



## Détermination de l'origine des pollutions fécales des eaux : Exemple d'outils développés dans le cadre du projet "Traceurs de contamination fécale"

**A-M. Pourcher**<sup>1</sup>, R. Marti<sup>1</sup>, P. Dabert<sup>1</sup>, M. Gourmelon<sup>2</sup>, M-P. Caprais<sup>2</sup>, S. Mieszkin<sup>2</sup>, E. Jardé<sup>3</sup>, P. Petitjean<sup>3</sup>, A. Jaffrezic<sup>4</sup>, N. Wery<sup>5</sup>, P-Y. Communal<sup>6</sup>, A. Jadas-Hécart<sup>6</sup>, G. Durand<sup>7</sup>

<sup>1</sup> **Unité de recherche GERE-Cemagref Rennes**

<sup>2</sup> Laboratoire de Microbiologie, Département Environnement - IFREMER Plouzané

<sup>3</sup> Unité Mixte de Recherche 6118 - CNRS Géosciences Rennes

<sup>4</sup> Unité mixte de recherche Sol Agro et hydro Systèmes - INRA Rennes

<sup>5</sup> Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement -UR 50- INRA Narbonne

<sup>6</sup> Laboratoire LEESA / EquAM - Université d'Angers

<sup>7</sup> Littoralis -Plouzané



déjections d'animaux  
d'élevages



effluents et boues issus  
des stations d'épuration



rejets des habitations non  
connectées aux réseaux



pollution microbologique et chimique  
qui participe à la dégradation de la  
qualité des eaux de surface



**Pollution localisée**  
rejets identifiables



**Pollution diffuse**  
Identification de  
leur origine difficile



## Comment tracer les pollutions fécales ?



zones de baignade

← Contamination des zones sensibles →



zones conchylicoles



Source Cemagref



## Comment tracer les pollutions fécales ?

☞ méthodes normalisées de détection de pollution fécale

2 indicateurs de contamination fécale

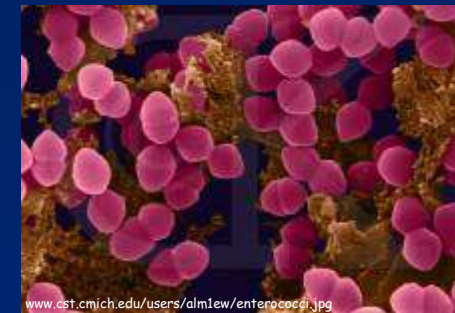


[www.ebiologie.fr/upload/Gallery/e\\_coli-dk.jpg](http://www.ebiologie.fr/upload/Gallery/e_coli-dk.jpg)

*E. coli*

😊 origine fécale

☹ impossible de différencier  
humain/ animal



[www.cst.cmich.edu/users/alm1ew/enterococci.jpg](http://www.cst.cmich.edu/users/alm1ew/enterococci.jpg)

Entérocoques intestinaux



Source Cemagref



## Comment tracer les pollutions fécales ?

→ Besoin d'outils analytiques pour identifier les sources de pollution

travaux scientifiques sur les marqueurs

### 2 Projets

**Traceurs (Cemagref)**  
AFSSET  
6 organismes de recherche

**Marquopoleau (Littoralis/Ifremer)**  
labellisé par le Pôle Mer Bretagne  
Fonds FUI, région Bretagne, collectivités territoriales

3 laboratoires d'analyses privés (Littoralis, 2 IPL)  
4 organismes de recherche  
Agence de l'Eau Loire-Bretagne  
DRASS Bretagne  
Brest Métropole Océane (collectivités)

## **objectif (projet Traceurs - 2007-2010)**

développer et valider de nouveaux outils analytiques fondés sur l'identification de marqueurs permettant de déterminer l'origine humaine ou animale de la pollution fécale

## **finalité (projet Marquopoleau -2009-2011)**

fournir aux acteurs de l'eau les bases scientifiques et les outils nécessaires aux évaluations d'impact et de risques liés aux contaminations fécales

Outils supplémentaires pour les profils de baignade



**originalité des projets : approche pluridisciplinaire**

# Marqueurs de contamination

## 2 approches :

### - microbiologique :

1) identification de séquences d'ADN bactérien

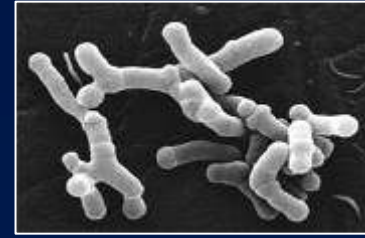
2) identification de bactériophages

### - chimique :

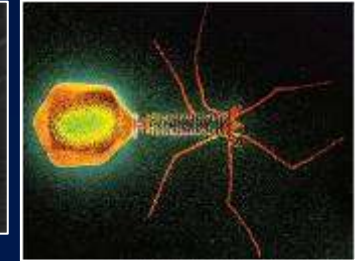
1) quantification de molécules spécifiques des rejets de stations d'épuration urbaines

2) identification des empreintes moléculaires des stéroïdes en fonction des effluents humains ou animaux

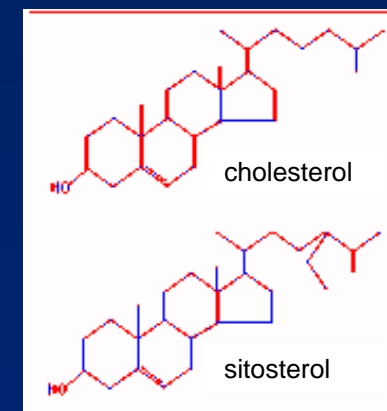
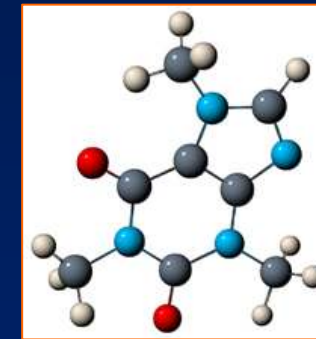
3) caractérisation de la matière organique



[microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacter...](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacter...)



[www.scienceclarified.com/As-Bi/Bacteria.html](http://www.scienceclarified.com/As-Bi/Bacteria.html)



# projet Traceurs - 2007-2010

## 6 Laboratoires partenaires

CEMAGREF Rennes

marqueurs bactériens spécifiques des effluents d'élevages  
porcins / bovins

IFREMER Brest

marqueurs viraux et bactériens animaux et humains

INRA Narbonne

marqueurs bactériens humains

LEESA/EquAM -Université d'Angers

marqueurs chimiques : molécules d'origine humaine

UMR CNRS Géosciences- Rennes

UMR Sol Agronomie Spatialisation (SAS)- Rennes

marqueurs chimiques : caractérisation de la matière organique

# projet Traceurs - 2007-2010 : Programme de l'étude

## 1) développement d'outils

sur fèces bovines, porcines et humaines, effluents de stations d'épuration

## 2) application terrain

comportement des marqueurs et de *E. coli*

- eaux de ruissellement lors de l'épandage simulation de pluie
- cours d'eau impactés pollution humaine ou animale



Source Cemagref

station d'épuration urbaine



[www.cemagref.fr/.../epuration/07/epuration.jpg](http://www.cemagref.fr/.../epuration/07/epuration.jpg)

rejet d'abattoir

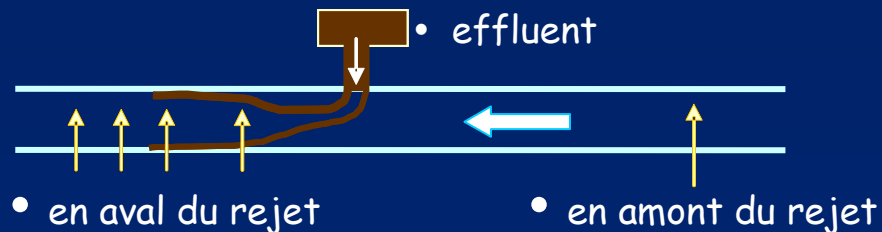


[www.mddep.gouv.qc.ca/.../yamaska/image/rejet.jpg](http://www.mddep.gouv.qc.ca/.../yamaska/image/rejet.jpg)

zone impactée animale



Source : Environnement Canada



- à l'échelle de bassin versant - eau douce et eau marine



# Projet MARQUOPOLEAU 2009- 2011 - Programme de l'étude

## 10 partenaires

- Validation, adaptation des outils analytiques
- Formation des partenaires privés aux méthodes
- Evaluation de la persistance en microcosmes
  - eau douce à l'obscurité à 8°C
  - eau de mer en lumière artificielle à 18°C
- Application des outils aux pollutions diffuses d'un bassin versant
  - suisvis mensuels + crues pendant 1 an
  - points de prélèvements en amont et au niveau du littoral (baignade)
- Transfert des outils analytiques au partenaire privé dès la validation des méthodes
- Essai d'intercalibration des méthodes sélectionnées

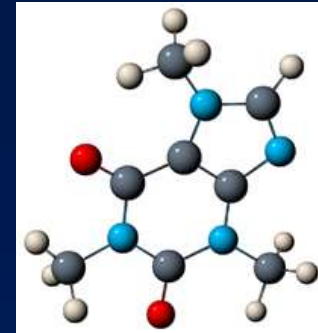


# Premiers résultats projet Traceurs



## ➤ marqueurs chimiques d'origine humaine

- **caféine**
- **8 autres molécules** de synthèse détectées dans 100% des effluents urbains (US-EPA)
  - éthyl citrate (additif du tabac)
  - galaxolide, tonalide, benzophenone (parfums dans cosmétiques)
  - diphenhydramine (antihistamine)
  - tri(2-chloroethyl)phosphate (TCP), tri(dichlorisopropyl)phosphate (TDCP) (retardateurs de flamme)
  - triclosan (désinfectant)

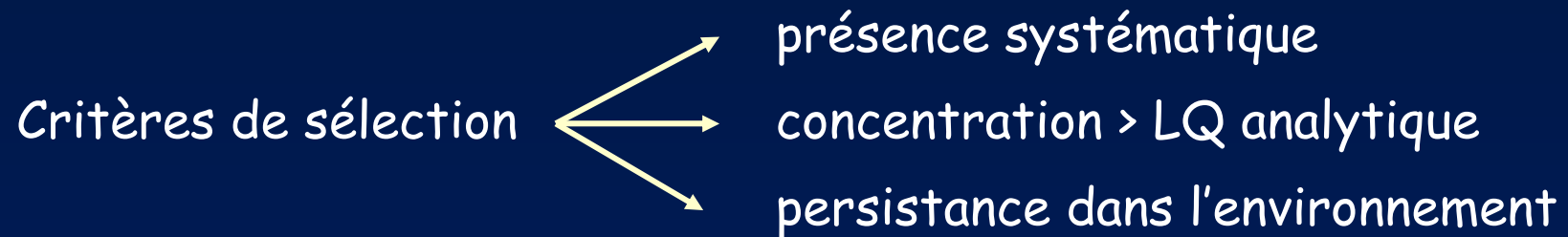


[www.edgb2b.com/.../produit/produit\\_la\\_46002.jpg](http://www.edgb2b.com/.../produit/produit_la_46002.jpg)

## outils analytiques

analyse multi résidus par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem

## ➤ marqueurs chimiques de synthèse



## Dosage validé pour 7 molécules sur les 9 sélectionnées

éthyl citrate

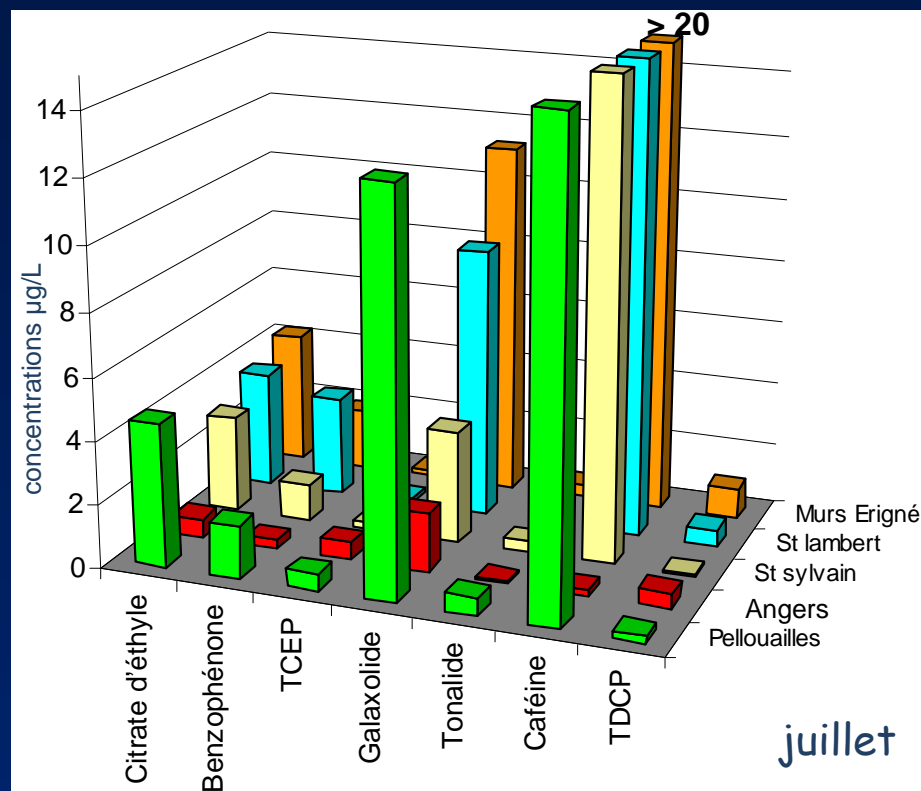
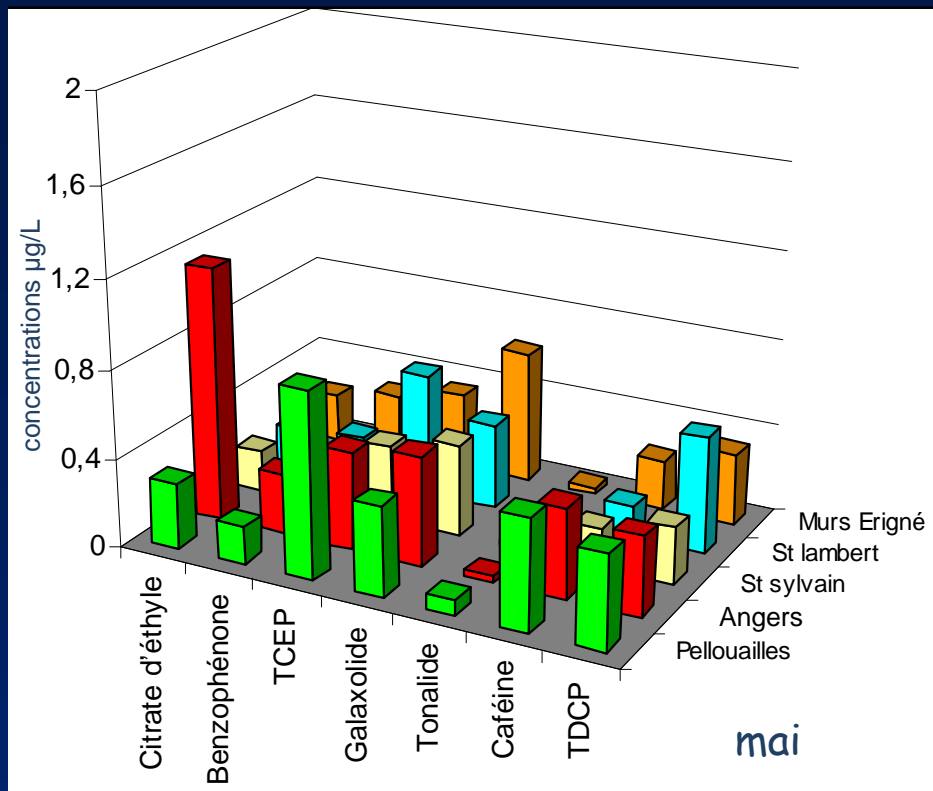
Benzophénone, galaxolide, tonalide

TCEP, TDCP

caféine

# Analyse de 5 effluents de sortie de stations d'épuration (2700 à 250 000 EH)

Résultats



fluctuations  $\swarrow$  station d'épuration  
 $\searrow$  date de prélèvement

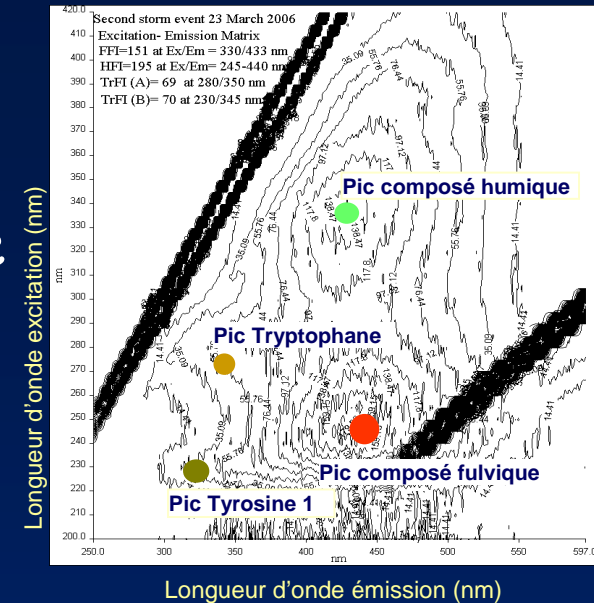
les 7 molécules sélectionnées sont détectées à des teneurs > LQ (0,02 µg/L)

## marqueurs et outils

### ➤ marqueurs chimiques naturels

- fraction soluble de la matière organique  
(empreinte spectrale)

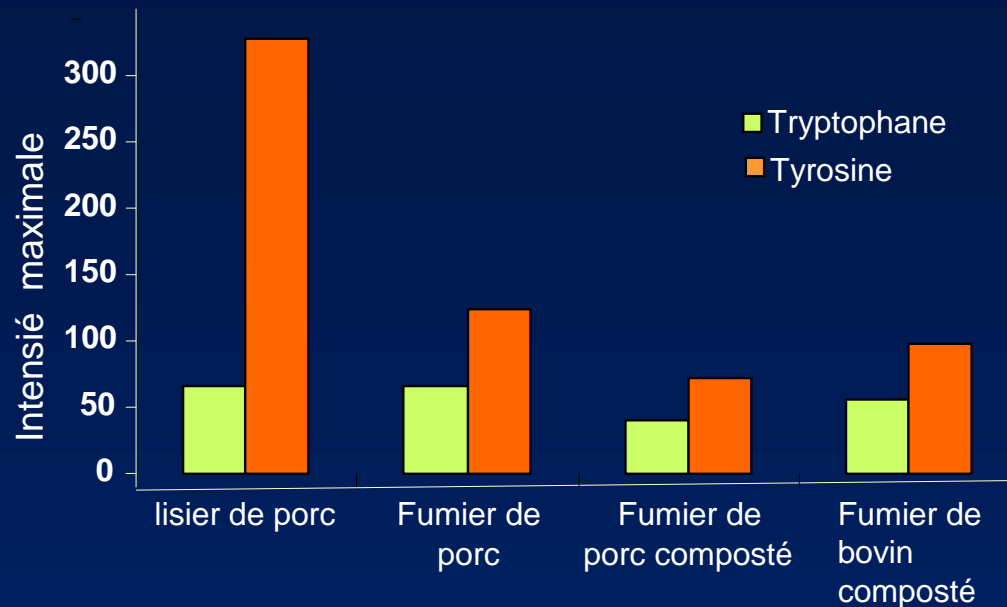
tyrosine et tryptophane



### outils analytiques

spectrométrie de fluorescence moléculaire tridimensionnelle

## Signature spectrale des effluents d'élevage : tryptophane et tyrosine



Intensité importante de la tyrosine dans lisier de porc

Parcelle amendée lisier de porc

→ signal tyrosine plus important que fertilisation minérale 6 mois après épandage

➤ **marqueurs chimiques naturels**

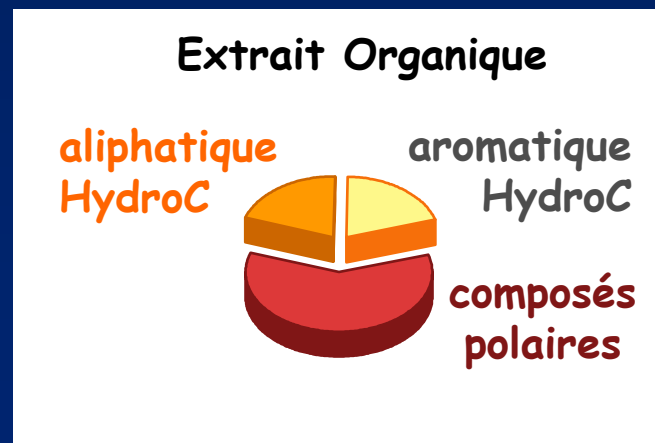
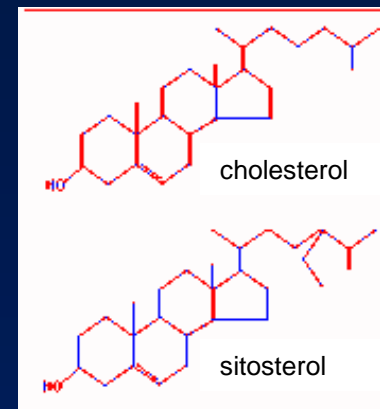
- stérols, stanols

**outils analytiques**

Extraction de la matière organique

Fractionnement des extraits organiques par chromatographie liquide

Analyse des stéroïdes par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

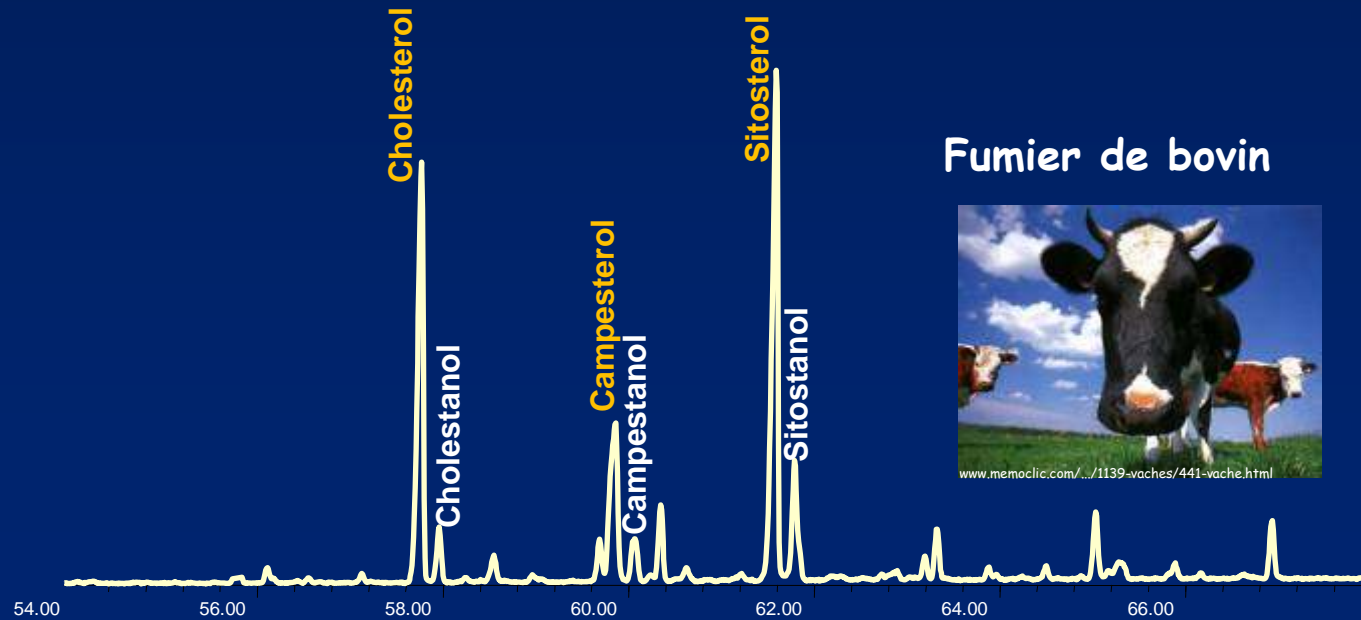
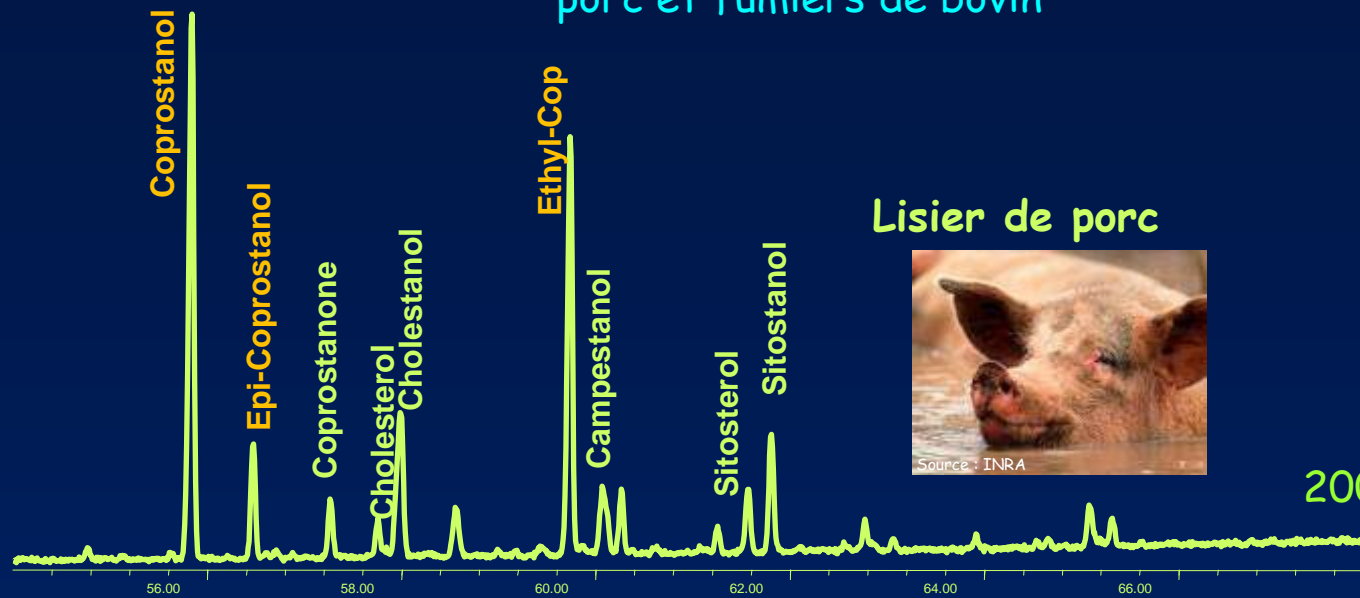


Analyse CPG-SM  
Molécules de masse

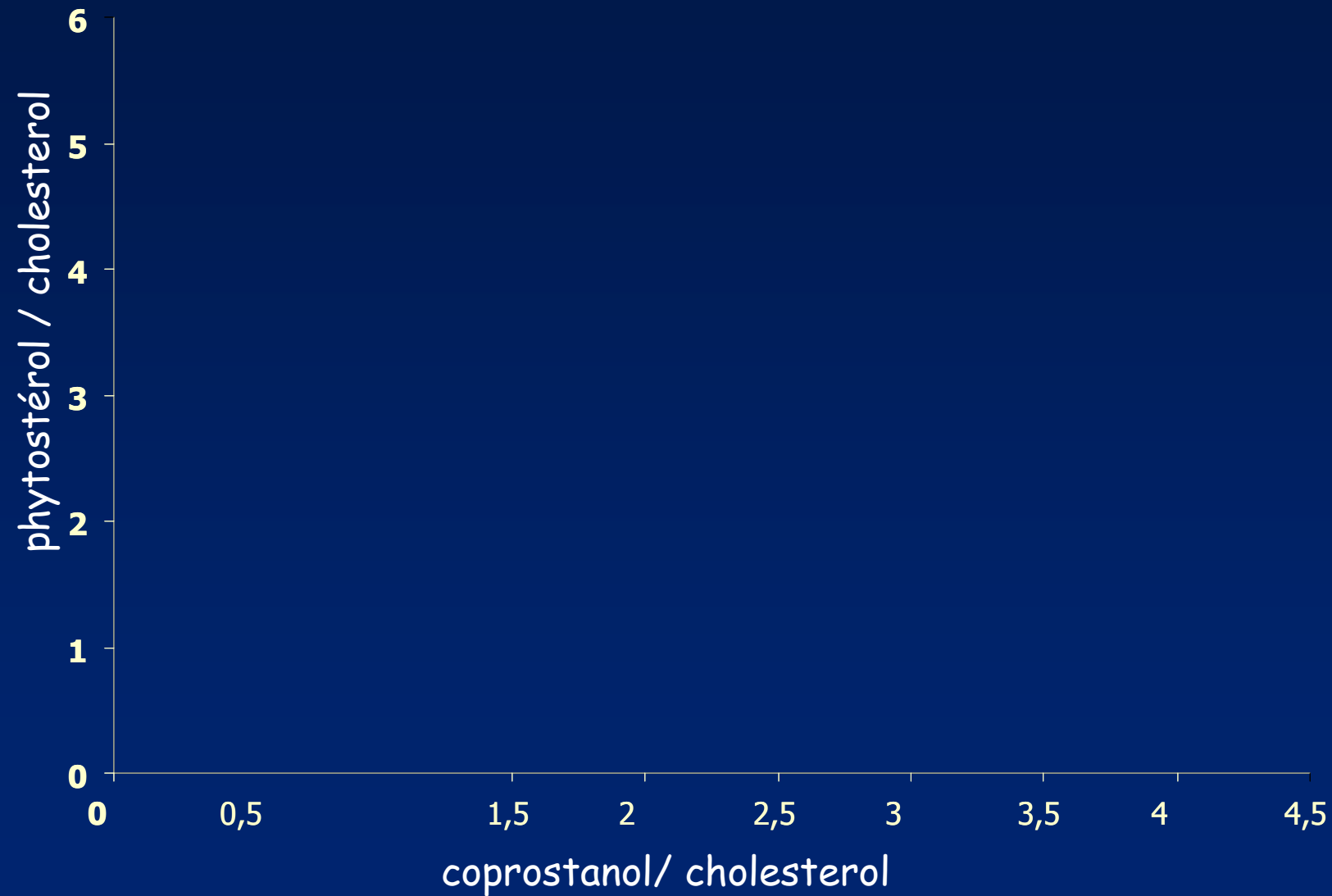


[www.edgb2b.com/.../produit/produit\\_la\\_46002.jpg](http://www.edgb2b.com/.../produit/produit_la_46002.jpg)

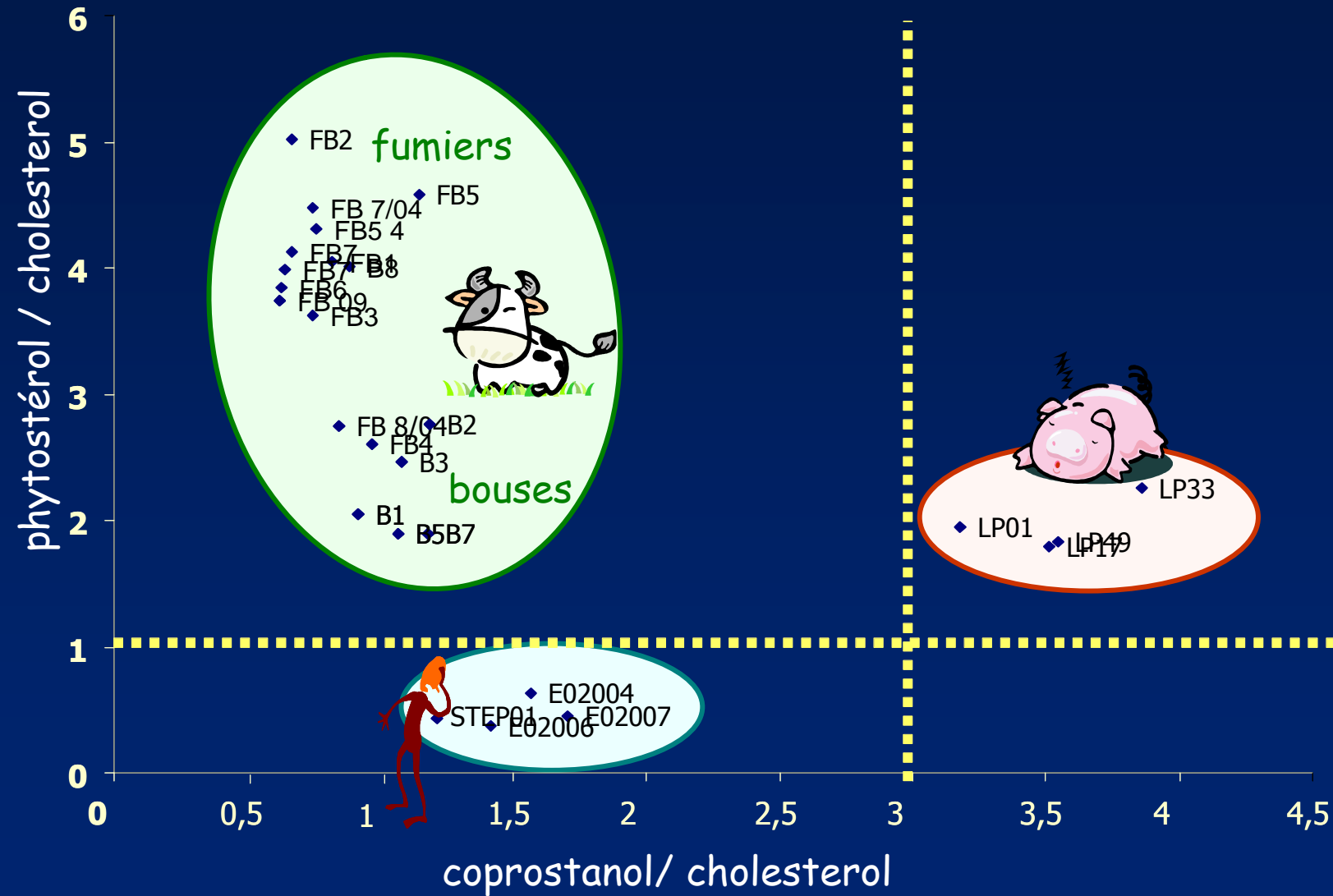
# Profils des stérols et stanols des lisiers de porc et fumiers de bovin



# Comparaison des ratios stérols/ stanols dans les déjections humaines, bovines et porcines



# Comparaison des ratios stérols/ stanols dans les déjections humaines, bovines et porcines



## ➤ marqueurs bactériens et viraux

marqueurs et outils

bactériophages F ARN

Flore dominante du tractus intestinal

## outils analytiques

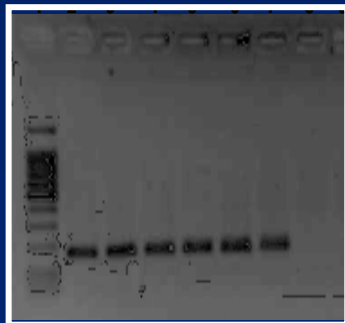
- caractérisation

clonage , séquençage

CE-SSCP (Capillary electrophoresis -Single Strand Conformation Polymorphism)

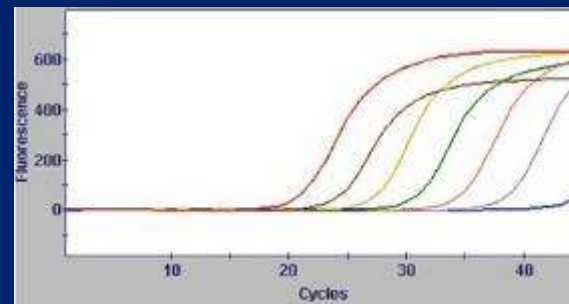
- détection

PCR conventionnelle

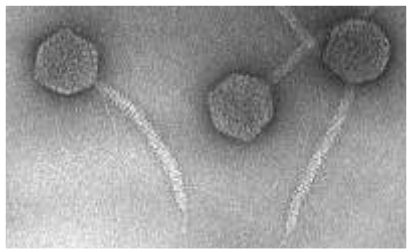


Source : Cemagref

ou PCR quantitative



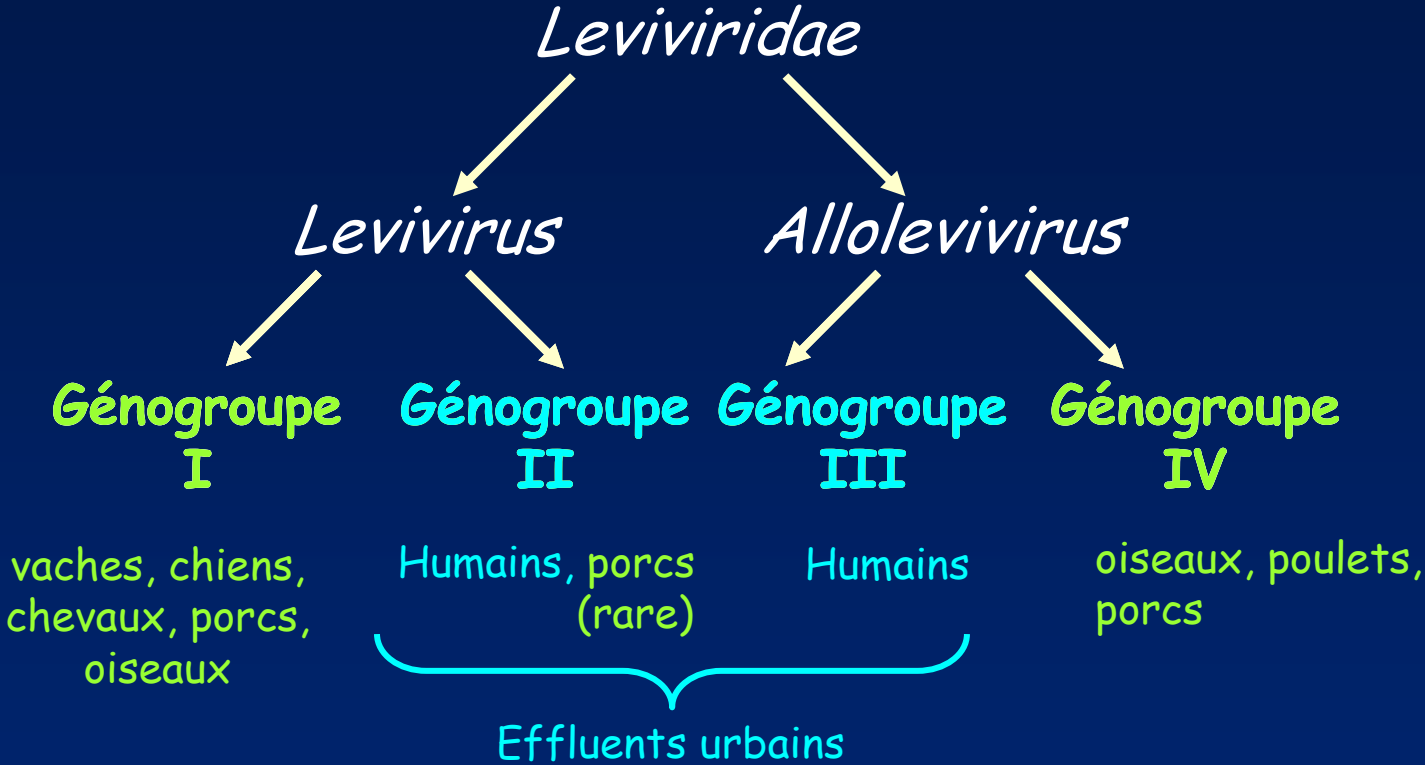
openwetware.org



www.printempsdeschercheurs.fr/IMG/rubon68.jpg

# Les bactériophages F-ARN spécifiques

virus de bactéries :  
infectent seulement les bactéries du tube digestif  
(coliformes)



Sur 21 effluents ou boues de stations  
90,5% : présence de génogroupes II et III → Origine humaine

2 échantillons génogroupes I (10 %) → Présence de rejets animaux ?

# Recherche d'un marqueur bactérien

Résultats

Cible : flore anaérobie majoritaire dans le tube digestif



*Clostridium*



*Bacillus*



*Bifidobacterium*



*Lactobacillus*



*Streptococcus*



*Bacteroidales*



3 groupes de germes retenus



*Bifidobacterium*



*Lactobacillus*



*Bacteroidales*



*Bifidobacterium*  
*Bacteroidales*



*Bifidobacterium*  
*Lactobacillus*  
*Bacteroidales*



*Bifidobacterium*  
*Bacteroidales*

## A la fin des deux projets :



Disponibilité au niveau des laboratoires d'analyse des eaux  
d'outils analytiques performants, validés permettant de discriminer  
les sources de contamination d'origine humaine, bovine et porcine



