

**les
rencontres
scientifiques
de l'Anses**

anses
alimentation, environnement, travail



Exposition aux contaminants de l'environnement

Cité internationale Paris 14^e



Lundi 6 décembre 2010



Développement de marqueurs spécifiques de contamination fécale : application aux profils de baignade

- *Anne-Marie Pourcher*

Projet "Traceurs de contamination fécale "

6 laboratoires

A-M. Pourcher¹, E. Jardé², M-P. Caprais³, A. Jaffrezic⁴, N. Wery⁵,
A. Jadas-Hécart⁶, P-Y. Communal⁶, R. Marti¹, S. Mieszkin³, M. Derrien²,
O. Solecki¹, L. Jeanneau², M. Gourmelon³

1 Cemagref - Rennes



2 CNRS Géosciences - Rennes



3 Ifremer - Plouzané



4 INRA Agrocampus - Rennes



5 INRA LBE - Narbonne



6 Université - LEESA - Angers





Source: INRA



déjections d'animaux
d'élevages



Source: Cemagref

effluents et boues issus des
stations d'épuration



biodiversite.wallonie.be/.../pointnoir.htm

rejets des habitations non
connectées aux réseaux

Contamination ponctuelle ou diffuse

Directive européenne 2006/7/CE sur la qualité des eaux de baignade
Elaboration de profils de baignade (mise en œuvre : mars 2011) ⇒ identifier les sources de pollutions fécales susceptibles de contaminer les zones de baignade.



déjections d'animaux
d'élevages

effluents et boues issus des
stations d'épuration

rejets des habitations non
connectées aux réseaux

Contamination ponctuelle ou diffuse

Directive européenne 2006/7/CE sur la qualité des eaux de baignade
Elaboration de profils de baignade (mise en œuvre : mars 2011) ⇒ identifier les
sources de pollutions fécales susceptibles de contaminer les zones de baignade.

Quelles méthodes pour identifier
l'origine de la pollution
(humaine / animale) ?





👉 méthodes normalisées de détection de pollution fécale

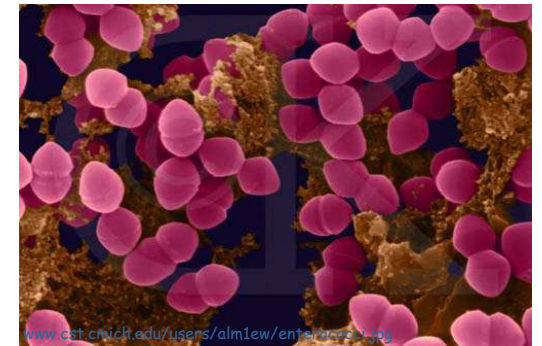
2 indicateurs de contamination fécale



E. coli

😊 origine fécale

☹ impossible de différencier
humain/ animal



Entérocoques intestinaux

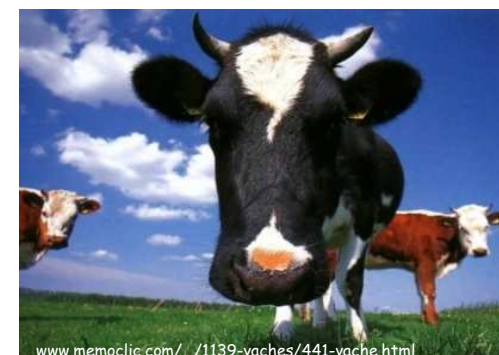
Depuis \approx 10 ans \Rightarrow méthodes "Faecal source tracking"

Regroupent des méthodes biologiques et chimiques pour identifier les principales sources de contamination fécale dans les eaux de surface



Depuis \approx 10 ans \Rightarrow méthodes "Faecal source tracking"

Regroupent des méthodes biologiques et chimiques pour identifier les principales sources de contamination fécale dans les eaux de surface



Objectifs du projet "Traces" :

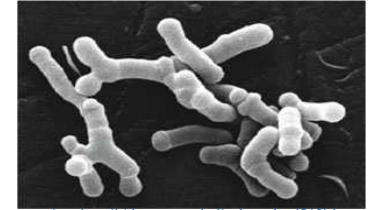
Développer et valider des outils existants et de nouveaux outils analytiques fondés sur l'identification de marqueurs permettant de déterminer l'origine humaine ou animale de la pollution fécale

Différents outils



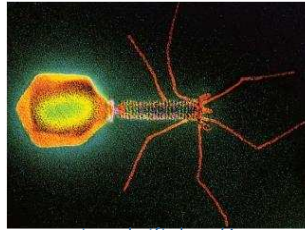
➤ microbiologiques :

- séquences d'ADN bactérien : flore dominante du tube digestif



microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifido_bacter...

- Phages F-RNA spécifiques



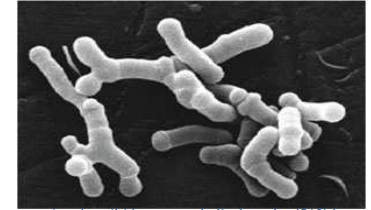
www.scienceclarified.com/As-Bi/Bacteria.html

Différents outils



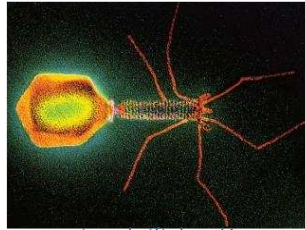
➤ microbiologiques :

- séquences d'ADN bactérien : flore dominante du tube digestif



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

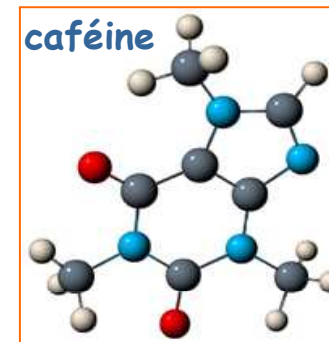
- Phages F-RNA spécifiques



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

➤ chimiques :

- molécules spécifiques des effluents urbains

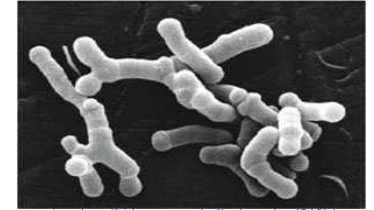


Différents outils



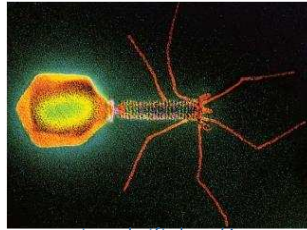
➤ microbiologiques :

- séquences d'ADN bactérien : flore dominante du tube digestif



microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifido_bacter...

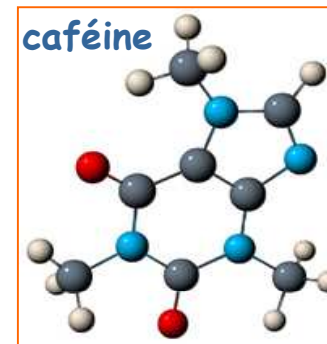
- Phages F-RNA spécifiques



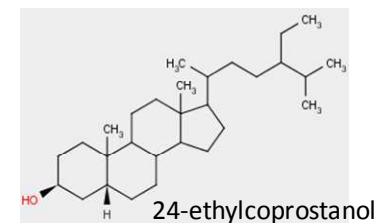
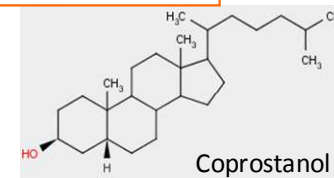
www.scienceclarified.com/As-Bi/Bacteria.html

➤ chimiques :

- molécules spécifiques des effluents urbains



- empreintes moléculaires des stérols et stanols



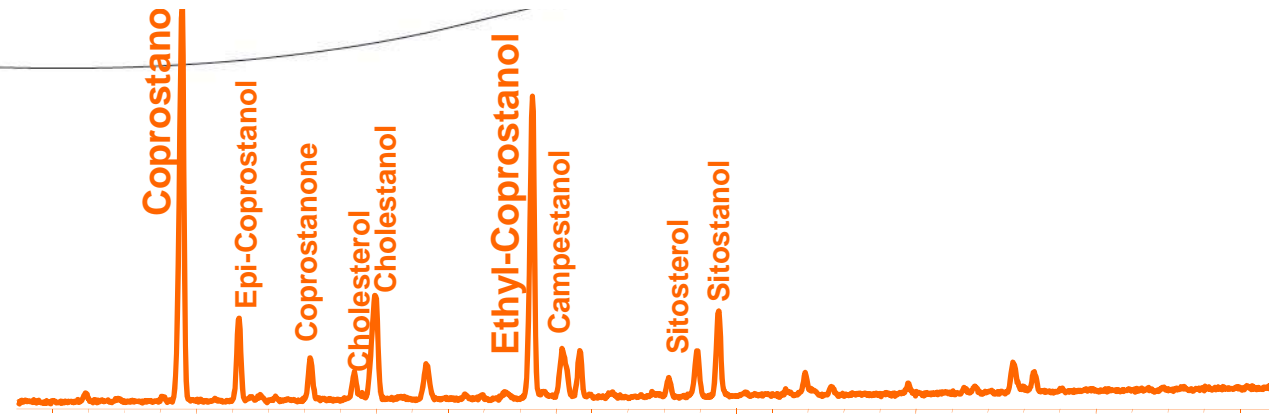
Exemples de profils de stérols et de stanols



Lisier de porc



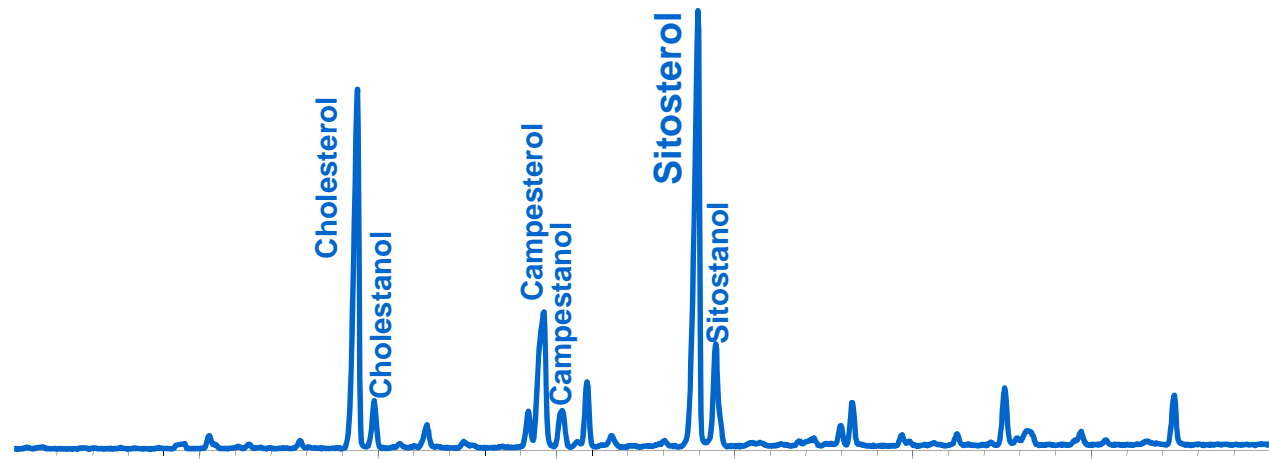
Source : INRA



Fumier de bovin



www.memoclic.com/.../1139-vaches/441-vache.html



2 ratios de stéroïdes :

$$R1 (\%) : \frac{\text{coprostanol}}{(\text{coprostanol} + 24\text{-ethylcoprostanol})}$$

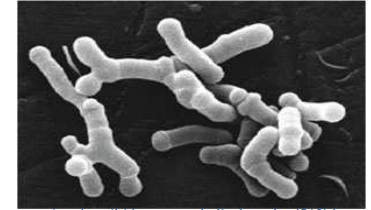
$$R2 : \frac{\text{sitostanol}}{\text{coprostanol}}$$

Différents outils



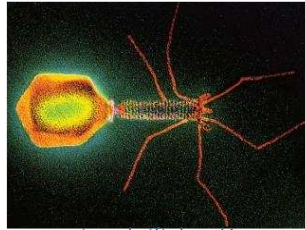
➤ microbiologiques :

- séquences d'ADN bactérien : flore dominante du tube digestif



microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifido_bacter...

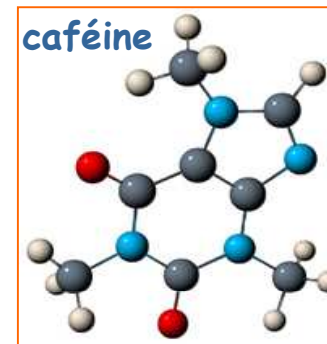
- Phages F-RNA spécifiques



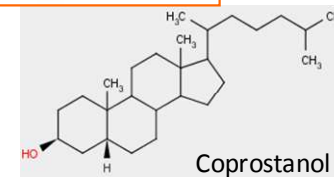
www.scienceclarified.com/As-Bi/Bacteria.html

➤ chimiques :

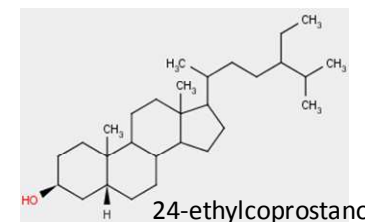
- molécules spécifiques des effluents urbains



- empreintes moléculaires des stérols et stanols



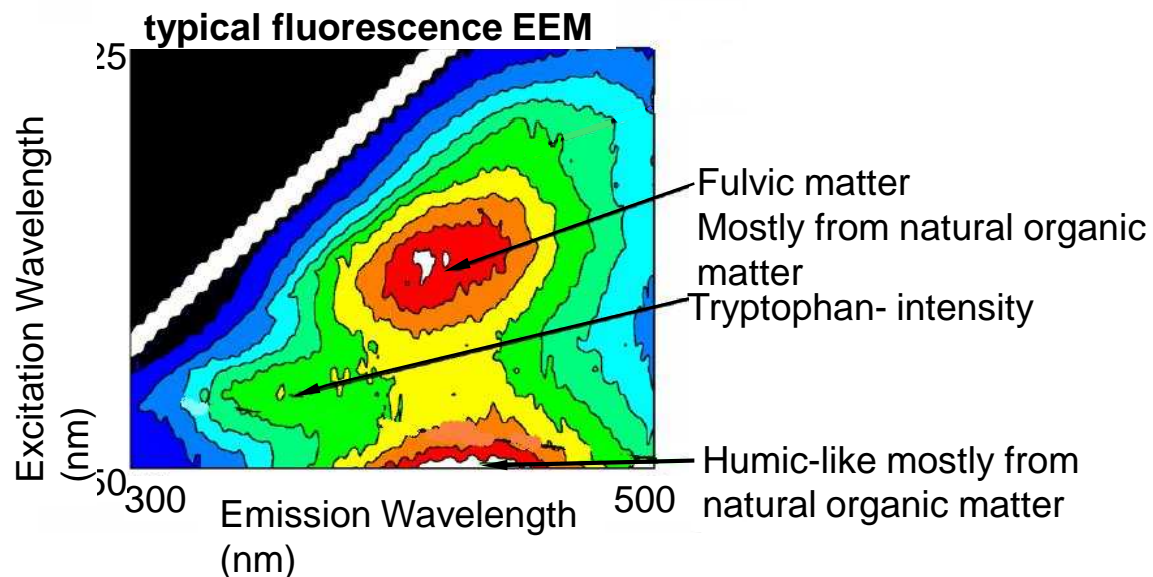
- caractérisation de la matière organique





Caractérisation de la matière organique

La matrice EEM est divisée en 2 régions fluorescentes (biochimique et géochimique) elles mêmes subdivisées en différentes zones



2 ratios :

biochimique/géochimique : **bio-géo**

Geochemical Fluorescence Index : **GFI**

Marqueurs bactériens et viraux








25

hôte	marqueurs	publications
	<i>Pig-2-Bac</i> (<i>Bacteroidales</i>)	<i>Mieszkin et al., 2009</i> 
	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Marti et al., 2010</i> 









Marqueurs bactériens et viraux



hôte	marqueurs	publications
	Pig-2-Bac (<i>Bacteroidales</i>)	Mieszkin <i>et al.</i> , 2009 
	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Marti <i>et al.</i> , 2010 
	Rum-2-Bac (<i>Bacteroidales</i>)	Mieszkin <i>et al.</i> , 2009 






Marqueurs bactériens et viraux



hôte	marqueurs	publications
	Pig-2-Bac <i>(Bacteroidales)</i>	<i>Mieszkin et al., 2009</i> 
	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Marti et al., 2010</i> 
	Rum-2-Bac <i>(Bacteroidales)</i>	<i>Mieszkin et al., 2009</i> 
	HF183 <i>(Bacteroidales)</i>	<i>Seurinck et al., 2005</i>
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Gourmelon et al., 2010</i> 
	bactériophages F-RNA spécifiques (groupes II et III)	<i>Gourmelon et al., 2010</i> 



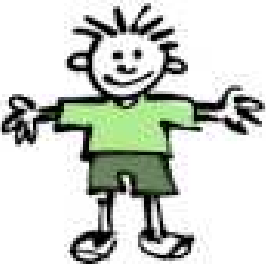

Marqueurs chimiques



hôte	marqueurs	publications
	Ratios de stanols R1 et R2	Jardé <i>et al.</i> , 2007 
 	Ratios de stanols R1 et R2	Jardé <i>et al.</i> , 2007 

Marqueurs chimiques



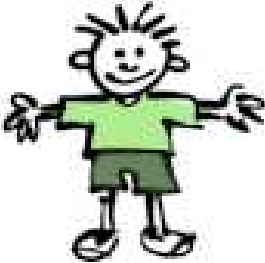




hôte	marqueurs	publications
	Ratios de fluorescence bio-géo et GFI	Bilal <i>et al.</i> , 2010 
	Ratios de fluorescence bio-géo et GFI	Bilal <i>et al.</i> , 2010 

Marqueurs chimiques



15

hôte	marqueurs	publications
	<p>Ratios de fluorescence bio-géo et GFI</p>	<p>Bilal <i>et al.</i>, 2010</p> 
	<p>Ratios de fluorescence bio-géo et GFI</p> <p>Caféine, benzophénone TCEP tri(2-chloroethyl)phosphate)</p>	<p>Bilal <i>et al.</i>, 2010</p> <p>Gourmelon <i>et al.</i>, 2010</p>  

33 échantillons

4 effluents de stations d'épuration

3 eaux de ruissellement après épandage de fumier de bovin

3 eaux de ruissellement après épandage de lisier de porc

23 eaux de rivières

33 échantillons

4 effluents de stations d'épuration

3 eaux de ruissellement après épandage de fumier de bovin

3 eaux de ruissellement après épandage de lisier de porc

23 eaux de rivières

2 zones de baignade (eau douce et eau de mer)

7 points en amont des deux zones de baignade

33 échantillons

4 effluents de stations d'épuration

3 eaux de ruissellement après épandage de fumier de bovin

3 eaux de ruissellement après épandage de lisier de porc

23 eaux de rivières

2 zones de baignade (eau douce et eau de mer)

7 points en amont des deux zones de baignade

14 marqueurs

3 marqueurs chimiques

2 ratios de fluorescence

2 ratios de stanols

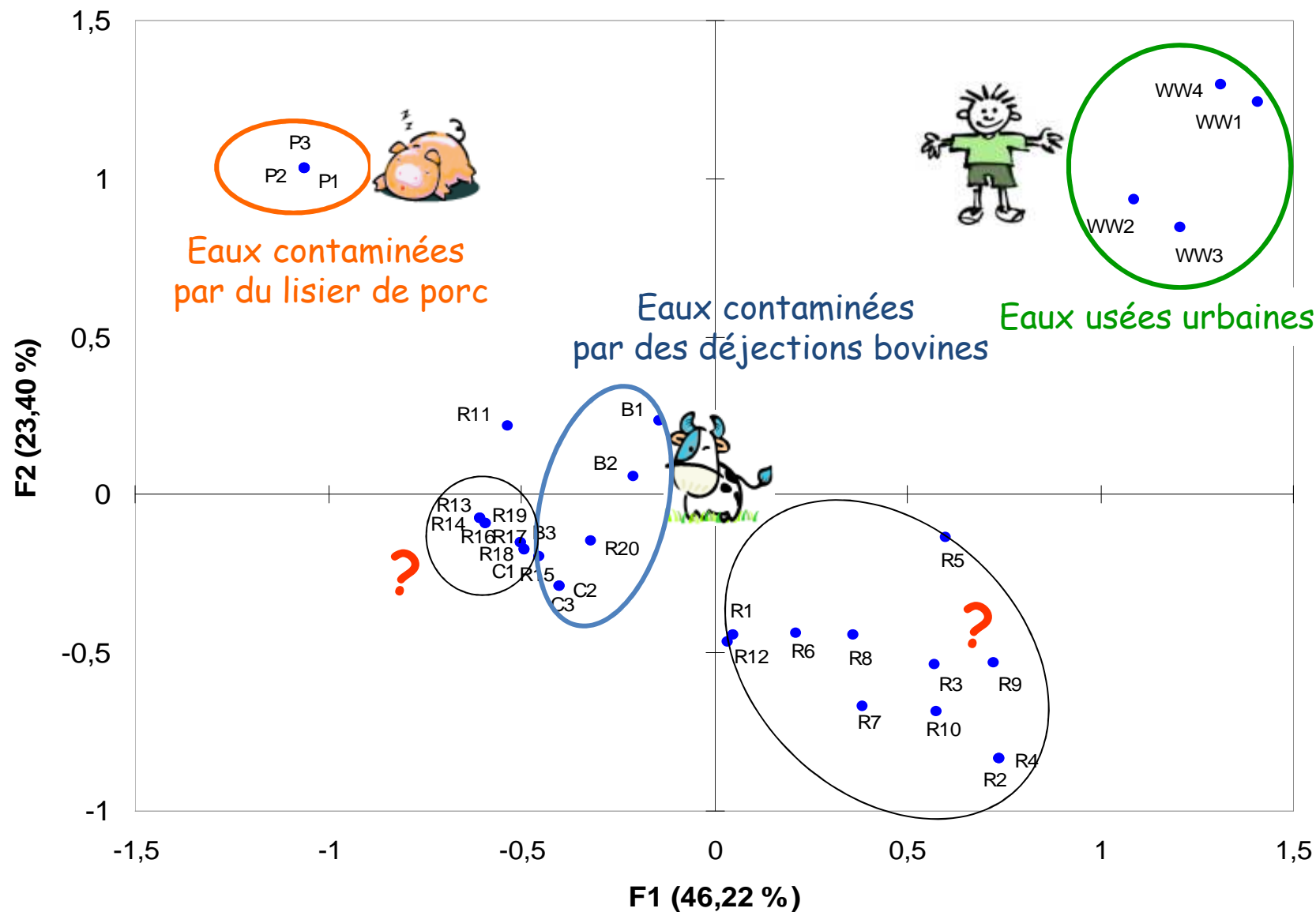
2 groupes de phages F-RNA

5 marqueurs bactériens

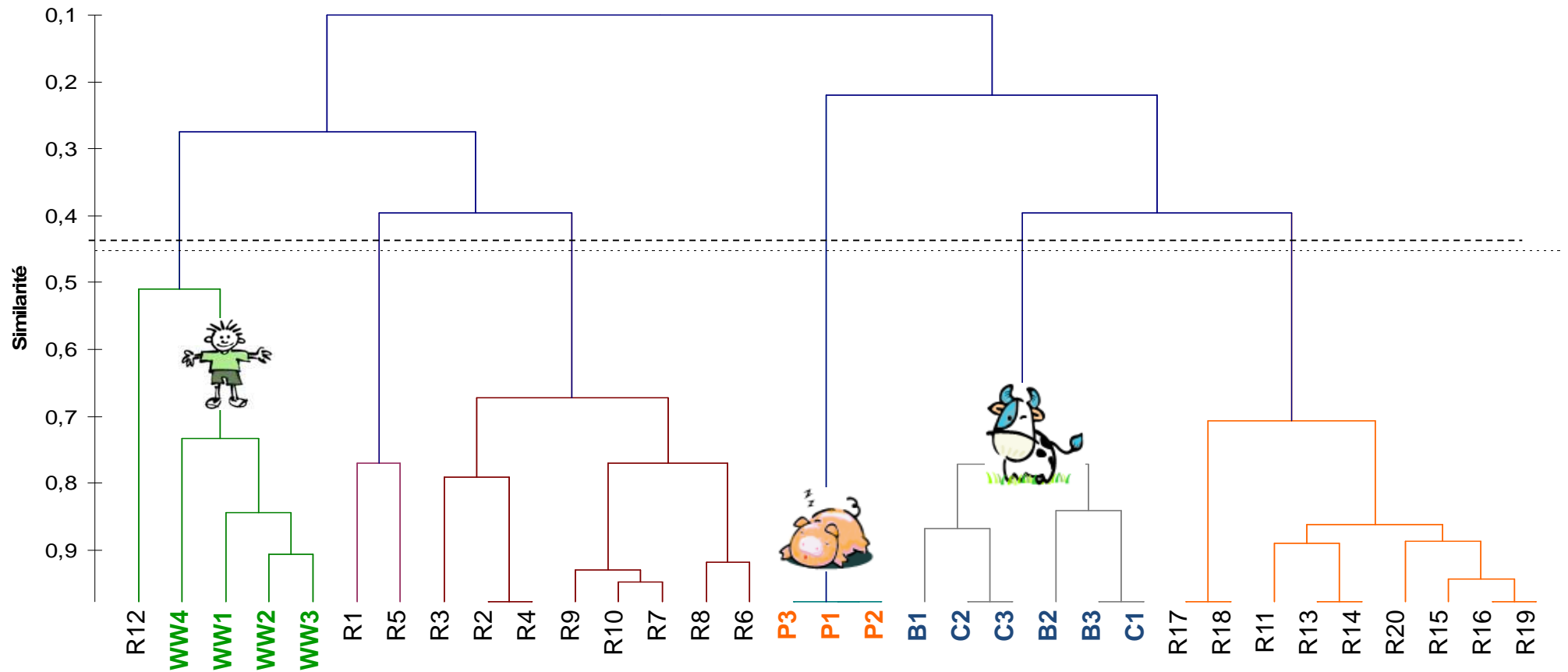
Analyse des Correspondances Multiples

Classification Ascendante Hiérarchique

Application des outils à 33 échantillons d'eaux



Analyse des correspondances multiples



E. coli >1000/ 100 mL

R1 > 60

bio geo > 0,17 et GFI < 0,9

B. adolescentis > 10⁵

HF 183 > 10⁵

Phages FRNA II et III

Caféine ≥ 0,3

Benzophenone ≥ 0,2

TCEP 0,08 à 0,5

E. coli >1000

bio geo > 0,17

GFI > 1,2

Pig-2-Bac > 10⁵

L. amylovorus > 10⁷

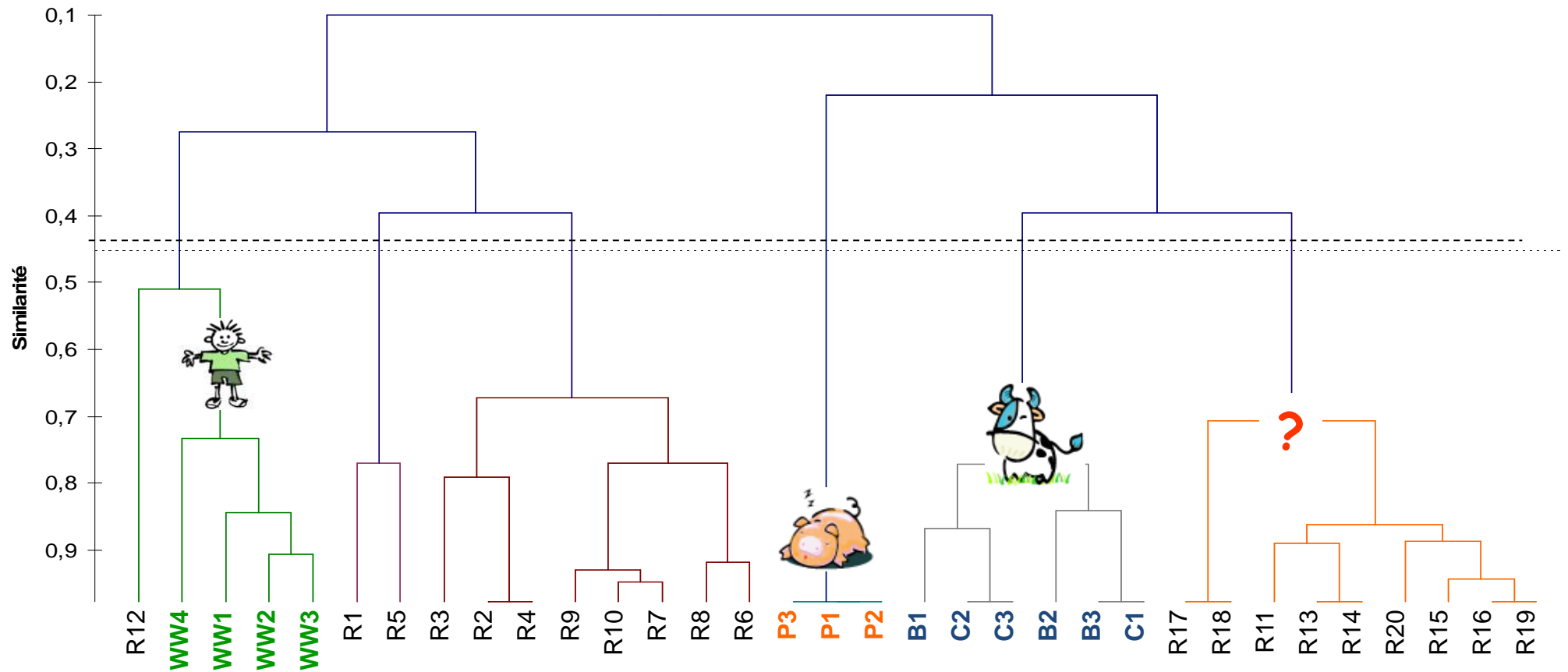
E. coli >1000

R1 < 50

R2 > 1

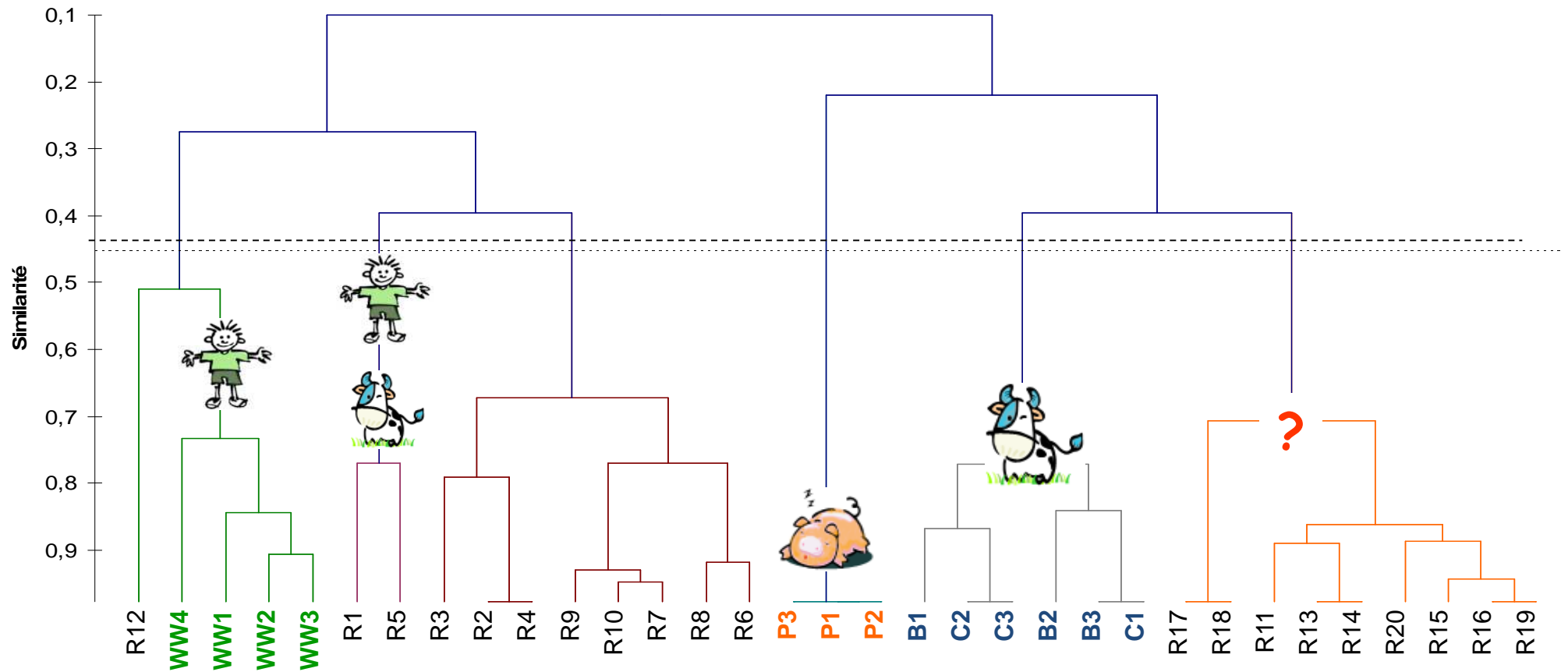
Rum-2-Bac > 10⁵

B. adolescentis 10⁴ à 10⁵



E. coli < 500 / 100 mL
 marqueurs bactériens non détectés
 caféine < 0,1 µg/L
 ratios non spécifiques

Origine ?



E. coli > 1000

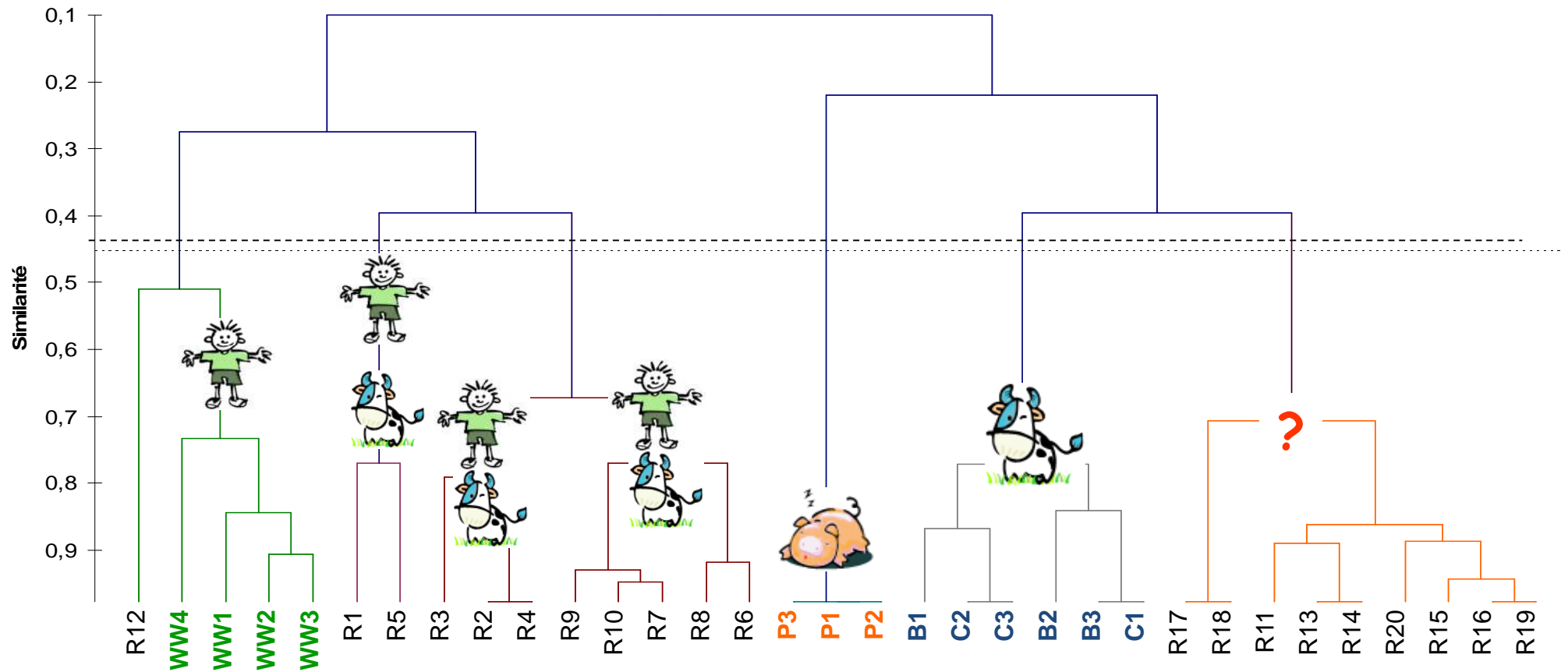
R1 < 50

Rum-2-Bac > 10⁵

Caféine > 0,1

Benzophenone > 0,1

TCEP 0,05 à 0,1



E. coli >1000

HF 183 10⁴

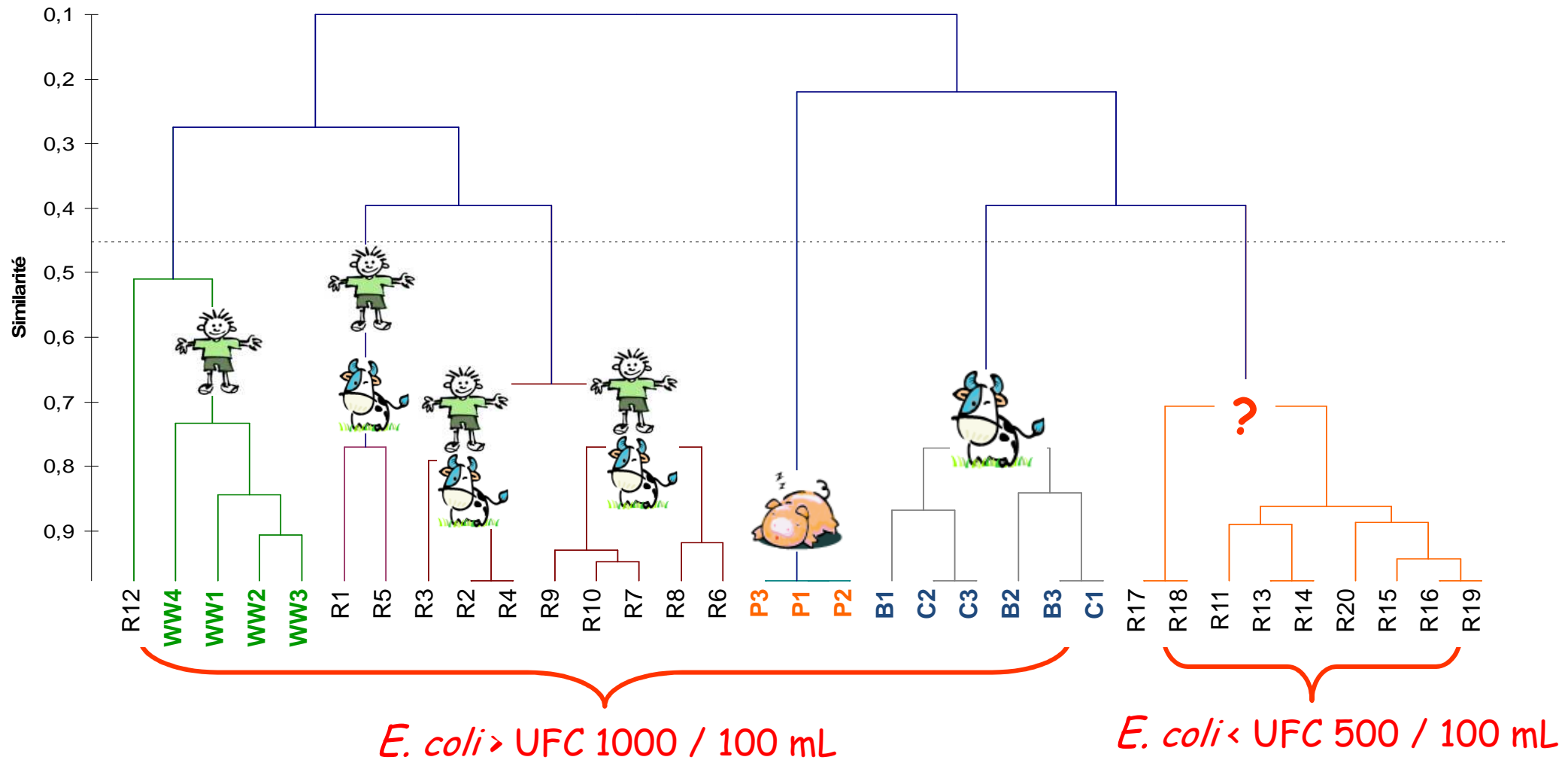
Rum-2-Bac >10⁵

Phages II et III : 100%

Caféine 0,05 à 0,17

+/- Benzophenone

+/- TCEP

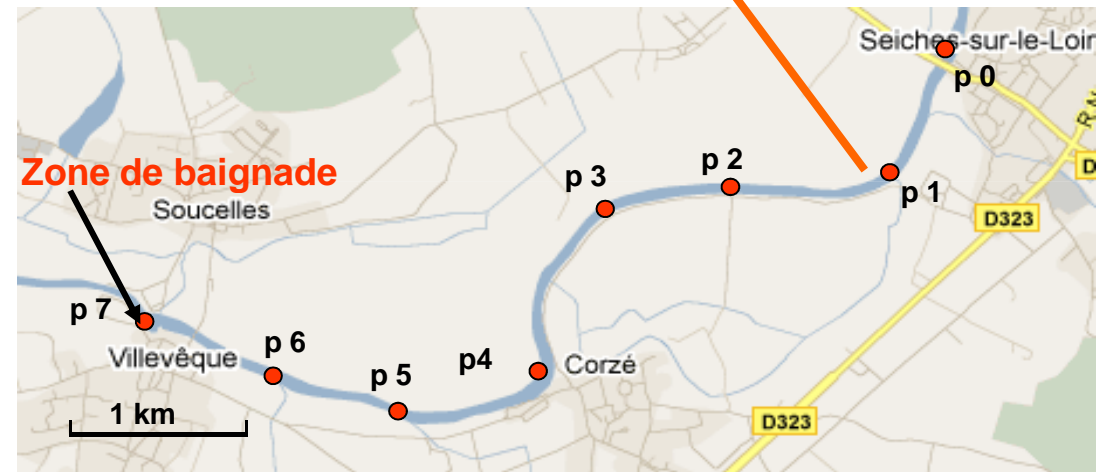


marqueurs indiquent
1 ou plusieurs origines

Origine non déterminée

Directive (2006/7/EC) eaux de bonne qualité :
1000 *E. coli* / 100 mL en eau douce
500 *E. coli* / 100 mL en eau de mer

Application des outils à deux zones de baignades



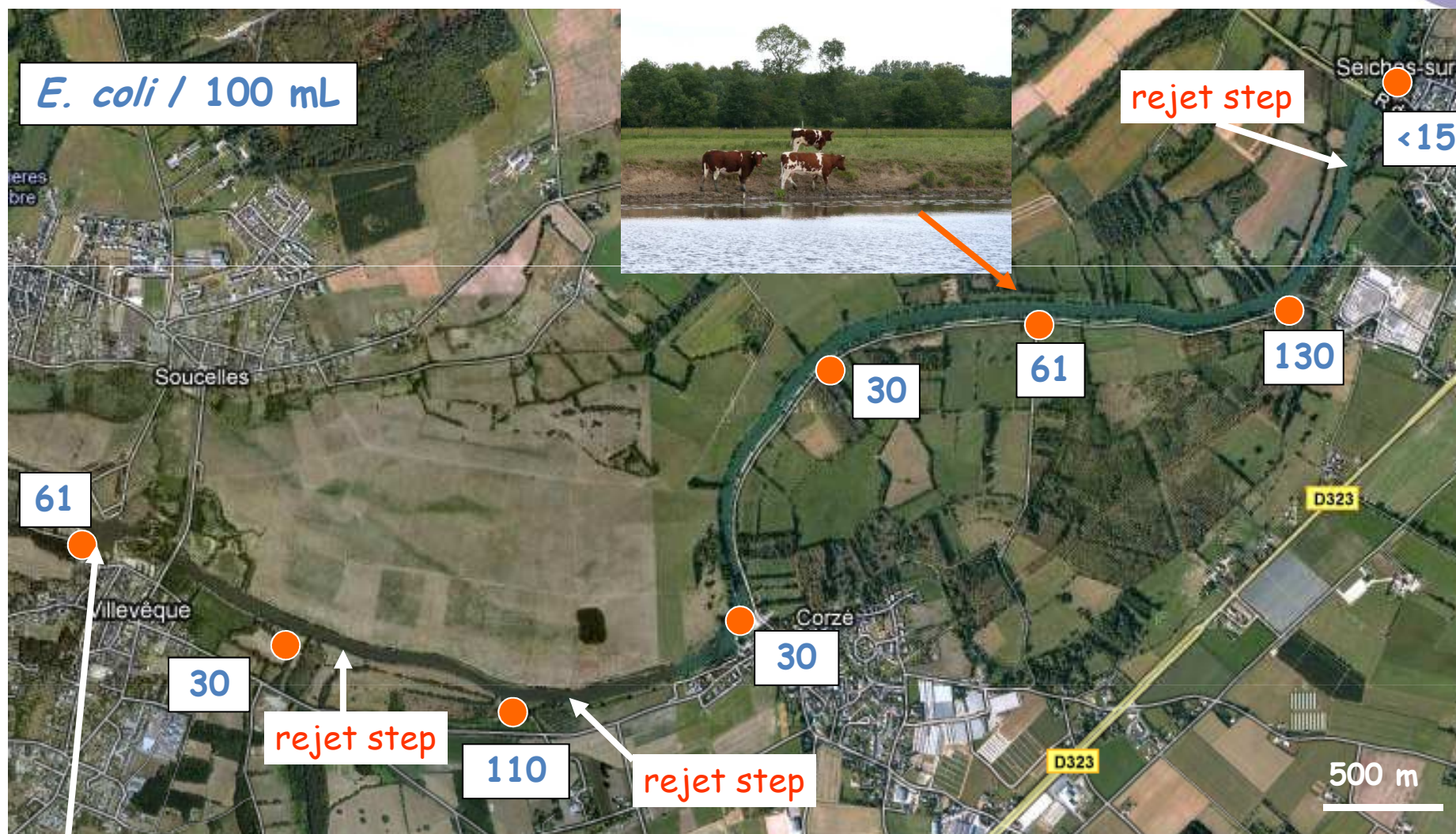
Zone de baignade

Eau de mer : bassin versant du Pénérf

Eau douce: le Loir

Eau douce: le Loir

les rencontres scientifiques de l'Anses



E. coli / 100 mL

rejet step

< 15

30

61

130

61

30

rejet step

110

rejet step

30

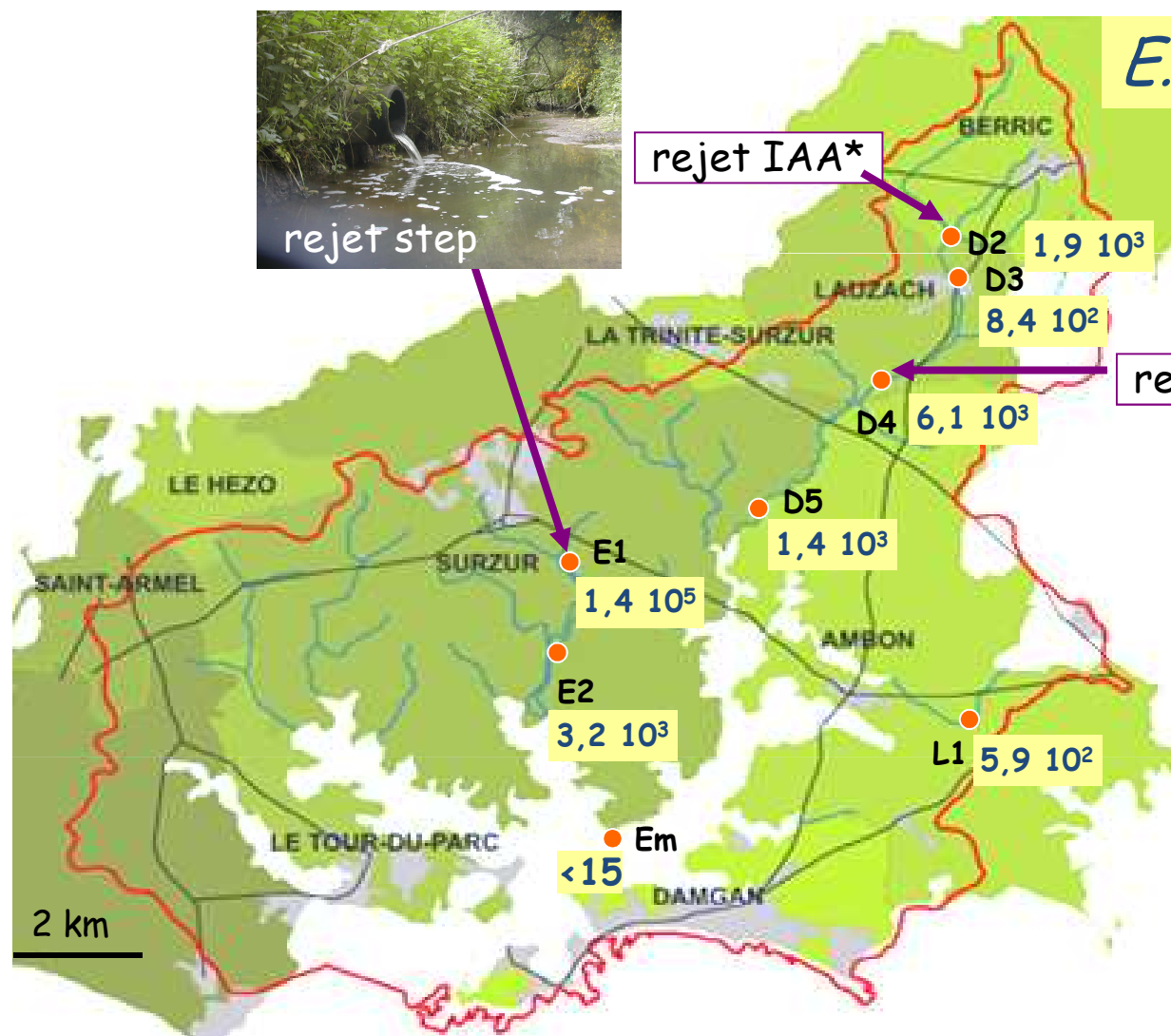
Zone de baignade

concentrations en *E. coli* < 150 UFC/ 100 mL

seul marqueur détecté : caféine (0,1 à 0,2 µg/L)



Eau de mer : bassin versant du Penerf



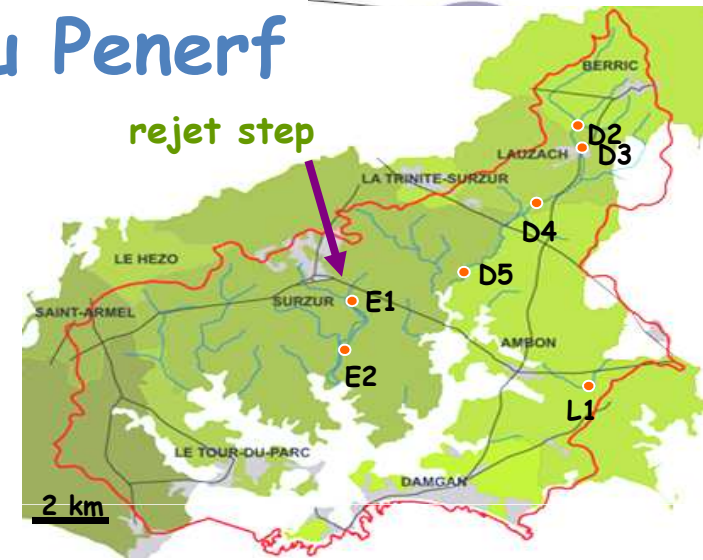
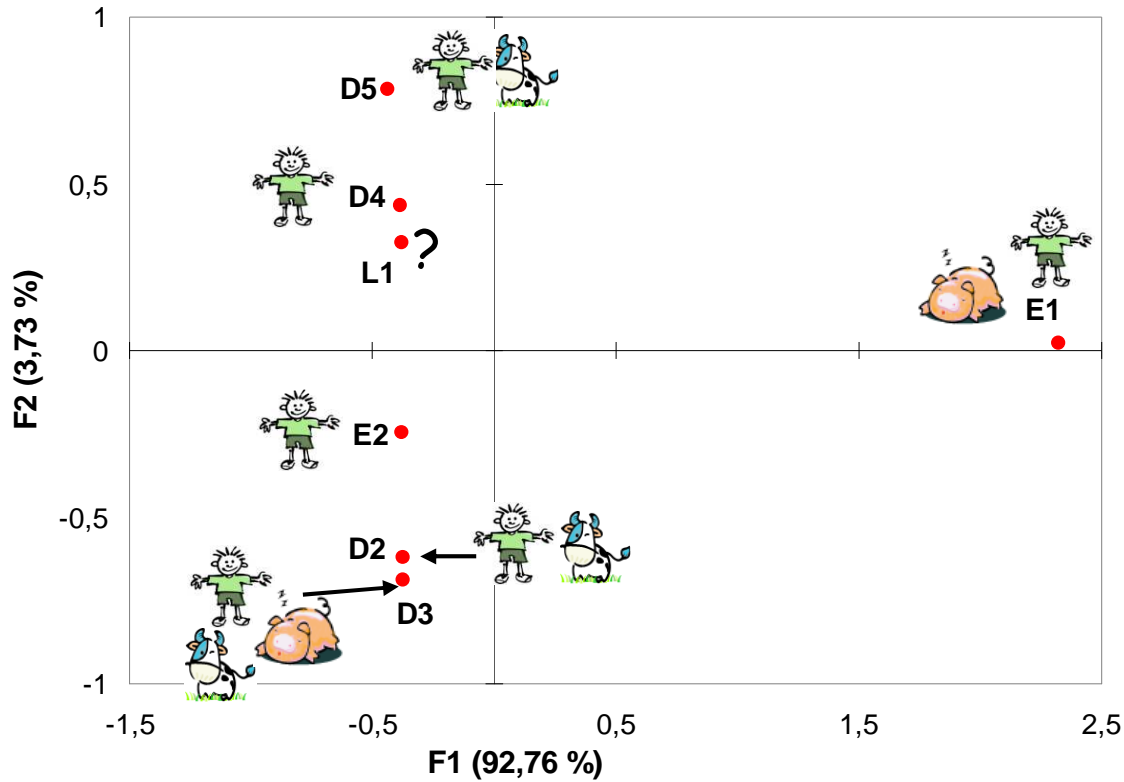
E. coli 100/ mL

Caractéristiques :

- zones de pâturages
- épandages de lisiers de porc
- rejets d'IAA
- rejets de stations d'épuration

*Rejet d'une industrie agro-alimentaire
Point D1 : transformation de canards
Point D4 : protéines industrielles

Eau de mer : bassin versant du Penerf



Origine supposée de la pollution:

- humaine
- bovine
- porcine

	<i>E. coli</i>	R1	R2	Bio/géo	GFI	caféine	TCEP	Phages humains	HF183	B. ado	<i>L. amy</i>	Rum-2
D2	810	31	4,1	0,18	1,1	0,07	0,04	0	0	0	0	0
D3	840	43	2,5	0,15	1,1	0,05	0	0	0	0	D	0
D4	2,2 10 ³	52	2,1	0,14	1,1	0,18	0	0	0	0	0	0
D5	1,4 10 ³	57	1,7	0,14	1,1	0,22	0	0	0	0	0	D
E1	1,4 10 ⁵	88	0,1	0,23	0,9	12,4	0,29	4,3 10 ³	7,3 10 ⁵	1,2 10 ⁴	200	0
E2	3,2 10 ³	61	1,0	0,11	1,0	0,08	0,05	0	0	0	0	0
L1	590	55	2,6	0,11	1,1	0	0	0	0	0	0	0

Conclusion (1/3)

Caractéristiques et limites de la boîte à outils



Marqueurs bactériens et viraux

Très spécifiques, excepté *B. adolescentis*

Non détectés *E. coli* <1000 UFC/ 100 mL



Amélioration du
seuil de détection

Conclusion (2/3)

Caractéristiques et limites de la boîte à outils

Marqueurs chimiques

Présence simultanée de caféine, TCEP et /ou benzophénone
très spécifique d'une pollution humaine



Conclusion (2/3)

Caractéristiques et limites de la boîte à outils



Marqueurs chimiques

Présence simultanée de caféine, TCEP et /ou benzophénone
très spécifique d'une pollution humaine

Ratios des stanols et de fluorescence

Difficilement interprétables en cas de pollutions mixtes

Interprétables lorsque qu'une pollution est dominante
(ex: zone de pâturage intensif, rejet de station d'épuration)



Caractéristiques et limites de la boîte à outils

Marqueurs chimiques

Présence simultanée de caféine, TCEP et /ou benzophénone très spécifique d'une pollution humaine

Ratios des stanols et de fluorescence

Difficilement interprétables en cas de pollutions mixtes

Interprétables lorsque qu'une pollution est dominante (ex: zone de pâturage intensif, rejet de station d'épuration)



Étude d'un bassin versant sur une année

→ Continuer l'acquisition de données pour valider les marqueurs

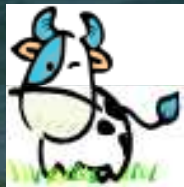
Conclusion (3/3)

Caractérisation de 3 types de pollution à l'aide de la boîte à outils (*E. coli* > 1000 / 100 mL)

Bacteroidales Rum-2-Bac

$R1 < 47$ and $R2 > 1$

Bio/géo > 0.17 et GFI > 1.2



Bacteroidales Pig-2-Bac
Lactobacillus amylovorus

Bio/géo > 0.17 et GFI > 1.2



Bacteroidales HF183,
Phages F-RNA II et II
Caféine > 0,1
TCEP, benzophenone

$R1 > 65 \%$ et $R2 < 0.12$
Bio/géo > 0.17 et GFI < 0.9



Merci de votre attention

