence de micro-organismes pathogènes, les autorités ont durci les exigences en matière de qualité bactériologique des eaux conchylicoles et des eaux de baignade. La directive européenne 2006/7/CEE concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade fixe ainsi des seuils de qualité plus sévères que ceux de la directive précédente et demande l'élaboration de profils de baignade qui doivent notamment recenser les sources de contaminations microbiologiques. Celles-ci peuvent amener les collectivités à fermer temporairement la baignade ou à prendre des mesures de gestion adaptée à la protection sanitaire des baigneurs. Comme le stipulent les textes réglementaires, la contamination microbiologique est évaluée par le dénombrement d'indicateurs fécaux (*Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux). Ainsi, en deçà de 500 *E. coli*/100 mL pour l'eau de mer et de 1 000 *E. coli*/100 mL pour l'eau douce, les eaux de baignade sont considérées de bonne qualité par la directive 2006/7/CEE. Si la présence de ces indicateurs révèle bien une contamination fécale, ils présentent l'inconvénient de ne pas différencier les sources

potentielles des contaminations : effluents de stations d'épuration urbaines, eaux de ruissellement issues d'épandages de lisier de porcs ou de fumier de bovins, déjections animales émises lors du pâturage...

Les administrations et les collectivités chargées d'établir les profils de baignade ne disposent pas d'outils d'identification des pollutions responsables des non-conformités des zones de baignades, ce qui rend difficile la définition des actions prioritaires à mener pour améliorer la qualité sanitaire des eaux. Il est donc important de proposer aux acteurs de l'eau des méthodes analytiques complémentaires au dénombrement des indicateurs fécaux, fondées sur la recherche de marqueurs de l'origine de la contamination fécale. Les marqueurs identifiés dans la littérature scientifique sont des molécules chimiques retrouvées dans les effluents de stations d'épuration ou dans les déjections ainsi que des micro-organismes de la flore digestive (Blanch *et al.*, 2006, Gourmelon *et al.*, 2010 ; Derrien *et al.*, 2011). Ils peuvent être utilisés séparément ou conjointement. L'utilisation combinée des marqueurs, désignée sous le terme de « boîte à outils », permet d'améliorer le pouvoir discriminant des marqueurs (Blanch *et al.*, 2006). Elle est par conséquent intéressante pour déterminer l'origine des contaminations de bassins versants complexes regroupant des activités agricoles et urbaines.

Objectif de l'étude

Quatre équipes de recherche se sont associées dans le cadre du projet Marquopoleau¹ afin de proposer aux laboratoires d'analyses des eaux une boîte à outils permettant de différencier trois sources majeures de contamination fécale (humaine, porcine et bovine). Les marqueurs chimiques et microbiologiques qui constituent la boîte à outils ont été retenus en raison de leur spécificité d'hôte (Gourmelon *et al.*, 2010, Derrien *et al.*, 2011). Toutefois, ce critère, nécessaire à leur sélection, est insuffisant pour que les marqueurs soient considérés comme des outils analytiques performants et fiables. Ils doivent également répondre à deux autres critères : ne pas se multiplier en dehors de l'hôte et présenter une persistance proche de celle des indicateurs fécaux dans les eaux. L'objectif de cet article est d'estimer si les marqueurs sélectionnés dans le cadre du projet Marquopoleau répondent à ces deux critères. Leur comportement a donc été comparé à celui des indicateurs fécaux (i) en microcosmes constitués d'eau douce et d'eau de mer et (ii) à l'échelle d'un bassin versant sur une année afin d'évaluer l'influence éventuelle des saisons.

Composition de la boîte à outils

La boîte à outils a été conçue pour différencier les trois sources majeures de contamination des eaux de surface en Bretagne : les déjections humaines, bovines et porcines. Elle est constituée de marqueurs chimiques (caféine et stanols) et microbiologiques (bactériophages et bactéries).

Marqueurs chimiques

Parmi huit molécules testées comme marqueurs des rejets de stations d'épuration (caféine, retardateurs de flamme, additifs de parfums, détergents...), seule la caféine a été retenue en raison de sa présence systématique dans les eaux usées à des concentrations supérieures à celles des autres marqueurs chimiques (Gourmelon *et al.*, 2010). La digestion des stéroïdes présents initialement dans les aliments, produit un mélange de stérols initiaux et de stanols fécaux dont la distribution dans les déjections dépend de la flore intestinale et du régime alimentaire de l'hôte. La spécificité d'hôte des stérols étant moins élevée que celle des stanols (Derrien *et al.*, 2011), seuls ces derniers ont été retenus. Les variables sont les teneurs relatives des stanols dans les déjections bovines, porcines et les effluents d'origine humaine. La variabilité inter-espèce de la distribution des stanols est exploitée via une analyse en composantes principales (ACP) qui permet de discriminer les déjections animales des effluents et boues de stations d'épuration.

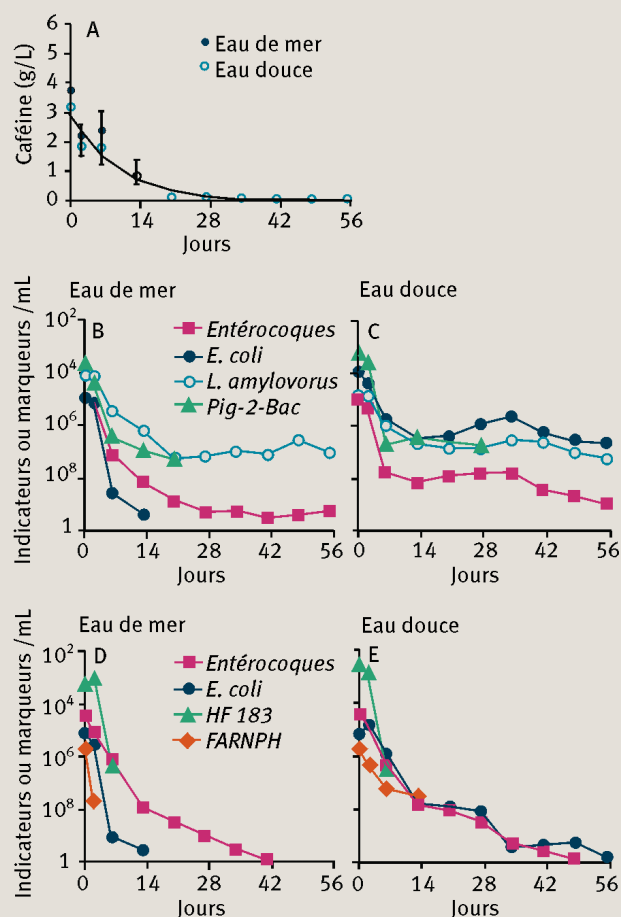
Les méthodologies développées pour la quantification de la caféine et des stanols présentent un principe similaire avec une étape d'extraction et de concentration suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse

couplée à la spectrométrie de masse (stanols) ou à la spectrométrie de masse en tandem (caféine).

Marqueurs microbiologiques

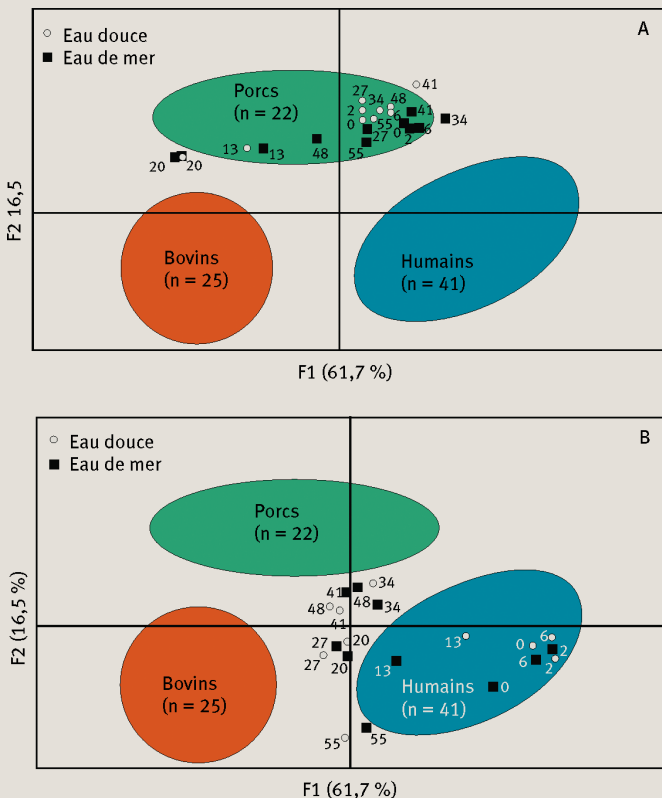
Les phages FARN spécifiques (FARNPH), virus à ARN qui infectent *E. coli*, sont subdivisés en quatre génotypes généralement associés aux effluents d'élevages (groupes I et IV) ou aux eaux usées urbaines (groupes II et III). Toutefois, les génotypes des groupes I, III et IV manquant de spécificité ou étant faiblement présents dans les échantillons cibles (Gourmelon *et al.*, 2010), seuls les génotypes du groupe II, indicateurs d'une contamination humaine, ont été sélectionnés dans cette étude. Les dénombrements des bactériophages sont réalisés par une méthode culturale selon la norme ISO NF 10705-1. Les isolats de FARNPH sont ensuite génotypés par *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Les résultats sont exprimés en unité formant pages (UFP).

❶ Persistance de la caféine (A) après inoculation d'eau usée urbaine et persistance des indicateurs fécaux et des marqueurs microbiologiques dans l'eau de mer et l'eau douce inoculées avec du lisier de porc (B et C) et de l'eau usée urbaine (D et E). Les résultats sont exprimés en UFC pour les indicateurs fécaux, en UFP pour les phages, en copies de génome pour les *Bacteroidales* et en éq. UFC pour *L. amylovorus*.



1. Projet financé par le Fonds unique interministériel, la région Bretagne, les conseils généraux du Finistère et d'Ille-et-Vilaine et Brest Métropole Océane (2009-2012). Ce projet fait suite aux projets « Traceurs » financés par l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (2007-2010).

2 Positionnement des échantillons prélevés au cours du temps dans les microcosmes contaminés par du lisier de porc (A) et de l'eau usée urbaine (B) dans l'ACP réalisée sur la distribution des stanols. Les chiffres indiquent le nombre de jours écoulés entre le début de l'expérience et le prélèvement.



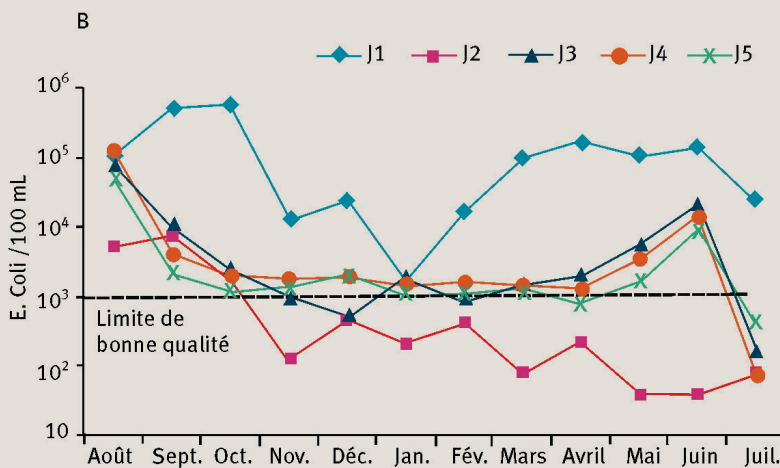
Deux groupes de bactéries anaérobies appartenant à la flore dominante du tractus intestinal ont été également sélectionnés en raison de leur spécificité d'hôte et de leur abondance dans les fèces. Ils correspondent à l'espèce *Lactobacillus amylovorus*, associée aux fèces de porcs et à des séquences d'ADN de *Bacteroidales* associées aux déjections des humains (HF183), des porcs (Pig-2-Bac) et des ruminants (Rum-2-Bac) (Gourmelon *et al.*, 2010). La mise en évidence de leur génome est réalisée, après une extraction de l'ADN, par une amplification génique de type PCR en temps réel. Les gènes cibles sont pour les *Bacteroidales* celui codant pour l'ADNr 16S et pour *L. amylovorus* celui codant pour une région inconnue mais spécifique de l'espèce bactérienne. Les résultats sont exprimés en copie de génome pour les *Bacteroidales* et en équivalent unité formant colonie (eq. UFC) pour *L. amylovorus*.

L'interprétation de la boîte à outils s'appuie sur deux catégories de résultats associés aux seuils de quantification et de détection des méthodes. Ainsi, la caféine et les marqueurs microbiologiques sont quantifiés lorsque le résultat de l'analyse se situe dans une gamme étalon élaborée à partir d'un échantillon standard. Ils sont détectés lorsque la valeur de l'échantillon se situe en deçà de la gamme étalon.

Comparaison de la persistance des marqueurs à celle des indicateurs fécaux en microcosmes

La persistance des marqueurs peut être influencée par de nombreux facteurs caractéristiques du milieu aquatique tels que la teneur en oxygène, la température, la lumière, la salinité, la concentration en éléments nutritifs, le pH ou la prédation par les protozoaires. Les pollutions fécales étant susceptibles de contaminer aussi bien les eaux douces que les eaux marines littorales, l'étude a

3 Localisation des prélèvements sur le bassin versant du Justicou (A) et concentrations en *E. coli* (B).



4 Sources de contaminations déduites de la boîte à outils sur les cinq points du bassin versant du Justicou (J1 à J5). La présence de l'un des trois types de pollution est indiquée par une barre. Trait plein : au moins l'un des marqueurs a été quantifié. Trait hachuré : au moins l'un des marqueurs a été détecté. Le symbole * indique que les teneurs en *E. coli* sont inférieures à la limite de bonne qualité.



consisté à comparer le comportement des marqueurs à celui des indicateurs fécaux dans ces deux types d'eaux. Celles-ci se différencient par leur degré de salinité, mais également par d'autres facteurs tels que leur composition en éléments nutritifs, leur pH et la population de protozoaires. L'effet de la lumière a été écarté par un maintien des eaux à l'obscurité. Les conditions les plus défavorables à la survie des marqueurs microbiologiques ont été retenues : saturation en oxygène dissous et présence de protozoaires (eaux non filtrées). La température des eaux a été maintenue à 18 ± 2 °C, ce qui correspond aux températures observées en Bretagne dans les eaux de surface durant la période estivale. Le suivi des concentrations en marqueurs et en indicateurs fécaux a été réalisé pendant 55 jours en microcosmes constitués d'aquariums de 100 L remplis d'eau douce (salinité < 1 ‰) ou d'eau de mer (salinité de 33 ‰), contaminées avec du lisier de porc (dilution au 1/100^e) ou de l'eau usée urbaine (dilution au 1/20^e). Les résultats des analyses sont reportés sur les figures 1 et 2 issues des travaux de Solecki *et al.* (2011) et Jeanneau *et al.* (2012).

Bien que leurs persistances diffèrent, les courbes de disparition des indicateurs fécaux et des marqueurs microbiologiques suivent un modèle biphasique. Les données obtenues au cours de cette étude montrent que la

survie de *E. coli*, des bactériophages et des marqueurs *Bacteroidales* Pig-2-Bac et HF183 est plus élevée en eau douce qu'en eau de mer, alors que cette différence de comportement est moins marquée pour les entérocoques et *L. amylovorus*. Par ailleurs, *L. amylovorus*, qui a été quantifié pendant deux mois, persiste plus longtemps que les marqueurs Pig-2-Bac et HF183, qui n'ont plus été détectés après 21 et 6 jours en eau de mer et après 28 et 13 jours en eau douce. La disparition rapide des *Bacteroidales* peut être expliquée par leur sensibilité à l'oxygène, mais aussi par le seuil de détection de la technique de quantification qui est cent fois plus élevé que celui des indicateurs fécaux.

La caféine a été détectée pendant six jours en eau de mer. Elle est restée quantifiable jusqu'à la fin de l'expérience en eau douce, mais à des teneurs proches de la limite de quantification dès le vingt-et-unième jour.

La distribution des stanols est restée spécifique d'une pollution porcine ou humaine pendant treize jours indépendamment du degré de salinité de l'eau (figure 3).

Dans les conditions de l'expérience, les concentrations en *E. coli* ont atteint rapidement un faible niveau de concentration situé en deçà des valeurs limites de bonne qualité pour la baignade. Ainsi les concentrations

► inférieures à 500 UFC et 1 000 UFC /100 mL ont été atteintes respectivement en moins de six jours en eau de mer et en moins de treize jours en eau douce. Il est important de souligner que pendant cette période, les marqueurs chimiques et microbiologiques ont été quantifiés, validant ainsi l'utilisation de la boîte à outils pour des eaux de mauvaise qualité bactériologique.

Application de la boîte à outils à un bassin versant

La boîte à outils devant être applicable à l'échelle de bassins versants complexes regroupant des activités urbaines et d'élevage, une campagne de mesures a été réalisée d'août 2010 à juillet 2011 (analyses mensuelles) sur cinq points d'un sous-bassin versant de l'Elorn (bassin versant du Justicou, Finistère), près de la commune de Plouneventer (29400), traversant des parcelles agricoles et recevant un rejet de station d'épuration (figure 3A). En parallèle au degré de pollution fécale qui a été déterminé par le dénombrement de *E. coli* (figure 3B), l'origine de la contamination a été estimée par l'analyse des différents marqueurs (figure 4).

Les teneurs en *E. coli* ont fluctué de l'ordre d'un facteur 100 à 1 000 au cours de l'année quel que soit le point de prélèvement. Les valeurs les plus fortes ont été observées au point J1, situé en aval de l'émissaire de la station d'épuration, et les valeurs les plus faibles au point J2, dans une zone agricole peu impactée par les pollutions. Les points J3 à J5 situés en aval du rejet urbain présentent des teneurs similaires en *E. coli* indépendamment de la date de prélèvement. Par ailleurs, excepté en août 2010 et en juin 2011, celles-ci sont proches de la valeur limite de bonne qualité en eau douce qui est de 1 000 *E. coli*/100 mL.

En accord avec le positionnement (en aval d'un rejet de station d'épuration) et les teneurs en *E. coli* du point J1, la boîte à outils a bien mis en évidence l'impact de la pollution humaine. Celle-ci a été révélée par la présence systématique de caféine, du marqueur *Bacteroidales* HF183, des phages F-ARN du génogroupe II et par les stanols associés à une contamination humaine. Par ailleurs, *L. amylovorus* a été quantifié deux fois sur ce point de prélèvement, indiquant une contamination porcine ponctuelle. L'absence de marqueurs pendant cinq mois au point J2 peut être expliquée par le faible niveau de contamination du cours d'eau. L'origine animale de la pollution sur ce point n'a d'ailleurs été indiquée que par la distribution des stanols dont le seuil de quantification est plus bas que celui des autres marqueurs. Les trois autres points analysés (J3 à J5) présentent une pollution mixte. La contamination humaine apparaît régulièrement alors que les contaminations bovines et porcines sont intermittentes. Cette différence de comportement

des marqueurs peut s'expliquer par le mode de gestion des effluents humains et animaux. Alors que la pollution humaine associée aux rejets de stations d'épuration est émise en continu, l'épandage du lisier et du fumier et la mise en pâture des bovins, tributaires de contraintes administratives et saisonnières, conduisent à une contamination plus aléatoire des cours d'eau.

Conclusion

Les différentes études menées dans le cadre du projet Marquopoleau ont montré, d'une part que les marqueurs sélectionnés présentent une persistance suffisamment élevée pour être détectés dans les eaux de surface, et d'autre part que leur utilisation combinée permet de différencier les trois principales sources de pollutions susceptibles d'altérer la qualité sanitaire des eaux. Le projet ayant pour ambition le transfert de la boîte à outils à des laboratoires d'analyses des eaux, celle-ci doit encore être validée par une étape d'intercalibration en aveugle des marqueurs. Il s'agit à terme de montrer que l'utilisation de boîtes à outils telles que celle qui est proposée dans cette étude, est nécessaire à la réalisation d'un diagnostic fiable de l'origine de la contamination, permettant ainsi de faciliter la mise en place d'actions correctives efficaces. ■

Les auteurs

Anne-Marie POURCHER et Olivia SOLECKI

Irstea, centre de Rennes, Université Européenne de Bretagne, UR GERE, Gestion environnementale et traitement biologique des déchets, 17 avenue de Cucillé, 35044 Rennes Cedex

✉ anne-marie.pourcher@irstea.fr

✉ olivia.solecki@univ-rennes1.fr

Émilie JARDÉ et Laurent JEANNEAU

UMR 6118 Géosciences Rennes, Équipe géochimie des eaux et des interfaces, Bâtiment 15, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex

✉ emilie.jarde@univ-rennes1.fr

✉ laurent.jeanneau@univ-rennes1.fr

Alain JADAS-HÉCART

UMR 6554 LETG Angers-LEESA, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 Bd Lavoisier, 49045 Angers Cedex 01

✉ alain.jadas-hecart@univ-angers.fr

Marie-Paule CAPRAIS et Michèle GOURMELON

Laboratoire de microbiologie MIC/LNR – EMP – RBE – IFREMER, BP 70, 29280 Plouzané

✉ marie.paule.caprais@ifremer.fr

✉ michele.gourmelon@ifremer.fr

Gaël DURAND

IDHESA Bretagne océane, 120 avenue A. de Rochon, BP 52, 29280 Plouzané

✉ gael.durand@idhesa.fr



QUELQUES RÉFÉRENCES CLÉS...

- 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., SKRABER, S., PAPAGEORGIOU, G. T., TAYLOR, H., WALLIS, J., JOFRE, J., 2006, Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking, *Applied Environmental Microbiology*, n° 72, p. 5915-5926.
- DERRIEN, M., JARDÉ, E., GRUAU, G., PIERSON-WICKMANN, A.C., 2011, Extreme variability of steroids profiles in cow faeces and pig slurries at regional scale : implications for the use of steroids to specify faecal pollution sources in waters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n° 59 (13), p. 7294-7302.
- GOURMELON, M., CAPRAIS, M. -P., MIESZKIN, S., MARTI, R., WERY, N., JARDE, E., DERRIEN, M., JADAS-HECART, A., COMMUNAL, P.-Y., JAFFREZIC, A., POURCHER, A.-M., 2010, Development of microbial and chemical MST tools 1 to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France, *Water Research*, n° 44 (16), p. 4812-4824.
- JEANNEAU, L., SOLECKI, O., WÉRY, N., JARDÉ, E., GOURMELON, M., COMMUNAL, P.-Y., JADAS-HÉCART, A., CAPRAIS, M.-P., GRUAU, G., POURCHER, A.-M., 2012, Relative Decay of fecal indicator bacteria and human associated-markers : a microcosm study simulating wastewater input into seawater and freshwater, *Environmental Science and Technology*, n° 46, p. 2375-2382.
- SOLECKI, O., JEANNEAU, L., JARDE, E., GOURMELON, M., MARIN, C., POURCHER, A.-M., 2011, Persistence of microbial and chemical pig manure markers as compared to faecal indicator bacteria survival in freshwater and seawater microcosms, *Water Research*, n° 45, p. 4623-4633.

► Consulter l'ensemble des références sur le site de la revue www.set-revue.fr

La contamination microbiologique des eaux est particulièrement préoccupante lorsqu'elle atteint des zones sensibles où s'exercent des activités humaines.