HAL
open science

Validation de l'utilisation des stéroïdes en tant qu'outil de traçage de l'origine des contaminations fécales des eaux de surface

Morgane Derrien

To cite this version:

Morgane Derrien. Validation de l'utilisation des stéroïdes en tant qu'outil de traçage de l'origine des contaminations fécales des eaux de surface. Hydrologie. Université Rennes 1, 2011. Français. NNT : . tel-00674880

HAL Id: tel-00674880

https://theses.hal.science/tel-00674880

Submitted on 28 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 4394 **ANNÉE 2011**

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Sciences de la Terre

Ecole doctorale Sciences de la Matière

présentée par

Morgane DERRIEN

Préparée à l'unité de recherche UMR 6118
Géosciences Rennes
UFR Structure et Propriétés de la Matière

Validation de l'utilisation des stéroïdes en tant qu'outil de traçage de l'origine des contaminations fécales des eaux de surface

Thèse soutenue à Géosciences Rennes
le 10 Novembre 2011

devant le jury composé de :

Jennifer DUNGAIT
Senior Research Scientist, BBSRC Institute / *rapporteur*

Pierre FAURE
Chargé de Recherche, CNRS / *rapporteur*

Anne-Marie POURCHER
Directeur de Recherche, Cemagref / *examinateur*

Bruno LARTIGES
Professeur, Université Toulouse 3 / *examinateur*

Marie-France DIGNAC
Chargée de Recherche, INRA / *examinateur*

Bruno LE BIZEC
Professeur, Université Nantes / *examinateur*

Anne-Catherine PIERSON-WIKMANN
Maître de Conférences, Université Rennes 1 / *invitée*

Gérard GRUAU
Directeur de Recherche, CNRS / *directeur de thèse*

Emilie JARDE
Chargée de Recherche, CNRS / *co-directeur de thèse*

A Nif-Nif, Naf-Naf et Nouf-Nouf![1]

[1] Petit clin d'œil à Dame Sophie!

REMERCIEMENTS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au laboratoire Géosciences Rennes de l'Unité Mixte de Recherche 6118. Cette thèse a été développée dans le cadre d'un contrat avec CNRS-Région Bretagne, je remercie donc ces deux partenaires.

J'adresse, en premier lieu, mes remerciements à Jennifer Dungait et Pierre Faure, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Je remercie également mes examinateurs Marie-France Dignac, Bruno Lartiges, Bruno Le Bizec et Anne-Marie Pourcher (qui a également acceptée de présider ce jury).

Un grand merci à toute l'équipe GEI (Géochimie des Eaux et des Interfaces) qui m'a accueillie pendant ces trois ans. Merci Aline, merci Mélanie pour votre soutien en particulier pendant la dernière année! Merci à vous, les ingés sans qui le labo n'existerait pas! Maître Jeanneau, thanks pour tes cours de SPE! Un autre grand merci à mes trois directeurs de thèse: Anne-Catherine, Emilie et Gérard! Vous avez eu chacun votre rôle au cours de cette thèse, des rôles complémentaires qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Une mention spéciale pour Emilie, qui m'a accompagnée, formée et aidée aussi bien au labo que devant l'ordi et que j'ai fait rager plus d'une fois avec mes fautes d'étourderies...ma boîte mail en est la preuve! Merci Gérard, pour votre enseignement. La recherche n'est pas chose facile, l'étudiant manque souvent de recul sur son sujet, et ce sont ces discussions avec vous, qui m'ont permis de lever le nez et de voir plus loin! Anne-Catherine, merci, en particulier pour le soutien et l'aide que tu m'as apportée pour la dernière ligne droite.

Bien sûr, dans cette équipe, il y a aussi mes collègues du 316 que je remercie plus que vivement. Mathieu qui a changé de statut 3 fois en 3 ans, belle performance, et oui merci pour tous ces moments de culture scientifique, gastronomiques, sportifs et les bonus! Tibo, toi aussi, 3 statuts en 3 ans, je dis bravo! La liste est longue, pleins de souvenirs... Je te souhaite tout le bonheur possible ainsi qu'à ta petite famille! Et je garde le meilleur pour la fin, bien évidemment je parle de ma Blonde, le Marsac, le Marsou, le roi des REE, mon héros, mon frère de thèse... Au final passer trois ans dans le même bureau qu'une blonde, c'est vraiment...de la balle...surtout après 17h! Je ne vais pas écrire un paragraphe sur toi, ça te ferait trop plaisir... alors je m'arrête là... de toute façon tu sais tout... parce que t'es trop fort! Je n'oublie pas pour autant les petits et les A.I., qui n'ont été que de passage, malheureusement,

et que nous avons pleuré à chaque départ: Gravos, Anch', Anouk, Adeline, Hugo, l'Aveyronnais, Anne-Liz, Reb, Mister Météo et la p'tite blonde!

Mais il n'y a pas que des géochimistes dans ce labo! Ben non, il y a des hydros! Nico pour ta funky attitude et bien plus encore! Les hydros du troisième: Alex, Roi de l'Inde depuis quelques mois et Clem! J'espère que vous avez autant apprécié que moi ces petits cafés, servis avec le sourire à chaque fois sans exception!

Et puis il y a encore pleins d'autres bêtes curieuses dans ce laboratoire que je voudrai remercier. Clou, merci pour ces bouffés d'air pur (ahahah, quelle blague), les discussions stat et du coup cailloux, tu m'as permis de faire mes premiers pas dans la géologie, et tu as été le meilleur bureau des pleurs que j'ai pu trouver sur ma route. Un "gros caca" à Fabou, je n'en dirais pas plus! Et je remercie aussi Eline, Gwen, Alain, Sam, Gloria, GuiGui, Justine, Polo, Quino, Tanguy, Cricri, Pietro, Etienne, Jérémy, Mash', Sté, Romain et Pipo... pour tous les bons moments, les pauses, les éclats de rire, les bouffes, les pétanques, les soirées, les apéros etc... Sans oublier les anciens: Seb, Delph...

Et oui j'ai apprécié de passer trois ans dans les bât 15 et 14B sans oublier le bât 5.

Une petite-grande dédicace à Edith Parlanti, qui m'a fait découvrir la recherche et la matière organique...

Merci à tous mes coloc' d'avoir accepté de vivre avec moi et de m'avoir supportée, avec une palme d'or pour Anouk qui tient encore le coup! Merci aussi à mes autres "colocs" du 63 pour tous ces savoureux moments!

Merci à ma maman qui a toujours accepté mes choix en particulier les ratés!

J'ai été loin de vous pendant trois ans et l'on ne se voyait pas très souvent, mais qu'est-ce que j'ai pensé à vous, mes amis...: Elise, Titi, Pôl, Troll, Romia, mes "copines" de Master (Coralie, Judith, Marlène et Davy), Maia, Chloé et mes Barbotes! Que je suis contente de vous avoir!

Et merci, Xav!

Pour finir, je dirai: "goulou goulou" ou un truc du genre... je rajouterai même un: ":-p".

SOMMAIRE

Liste des illustrations 7

Liste des abréviations 13

INTRODUCTION GENERALE 17

CHAPITRE 1 - CONTEXTE, ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS DE LA THESE 23

I/- Contexte général de la thèse 24
I/-1 Rappels concernant les problèmes sanitaires engendrés par les contaminations fécales des eaux et les réglementations françaises et européennes mises en place 24
I/-1-1 Réglementation sur la qualité microbiologique des eaux de baignades 26
I/-1-2 Réglementation sur la qualité microbiologique des eaux conchylicoles 30
I/-2 Implications sur l'état de la qualité microbiologique des eaux de baignade et des eaux conchylicoles en France sous les nouvelles directives 31
I/-2-1 Implications pour les eaux de baignade 31
I/-2-2 Implications pour les eaux conchylicoles 32
I/-3 Rappels concernant les sources possibles de contamination et leurs voies de transfert 33

II/- Les besoins de traçage de l'origine des contaminations fécales et les outils mobilisables pour le traçage 37
II/-1 Pourquoi tracer les sources de contaminations fécales ? 37
II/-2 Les différents outils à disposition 38
II/-2-1 Les outils microbiologiques 38
II/-2-2 Les outils chimiques 42
II/-3 Avantages et inconvénients des différents outils 43

III/- Zoom sur les stéroïdes comme marqueurs de contaminations fécales et questions en suspens concernant l'utilisation de ces marqueurs 49
III/-1 Rappels sur les mécanismes et les facteurs à l'origine des différences de signatures observées entre les sources 49
III/-2 Rappels sur les différents rapports utilisés 54
III/-3 Rappels sur les différentes méthodes statistiques globales utilisées 56
III/-4 Questions en suspens 57
III/-4-1 La question de l'homogénéité des sources et de la spécificité des marqueurs 57
III/-4-2 La question de la persistance des marqueurs dans l'environnement 58
III/-4-3 Utilisation des rapports ou des méthodes statistiques multivariées 59
III/-4-4 La question de la cohérence des marqueurs entre eux 60

IV/- Objectifs de la thèse : de la nécessité de conduire des études approfondies sur les stéroïdes et d'en valider l'utilisation en les couplant avec les autres marqueurs 60

CHAPITRE 2 - SITE D'ETUDE, ECHANTILLONNAGE ET METHODES ANALYTIQUES 63

I/- Choix de la région d'étude 65
I/-1 Rappels concernant les problèmes engendrés par les contaminations fécales des eaux de Bretagne 65
I/-2 Rappels sur la pression exercée par les déjections animales d'élevage intensif sur les eaux superficielles de Bretagne 69
I/-3 Rappels concernant la pression exercée par les autres sources de contamination . 73
I/-4 Rappel concernant les besoins en traçage et les difficultés inhérentes aux traçages des sources de contamination dans la région d'étude 74

II/- Stratégie d'échantillonnage 74
II/-1 Echantillons utilisés pour la caractérisation des sources et l'analyse des effets des processus de traitement sur les stéroïdes 75
II/-1-1 Déjections bovines 75
II/-1-2 Déjections porcines 77
II/-1-3 Effluents et boues de station d'épuration 80
II/-2 Echantillons utilisés pour l'évaluation de la persistance des stéroïdes pendant le transport et leur introduction dans le milieu aquatique et pour leur validation 84
II/-2-1 Echantillons issus du dispositif expérimental d'analyse du transfert des marqueurs animaux pendant le ruissellement 84
II/-2-2 Echantillons issus du dispositif expérimental d'analyse de transfert du signal en condition de dilution des marqueurs humains dans des eaux naturelles 86
II/-3 Echantillons utilisés pour l'évaluation des stéroïdes en tant que traceurs de l'origine de la contamination fécale en région d'élevage intensif 88
II/-3-1 Echantillons de la rivière du bassin versant du Daoulas 88
II/-3-2. Echantillons de la rivière du bassin versant de Pénerf et de sa zone conchylicole 90

III/- Méthodes analytiques 92
III/-1 Extraction organique des matrices solides 92
III/-2 Extraction organiques des matrices aqueuses 92
III/-3 Fractionnement par chromatographie liquide 94
III/-4 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse 95
III/-4-1 Principe de la CPG-SM 95
III/-4-2 Appareillage 97
III/-4-3 Silylation des stéroïdes 97
III/-4-4 Quantification des stéroïdes 98

IV/- Analyses statistiques 102
IV/-1 L'ACP 102
IV/-2 L'AFD 103

CHAPITRE 3 - EXTREME VARIABILITE DES SIGNATURES DE STEROÏDES DANS LES DEJECTIONS BOVINES ET PORCINES A UNE ECHELLE REGIONALE : IMPLICATIONS DE L'UTILISATION DES STEROÏDES POUR IDENTIFIER LES SOURCES DE CONTAMINATION FECALE DANS LES EAUX 105

Contexte et objectifs 107

Abstract 108

I/- Introduction 110

II/- Materials and Methods 111
II/-1 Samples and sample preparation 111
II/-2 Reagent and chemicals 116
II/-3 Calibration solutions of sterol and stanol compounds 116
II/-4 Extraction – Fractionation 116
II/-5 Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) 117
II/-6 Statistical analysis 119

III/- RESULTS and DISCUSSION 119
III/-1 Differences in steroid profiles between cow faeces and pig slurries, and the effect of diet variation and animal metabolism 119
III/-2 Effects of straw addition, storage and treatment processes on steroid profiles . 122
III/-3 Evidence for a loss of specificity of the steroid ratios used so far to distinguish cow from pig faeces 123
III/-4 Implication for the use of steroids to specify pollution sources in waters 127

References 130

Conclusions et perspectives 134

CHAPITRE 4 - MARQUEURS MICROBIOLOGIQUES ET CHIMIQUES : TRANSFERT DANS LES EAUX DE RUISSELLEMENT DE SOLS AMENDES PAR DES DEJECTIONS ANIMALES 135

Contexte et objectifs 137

Abstract 139

I/- Introduction 141

II/- Materials and methods 143
II/-1 Study site 143
II/-1-1 Cattle manure and swine slurry characteristics and application rates 145
II/-1-2 Rainfall simulation 145
II/-1-3 Runoff water sampling 146
II/-2 Microbial methods 146
II/-2-1 Enumeration of faecal indicators 146
II/-2-2 Quantification of host-specific bacterial markers 147
II/-3 Chemical methods 148

II/-3-1 Dissolved organic carbon 148
II/-3-2 Steroid analyses 148
II/-3-3 Fluorescence 149
II/-4 Statistical Analysis 150

III/- Results and discussion 151
III/-1 Swine slurry, cattle manure and soil 151
III/-2 Rainfall event 153
III/-2-1 Dynamics of faecal indicators and dissolved organic carbon concentrations in runoff waters 153
III/-2-2 Dynamics of host-specific bacterial and chemical markers in runoff waters 157

IV/- Conclusions 160

References 161

Conclusions et perspectives 168

CHAPITRE 5 - LES STANOLS SONT-ILS APTES A IDENTIFIER L'ORIGINE DES CONTAMINATIONS FECALES DANS LES EAUX DANS LE CAS DE CONTAMINATIONS MULTI-SOURCES: COMPARAISON AVEC LES MARQUEURS MICROBIOLOGIQUES? 169

Contexte et objectifs 171

Abstract 172

I/- Introduction 174

II/- Materials and methods 177
II/-1 Type and origin of samples 177
II/-1-1 Concentrated and diluted "pure" animal source samples 177
II/-1-2 Concentrated and diluted "pure" human source samples 178
II/-1-3 Samples from the *Daoulas* and *Pénerf* river basins 178
II/-2 Analytical methods 180
II/-2-1 Stanols 180
II/-2-2 Microbial markers 183
II/-2-3 Caffeine and TCEP 183
II/-3 Statistical analysis 183

III/- Results 184
III/-1 Stanol profiles of "pure" bovine, porcine and human sources 184
III/-2 Statistical comparison of human and animal stanol signatures and effect of dilution and runoff on "pure" source stanol signatures 186
III/-3 Comparison with river samples 190

IV/- Discussion 193

V/- Conclusion 197

References 199

Conclusions **205**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **207**

BIBLIOGRAPHIE **215**

ANNEXES **241**

Annexe 1: DIRECTIVE 2006/7/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 15 février 2006 concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE **243**

Annexe 2: DIRECTIVE 2006/113/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 12 décembre 2006 relative à la qualité requise des eaux conchylicoles (version codifiée) **261**

Annexe 3: Exemples de Chromatogrammes (TIC) de déjections brutes (déjection bovine, lisier porcin et effluent de STEP) **271**

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Chapitre 1 :

Tableau I.1: Liste des principales pathologies liées aux micro-organismes présents dans les matières fécales (d'après Delolme *et al.*, 1992; Stablo, 1998; Dupoiron, 2005). 25

Tableau I.2: Classement sanitaire microbiologique des eaux de baignade selon la directive 76/160/CEE. 27

Tableau I.3: Limites de qualité microbiologiques relatives aux eaux de baignade selon la directive 2006/7/CE. 28

Tableau I.4: Réglementation sanitaire des zones de production conchylicole et usages professionnels et récréatifs associés selon le règlement 854/2004/CE du parlement européen et du conseil. 30

Figure I.1: Répartition de la qualité des zones de baignades en eaux côtières en France selon leur classement d'après les directives 76/160/CEE et 2006/7/CE (d'après le rapport - Simulation de la qualité des eaux de baignade en mer 2008 - Surfrider Foundation). 32

Figure I.2: Répartition de la qualité des zones de conchylicultures en France selon leur classement d'après l'arrêté 21/05/1999 et le règlement 854/2004 (d'après le rapport - Bilan national REMI 2008 - Ifremer). 32

Figure I.3: Les principales sources de contaminations fécales dans les zones littorales (modifié selon Ifremer Environement, 2004). 34

Figure I.4: Répartition des causes de contamination fécale en 2008 (Etat sanitaire des eaux de baignade en mer et en eau douce – Bilan de la saison balnéaire 2008 - Ministère de la santé et des sports DGS/DDASS, 2009). 36

Tableau I.5: Synthèse des principaux outils basés sur l'identification directe de virus, parasites pathogènes et bactéries et bactériophages. 40

Tableau I.6: Synthèse des principaux outils basés sur les méthodes microbiologiques indirectes. 41

Tableau I.7: Synthèse des principaux rapports de bactéries. 42

Tableau I.8: Avantages et inconvénients de l'ensemble des marqueurs microbiologiques (d'après Scott *et al.*, 2002; Seurinck *et al.*, 2005; Cimenti *et al.*, 2007 et Hagedorm *et al.*, 2009). 45

Tableau I.9: Avantages et inconvénients de l'ensemble des marqueurs chimiques (d'après Scott *et al.*, 2002; Seurinck *et al.*, 2005; Cimenti *et al.*, 2007 et Hagedorm *et al.*, 2009). 46
Figure I.5: Structure du noyau stérane. 49
Figure I.6: Formation de quatre stéréoisomères du cholestérol après biohydrogénation suite à la réduction microbienne dans le tractus intestinal. 51
Tableau I.10: Noms systémiques, usuels et formules brutes des principaux stéroïdes dans le règne animal et végétal. 52
Figure I.7: Distribution (en %) des stéroïdes de cinq espèces (d'après Leeming et al., 1996). 53
Tableau I.11: Liste des rapports de stéroïdes présentés dans la littérature comme capable d'identifier les sources de contamination fécale. 55

Chapitre 2 :

Tableau II.1: Résultats des contrôles sanitaires effectués sur les eaux de baignades en mer de Bretagne pour la saison 2010 delon la directive 76/160/CE (Source: ARS)..... 66
Figure II.1: Evolution de la qualité microbiologique des eaux de baignades en mer de 1997 à 2010 (d'après ARS Bretagne 2010). 67
Figure II.2: Evolution de la qualité microbiologique des zones de conchylicultures de 1997 à 2009 (d'après Réseau REMI, Ifremer, 2010). 68
Figure II.3: Evolution de la qualité microbiologique des sites de pêches à pied de loisir de 1997 à 2009 (d'après ARS Bretagne 2010). 69
Tableau II.2: Chiffres clés des cheptels rassemblés dans les exploitations agricoles bretonnes pour l'année 2010 pour les élevages porcins (a), les élevages bovins (b) et avicoles (c) 70
Figure II.4: Carte de répartition des cantons de Bretagne classés en zones d'excédent structurel (ZES) du point de vue des apports d'azote au sol en 2009 (Sources : BD Carto Diren Bretagne, édition le 16/11/2009). 71
Figure II. 5: Article paru le 12 Juin 2011 dans le Ouest France, journal quotidien régional, à propos d'une pollution d'un affluent de l'Elorn suite à un rejet accidentel de lisier directement dans un cours d'eau. 72
Tableau II.3: Description des échantillons de déjections bovines. 76
Figure II.6: Représentation schématique des étapes de traitement du lisier de porc..... 77
Tableau II.4: Description des échantillons de déjections porcines. 79
Figure II.7: Schéma du fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées. 81
Tableau II.5: Description des échantillons de station d'épuration. 82

Figure II.8: Schéma du dispositif de simulation de pluie et de collecte des eaux de ruissellement. 86
Figure II.9: Carte de localisation des prélèvements d'eaux effectués sur le bassin versant de Daoulas (29). 89
Figure II.10: Carte de localisation des prélèvements d'eaux sur le bassin versant de Pénerf (56). 91
Figure II.11: Schéma du montage expérimental utilisé pour l'extraction sur phase solide des stéroïdes présents dans des échantillons aqueux. 93
Figure II.12: Fragmentogramme et fragmentation du coprostanol sous sa forme éther de triméthylsilyle. 96
Figure II.13: Schéma de la réaction de silylation du cholestérol. 98
Tableau II.6: Ions identifiants et quantifiants caractéristiques des stéroïdes analysés dans le cadre de cette thèse, et standards de quantification utilisés pour les deux types de matrices. 101
Figure II.14: Exemple de représentations des plans factoriels F1xF2 projetant les variables (a) et les individus (b). 103

Chapitre 3 :

Figure III.1: Sample location map. Open stars: cow manures; filled stars: pig slurries. 112
Table III.1: Description of cow faeces samples. 113
Table III.2: Description of pig faeces samples. 115
Table III.3: Usual, trivial names, formula, symbols, m/z used for the identification and quantification and information on quantification compounds (name, linearity and limit of detection). 118
Figure III.2: Average steroid profiles (in weight % ± standard deviations) in samples of cowpat, fresh cow manure and aged cow manure. 120
Figure III.3: Average steroid profiles (in weight % ± standard deviations) in samples of fresh raw pig slurry, aged raw pig slurry, physically treated pig slurry and chemically treated pig slurry. 121
Table III.4: Comparison of published and measured diagnostic values (i.e. maximum and minimum) for the six steroid ratios cited in the literature (11,14 and 32) as capable of discriminating between pig and cow faeces. 124
Figure III.4: Variation of the 5□-stanols/C27 ratio in cow and pig faeces: comparison of literature data (11, 14, 18 and 33) with the present dataset. 125

Figure III.5: Plot of principal components analysis of the 35 analysed samples using the six most discriminant stanol compounds. F1 axis = principal component 1; F2 axis = principal component 2. 127
Table III.5: Factorial coordinates of variables (percentage of each stanol) and relative contributions (in %) of variables to principal components 1 (F1) and 2 (F2). 128

Chapitre 4 :

Figure IV.1: Schematic diagram of the rainfall experiment. 144
Table IV.1: Hydrological characteristics of rainfall simulation events. Average and Standard error of three replicates are reported. 146
Figure IV.2: 3-D fluorescence regions. 150
Table IV.2: Faecal indicators, microbiological and chemical markers in swine slurry and cattle manure. 151
Figure IV.3: Faecal indicators and chemical parameters in the runoff water. 155
Table IV.3: Cumulative amounts of faecal indicators and F specific coliphages transferred into the runoff water during the rainfall experiments. 157
Table IV.4: Results of the faecal markers for the runoff samples (control, swine slurry and cattle manure). 159

Chapitre 5 :

Figure V.1: Location map of the Pénerf river basin showing the position of the analyzed river samples. Also indicated is the location of the municipal (open star) and industrial (filled star) waste water treatment plant. 180
Table V.1: Usual and trivial names of the six stanol compounds used in this study. Also given in the table are the chemical formula of the compounds as well as the m/z values used for their identification and quantification. Regression coefficient of calibration curves and detection and quantification limits are also indicated. The numerical symbols encrypted in column 3 allow location of the compounds in Figure 2. 182
Figure V.2: Average stanols profiles (in weight % ± standard error) for the “pure” bovine, porcine and human sources as defined by the source samples analyzed in this study. Average concentrations were calculated with reference to the entire stanol series. The name of the stanol compounds is obtained by comparing the numerical symbols on the x axis of the histogram with Table 1. 185

Figure V.3: Plot of the principal component analysis of the 88 source samples investigated in this study using the six most discriminant stanol compounds proposed by Derrien et al. (2011) for discrimination porcine from bovine faecal sources. Runoff and diluted samples were used supplementary individuals. F1 axis: principal component 1; F2 axis: principal component 1. 187

Table V.2: Factorial coordinates of variables and relative contributions (in %) of variables to principal components 1 (F1) and 2 (F2) of the principal component analysis carried out with the runoff samples used as supplementary individuals. 188

Table V.3: Factorial coordinates of variables and relative contributions (in %) of variables to principal components 1 (F1) and 2 (F2) of the principal component analysis carried out with all source samples (including the runoff samples) used as individuals..... 189

Figure V.4: Plot of the principal component analysis comparing of the 88 source samples and the 9 river water samples investigated in this study using the six most discriminant stanol compounds proposed by Derrien et al. (2011) for discrimination porcine from bovine faecal sources. All source samples (i.e. manure, WWTP, runoff and diluted samples) were used as individuals, in contrast to river water samples which were used as supplementary individuals. F1 axis: principal component 1; F2 axis: principal component 2. 190

Table V.4: Comparison between concentrations of faecal microbial and chemical indicators in river water samples and the source provenances assigned by the PCA analysis of stanol distributions. 192

Figure V.5: Diagram illustrating positive correlation between E. Coli and Rum-2-Bac concentrations in those samples for which the 6 stanol-based PCA method indicates a faecal contamination of bovine origin. The existence of samples showing no traces of Rum-2- Bac while having *E. Coli* concentrations >>0 suggests existence of a minimum faecal contamination load to insure detection of the Rum-2-Bac marker. 197

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP : Analyse en Composante Principale
ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNr 16S : Gène codant pour la petite sous-unité du ribosome
AFD : Analyse Factorielle Discriminante
AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
ARA : Antibiotic Resistance Analysis
ARN : Acide Ribonucléique
ARS : Agence Régionale de la Santé
ASE : Accelerated Solvent Extraction
BSTFA + TMCS : N,O-bis(triméthylsilyl)trifuoroacétamide + triméthylchlorosilane
BWD : Bathing Water Directive
CE : Communauté Européenne
CEE : Communauté Economique Européenne
CA : Coliformes Atypiques
CF : Coliformes Fécaux
CF : Coliformes Totaux
CLI : Chair et Liquide Intervalvaire
CPG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Spectrométrie de Masse
CUP : Carbon Utilization Profiling
DDASS : Direction Départemental des Affaires Sanitaires et Sociales
DCE : Directive Cadre sur l'Eau
DCM : Dichlorométhane
DGS : Direction Générale de la Santé
DOC: Dissolved Organic Carbon
DRAAF : Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt
E. coli : *Escherichia coli*
MeOH : Méthanol
MST : Microbial Source Tracking
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis
PFU : Plaque Forming Unit
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
RDA: Representational Difference Analysis
REMI : Réseau national de contrôle microbiologique des zones de production conchylicoles
Rep-PCR : Polymerase chain reaction répétitive
SI : Standard Interne
STEP : STation d'EPuration
UFC : Unité Formant une Colonie
WFD : Water Framework Directive
WWTP : Waste Water Treatment Plant
ZES : Zone d'Excédent Structurel

RESUME:

Les contaminations fécales d'origine humaine ou animale contribuent à la dégradation des écosystèmes et affectent la qualité de l'eau avec des risques pour la santé publique par l'exposition à des agents pathogènes. Afin de réduire ces risques et d'améliorer la qualité de l'eau, il est nécessaire de développer des outils capables d'identifier les sources de contaminations fécales. Cet enjeu est exacerbé en Europe par le durcissement des directives sur les eaux de baignade et les eaux conchylicoles et l'obligation de procéder à l'identification et à la hiérarchisation des sources de contaminations.

Cette thèse s'est attachée à valider l'utilisation des stéroïdes en tant que traceurs des sources de contaminations fécales des eaux de surface. La méthode utilisée est basée sur une analyse en composante principale de six stanols fécaux. L'approche scientifique a été menée en trois étapes, de l'échelle moléculaire à l'échelle du bassin versant. La spécificité des stéroïdes et l'homogénéité des sources ont été étudiées sur des déjections bovines, porcines et sur des influents, effluents et boues de stations d'épuration domestiques. Puis, la conservation et la persistance des empreintes stéroïdes ont été évaluées au cours du transport des échantillons sources vers le milieu naturel récepteur par des expérimentations en conditions contrôlées. Enfin, la méthode développée a été validée à l'échelle de deux bassins versants sujets à des contaminations fécales récurrentes multi-sources.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail permettent de valider l'utilisation des stéroïdes en tant que traceurs opérationnels de l'origine des contaminations fécales.

Mots clés : contamination fécale, stéroïdes, stanols fécaux, traceurs, analyse en composante principale, spécificité des sources, persistance.

ABSTRACT:

Faecal contaminations from human and animal wastes not only contribute to the degradation of aquatic systems but also affect water quality posing threat to human health from exposure to pathogens. To reduce these risks and improve water quality, it is necessary to develop of tools capable of identifying faecal contamination sources. This issue is exacerbated in Europe by the hardening of guidelines for bathing waters and shellfish waters and the obligation to identify and prioritize sources of contamination.

The aim of this thesis is to validate the use of steroids as a tool for tracing the origin of faecal contamination in surface waters. The method is based on principal component analysis of six fecal stanols. The scientific approach was conducted in three steps, from molecular scale to the watershed scale. The specificity of steroids and the homogeneity of sources were studied on bovine and porcine manures and on influent, effluent and sludge of waste water treatment plant. Then the conservation and the persistence of the steroid fingerprint were evaluated during the transport of raw samples to the environment receiving by experiments under controlled conditions. Finally, the method developed has been validated at the scale of two watersheds impacted by recurrent multi-sources contaminations.

All the results obtained in this work lead to validate the use of steroids as an operational tool to trace faecal sources contamination.

Key words: faecal contamination, steroids, faecal stanols, homogeneity, persistence, source assignment, principal component analysis.

Introduction générale

Qu'il s'agisse d'eaux destinées à la consommation, à l'habitat d'organismes aquatiques, aux loisirs et/ou à la pêche, la qualité des eaux est un paramètre essentiel à surveiller et à contrôler. Une eau contaminée, et donc de mauvaise qualité, engendre de nombreux désordres pouvant être plus ou moins graves, avec des impacts sur la santé des populations et des écosystèmes, ainsi que sur les activités économiques et sur la production de denrées alimentaires. Les pollutions de l'eau peuvent être de plusieurs types : 1) physiques de par l'apport de matières en suspension qui agissent sur la température ou sur la radioactivité des masses d'eaux, 2) chimiques dues à la présence de substances indésirables (nitrates et phosphates) qui provoquent de profonds déséquilibres chimiques ayant des effets biologiques ou de substances toxiques (métaux lourds et micro-polluants organiques) et 3) microbiologiques du fait de l'apport d'agents pathogènes (virus, bactéries et parasites).

L'introduction dans les eaux d'agents pathogènes (bactéries, virus, parasites…) pour l'homme découle directement du rejet dans les eaux de matières fécales, d'origine humaine ou animale. Ces contaminations sont sources de nombreuses maladies liées à des facteurs infectieux ou toxiques. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les pollutions microbiologiques provoquent chaque année plus de 4 milliards de cas de diarrhées dans le monde, lesquels s'ajoutent aux nombreux cas d'autres pathologies provoquées par ces pollutions. Ces différentes infections sont liées soit à la consommation directe d'eaux contaminées, soit à l'ingestion ou au contact cutané d'eaux contaminées lors d'activités récréatives telles que la baignade, soit encore à l'ingestion de coquillages récoltés dans des zones de mauvaise qualité microbiologique.

En Europe, le traitement de plus en plus poussé et systématique des eaux de consommation limite le risque aux eaux de baignade et à la consommation des coquillages, deux domaines soumis à réglementation. Concernant la qualité microbiologique des eaux de baignade, celle-ci était réglementé jusqu'à récemment à l'échelle européenne par la directive 76/160/CEE définissant un classement des zones de baignade en fonction de leur qualité microbiologique. Ce classement, basé sur la détection de trois indicateurs microbiologiques (*Escherichia coli* (*E. coli*), les entérocoques intestinaux et les coliformes fécaux) n'imposait pas de déterminer les sources réelles ou potentielles de la contamination. Mais face à la pression liée aux risques sanitaires, les autorités européennes ont décidé de durcir les valeurs seuils d'indicateurs fécaux et d'imposer désormais l'établissement de profils de baignade, dont l'un des objectifs est précisément de déterminer les sources effectives ou potentielles de

la contamination, en éditant la directive 2006/7/CE. Un durcissement similaire est observé les zones de conchylicultures avec l'abrogation de la réglementation sanitaire européenne (91/492/CEE) au profit de la directive (2006/113/CE).

Les sources potentielles de contaminations fécales peuvent être soit humaines, soit animales, soit une combinaison des deux. Les contaminations d'origine humaine peuvent être liées: soit à des rejets directs accidentels d'eaux usées dans le milieu naturel et/ou à des infiltrations dans le sol d'eaux usées se propageant vers les eaux, soit au lessivage de boues résiduaires de stations d'épuration (STEP) épandues sur les sols agricoles. Les contaminations d'origine animale peuvent prendre plusieurs formes. Elles peuvent être liées aux rejets directs de déjections dans les eaux par les animaux d'élevage pâturant en bordure de cours d'eau et à moindre mesure par les animaux sauvages et domestiques. Elles peuvent être aussi et surtout être liées au lessivage des matières fécales épandues sur les sols agricoles en remplacement de ou en complément des engrais minéraux.

Les indicateurs microbiologiques classiques actuels (*E. coli*, entérocoques intestinaux et coliformes fécaux) ne sont pas aptes à répondre à la nouvelle exigence d'identification des sources de contaminations fécales. D'où l'émergence depuis quelques années d'un champ de recherche, connu sous le terme générique de Microbial Source Tracking (MST), visant à développer des marqueurs spécifiques susceptibles de distinguer les contaminations humaines et animales et au sein des contaminations animales, les types précis d'animaux en cause. Deux grands types d'outils sont ciblés dans ces recherches: les outils microbiologiques (Scott *et al.*, 2002; Harwood *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2005) et les outils chimiques (Glassmeyer *et al.*, 2005; Hagedorm et *al.*, 2009). Les méthodes microbiologiques s'appuient sur la recherche des micro-organismes spécifiques (bactéries, virus et parasites) des différentes sources impliquées via des techniques culturales et/ou moléculaires alors que les méthodes chimiques s'appuient sur la recherche de composés chimiques naturels (stéroïdes et acides biliaires) (Leeming *et al.*, 1996; Elhmmali *et al.*, 1997,2000), et/ ou de composés issus des habitudes de consommation des hommes (résidus médicamenteux, caféine, dérivés du tabac) (Heberer, 2002; Glassmeyer *et al.*, 2005) et/ou des composés de synthèse (parfums, produits lessiviels et retardateurs de flamme) (Eganhouse *et al.*, 1983; Peck *et al.*, 2006).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de travailler sur les composés chimiques et spécifiquement sur les stéroïdes. En effet, ces composés semblent remplir les différents critères : 1) un pouvoir discriminant pour mettre en évidence le type de contaminations

fécales et une sensibilité reconnue, 2) une stabilité de la méthodologie, géographique et temporelle, 4) une persistance au minimum similaire à celle des indicateurs de contamination fécale et 5) des concentrations suffisantes dans le milieu naturel pour être détectés; critères nécessaires pour être un bon outil de traçage.

Afin de contribuer à valider l'utilisation de ces composés comme outil de traçage de l'origine des contaminations fécales des eaux, une étude a été entreprise avec la région Bretagne comme cadre, celle-ci étant choisie pour 1) sa capacité à mobiliser en parallèle des sources humaines et des sources animales multiples (bovine et porcine, principalement) du fait de la présence conjointe d'une densité humaine importante et de zones d'élevage intensif conduisant à des apports massifs de déjections animales au sol et 2) la présence avérée sur ses côtes et au sein de ses eaux continentales de zones contaminées. La démarche scientifique s'est organisée suivant trois étapes :

- Nous avons tout d'abord cherché à caractériser chacune des trois sources (humaine, bovine et porcine) susceptibles d'être à l'origine des contaminations microbiologiques observées dans cette région du point de vue de leurs signatures en stéroïdes, avec comme objectif d'établir les caractéristiques propres à chaque source et de vérifier l'homogénéité de celles-ci aux échelles locales et régionales. Et ainsi, établir (ou vérifier) l'existence de signatures en stéroïdes réellement spécifiques à chaque source, première condition *sine qua non* de l'utilisation des stéroïdes en tant qu'outil de traçage de l'origine de la contamination fécale des eaux.
- Nous avons ensuite cherché à vérifier que les signatures propres à chaque source étaient conservées pendant le transfert des matières fécales de la source vers le milieu récepteur. Cette vérification s'est faite notamment par la mise en œuvre d'expériences de ruissellement sur des parcelles agricoles ayant préalablement reçu des épandages de déjections bovines et porcines. L'objectif ici était de vérifier la conservation des signatures propres à chaque source lors du transfert et des processus de changement de matrice et de dilution subits par les stéroïdes. La persistance des signatures spécifiques lors du transfert est la deuxième condition *sine qua non* de l'utilisation des stéroïdes en tant qu'outil de traçage de l'origine de la contamination fécale des eaux.
- Enfin, dans un troisième temps, nous avons comparé les marqueurs stéroïdes validés suite aux deux premières étapes à d'autres marqueurs chimiques (caféine et retardateur de flamme) et à des marqueurs microbiologiques dans le cas d'eaux soumises à des contaminations fécales d'origine inconnue. Cette étape constitue l'étape ultime de

validation de l'utilisation des marqueurs stéroïdes en tant que traceurs opérationnels des sources de la contamination fécale des eaux.

On notera que cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche interdisciplinaire rassemblant des microbiologistes, des chimistes et des géochimistes organiciens (les projets Traces I et II, financé par l'Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) et portés par Anne-Marie Pourcher) et visant à développer et confronter sur les mêmes objets (déjections brutes; eaux de ruissellement; eaux de bassins versants contaminés) des marqueurs chimiques et des marqueurs microbiologiques. L'objectif de cette confrontation étant de mettre au point une palette complète d'outils complémentaires capables de déterminer l'origine d'une contamination fécale. Ce désir d'associer les traceurs les uns avec les autres part du constat qu'aucun ne peut garantir à lui seul la détermination à coup sûr de cette origine.

Ce manuscrit est composé de cinq chapitres, incluant deux publications parues et une publication en préparation.

1. Le premier chapitre est consacré à une présentation détaillée du contexte, de l'état de l'art et des objectifs de thèse.
2. Le deuxième chapitre a pour but d'expliquer le choix du site d'étude, de détailler l'échantillonnage et de présenter la méthodologie analytique utilisée.
3. Le troisième chapitre traite de la variabilité des signatures des stéroïdes au sein des déjections bovines et porcines et entre ces deux ensembles, des origines possibles de cette variabilité (régime alimentaire, temps de stockage et traitements), et de la capacité des stéroïdes à constituer des marqueurs spécifiques de ces deux sources.
4. Le quatrième chapitre présente et discute les résultats d'expériences de ruissellement conduites sur des parcelles amendées en déjections bovines et porcines et visant à vérifier la persistance des signatures pendant la dilution et le transport.
5. Le cinquième et dernier chapitre présente les résultats de l'étude de validation associant marqueurs stéroïdes, marqueurs chimiques et marqueurs microbiologiques réalisées sur les eaux de deux bassins versants contaminées par des matières fécales d'origine inconnue.

Chapitre 1 - Contexte, état de l’art et objectifs de la thèse

I/- CONTEXTE GENERAL DE LA THESE

I/-1 Rappels concernant les problèmes sanitaires engendrés par les contaminations fécales des eaux et les réglementations françaises et européennes mises en place

Les pollutions microbiologiques des masses d'eaux d'origines naturelles, domestiques, agricoles ou industrielles, sont sources de nombreuses maladies liées à des facteurs infectieux ou toxiques. En effet, les matières fécales contiennent des micro-organismes pathogènes tels que des bactéries, des virus, des champignons et des parasites (Pell, 1997; Fleisher *et al.*, 1998; Pruss, 1998, Sinton *et al.*, 1998; Asperen *et al.*, 1998; Gerba *et al.*, 2005) qui sont présents dans les eaux lorsqu'il y a contamination fécale. Ces micro-organismes peuvent générer une multitude de pathologies plus ou moins graves, dont les plus communes sont résumées dans le tableau I.1 (Kay *et al.*, 1994; Pruss, 1998; Given *et al.*, 2006; DePaola *et al.*, 2010).

Tableau I.1: Liste des principales pathologies liées aux micro-organismes présents dans les matières fécales (d'après Delolme *et al.*, 1992; Stablo, 1998; Dupoiron, 2005).

Origine	Pathologie	Micro-organisme
Bactérie	Fièvres typhoïdes ou paratyphoïdes	*Salmonella typhi*, Parathyphi A, B et C
	Dysenterie bacillaire	*Shigella*
	Choléra	*Vibrio cholerae*
	Gastro-entérites aigues et diarrhées	*Escherichia coli* entérotoxinogènes, *Yersinia enterocolitica*, *Camylobacter jejuni*, *Shigella*, *Salmonella spp.*
	Pneumopathies	*Legionella*
	Infections cutanées	*Staphylococcus aureus*
Virus	Hépatites A et C	Entérovirus
	Poliomyélite	Polyovirus
	Gastro-entérites aigues et diarrhées	Entérovirus, Rotavirus, Adénovirus, Réovirus et Virus de Norwalk
Parasites	Dysenterie amibienne	*Entamoeba histolytica*
	Gastro-entérites	*Crystosporidum*, *Giardia lamblia*
Champignons	Infections de la sphère Oto-Rhino-Laryngologique et oculaire	*Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.* et *Candida spp.*

Ainsi, la consommation d'eau contaminée par les matières fécales induit des risques sanitaires importants pour les populations. Chaque année, à l'échelle mondiale, la consommation d'eaux de mauvaise qualité a pour conséquence la mort de trois millions de personnes, dont la majorité des victimes sont des enfants de moins de cinq ans (Pond, 2005 - Source OMS). Les risques sanitaires sont non seulement liés à la consommation d'eau contaminée par des matières fécales, mais également à la pratique d'activités récréatives telles

que la baignade ou bien encore à l'ingestion de coquillages récoltés dans des eaux de mauvaise qualité microbiologique.

En plus d'engendrer un problème de santé publique majeur, les contaminations fécales des eaux peuvent entrainer des problèmes d'ordre économiques et sociaux. En effet, les contaminations fécales des eaux peuvent avoir comme conséquence:

- des déclassements ou des fermetures de zones de baignade,
- une interdiction de vente de coquillages ou la nécessité d'une purification des coquillages avant commercialisation,
- une image néfaste pour le tourisme du fait de l'interdiction des pêches à pied et du mauvais classement des zones de baignades voire la fermeture,
- des conflits d'usage entre les différents usagers des eaux: agriculteurs, pêcheurs, conchyliculteurs, touristes, populations urbaines…

I/-1-1 Réglementation sur la qualité microbiologique des eaux de baignades

Dans l'intention de protéger la santé publique, l'Europe a mis en place en 1976 une réglementation (Directive 76/160/CEE[1]) sur la qualité microbiologique des eaux de baignade avec l'édition de 4 classes de qualité: excellente (classe A), bonne (classe B), suffisante (classe C) et insuffisante (classe D). Ce classement est basé sur la détection d'indicateurs microbiologiques: *Escherichia coli* (*E. coli*), les entérocoques intestinaux et les coliformes fécaux. Le Tableau I.2 présente le classement sanitaire des eaux de baignade de cette directive en fonction des valeurs seuils.

[1] Législation européenne des eaux de baignade du 8 décembre 1975 qui fixe les critères minima de qualités auxquels doivent répondre les eaux de baignade ainsi que 1) les paramètres physico-chimiques et microbiologiques réglementaires à analyser, 2) les valeurs-limites impératives et les valeurs indicatives de ces paramètres que les eaux doivent respecter, 3) la fréquence d'échantillonnage minimale et la méthode d'analyse ou d'inspection de ces eaux.

Tableau I.2: Classement sanitaire microbiologique des eaux de baignade selon la directive 76/160/CEE.

		Catégorie			
Indicateurs microbiologiques (UFC*/100mL)		**A Bonne**	**B Moyenne**	**C Momentanément polluée**	**D Mauvaise**
Coliformes totaux	Valeur guide[a] (500/100mL)	> 80 %	/	/	/
	Valeur impérative[b] (10 000/100mL)	> 95 %	> 95 %	< 95 % > 66 %	< 66 %
E. coli	Valeur guide[a] (100/100mL)	> 80 %	/	/	/
	Valeur impérative[b] (2 000/100mL)	> 95 %	> 95 %	< 95 % > 66 %	< 66 %
Entérocoques intestinaux	Valeur guide[a] (100/100mL)	> 90 %	/	/	/

Pourcentage de résultats qui doivent respecter les valeurs seuils déterminées
* UFC : Unité Formant une Colonie
[a]Valeurs guides: bonne qualité (classe A dans la réglementation)
[b]Valeurs impératives: moyenne qualité (classe B dans la réglementation)

L'application de cette directive a conduit les états membres à mieux gérer les risques sanitaires liés aux eaux résiduaires, principales sources responsables des contaminations. Ainsi en 2004, 95% des zones de baignade françaises ont été classées A contre 60% lors de la mise en application de la directive (Direction Générale de la Santé, 2004). Jusqu'à présent, les réglementations européennes n'imposaient pas de déterminer la ou les sources exactes des contaminations fécales. Cette situation a récemment changé, avec l'adoption d'une nouvelle réglementation sur les eaux de baignade (Directive 2006/7/CE) en 2006 afin d'assurer une cohérence avec les exigences de qualité imposée par la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE). En effet, la DCE oblige les états membres de l'Union Européenne à se conformer à des exigences strictes et ambitieuses pour atteindre d'ici à 2015 un bon état écologique et chimique des eaux superficielles (eaux douces et côtières) et des eaux souterraines. Ainsi, la démarche de suivi de qualité des eaux de baignade pour cette nouvelle réglementation reste identique à la celle de 1976 mais présente de nouvelles particularités :

- le classement de qualité sera effectué en prenant en compte les quatre dernières années de suivis,

- le nombre de paramètres microbiologiques est réduit à deux: *E. coli* et les entérocoques intestinaux, avec pour chacun d'eux un abaissement des seuils réglementaires,
- le nombre de prélèvements par station balnéaire sera au minimum de 4,
- le nombre de classe de qualité est réduit à trois: excellente, bonne et suffisante avec une différence de seuil pour les eaux intérieures et les eaux côtières et de transition. Le tableau I.3 résume les nouvelles limites de qualité microbiologiques relatives aux eaux de baignades selon la directive 2006/7/CE.

Tableau I.3: Limites de qualité microbiologiques relatives aux eaux de baignade selon la directive 2006/7/CE.

	Indicateurs microbiologiques					
	***E. coli* (UFC*/100mL)**			**Entérocoques intestinaux (UFC*/100mL)**		
Qualité	Excellente	Bonne	Suffisante	Excellente	Bonne	Suffisante
Eaux côtières et eaux de transition	250**	500**	550***	100**	200**	250***
Eaux intérieures	500**	1000**	1100***	200**	400**	450***

* UFC : Unité Formant une Colonie
**Valeur au 95ème percentile
***Valeur au 90ème percentile

La nouvelle réglementation impose également une identification et une hiérarchisation des sources de contamination par la réalisation par les collectivités de "profils de baignade" pour chacune des zones. Ces profils devaient être transmis à l'Agence Régionale de la Santé (ARS) au plus tard le 1er février 2011. En mai 2011, l'ARS n'avait reçu que 30% des profils de baignade au niveau national. Au vu de ces retards, un allongement des délais (de quelques mois) a été accordé par le ministère de la santé (Instruction DGS/EA4/2011/166 du 6 mai 2011) en vue d'établir un bilan national de l'état d'avancement des profils d'eaux de baignade au sens de la directive européenne 2006/7/CE et cela sans mesures de pénalités.

Un "profil de baignade" est un outil de diagnostic et de gestion. Il consiste d'une part à identifier les sources de contamination susceptibles d'avoir un impact sur la qualité microbiologique des eaux de baignade et d'affecter la santé des baigneurs et d'autre part à définir les mesures de gestion à mettre en œuvre pour prévenir les contaminations à court terme, ainsi que les actions à conduire, afin de parvenir en 2015 à une eau de qualité au moins

« suffisante » au sens de la directive. L'élaboration des profils des eaux de baignade est donc une mesure essentielle qui doit permettre d'améliorer la qualité des eaux de baignade et de prévenir les risques sanitaires pour celles ne répondant pas aux critères de qualité.

L'élaboration de profil de baignade s'effectue en trois phases : 1) un état des lieux, 2) un diagnostic et 3) une synthèse et les mesures de gestion à mettre en œuvre.

La première phase consiste à :

- réaliser une description de la zone de baignade et de la zone d'étude (caractéristiques physiques, géographiques, géomorphologiques et hydrogéologiques des eaux),
- collecter les données sur la qualité des eaux et des coquillages,
- réaliser un inventaire des sources potentielles de contamination,
- évaluer le potentiel de prolifération des cyanobactéries, des macro-algues et/ou des phytoplanctons.

La deuxième phase a pour but d'évaluer de manière globale le risque potentiel de contamination. Elle doit permettre de:

- classer les sources de contamination identifiées et déterminer si elles engendrent des pollutions à court terme ou des pollutions chroniques,
- hiérarchiser les sources de contamination selon leur impact sur la qualité des eaux de baignade,
- lister les risques accidentels de contamination du bassin,
- prendre en compte les perspectives d'évolution démographique et leur impact sur les sources de contamination.

Enfin la troisième phase se traduit par trois points clés :

- l'établissement de mesures de gestion préventives des pollutions à court terme,
- l'établissement de mesures de gestion préventives des autres sources de contaminations,
- la mise en place d'un plan d'action qui définira les mesures à mettre en œuvre pour supprimer ou réduire les causes de contamination.

Les sources de contamination affectant la qualité des eaux de baignade étant amenées à évoluer, les profils seront régulièrement ré-examinés. Les eaux classées d'excellente qualité

ne le seront que si la qualité se dégrade; pour les eaux de bonne qualité, la révision se fera tous les quatre ans; tous les trois ans pour les eaux de qualité suffisante et enfin tous les deux ans pour celles de qualité insuffisante (d'après Le guide national pour l'élaboration d'un profil de baignade, 2009).

I/-1-2 Réglementation sur la qualité microbiologique des eaux conchylicoles

Depuis 1991, les zones de production conchylicole (bivalves et gastéropodes) sont soumises à une réglementation sanitaire européenne (91/492/CEE) qui fixe des règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des mollusques vivants selon l'arrêté du 21/05/99[2]. En 2006, une nouvelle réglementation (Directive 2006/113/CE) plus contraignante par le renforcement des seuils de qualités a vu le jour par l'application du règlement 854/2004/CE. Celle-ci a pour but la protection et/ou l'amélioration des zones de conchylicultures pour permettre le développement des coquillages et contribuer à la bonne qualité des produits destinés à l'alimentation humaine. Dans cette réglementation, les zones de production conchylicole sont réparties en trois classes (au lieu de 4 classes dans la réglementation précédente) suivant le niveau de contamination microbiologique évalué par E. *coli* (Tableau I.4). En plus de la classification, il est demandé d'étudier les sources de contaminations fécales pouvant atteindre les zones conchylicoles.

Tableau I.4: Réglementation sanitaire des zones de production conchylicole et usages professionnels et récréatifs associés selon le règlement 854/2004/CE du parlement européen et du conseil.

Classes	Seuil (E. *coli*/100 g CLI[a])	Usage professionnel	Usage récréatif
A	100 % des résultats < 230	Elevage et pêche autorisés, possibilité de vente directe (sans traitement)	Pêche autorisée
B	90 % des résultats < 4600 et 10 % des résultats > 4600 et < 46000	Elevage et pêche autorisés, mais traitement de purification avant commercialisation	Pêche tolérée[b]
C	100 % des résultats > 46000	Elevage et pêche interdits excepté dérogation préfectorale	Pêche interdite

[a] Chair et Liquide Intervalvaire, [b] Cuisson fortement conseillée avant la consommation.

[2]Classes et seuils de qualité microbiologiques de l'arrêté 21 Mai 1999.

Nombre d'*Escherichia coli* / 100 g CLI					
Classe	230	1 000	4 600	46 000	
A	≥ 90 %	≤ 10 %	0 %		
B	≥ 90 %			≤ 10 %	0 %
C	≥ 90 %				≤ 10 %
D					> 10 %

De par l'évolution des réglementations sur la qualité des eaux de baignades et des eaux conchylicoles, la détermination de l'origine des contaminations fécales est donc devenue un enjeu sur le plan européen où les zones de baignades et les zones conchylicoles sont soumises à une forte pression anthropique.

I/-2 Implications sur l'état de la qualité microbiologique des eaux de baignade et des eaux conchylicoles en France sous les nouvelles directives

Une étude comparative des classements de la qualité des zones de baignade en France, en eaux côtières uniquement, selon les dispositions de la directive 76/160/CEE et de la directive 2006/7/CE est présentée dans ce qui suit en se basant sur les résultats de la saison 2008. Une autre étude comparative est présentée, cette fois-ci pour les zones de conchylicultures en France toujours pour l'année 2008, selon leur classement d'après l'arrêté 21/05/1999 et le règlement 854/2004/CE.

I/-2-1 Implications pour les eaux de baignade

La figure I.1 présente la répartition de la qualité de 1974 eaux de baignade en zones côtières en France en comparant le classement selon la directive actuelle (76/160/CEE) et la nouvelle directive (2006/7/CE). Les critères de qualité pour cette simulation ont été calculés avec les données des années 2005 à 2008 sur les deux paramètres inscrits dans la directive 2006/7/CE (*E. coli* et les entérocoques intestinaux) et les classes de qualité qu'elle définit.

Les résultats de cette simulation montrent une dégradation de la qualité microbiologique des eaux de baignades selon les critères de qualité de la nouvelle réglementation (Directive 2006/7/CE). En effet, la figure I.1 montre une augmentation sensible du nombre de zones de baignades présentant une qualité microbiologique suffisante (augmentation de 2,8 à 7,7 % selon les critères de la directive 2006/7/CE), et l'émergence d'une proportion très significative de zones de baignades de qualité insuffisante (augmentation de 0,4 à 8,6 % selon les critères de la directive 2006/7/CE[3]). Cette détérioration de la qualité microbiologique des eaux de baignade se fait au détriment des eaux classées en qualité « excellente » et « bonne » dont le total passe de 97 % avec la Directive 76/160/CE à 84 % avec la Directive 2006/7/CE.

[3]Une eau de baignade est classée de qualité Insuffisante si l'un au moins des 90ème percentiles des indicateurs *E. coli* et entérocoques intestinaux est strictement supérieur à la valeur seuil correspondante de la classe de qualité suffisante.

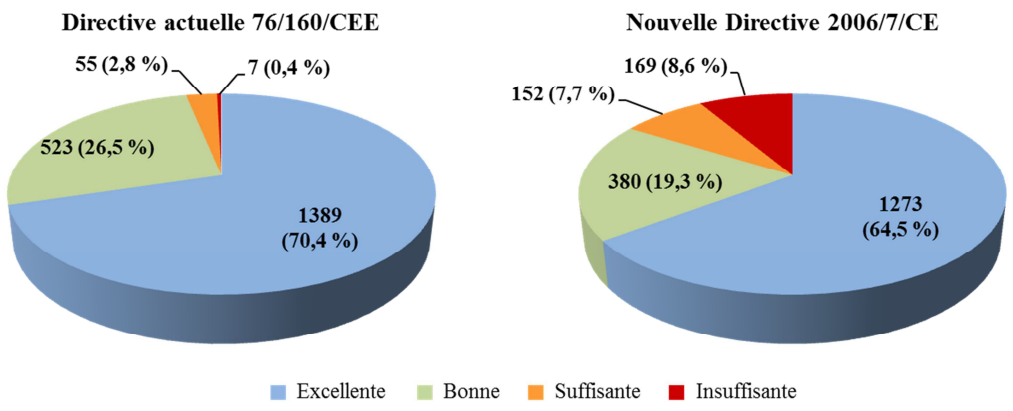


Figure I.1: Répartition de la qualité des zones de baignades en eaux côtières en France selon leur classement d'après les directives 76/160/CEE et 2006/7/CE (d'après le rapport - Simulation de la qualité des eaux de baignade en mer 2008 - Surfrider Foundation).

I/-2-2 Implications pour les eaux conchylicoles

La figure I.2 présente le bilan de la répartition de la qualité des 238 zones conchylicoles françaises contrôlées en 2008 en comparant le classement selon l'arrêté du 21 Mai 1999 et selon le règlement 854/2004/CE[4]. La répartition des zones selon leurs critères de qualité a été réalisée avec les données des années 2006 à 2008 en prenant *E. coli* comme paramètre de qualité microbiologique.

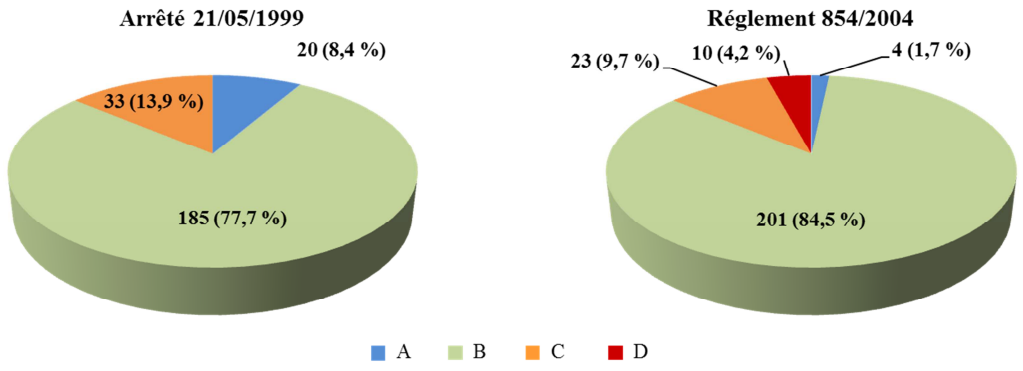


Figure I.2: Répartition de la qualité des zones de conchylicultures en France selon leur classement d'après l'arrêté 21/05/1999 et le règlement 854/2004 (d'après le rapport - Bilan national REMI 2008 - Ifremer).

Les résultats de cette simulation montrent que la modification des seuils réglementaires selon l'aplication des seuils du règlement 854/2004/CE par rapport à l'arrêté de 21 Mai 1999

[4]Estimation de qualité: 100% des résultats > 46 000 *E. coli*/100 g CLI, ce qui correspond à la classe D sous l'arrêté 21/05/1999.

a un impact direct sur le classement des zones conchylicoles, avec un déclassement de nombre de zones conchylicoles. Ainsi, sur les 20 zones classées en catégorie A selon l'arrêté 21 Mai 1999, 16 sont déclassées en B selon le règlement 854/2004/CE. L'application des critères de ce réglement déclasse également 10 zones en classe D, c'est-à-dire en qualité insuffisante d'un point de vue microbiologique avec comme conséquence une interdiction d'élevage et de pêches de coquillages.

Ces études comparatives sont des simulations qui démontrent que l'application des critères édités par les nouvelles directives conduit à des déclassements des zones de baignades ou des zones conchylicoles d'un point de vue de la qualité microbiologique. Ces simulations se placent dans le cas extrême. C'est-à-dire qu'elles ont été réalisées sans tenir compte des éventuelles actions préventives conduites par les collectivités suite à l'établissement des profils de baignade et en particulier suite au recensement de toutes les sources de contaminations microbiologiques les amenant à fermer temporairement une zone de baignade ou à prendre des mesures de gestion adaptées à la protection sanitaire des usagers.

I/-3 Rappels concernant les sources possibles de contamination et leurs voies de transfert

Les sources potentielles de contaminations fécales des masses d'eaux de surface sont multiples et peuvent avoir une origine humaine ou animale qu'il convient, selon les nouvelles directives relatives aux zones de baignades et de conchylicultures, d'identifier et de hiérarchiser. La figure I.3 présente les principales sources de contamination fécale et leurs voies de transfert vers les eaux.

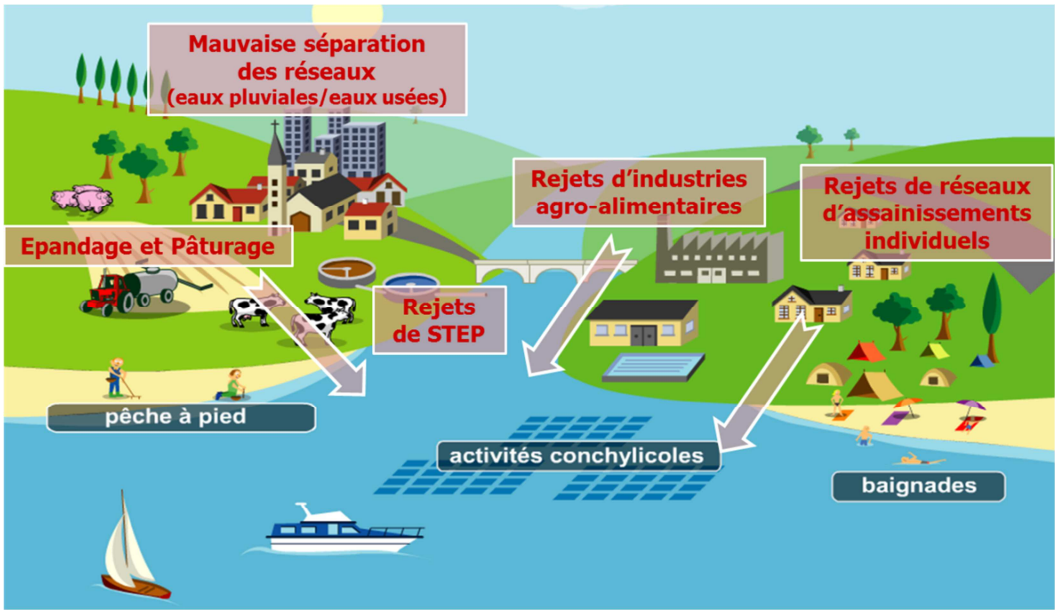


Figure I.3: Les principales sources de contaminations fécales dans les zones littorales (modifié selon Ifremer Environement, 2004).

Trois mécanismes principaux sont à l'origine des contaminations fécales humaines des eaux. Le premier mécanisme est le rejet direct d'influents de STEP domestiques. Il existe deux types majeurs de STEP; celles avec un réseau unitaire (c'est-à-dire qu'il n'y a pas de séparation entre les eaux usées domestiques et les eaux de pluies) et celles avec un réseau séparatif (c'est-à-dire qu'il y a une séparation entre le réseau des eaux pluviales et le réseau des eaux usées domestiques). En période de fortes pluies, celles à réseau unitaire ont du mal à gérer les forts débits en entrée de STEP, ce qui peut entraîner au niveau des déversoirs d'orage, un rejet direct des eaux usées dans les cours d'eaux aval (Barataud *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2005). Des rejets directs d'influents de STEP peuvent également se produire en période estivale, dans les villes touristiques, où l'augmentation de la population pendant cette période génère une augmentation du volume d'eaux usées à traiter que la STEP n'a pas forcément la capacité de gérer. Mais ces rejets peuvent également provenir de problèmes techniques tels qu'un dysfonctionnement accidentel et momentané d'une STEP ou un problème de raccordement au niveau des canalisations.

L'autre mécanisme pouvant entraîner des contaminations fécales d'origine humaine dans le milieu naturel est l'infiltration des eaux usées d'un système d'assainissement autonome dans le sol, qui sont susceptibles de se propager jusqu'aux cours d'eaux. Cela peut être dû à un mauvais entretien du système ou à sa vétusté.

La dernière voie possible de contaminations fécales d'origine humaine est l'épandage sur les terres agricoles de boues résiduaires via le lessivage des sols en période pluvieuse.

La deuxième source majeure de contaminations fécales des eaux est d'origine animale, en particulier dans les zones d'élevage intensif. L'épandage des déjections animales d'élevage (principalement d'élevage bovin, porcin et avicole, Ademe – Fiche technique Epandage) sur les terres agricoles est la principale voie de contamination fécale des eaux de surface par apports diffus. Les déjections animales sont riches en macro- et micro-nutriments (azote (N), phosphore (P), potassium (K), calcium (Ca) et magnésium (Mg)) essentiels à la croissance végétale (Sharpley et Smith, 1995) et en matière organique assurant la stabilité structurale du sol (Verma et Sharma, 2007). Elles sont donc recyclées en agriculture par épandage sur les sols agricoles à la place des traditionnels engrais minéraux.

Les déjections déposées par les animaux en pâturage (bovins, ovins) sur les prairies humides en bordure de cours d'eaux peuvent également, via le lessivage des sols, impacter la qualité de l'eau d'un point de vue microbiologique.

Enfin, le déversement de quantité plus ou moins importante de déjections animales directement dans les eaux peut impacter la qualité microbiologique des eaux. Cette troisième voie peut survenir en cas d'erreur de manipulation des fosses à lisiers ou des tonnes à lisiers utilisées pour l'épandage des déjections au champ. On notera qu'à l'inverse des deux premières voies de transferts pour lesquelles le sol est susceptible de jouer un effet tampon, cette dernière voie fait courir un risque sanitaire direct et majeur pour les écosystèmes.

Les contaminations fécales engendrées par les animaux domestiques (chiens et chevaux sur les plages par exemple) ainsi que par les animaux sauvages (rongeurs, oiseaux, animaux forestiers) sont également des sources de contamination possible. Par exemple, la contamination des eaux par les oiseaux tels que les canards, les goélands et les mouettes a été à plusieurs reprises mise en évidence mais reste faible par rapport aux sources humaines ou animales (Levesque *et al.*, 1993 ; Edge et Hill, 2007 ; Wright *et al.*, 2009).

Depuis 1995, en France, les ARS (Agences Régionales de la Santé) avec l'aide des collectivités locales concernées et des autres services de l'Etat dont les Agences de l'Eau, réalisent un recensement des différentes causes des contaminations fécales sur l'ensemble des zones de baignades non conformes (eaux intérieures et côtières). La figure I.4 présente la répartition des causes de non-conformité pendant la saison balnéaire 2008 en France. Ce

graphique met en évidence que 51,3 % des contaminations fécales sont dues à des insuffisances structurelles des STEP. L'autre cause principale à hauteur de 35,3 % correspond aux apports diffus (ruissellement urbains ou des surfaces agricoles ayant reçu un épandage de déjections animales ou de boues de STEP). D'autres causes telles que la situation de la plage (confinement, milieu urbain), les conditions climatiques défavorables (vent, orage, pluies fortes, marées, températures élevées) et des dysfonctionnements ponctuels de l'assainissement sont aussi des causes de pollution non négligeables (> 20 %). Une part importante (25 %) des causes des non-conformités des zones de baignades reste non déterminée.

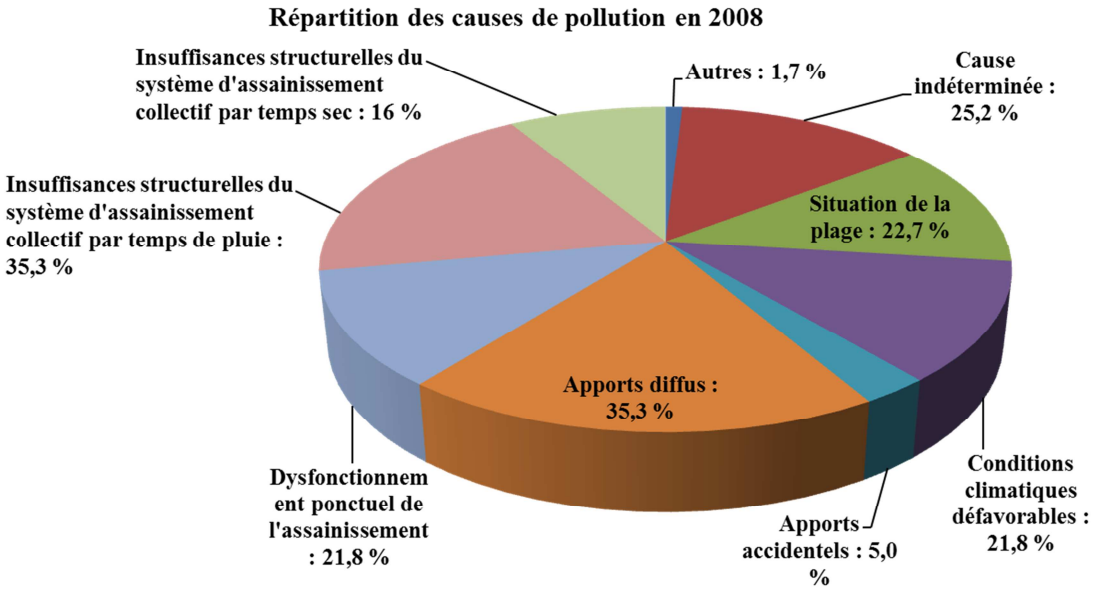


Figure I.4: Répartition des causes de contamination fécale en 2008 (Etat sanitaire des eaux de baignade en mer et en eau douce – Bilan de la saison balnéaire 2008 - Ministère de la santé et des sports DGS/DDASS, 2009).

Les contaminations fécales seraient donc, d'après cette étude, principalement dues à une origine humaine mais les contaminations d'origine animale ne sont pas à négliger. La multiplicité des sources de contamination fécale montrent que l'enjeu majeur est de distinguer les sources d'origine humaine (le plus souvent localisées dans les zones urbaines) de celles d'origine animale/agricole (le plus souvent diffuses dans ces mêmes zones).

II/- LES BESOINS DE TRAÇAGE DE L'ORIGINE DES CONTAMINATIONS FECALES ET LES OUTILS MOBILISABLES POUR LE TRAÇAGE

II/-1 Pourquoi tracer les sources de contaminations fécales ?

Le besoin de tracer les sources de contaminations fécales découle de leur multiplicité et de la nécessité de les identifier pour prendre les mesures nécessaires à la protection sanitaire des masses d'eaux du globe concernées. Il s'agit là d'un enjeu majeur de santé humaine à l'échelle planétaire, qui se traduit par la hiérarchisation des actions curatives et préventives à entreprendre. Au plan français et européen, les enjeux principaux portent sur les eaux de baignade et les eaux conchylicoles. Les enjeux de base sont renforcés par la nécessité pour les collectivités d'identifier précisément les sources de contaminations fécales menaçant les différents points de baignade qu'elles gèrent afin de concevoir des mesures permettant de réduire ce risque et/ou de limiter l'exposition des usagers à ces pollutions.

Cependant, identifier et hiérarchiser les sources n'est pas trivial. Une source commune à toutes les régions du globe en matière de contamination fécale des eaux intérieures ou côtières sont les rejets liés aux matières fécales humaines. Cette source peut prendre plusieurs formes allant du rejet direct et ponctuel, par les humains, de leurs déjections dans les eaux aux rejets d'eaux résiduaires issues de STEP et contenant encore un nombre significatif de germes pathogènes. A ces sources d'origine humaine, s'ajoutent des sources agricoles animales, celles–ci pouvant être extrêmement importantes en nombre et en flux dans des régions d'élevage intensif. Les indicateurs microbiologiques classiques que sont *E. coli* et les entérocoques intestinaux ne sont pas aptes à répondre à la nouvelle exigence d'identification des sources exactes de contaminations fécales. D'où l'émergence d'un champ de recherche visant à développer des marqueurs spécifiques susceptibles de distinguer les contaminations humaines des contaminations animales, d'une part, et les différents types de contaminations animales entre elles d'autre part. L'enjeu est d'importance puisqu'il s'agit de fournir des outils d'aide à la décision aux collectivités locales et territoriales pour protéger et restaurer la qualité microbiologique des eaux de baignade et des eaux conchylicoles. C'est dans cette démarche de développement et de validation de marqueurs spécifiques, connue sous le terme générique de Microbial Source Tracking (MST), que s'inscrit ce travail de thèse.

II/-2 Les différents outils à disposition

Un bon outil de traçage doit être spécifique d'une source, sensible, prévalent, universel (climat, géographie, régime alimentaire…) et détectable dans toutes les matrices environnementales aqueuses (Cimenti *et al.*, 2007). Les outils à disposition pour tracer les contaminations fécales pouvant correspondre à ces critères sont les micro-organismes (virus, bactéries et parasites) et les composés chimiques. Ces différents marqueurs sont présentés ci-après.

II/-2-1 Les outils microbiologiques

Les micro-organismes font depuis longtemps l'objet de recherches dédiées à les utiliser en tant que marqueurs spécifiques des différentes sources de contaminations fécales. Les premières tentatives remontent à l'observation de la différence de fermentation entre les streptocoques des fèces humaines, fermentant le mannitol, et ceux des déjections bovines et équines fermentant le raffinose (Gordon, 1905). Depuis le début des années 2000, les méthodes analytiques se sont améliorées conduisant à différentes méthodes de MST utilisant certains marqueurs phénotypiques ou génotypiques particuliers des indicateurs fécaux classiques propres aux différentes sources impliquées (Scott *et al.*, 2002; Harwood *et al.*, 2003; Wallis et Taylor, 2003; Ahmed *et al.*, 2005) et/ou basées sur la recherche d'autres cibles bactériennes ou virales spécifiques des hôtes humains et animaux et donc aptes à séparer les différentes sources de contaminations les unes des autres (Schaper *et al.*, 2002; Meays *et al.*, 2004; Seurinck *et al.*, 2005; Layton *et al.*, 2006; Cimenti *et al.*, 2007; King *et al.*, 2007; Ufnar *et al.*, 2007).

Globalement, les méthodes microbiologiques s'appuient sur des techniques culturales et moléculaires faisant ou non appel à des bases de données. Elles peuvent être classées en trois groupes distincts:

- des méthodes directes basées sur l'identification des virus, bactéries et parasites pathogènes incluant les outils moléculaires (recherche de variations génotypiques au sein d'une même espèce en fonction de l'hôte),
- des méthodes indirectes basées sur l'utilisation de micro-organismes fécaux incluant les outils moléculaires,
- des méthodes indirectes basées sur des rapports d'abondance de certains genres ou espèces.

Les méthodes directes basées sur l'identification des virus, bactéries et parasites pathogènes et non pathogènes:

La détection directe des agents pathogènes spécifiques aux humains, tels que les virus entériques et les vers intestinaux est le moyen le plus direct pour déterminer les risques sanitaires associés. Cependant, leur détection n'est pas aisée et relativement coûteuse.

Les techniques moléculaires ont permis d'identifier des génotypes de virus spécifiques des humains, des porcins et des bovins. Les bactéries et les bacteriophages ont été également utilisés comme marqueur de contaminations fécales via des méthodes directes. Ainsi, les bactériophages F-ARN spécifiques, les Bifidobactéries genre *Bifidobacterium* et les *Bactoroidales* genre *Bacteroides* ont montré une capacité à être utilisés comme traceur de contaminations fécales. Le tableau I.5 regroupe les principaux outils basés sur l'identification directe de virus, parasites pathogènes et bactéries et bactériophages.

Tableau I.5: Synthèse des principaux outils basés sur l'identification directe de virus, parasites pathogènes et bactéries et bactériophages.

Outils	Groupes de marqueurs	Types de marqueurs	Sources ciblées	Références bibliographiques
Virus	Virus entériques	Poliovirus, échovirus, hépatovirus, réovirus, rotavirus, adénovirus etc	Humaine	Fong et Lipp, 2005
	Génotypes des virus	Adénovirus, entérovirus, polyomavirus	Humaine Bovine Porcine	Griffin *et al.*, 1999 Fong et Lipp 2005 Hundesa *et al.*, 2006
Parasites	Vers intestinaux	Helminthes, plathelminthes	Humaine	Malicki *et al.*, 2001 Cimenti *et al.*, 2007
Bactéries	Bifidobacteries genre *Bifidobacterium*	*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. thermophilum* et *B. breve*	Humaine Porcine	Resnick et Levin, 1981 Mara et Oragui, 1983
	Bacteroidales genre *Bacteroides*	ADNr 16S des *bacteroidales*	Humaine Bovine Porcine	Marti *et al.*, 2009 Mieszkin *et al.*, 2009 et 2010
Bactério phages	Bactériophages F-ARN	Leviviridae (I à IV)	Humaine Animal	Furuse *et al.*, 1981 Havelaar *et al.*, 1990

<u>Les méthodes indirectes basées sur l'utilisation de indicateurs fécaux classiques:</u>

Ces méthodes indirectes regroupent les méthodes phénotypiques et génotypiques après mise en culture des bactéries. Les méthodes de culture sont basées sur l'isolement parmi les micro-organismes présents dans l'eau d'une espèce (ou d'un groupe d'espèces) susceptible de posséder des caractères phénotypiques ou génotypiques qui soient spécifiques d'une source donnée. Les méthodes phénotypiques s'appuient sur l'utilisation de caractère phénotypique typique de l'espèce indicatrice comme une caractéristique de distinction. Ces différences phénotypiques sont causées par les différentes conditions imposées aux bactéries dans le tractus intestinal des espèces hôtes. Les méthodes génotypiques sont considérées par beaucoup d'auteurs comme nettement plus fiables que les méthodes phénotypiques (Meays *et al.*, 2004; Seurinck *et al.*, 2005; Fong et Lipp, 2005). Elles consistent à utiliser le profil

génotypique de bactéries présentes dans l'intestin pour distinguer les sources de contamination fécale. Le tableau I.6 regroupe les principaux outils de ces méthodes indirectes.

Tableau I.6: Synthèse des principaux outils basés sur les méthodes microbiologiques indirectes.

Outils	Groupes de marqueurs	Types de marqueurs	Sources ciblées	Références bibliographiques
Phénotypes	ARA (Analyse de la résistance aux antibiotiques)	*E. coli*, Entérocoques intestinaux	Humaine Animale	Simpson *et al.*, 2002; Harwood *et al.*, 2003; Seurinck *et al.*, 2005; Cimenti *et al.*, 2007.
	CUP (Profil d'utilisation des sources de carbone)	*E. coli*, Entérocoques intestinaux	Humaine Animale	Simpson *et al.*, 2002; Hagedorn *et al.*, 2003.
	Sérogroupage	*E. coli*	Humaine Animale	Parveen *et al.*, 2001; Cimenti *et al.*, 2007.
Génotypes	Ribotypage	*E. coli*, Entérocoques intestinaux	Humaine Animale	Parveen *et al.*, 1999.
	Rep-PCR (Polymerase chain reaction répétitive)	*E. coli*, Entérocoques intestinaux	Humaine Animale	Dombek *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2005.
	PFGE (Electrophorèse sur gel en champs pulsé)	*E. coli*, Entérocoques intestinaux	Humaine Animale	Myoda *et al.*, 2003.
	AFLP (Polymorphisme de longueur de fragments d'ADN amplifiés)	*E. coli*	Humaine Animale	Guan *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2004.
	RAPD (Amplification aléatoire d'ADN polymorphe)	*E. coli*	Humaine Animale	Venieri *et al.*, 2004.

<u>Les méthodes indirectes basées sur des rapports d'abondance de certains genres ou espèces:</u>

Plusieurs rapports de bactéries ont été élaborés dans la littérature pour déterminer l'origine des contaminations fécales. Le tableau I.7 synthétise les principaux rapports utilisés.

Tableau I.7: Synthèse des principaux rapports de bactéries.

Outils	Groupes de bactéries	Types de marqueurs	Sources ciblées	Références bibliographiques
Rapports	Entérocoques et coliformes fécaux	Entéro./CF	Humaine Animale	Geldreich et Kenner, 1969
	Coliformes (atypiques et totaux)	CA/CT	Urbaine Agricole	Brion et Mao, 2000.
	Bifidobactéries (fermentant le sorbitol et totales)	Bifido. sorbitol / Bifido. T.	Humaine Animale	Bonjoch *et al.*, 2004.

II/-2-2 Les outils chimiques

Trois groupes de marqueurs chimiques sont utilisés pour tracer les sources de contaminations fécales (Glassmeyer *et al.*, 2005) : 1) les marqueurs ingérés et/ou produits par les animaux et les hommes et excrétés dans les fèces, 2) les marqueurs ingérés par l'homme et excrétés dans les fèces humaines et 3) les marqueurs associés aux eaux usées des STEP.

Le premier groupe de marqueurs correspond à un ensemble de composés chimiques ingérés et/ou produits par l'organisme animal ou humain et excrétés via les fèces. Les deux familles de ces marqueurs sont :

- les stéroïdes (dans les déjections humaines et animales) (Leeming *et al.*, 1996; Bull *et al.*, 2002),
- les acides biliaires (dans les déjections humaines et animales) (Elhmmali *et al.*, 1997, 2000; Chaler *et al.*, 2001).

Le deuxième groupe de marqueurs est constitué de composés chimiques naturels ou de synthèse. Les plus couramment utilisés sont :

- les résidus médicamenteux. Les produits pharmaceutiques humains ont été classés en neuf catégories en fonction de leur usage (Heberer, 2002) : analgésiques, anti-inflammatoires, antibiotiques, anti-épileptiques, β-bloquants, régulateurs lipidiques sanguins, contrastants radiographiques, anticancéreux chimiques, contraceptifs oraux. Les produits pharmaceutiques vétérinaires les plus couramment retrouvés dans les eaux sont les stimulateurs de croissance, les additifs alimentaires utilisés pour améliorer la production animale et les

substances thérapeutiques type antiparasitaires ou antibiotiques (Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

- la caféine est le composé le plus utilisé comme traceur de contamination fécale humaine (Buerge *et al.*, 2003; Glassmeyer *et al.*, 2005). La caféine est en effet présente dans plusieurs boissons (café, thé, cacao et cola), ainsi que dans de nombreux produits alimentaires (chocolat, …) et se retrouve donc associée aux matières fécales humaines.
- les composés issus de la consommation de tabac, tels que la cotinine (métabolite du tabac) et l'éthyl citrate (additif du tabac) (Glassmeyer *et al.*, 2005).

Le dernier groupe correspond à des molécules de synthèse (produits d'hygiène et d'entretien) traitées dans les stations d'épuration domestiques en même temps que les déjections humaines et rejetées dans l'environnement en même temps que celles-ci. Les plus communément utilisées car les plus ubiquistes sont :

- les détergents de type alkylbenzène et alkylbenzènesulfonate à chaine linéaire (Eganhouse *et al.*, 1983). Dans l'eau, ce sont principalement les nonylphénols qui sont recherchés comme produits de biodégradation des alkylbenzènesulfonate à chaine linéaire (Stephanou et Giger, 1982).
- les molécules constitutives des parfums utilisés dans les produits lessiviels sont principalement des composés polycycliques (Peck et Hornbuckle, 2004; Peck *et al.*, 2006). Parmi ces composés, la galaxolide, la tonalide et dans une moindre mesure la celestolide sont les plus fréquemment utilisées.
- les agents blanchissants fluorescents qui représentent environ 0,15 % des lessives. Les plus utilisés sont le 4,4'-bis(2-sulfstyryl)biphenyl, le 4,4'-bis(4-anilino-6-morpholino-1,3,5-triazin-2yl)-amino)stilbene et le 4,4'-bis(4-chloro-3-sulfotyryl)biphenyl (Poiger *et al.*, 1998). Bien que ces produits soient conçus pour être adsorbés sur le linge, 5 à 80 % sont évacués dans les réseaux d'assainissement avec les eaux de lavage.
- les retardateurs de flamme (Gilpin *et al.*, 2003; Glassmeyer *et al.*, 2005).

II/-3 Avantages et inconvénients des différents outils

Ce paragraphe consiste à faire une comparaison des différentes approches (microbiologiques et chimiques) utilisées pour tracer les contaminations fécales. Un bon

candidat pour cette mission doit répondre à plusieurs critères (Maier *et al.*, 2000 ; US Environmental Protection Agency, 2005; Cimenti *et al.*, 2007):

- spécificité du marqueur, c'est-à dire qu'il ne doit pas être présent dans l'environnement dans d'autres circonstances que dans celles d'une contamination fécale et posséder un pouvoir discriminant pour l'hôte;
- sensibilité du marqueur, c'est-à-dire qu'il doit être présent à chaque fois qu'une contamination fécale est détectée sans croître dans le milieu;
- corrélation avec les indicateurs de contamination fécale classique en termes de persistance et avec les agents pathogènes;
- stabilité du marqueur (pas de mutation ou de variabilité liée à la méthodologie);
- stabilités temporelle et géographique;
- être en quantité suffisante pour être détecté et quantifié;
- la méthodologie employée doit être rapide, facile à réaliser et peu onéreuse.

Les tableaux I.8 et I.9 présentent l'ensemble des approches microbiologiques et chimiques ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Tableau I.8: Avantages et inconvénients de l'ensemble des marqueurs microbiologiques (d'après Scott *et al.*, 2002; Seurinck *et al.*, 2005; Cimenti *et al.*, 2007 et Hagedorm *et al.*, 2009).

	Type	Cible	Sources	Avantages	Inconvénients
Marqueurs microbiologiques	Direct	Virus	Humaine, Porcin	Evite l'utilisation des indicateurs Haut degré de spécificité	Faible abondance dans l'environnement Détection complexe, fastidieuse et coûteuse
		Parasites	Humaine	Evite l'utilisation des indicateurs Haut degré de spécificité	Faible abondance dans l'environnement Détection complexe, fastidieuse et coûteuse
		Bactéries	Humaine, Bovine, Porcine	Spécificité réconnue	Culture difficile Persistance variable ou peu déterminée
		Bactériophages	Humain, Animal	Détection rapide Méthode simple	Manque de spécificité Faible sensibilité
	Indirect	Phénotypes	Humaine, Animale	Utilisation d'un caractère spécifique d'une source	Phénotypes instables Faible sensibilité Spécificité limitée
		Génotypes	Humaine, Animale	Plus fiables que les méthodes phénotypiques	Manque de spécificité Manque de reproductibilité Variabilité dans le temps Variabilité selon la géographie
	Indirect	Rapports	Humaine, Animale	Résultats généralement rapides	Valeurs intermédiaires pas exploitables Variabilité dans le temps des temps de survie Variabilité dans le temps des valeurs de rapports

Tableau I.9: Avantages et inconvénients de l'ensemble des marqueurs chimiques (d'après Scott *et al.*, 2002; Seurinck *et al.*, 2005; Cimenti *et al.*, 2007 et Hagedorm *et al.*, 2009).

	Type	Famille	Sources	Avantages	Inconvénients
Marqueurs chimiques	Groupe 1	Stéroïdes	Humaine, Animale	Seuil de détection faible Spécificité élevée Détection temporelle et géographique	Persistance variable mais pouvant être de plusieurs semaines Stérols présents naturellement
		Acides biliaires	Humaine, Animale	Seuil de détection faible Spécificité élevée	Extraction difficile
	Groupe 2	Résidus médicamenteux	Humaine, Animale	Seuil de détection faible	Plus ou moins spécifique Présence variable dans l'environnement
		Caféine	Humaine	Seuil de détection faible Spécificité élevée	Taux de dégradation variable
		Composés issus du tabac	Humaine	Seuil de détection faible Spécificité élevée	Persistance dans l'environnement variable
	Groupe 3	Détergents	Humaine	Seuil de détection faible Persistance importante	Sensible à la dégradation microbienne Faible spécificité
		Parfums	Humaine	Spécificité élevée	Présence plus ou moins faible
		Agents blanchissants	Humaine	Seuil de détection faible Peu biodégradables Persistance importante	Interférences lors de l'analyse
		Retardateurs de flamme	Humaine	Spécificité	Présence plus ou moins faible

Que l'approche soit microbiologique ou chimique, le marqueur idéal n'existe pas. Cependant les marqueurs présentés ci-dessus répondent plus ou moins bien aux critères nécessaires pour être un « bon » candidat.

Dans le cas de l'approche microbiologique, l'utilisation de marqueurs directs présente l'avantage absolu de détecter directement les micro-organismes à l'origine des pathologies sans passer par la détection des indicateurs classiques. Cependant ces techniques demandent énormément de temps, de moyens et nécessitent un équipement onéreux. Parmi ces marqueurs directs sont aussi comptés les bactéries et les phages qui nécessitent une étape de culture difficile. Mais de façon générale, s'ils sont comparés aux marqueurs indirects - marqueurs puvant être peu spécifiques, plus ou moins sensibles et avec un temps de survie variable et souvent inférieur aux agents pathogènes - ces marqueurs restent une piste à privilégier.

Dans le cas d'une approche chimique, un des atouts est leur temps de survie et leur limite de détection très faible par rapport aux marqueurs microbiologiques. Parmi les marqueurs chimiques, ceux issus de la digestion présentent l'avantage indéniable de différencier plusieurs sources (humaine ou animale) en plus d'une spécificité élevée comparés aux marqueurs ingérés et excrétés par l'homme ou associés aux fèces.

La spécificité et la sensibilité sont variables d'un marqueur à un autre, cependant certains types de marqueurs (marqueurs microbiologiques directs et marqueurs chimiques du groupe 1 seraient à privilégier si ces deux critères étaient les seuls à être pris en compte. Cependant, il faut également qu'il existe une corrélation entre le marqueur et les indicateurs de contamination fécale. Pour l'ensemble des marqueurs, cette corrélation existe, seuls quelques marqueurs comme les vers intestinaux et les virus entériques sont présents en faible quantité lorsqu'une contamination fécale est décelée.

Concernant la stabilité du marqueur, un petit nombre présente des inconvénients par rapport à la méthodologie, en particulier les agents blanchissants. La stabilité géographique et temporelle sont des critères importants qu'il est impossible de négliger. En effet, l'enjeu étant à la fois européen et mondial, il est tout à fait justifié de développer des outils de traçage insensible aux différences de températures, climats… Or sur le panel présenté, la variabilité géographique apparaît être un inconvénient caractéristique des marqueurs microbiologiques ou sur lequel elle reste à déterminer, et il en est de même pour la variabilité temporelle. La persistance, le taux de dégradation sont des paramètres généralement variables et peu étudiés

jusqu'à présent. Beaucoup de recherches doivent être effectuées sur ce point, afin de classer cinétiquement l'ensemble des marqueurs proposés. C'est un point critique de cette problématique. D'autant plus qu'un des critères de la US Environmental Protection Agency préconise de développer des marqueurs avec une persistance similaire à celle des indicateurs de contaminations fécale et des pathogènes. La survie dans l'environnement des micro-organismes est exprimée par le T_{90}, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que 90 % d'entre eux ne soient plus détectables par la technique analytique utilisée. Ce paramètre varie d'une espèce à l'autre et en fonction des conditions environnementales (température, salinité, rayonnement solaire, turbidité, osmolarité, oligotrophie, compétition inter-spécifique et prédation ainsi qu'en fonction des temps de transits) (Delpeuch, 1995; Seurinck *et al.*, 2005; Okabe et Shimazu, 2007). Il est très difficile de donner les temps de survie pour chaque espèce, cependant une vue d'ensemble de la littérature permet de dire que pour les bactéries le T_{90} va de quelques heures à quelques jours et que pour les virus il est plutôt de plusieurs jours à plusieurs semaines voir quelques mois pour certaines espèces (Mezrioui et Baleux, 1992; Monfort *et al.*, 2000; Bordalo *et al.*, 2002; Craig *et al.*, 2004; Seunrick *et al.*, 2005). Les approches microbiologiques basées sur les bactéries semblent donc être plus adaptées au traçage de contaminations fécales récentes. A l'opposé de ces marqueurs, un des points forts des marqueurs chimiques est leur persistance dans l'environnement, cependant elle est variable d'un composé à l'autre car elle dépend des conditions environnementales: aérobie/anaérobie, température, nature de la matrice environnementale et phase (dissoute ou particulaire). Par exemple, les stéroïdes peuvent persister plusieurs semaines dans l'eau (Solecki *et al.*, 2011) voire plusieurs années dans les sédiments (Bull *et al.*, 2002, Pratt *et al.*, 2008). La caféine présente l'avantage de rester principalement sous forme dissoute et ses voies de dégradation principales sont la photolyse indirecte (Stadler et Fay, 1995) et dans une moindre mesure la biodégradation (Buerge *et al.*, 2003). A contrario, la majorité des composés chimiques du groupe 3, de par leur caractère hydrophobe, ont une tendance à s'adsorber et donc à sédimenter mais plusieurs auteurs concluent sur une persistance suffisante pour tracer les contaminations fécales (Gilpin *et al.*, 2002, 2003; Gregor *et al.*, 2002).

Dernier critère, non des moindres, avoir un marqueur présent en concentration suffisante pour être quantifié dans le milieu naturel. Les marqueurs chimiques ont un net avantage sur ce critère, puisque les techniques utilisées pour les détecter ont des seuils de détection très bas (de l'ordre du $ng.L^{-1}$).

Il est impossible de rassembler l'ensemble de ces critères en un seul et unique marqueur. Chacun des marqueurs présentés ici présente des avantages et des inconvénients plus ou moins négligeables. Il est donc indéniable que c'est en couplant différents marqueurs que le meilleur diagnostic pour déterminer les sources de contaminations fécales dans le milieu naturel sera effectué.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de développer un outil de traçage basé sur l'analyse des stéroïdes. En effet, ces composés semblent présenter : 1) un pouvoir discriminant pour mettre en évidence le type de contaminations fécales et une sensibilité reconnue, 2) une stabilité de la méthodologie, ainsi qu'une stabilité géographique et temporelle, 3) une persistance au minimum similaire à celle des indicateurs de contamination fécale et 4) des concentrations suffisantes dans le milieu naturel pour être détectés.

III/- ZOOM SUR LES STEROÏDES COMME MARQUEURS DE CONTAMINATIONS FECALES ET QUESTIONS EN SUSPENS CONCERNANT L'UTILISATION DE CES MARQUEURS

III/-1 Rappels sur les mécanismes et les facteurs à l'origine des différences de signatures observées entre les sources

Les stéroïdes, au sens large, constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbones), majoritairement le squalène. Ce groupe de molécules comprend les stérols et les stanols, comme par exemple le cholestérol et le coprostanol, les hormones sexuelles comme l'estradiol et la testostérone, et enfin les médicaments anti-inflammatoires comme la dexaméthasone. Ils se caractérisent par un noyau stérane hydrophobe partiellement ou totalement hydrogéné (Figure I.5).

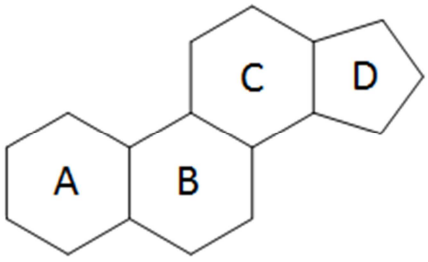


Figure I.5: Structure du noyau stérane.

L'oxydation du squalène suivi d'une réaction de cyclisation donne du cycloarténol (précurseur des stéroïdes végétaux) ou du lanostérol (précurseur des stéroïdes animaux et fongiques ainsi que certains stéroïdes végétaux). L'oxydation et la décarboxylation de ces deux composés amènent à la formation de composés appelés stérols. Les stérols contiennent entre 27 et 30 atomes de carbones et sont β-hydroxylés en C_3 et possèdent une chaîne aliphatique sur le cycle D du noyau stérane. Ces composés sont présents dans le règne animal et le règne végétal. Leur présence dans les plantes, les animaux et les champignons fait qu'il existe des centaines de stéroïdes. Chez les plantes, les phytostérols sont impliqués dans le maintien de la structure et dans le fonctionnement de la membrane cellulaire. Chez l'homme, le cholestérol (cholest-5-en-3β-ol) est utilisé pour la synthèse des acides biliaires au niveau du foie, composés nécessaires à la digestion des aliments. C'est également un composant majeur des membranes cellulaires car il contribue à la stabilité et au maintien de leur structure. De plus ce composé est un précurseur de nombreuses molécules telles que la vitamine D3, les hormones stéroïdes (cortisol, cortisone…) et des hormones stéroïdes sexuelles (œstrogène, progestérone et testostérone).

Dans le règne animal, le cholestérol est le précurseur de tous les stanols tandis que le campestérol (24-methylcholest-5-en-3β-ol), le stigmastérol (24-ethylcholesta-5,22E-dien-3β-ol) et le sitostérol (24-ethylcholest-5-en-3β-ol) sont les précurseurs des stanols des végétaux.

Les stanols présents dans les déjections des différents animaux et des hommes sont issus de la réduction microbienne anaérobie des stérols provenant de l'alimentation par la flore intestinale. La réduction de la double liaison Δ^5 induit sa biohydrogénation conduisant à deux isomères : 5β(H) et 5α(H). A cette réaction de biohydrogénation s'ajoute une réaction d'épimérisation du C_3 portant le groupement hydroxyle résultant en deux isomères : 3β(OH) et 3α(OH) (Figure I.6). La digestion et l'élimination via les fèces des stérols provenant du régime alimentaire peut ainsi résulter en un mélange de stérols initiaux et de stanols secondaires.

Le tableau I.10 présente les formules chimiques et les noms des principaux stéroïdes du règne animal et végétal.

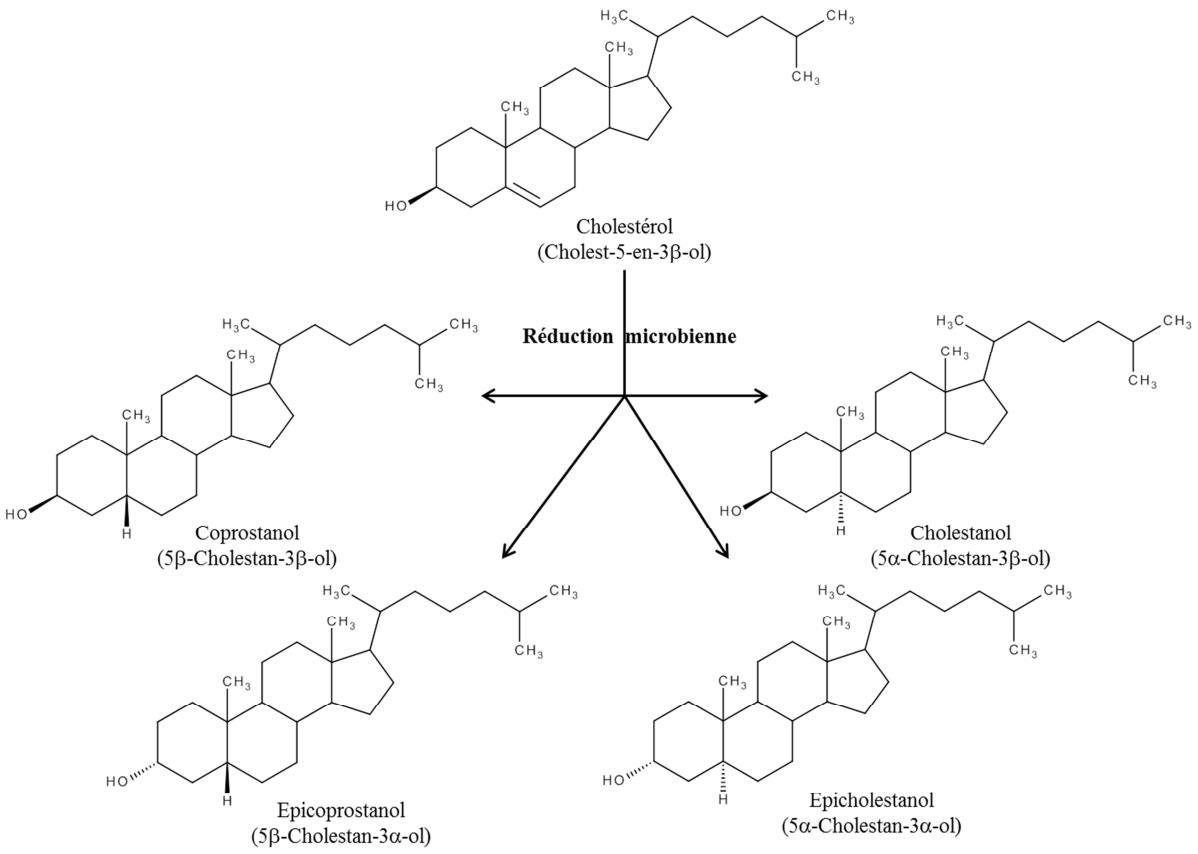


Figure I.6: Formation de quatre stéréoisomères du cholestérol après biohydrogénation suite à la réduction microbienne dans le tractus intestinal.

Tableau I.10: Noms systémiques, usuels et formules brutes des principaux stéroïdes dans le règne animal et végétal.

Noms systémiques	Noms usuels	Formules
Cholest-5-en-3β-ol	Cholestérol	$C_{27}H_{46}O$
5β-Cholestan-3-one	Coprostanone	$C_{27}H_{46}O$
5β-Cholestan-3β-ol	Coprostanol	$C_{27}H_{48}O$
5β-Cholestan-3α-ol	Epicoprostanol	$C_{27}H_{48}O$
5α-Cholestan-3β-ol	Cholestanol	$C_{27}H_{48}O$
5α-Cholestan-3α-ol	Epicholestanol	$C_{27}H_{48}O$
24-Methylcholest-5,22-dien-3β-ol	Brassicastérol	$C_{27}H_{46}O$
24-Methylcholesta-5,7,22-trien-3β-ol	Ergostérol	$C_{28}H_{44}O$
24-Methylcholest-5-en-3β-ol	Campestérol	$C_{28}H_{48}O$
24-Methyl-5α-cholestan-3β-ol	Campestanol	$C_{28}H_{50}O$
24-Ethylcholesta-5,22E-dien-3β-ol	Stigmastérol	$C_{29}H_{48}O$
24-Ethylcholest-5-en-3β-ol	Sitostérol	$C_{29}H_{50}O$
24-Ethyl-5α-cholesta-22E-dien-3β-ol	Stigmastanol	$C_{29}H_{52}O$
24-Ethyl-5β-cholesta-22-en-3β-ol	5β-Stigmastanol	$C_{29}H_{52}O$
24-Ethyl-5β-cholesta-22-en-3α-ol	5β-Epistigmastanol	$C_{29}H_{52}O$
24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol	Sitostanol	$C_{29}H_{52}O$
24-Ethyl-5β-cholestan-3β-ol	24-Ethylcoprostanol	$C_{29}H_{52}O$
24-Ethyl-5β-cholestan-3α-ol	24-Ethylepicoprostanol	$C_{29}H_{52}O$
4α,23,24-Trimethyl-5α-cholest-22-en-3β-ol	Dinostérol	$C_{30}H_{52}O$

Le coprostanol (5β-cholestan-3β-ol) est le principal stanol des fèces humaines dans lesquelles il représente environ 60% des stéroïdes présents (MacDonald *et al.*, 1983; Leeming *et al.*, 1996). Il a donc été initialement proposé comme marqueur des contaminations fécales d'origine humaine liées aux rejets de STEP (Dutka *et al.*, 1974 ; Goodfellow *et al.*, 1977; Grimalt *et al.*, 1990; Leeming *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1998; Carreira *et al.*, 2004; Reeves et Patton, 2005; Wu *et al.*, 2009). Cependant l'utilisation de cette molécule en tant que marqueur spécifique des effluents de STEP a été remise en question par plusieurs travaux du fait de sa présence dans les déjections d'autres espèces animales telles que les mammifères marins, les porcins ou les félins (Venkatesan et Santiago 1989; Venkatesan et Kaplan 1990; Leeming *et al.*, 1996; Jardé *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2007). La distribution des stéroïdes dans les fèces humaines et animales est fonction de trois facteurs : 1) le régime alimentaire, 2) la capacité des organismes à biosynthétiser des stérols endogènes et 3) la présence et la nature des

bactéries anaérobies de la flore intestinale catalysant l'hydrogénation des stérols en 5β(H) ou 5α(H) stanols (Leeming *et al.*, 1996). La combinaison de ces trois facteurs est à l'origine de l'« empreinte stéroïde » qui est différente d'une espèce à une autre. La figure I.7 présente les profils des stéroïdes pour cinq espèces animales, dont trois herbivores (bovin, équin et ovin) et deux omnivores (porcin et humain) (Leeming *et al.*, 1996).

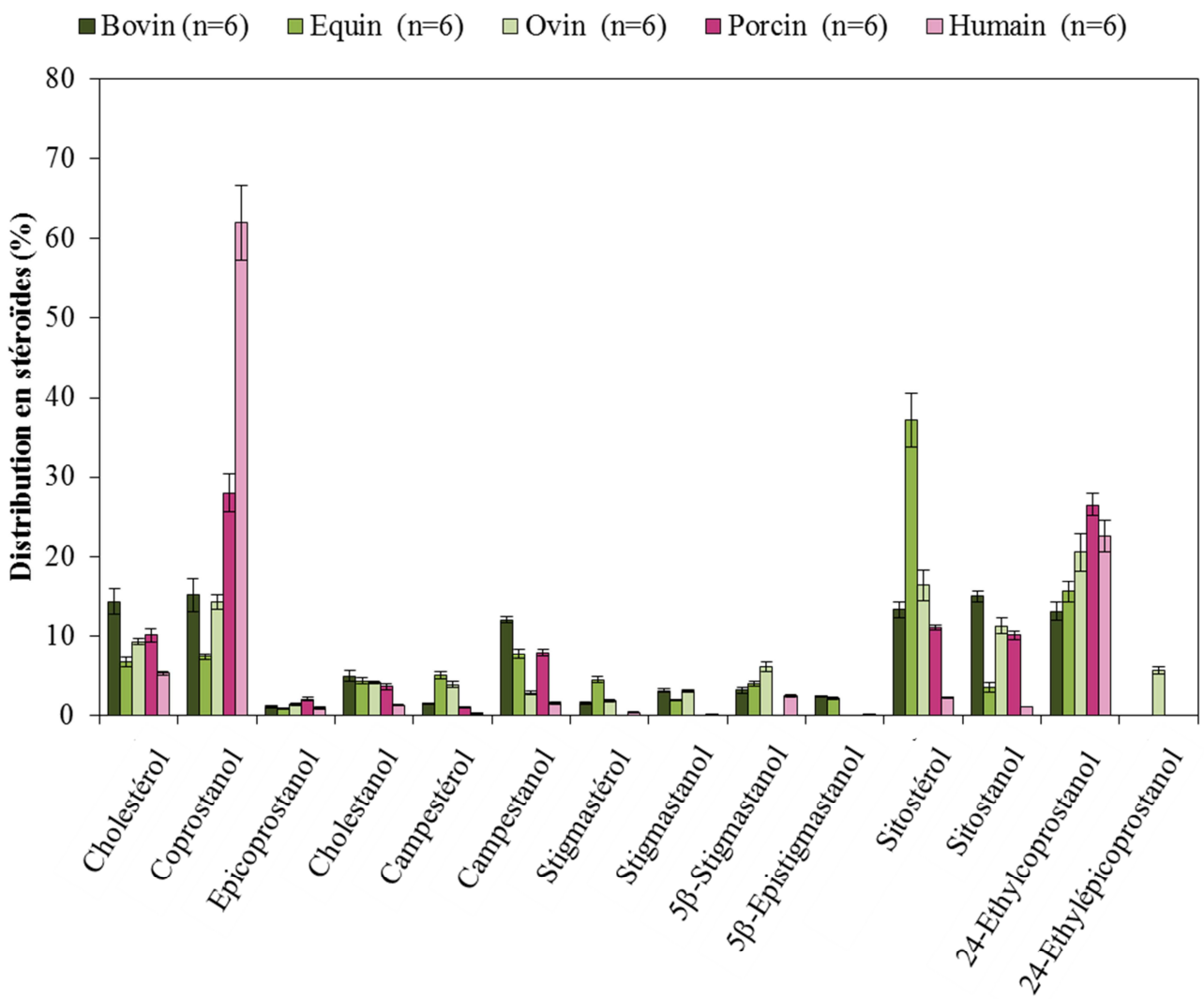


Figure I.7: Distribution (en %) des stéroïdes de cinq espèces (d'après Leeming et al., 1996).

Les déjections des herbivores sont dominées par les stéroïdes en C_{29} tels que le sitostérol, le 24-éthylcoprostanol et le sitostanol tandis que les déjections des omnivores contiennent à la fois des stéroïdes en C_{27} et en C_{29}, principalement des stanols tels que le coprostanol et le 24-éthylcoprostanol (Leeming *et al.*, 1996; Bull *et al.*, 2002). Les « empreintes stéroïdes» des trois herbivores montrent quelques dissemblances dues à un apport différent dans l'alimentation de plantes riches en stigmastérol ou en sitostérol. Les distributions en stéroïdes des déjections bovines et des déjections ovines se ressemblent, alors que les déjections

équines se différencient par deux fois moins de coprostanol (~7%) par rapport aux bovins (~15%) ou aux ovins (~14%), une quantité de sitostérol doublée (passant de ~13 et 16% pour les bovins et ovins, respectivement à 37% pour les équins) et une faible quantité de sitostanol (~3%). Le 24-éthylépicoprostanol est seulement présent dans les déjections des ovins.

Des différences sont également observées entre les deux « empreintes stéroïdes » des omnivores. Le profil des déjections humaines est nettement dominé par le coprostanol (> 60%) alors que dans les déjections porcines, le coprostanol représente ~30% de la distribution des stéroïdes. Le 24-éthylcoprostanol représente ~26% de la distribution des déjections porcines et ~22% de celle des déjections humaines. Le cholestérol, le sitostérol et le sitostanol sont des composés présents en quantité non négligeable (~10%) dans les déjections porcines, alors qu'ils ne sont présents qu'entre 1 et 5 % dans les déjections humaines.

Pour illustrer la variabilité de l' « empreinte stéroïde » d'une espèce à une autre, deux méthodes ont été développées. La première consiste à calculer des rapports d'abondance entre molécules, tandis que la deuxième approche consiste à prendre en compte toutes ou une partie des molécules de l' « empreinte stéroïde » et de réaliser un traitement statistique. Ces deux méthodes sont détaillées dans ce qui suit.

III/-2 Rappels sur les différents rapports utilisés

Les rapports entre stéroïdes ont été développés pour : 1) illustrer le degré de contamination par les eaux usées et 2) différencier les sources de contaminations fécales, principalement pour différencier une origine humaine et animale. Ces rapports ont été bâtis suite à l'analyse de déjections brutes représentatives de ces deux types d'origine et à l'observation de variations systématiques dans les proportions de certains stérols et stanols. Le tableau I.11 regroupe les principaux rapports utilisés dans la littérature.

Tableau I.11: Liste des rapports de stéroïdes présentés dans la littérature comme capable d'identifier les sources de contamination fécale.

Rapports	Symboles	Valeurs limites	Origine de la contamination	Auteurs
Coprostanol / Coprostanol+Cholestanol ou Coprostanol+Epicoprostanol / Coprostanol+Epicoprostanol+Cholestanol	R^1	R > 0,7	Humaine	Grimalt *et al.*, 1990; Bull *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 2005
Coprostanol / Cholestérol	R^2	R > 0,5	Humaine	Fattore *et al.*, 1996; Reeves *et al.*, 2005
Epicoprostanol / Coprostanol	R^3	R < 0,2	Humaine	Martins *et al.*, 2007; Froehner *et al.*, 2009
Campestérol+Sitostérol / Cholestérol	R^4	R > 1,5	Porcine	Jardé *et al.*, 2007
Coprostanol+Epicoprostanol+24-Ethylcoprostanol / Cholestérol+Sitostérol	R^5	R ≈ 1 R > 2	Bovine Porcine	Leeming *et al.*, 1996
[Coprostanol / Coprostanol+24-Ethylcoprostanol]*100	R^6	R > 73 R < 38	Humaine Bovine	Bull *et al.*, 2002
		R > 60 R < 45	Humaine Animale	Shah *et al.*, 2007
		38 < R < 47 51 < R < 61	Bovine Porcine	Gourmelon *et al.*, 2010
Coprostanol+Epicoprostanol / 5β-Stigmastanol+5β-Epistigmastanol	R^7	R < 1 R > 1	Ruminant Porcine	Bull *et al.*, 2002
Coprostanol+Epicoprostanol / Cholestérol	R^8	R < 0,7 R > 3,7	Bovine Porcine	Jardé *et al.*, 2007
Sitostanol / Coprostanol	R^9	2,3 < R < 3,3 0,2 < R < 0,7	Bovine Porcine	Gourmelon *et al.*, 2010

Les rapports R^{1-3} permettent de mettre en évidence une contamination fécale par des eaux usées. Ces rapports sont basés sur l'abondance du coprostanol par rapport aux autres composés. Le rapport R^4 permet d'identifier une contamination d'origine porcine. Les autres rapports R^{5-9} permettent de différencier deux sources de contaminations fécales: 1) une source humaine d'une source animale (rapport R^6), 2) une source animale d'une autre source animale (R^5et R^{7-9}). Par exemple, le rapport R^5 (Leeming *et al.*, 1996) qui est le rapport des 5β-stanols sur leur précurseurs correspondants va permettre une distinction entre les herbivores et les omnivores. En effet, les herbivores, de par leur régime alimentaire, ingèrent une grande quantité de phytostérols, c'est pourquoi leurs fèces sont composées d'une proportion importante de phytostanols. Dans les déjections des omnivores, comme les porcins, les proportions de 5β-stanols en C_{27} seront nettement supérieures aux proportions de phytostanols. Ainsi, les valeurs du rapport R^5 seront plus élevées ($R^5 > 2$) dans les déjections porcines que dans les déjections bovines ($R^5 \approx 1$).

III/-3 Rappels sur les différentes méthodes statistiques globales utilisées

Une deuxième approche consiste à prendre en compte toutes ou une partie des molécules de l' « empreinte stéroïde » et d'illustrer la variabilité de cette empreinte via un traitement statistique et une représentation en deux dimensions. Les projections, sur cette représentation en deux dimensions, des « empreintes stéroïdes » des déjections des différentes espèces permettent : 1) de définir des zones caractéristiques de chaque type de déjections, 2) de calculer les coordonnées du barycentre de chaque zone et 3) de créer des modèles de mélange. Ce type de traitement statistique a été appliqué à des déjections brutes (Leeming *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2007) et à des effluents d'élevage et de STEP (Saim *et al.*, 2009). Dans le cas des déjections brutes, il a permis de différencier les déjections de quinze espèces animales en quatre pôles (humain, carnivore, herbivore et oiseau) avec une probabilité d'affectation calculée *a posteriori* sur 97 échantillons de 92 % (Shah *et al.*, 2007). Dans le cas des effluents, ce type de traitement a permis de différencier les matières fécales présentes dans les eaux en quatre pôles (humain, cheval, poulet, caille) avec une probabilité d'affectation calculée *a posteriori* sur 48 échantillons de 83 % (Saim *et al.*, 2009). Ainsi sur ce type de graphique, la projection de l' « empreinte stéroïde » d'un échantillon d'eau contaminée permet d'en déterminer la source, dans le cas d'une contamination mono-source. L'obtention des coordonnées des barycentres de chacun des pôles dans l'étude de Shah *et al.*

(2007) a permis de développer un modèle de mélange visant à identifier les sources de déjections et leur proportion dans le cas d'un mélange. Cependant, l'« empreinte stéroïde » obtenue en mélangeant des déjections humaines et canines en proportion 1:1 était similaire à celle des déjections bovines conduisant à des modélisations erronées. Un modèle de régression linéaire multiple a été utilisé par Tyagi *et al.* (2007) pour identifier les sources de pollution fécale en utilisant au départ six stéroïdes fécaux et six acides biliaires. Le modèle proposé a été calibré en utilisant des échantillons bruts de fèces porcines, équines, bovines et avicoles. Ce modèle permet de différencier ces quatre types de déjections avec un taux de classification correcte de 98 % sur 93 échantillons.

Le traitement statistique de l'« empreinte stéroïde » semble donc être efficace pour différencier les déjections animales. Dans le cas de mélange de sources, l'étude de l'« empreinte stéroïde » doit être couplée à l'analyse d'autres types de marqueurs spécifiques de manière à contraindre les modèles de mélange.

III/-4 Questions en suspens

Même si les différentes études de la littérature montrent que les stéroïdes peuvent être des traceurs efficaces de sources de contamination fécale, certaines questions restent en suspens pour valider définitivement cet outil pour le traçage des contaminations fécales.

III/-4-1 La question de l'homogénéité des sources et de la spécificité des marqueurs

La première étape pour développer un marqueur de contamination fécale est de caractériser chaque source possible afin de développer un outil de traçage spécifique et sensible. Dans l'ensemble de la littérature, les auteurs ont analysé des échantillons de déjections brutes animales ou d'effluents/boues de STEP. Dans une grande majorité des études publiées, le nombre d'échantillons par source est relativement petit (< 10). Or dans l'étude de Jardé *et al.* (2007), une forte variabilité sur les distributions en stéroïdes de cinq échantillons de déjections porcines a été observée à l'échelle régionale. De plus, il est possible que ce phénomène puisse être accentué par d'autres facteurs tels que le régime alimentaire, les procédés de traitement et/ou de stockage des déjections avant épandage. Or aucune étude jusqu'à présent n'a traité de cette variabilité. En effet, les échantillons de déjections animales utilisées dans les études publiées sont, le plus souvent, des échantillons de déjections brutes où l'effet des processus de traitement avant épandage n'a pas été étudié. Il apparaît donc

nécessaire de vérifier l'homogénéité des sources, condition *sine qua non* à l'utilisation des stéroïdes comme marqueurs de contaminations fécales.

III/-4-2 La question de la persistance des marqueurs dans l'environnement

Un des critères clé des traceurs de contamination fécale est leur persistance dans l'environnement, qui doit être adaptée au temps de survie des pathogènes. La persistance des marqueurs dans les eaux est une donnée essentielle à connaître. Il n'existe que peu d'informations dans la littérature sur la dégradation et/ou la conservation des stéroïdes dans le temps. La persistance des stérols et des stanols a été étudiée en microcosmes pour des eaux douces (Matsumoto, 1983) et des eaux de mer (Thoumelin *et al.*, 1990) sans ajout de contamination et pour des eaux de mer dopées avec un effluent de STEP (Marty *et al.*, 1996), ainsi que pour des eaux douces et eaux de mers dopées avec un lisier porcin (Solecki *et al.*, 2011).

Ces études ont montré que dans le milieu aqueux, les stérols et les stanols étaient dégradés en deux phases. La première phase consomme environ 90 % des stérols et stanols présents initialement (Matsumoto, 1983). Le temps de demi-vie des stérols et des stanols en eau douce lors de cette première phase est ainsi estimé à 3,2 jours. Cette phase correspondrait à la consommation du carbone organique dissous labile (Thoumelin et al. 1990). La deuxième phase présente des taux de dégradation environ 10 fois inférieurs à ceux de la première (Matsumoto, 1983) et correspondrait à la dégradation de carbone organique dissous plus réfractaire. De plus, que ce soit en contexte naturel ou en contexte de contamination artificielle, les teneurs en sitostérol, stigmastérol et cholestérol augmentent au troisième (Matsumoto, 1983), au cinquième (Marty *et al.*, 1996) ou huitième jour (Thoumelin *et al.*, 1990) en fonction des conditions expérimentales. Ces augmentations sont dues à la libération de stérols présents dans les microcosmes au début de l'expérience et pouvant provenir de résidus de plantes supérieures (Matsumoto, 1983), de phycomycètes (Thoumelin *et al.*, 1990) ou de protozoaires bactériophages (Marty *et al.*, 1996).

Solecki *et al.* (2011) ont réalisé une expérience en microcosme afin d'évaluer le comportement des stéroïdes et des marqueurs microbiologiques au cours du temps dans des eaux de mers et eaux douces dopées avec du lisier de porc (dilution 1:100). Cette étude a permis de montrer que les taux de dégradation des 5 stanols suivis (coprostanol, épicoprostanol, campestanol, stigmastanol et le 24-éthylcoprostanol) n'étaient pas similaires.

Ces expériences ont également mis en avant deux comportements de dégradation au cours du temps. La concentration en coprostanol et 24-éthylcoprostanol reste stable les deux premiers jours, puis au bout du 27ème jour 90 % de ces composés sont dégradés. La dégradation continue légèrement jusqu'à la fin de l'expérimentation (au 55ème jour). Pour les trois autres composés (cholestanol, stigmastanol et campestanol), les concentrations diminuent d'environ 34 % les 6 premiers jours puis il y a stabilisation ou augmentation de la concentration (suivant le type d'eau) jusqu'au 20ème jour et enfin au 27ème jour, les trois composés sont presque complètement dégradés. Cette expérience montre donc deux types de cinétique de dégradation pour une même famille de composés.

Ces différentes études sur la persistance des stéroïdes en phase dissoute dans des microcosmes montrent des comportements de dégradation différents mais elles démontrent que les stéroïdes peuvent, tout de même, être utilisés pour le traçage de contamination fécale. Cependant, une question reste en suspens. Si ces marqueurs sont persistants dans une matrice qu'en est-il de leur transfert lors d'un changement de matrice ? La signature stéroïdienne sera-t-elle conservée lors du transfert, par exemple, des déjections présentes sur le sol vers les eaux naturelles?

III/-4-3 Utilisation des rapports ou des méthodes statistiques multivariées

L'utilisation des rapports d'abondance de stéroïdes est l'approche la plus couramment utilisée pour distinguer les sources de contaminations fécales. De nombreux rapports ont été développés et ont montré, à partir d'échantillons bruts leur pouvoir à identifier et/ou discriminer les sources de contaminations fécales. Cependant, la fiabilité de ces rapports repose sur deux conditions : 1) qu'il n'existe pas d'hétérogénéité des sources et 2) que tous les composés utilisés sont préservés ou dégradés dans les mêmes conditions et en même temps dans l'environnement. Dans le cas où ces deux conditions ne seraient pas respectées, cela peut amener à la mise en péril du traceur. Une analyse par approche globale, c'est-à-dire une approche prenant en compte l'ensemble de l' « empreinte stéroïde », apparaît être un choix plus pertinent. Les travaux de Tyagi *et al.* (2007) et Saim *et al.* (2009) ont montré des résultats concluants pour l'identification de sources. Cependant, ils ont été réalisées sur des échantillons de déjections brutes ou dans le cas de contaminations fécales mono-sources, et elles n'ont pas été testées en condition de contaminations multi-sources. Seuls Shah *et al.* (2007) ont testé la robustesse de leur analyse multivariée dans des conditions de contaminations multi-sources en réalisant des mélanges en laboratoire. Leurs résultats ont

montré que la distinction entre les sources n'était pas aussi aisée que dans le cas de contaminations fécales mono-sources.

Hormis l'étude de Shah *et al.* (2007), aucune étude n'a testé l'utilisation des stéroïdes dans des milieux naturels complexes c'est-à-dire soumis à plusieurs sources de contaminations fécales. Afin de valider l'utilisation de ces composés pour le traçage de contaminations fécales multi-sources, il est indispensable de les tester dans ces conditions.

III/-4-4 La question de la cohérence des marqueurs entre eux

Les contaminations dans les milieux complexes comme par exemple les régions d'agricultures intensives, impliquent une multiplicité de sources de contaminations fécales. Les outils chimiques ou microbiologiques mis à disposition pour tracer les sources de contaminations fécales ont la capacité d'identifier une source et pour certains, la capacité de différencier plusieurs sources. Aucun marqueur qu'il soit microbiologique ou chimique peut à lui seul permettre d'identifier toutes les sources de contaminations fécales dans les hydro-systèmes. Même si les stéroïdes ont la capacité d'en différencier plusieurs, il est nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs en parallèle pour 1) valider cet outil, 2) évaluer réellement l'information qu'il fournit, surtout dans des cas de contaminations mixtes 3) s'affranchir d'éventuelles erreurs d'interprétation et ainsi avoir un diagnostic des plus précis. A terme, ce travail permettra de mettre à disposition des collectivités une boîte à outils avec la sensibilité et la spécificité requises pour tracer tous les types de contaminations fécales dans les eaux de surface.

IV/- OBJECTIFS DE LA THESE : DE LA NECESSITE DE CONDUIRE DES ETUDES APPROFONDIES SUR LES STEROÏDES ET D'EN VALIDER L'UTILISATION EN LES COUPLANT AVEC LES AUTRES MARQUEURS

La synthèse bibliographique de cette première partie de thèse a mis en avant le risque de santé publique que peuvent entraîner les contaminations fécales des eaux. Les réglementations européennes (2006/7/CE et 2006/113/CE) imposent des objectifs en termes d'identification, de hiérarchisation des sources de contaminations fécales et de création de profils de baignade. Ces objectifs ne sont, jusque-là, pas réalisables. En effet, actuellement, les seuls outils à disposition des collectivités sont des indicateurs microbiologiques ne donnant en aucune

façon les informations demandées par les réglementations, et des méthodes probabilistes prenant en compte les activités sur le bassin versant amont des plages. Même si ces méthodes apportent des résultats, il semble tout de même indispensable de valider des outils capables d'identifier les sources de contaminations fécales dans des systèmes multi-sources.

L'objectif principal de cette thèse est de contribuer à valider l'utilisation des stéroïdes comme outil de traçage de l'origine des contaminations fécales des eaux dans les régions d'agriculture intensive, sujets à des contaminations multi-sources. La région Bretagne a été choisie comme région d'étude car elle est particulièrement représentative de ce genre de contexte complexe.

La démarche scientifique s'est effectuée en trois temps :

1. Tester l'homogénéité des pôles, condition *sine qua non* à l'utilisation des stéroïdes en tant que marqueurs, sur des échantillons « sources » (déjections bovines, déjections porcines, effluents et boues de station d'épuration domestiques). L'analyse de ces échantillons bruts a permis 1) de caractériser chaque pôle source de contamination présent au sein d'un bassin versant d'agriculture intensif, et 2) de développer une méthode statistique basée sur une analyse en composante principale (ACP) apte à différencier des déjections d'origine bovine et porcine. Cette partie fait l'objet des Chapitres 3 et 5 de la thèse.

2. Vérifier le transfert de ces traceurs lors d'expérimentations contrôlées au laboratoire ou sur site. Deux expérimentations en conditions contrôlées ont été réalisées dans le but de tester 1) le transfert des stéroïdes dans les matrices environnementales et 2) l'effet de dilution au cours de ce transfert. La première expérimentation a consisté à épandre des déjections animales sur des parcelles agricoles puis à simuler une pluie afin de récupérer les eaux de ruissellements et ainsi d'étudier le transfert des empreintes stéroïdes animales des déjections via les sols vers les eaux. La deuxième expérimentation a consisté à doper des eaux naturelles (eau douce et eau de mer) par un effluent de station d'épuration pour vérifier que le signal persistait même avec un effet de dilution important. Cette partie fait l'objet des Chapitres 4 et 5 de la thèse.

3. Appliquer ces marqueurs au milieu naturel en les associant à d'autres marqueurs chimiques et microbiologiques. Des campagnes de prélèvement ont été effectuées sur deux bassins versants situés en contexte d'agriculture intensive; l'un soumis à une contamination fécale mono-source (animale) et le second sujet à des contaminations fécales d'origine humaine et animale. Le but était d'étudier la viabilité et la robustesse de l'analyse statistique du profil des stanols en milieu naturel par comparaison avec d'autres marqueurs spécifiques. Cette partie fait l'objet du Chapitre 5 de la thèse.

Chapitre 2 - Site d’étude, échantillonnage et méthodes analytiques

I/- CHOIX DE LA REGION D'ETUDE

La région d'étude est la région Bretagne. Cette région a été choisie car elle réunit des activités d'élevage intensif regroupant des élevages porcins, bovins et avicoles, et une façade maritime importante, siège d'activités de baignade et de conchyliculture. Le besoin de traçage des sources de contaminations fécales est donc particulièrement important en région Bretagne, et se pose dans un contexte particulièrement difficile où toutes les sources possibles se trouvent rassemblées. Mettre au point des outils performants de traçage dans un tel contexte est donc idéal puisque les outils mis au point seront *a fortiori* utilisables dans des contextes plus simples où un nombre plus restreint de sources est impliqué. Nous rappelons ci-dessous certaines des principales caractéristiques de la région Bretagne, utiles pour la compréhension de ce travail de thèse.

I/-1 Rappels concernant les problèmes engendrés par les contaminations fécales des eaux de Bretagne

La contamination fécale des eaux superficielles fait peser des menaces sur deux activités essentielles à l'économie de la Bretagne : 1) le tourisme via la contamination éventuelle par des micro-organismes pathogènes des plages et des coquillages ramassés par les estivants pour leur consommation, et 2) l'élevage et la vente de coquillage via la contamination de ceux-ci par ces mêmes organismes.

L'Agence Régionale de la Santé (ARS) de Bretagne surveille la qualité des sites de baignade à l'échelle des quatre départements bretons pendant la période estivale de mai à septembre. Le tableau II.1 présente le classement des zones de baignade en mer en Bretagne pour l'année 2010 selon la directive 76/160/CEE. Sur 541 zones de baignade en eaux côtières, 61,4 % des zones sont de bonne qualité (A), 35,5 % de qualité moyenne (B) et 3,1 % de classe C, c'est-à-dire pouvant être momentanément polluée. Aucune zone n'a été classée en mauvaise qualité (D).

L'examen de l'évolution de la qualité microbiologique des eaux de baignade en mer de 1997 à 2010 (Figure II.1) montre des fluctuations annuelles. Sur ce suivi de treize ans, de 47,4 % à 64,2 % des eaux de mer ont été déclarées de bonne qualité, de 31 % à 44,6 % de qualité moyenne, de 3 % à 8 % momentanément polluées et aucune eau n'a été classée de mauvaise

qualité. Il n'y a pas eu d'amélioration ou de dégradation significative du niveau de qualité microbiologique des eaux de baignade en mer dans la région Bretagne. Ces fluctuations sont le reflet des variations climatiques estivales d'une année sur l'autre. Les quelques mauvais résultats résiduels sont dus à des phénomènes difficiles à maîtriser comme les pollutions diffuses, les dysfonctionnements ponctuels de réseaux d'assainissement lors d'épisodes de forte pluviométrie.

Tableau II.1: Résultats des contrôles sanitaires effectués sur les eaux de baignades en mer de Bretagne pour la saison 2010 delon la directive 76/160/CE (Source: ARS).

	Classement des plages (Directive 76/160/CEE)				
	Total	**A[a]**	**B[b]**	**C[c]**	**D[d]**
Côtes d'Armor	113	62	47	4	0
Finistère	257	144	102	11	0
Ille-et-Vilaine	43	27	15	1	0
Morbihan	128	99	28	1	0
Total	541	332	192	17	0

[a]Classe A : eaux conformes de bonne qualité,
[b]Classe B : eaux conformes de qualité moyenne,
[c]Classe C : eaux pouvant être momentanément polluée
[d]Classe D : eaux de mauvaise qualité – baignade interdite

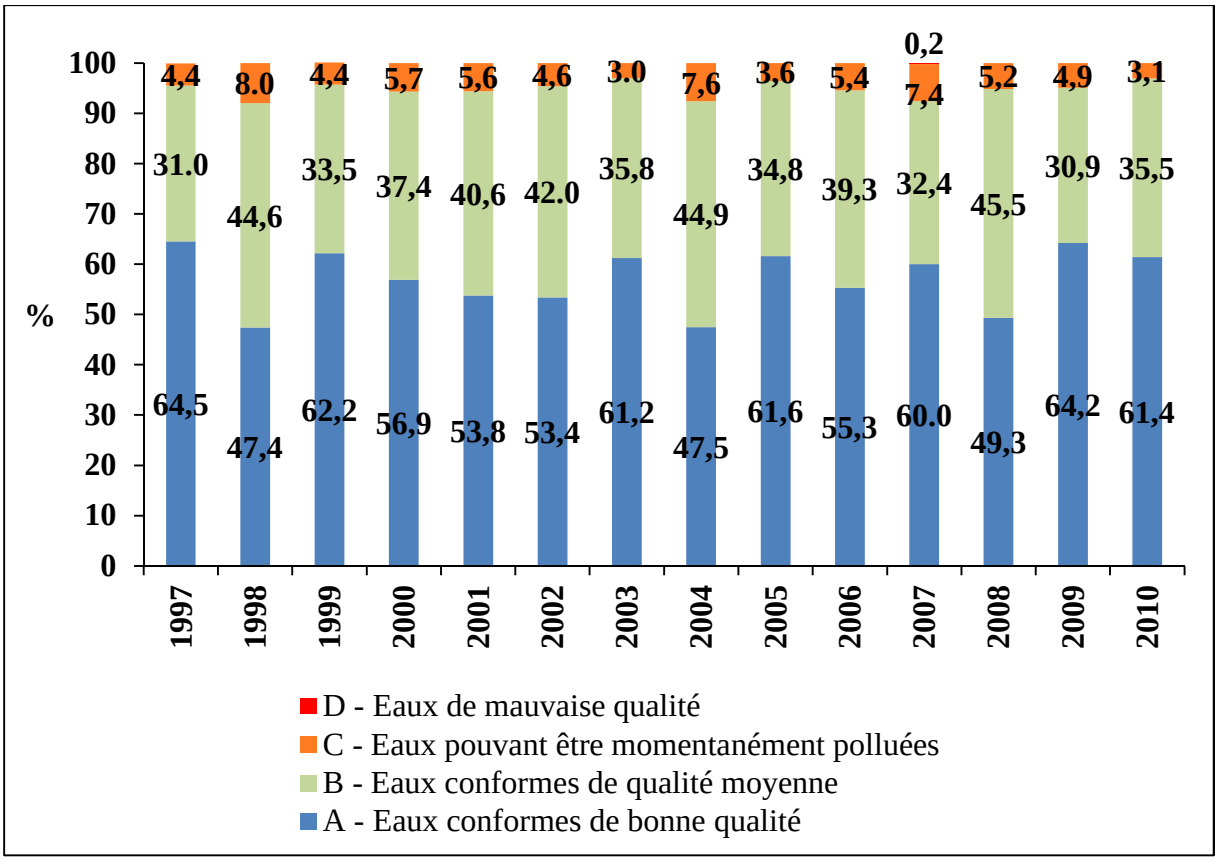


Figure II.1: Evolution de la qualité microbiologique des eaux de baignades en mer de 1997 à 2010 (d'après ARS Bretagne 2010).

Le REMI (Réseau national de contrôle microbiologique des zones de production conchylicoles) qui est géré à l'échelle nationale par l'IFREMER, surveille la qualité microbiologique des coquillages présents sur le littoral breton. La réglementation française relative aux coquillages (décret n°94-340 du 28 avril 1994 et arrêté interministériel du 21 mai 1999) prévoit une surveillance sanitaire des seules zones de production. Toutefois en Bretagne, cette surveillance est étendue aux zones de pêches à pied de loisir ce qui conduit à une image beaucoup plus exhaustive de la qualité sanitaire des coquillages présents sur le littoral de cette région. L'évaluation de la contamination microbiologique dans les coquillages des zones de pêches à pied de loisirs se base sur le dénombrement des bactéries (*E. coli*) dans les coquillages vivants et utilise les mêmes critères de classement que ceux appliqués pour les coquillages des zones conchylicoles. Pour être reconnus propres à la consommation humaine, les coquillages vivants ne doivent pas contenir plus de 230 *E. coli* pour 100 g de chair et de liquide intervalvaire.

Les figures II.2 et II.3 présentent l'évolution de la qualité microbiologique des zones bretonnes de conchylicultures et de pêches à pied de loisirs pour la période 1997 à 2009.

L'examen de l'évolution de la qualité microbiologique de ces deux types de zones fait apparaître une tendance générale à la dégradation des gisements naturels de coquillages en Bretagne (diminution du nombre de sites de bonne qualité), avec entre 50 et 90 % des gisements classés dans les qualités moyennes ou mauvaises suivant les années, et un total de 20 % des gisements strictement interdits à la consommation en 2009 dans les zones de pêches à pied de loisir.

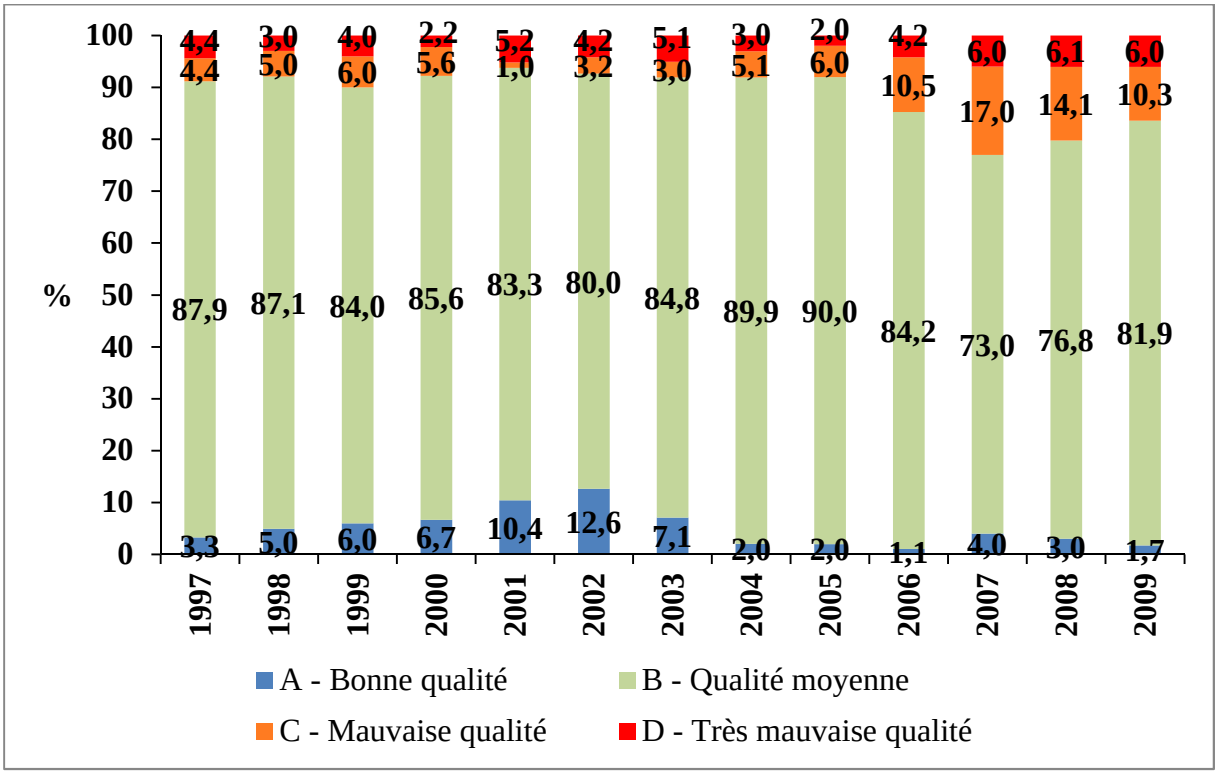


Figure II.2: Evolution de la qualité microbiologique des zones de conchylicultures de 1997 à 2009 (d'après Réseau REMI, Ifremer, 2010).

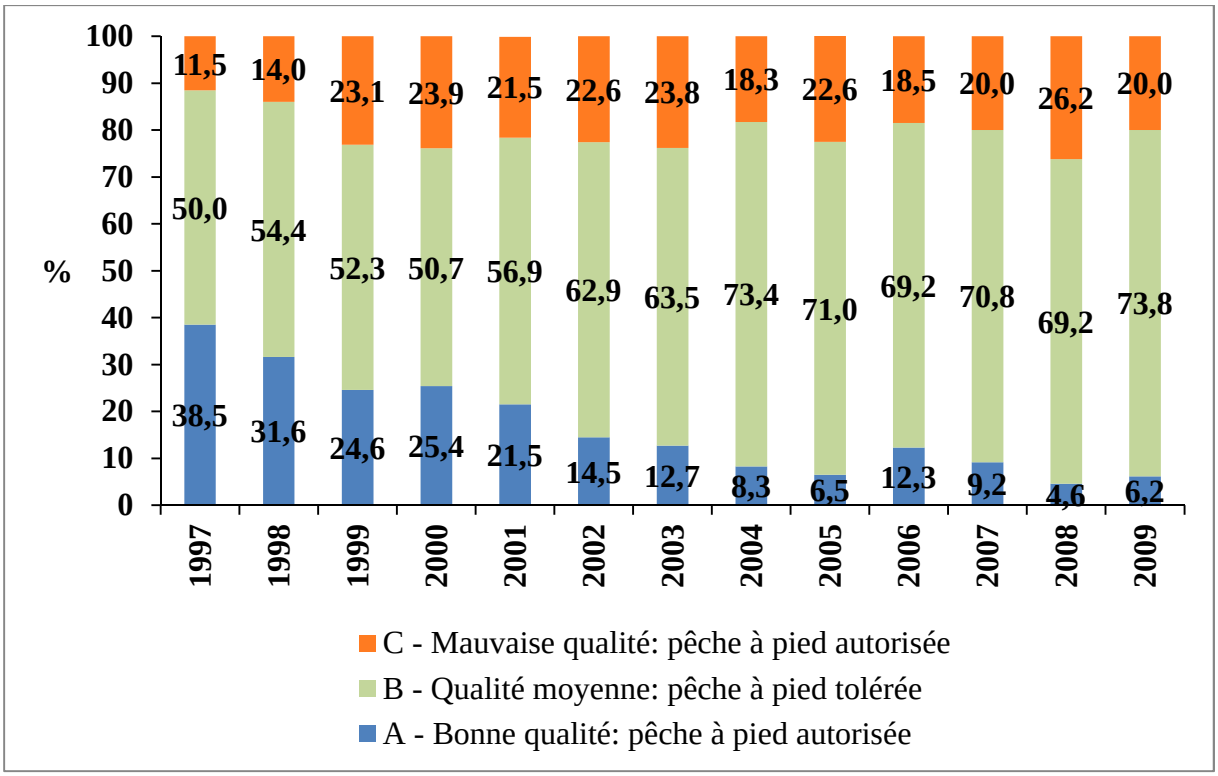


Figure II.3: Evolution de la qualité microbiologique des sites de pêches à pied de loisir de 1997 à 2009 (d'après ARS Bretagne 2010).

I/-2 Rappels sur la pression exercée par les déjections animales d'élevage intensif sur les eaux superficielles de Bretagne

Avec 60 % de son territoire (soit 1 658 101 ha) utilisé pour l'agriculture, la Bretagne est la première région française pour les productions animales. L'élevage intensif, avec trois types d'élevage (bovin, porcin et avicole), est l'activité prépondérante pour 70 % des exploitations de cette région. La production porcine bretonne représente 55 % de la production française, les filières de productions avicoles et bovines représentant respectivement 35 et 11 % de la production nationale. Le tableau II.2 (a, b, c) présente les chiffres clés des cheptels dans les exploitations agricoles bretonnes pour l'année 2010 pour les élevages porcins (a), les élevages bovins (b) et avicoles (c) (Source : Agreste – DRAAF Bretagne – Statistique agricole annuelle).

Tableau II.2: Chiffres clés des cheptels rassemblés dans les exploitations agricoles bretonnes pour l'année 2010 pour les élevages porcins (a), les élevages bovins (b) et avicoles (c)

(a) Elevage porcin en 2010

Catégories d'animaux	Truies	Porcelets	Jeunes porcs 20 à 50 kg	Porcs à l'engraissement 50 kg et +	Verrats	Total porcins
Nombre d'animaux	602 600	3 079 600	1 092 900	3 459 500	6 890	8 241 490
Nombre d'animaux (%)	7,3	37,3	13,3	42,0	0,1	100

(b) Elevage bovin en 2010

Catégories d'animaux	Vaches laitières	Vaches nourrices	Bovins de moins de 1 an	Bovins de 1 à 2 ans	Bovins de plus de 2 ans	Total bovins
Nombre d'animaux	730 695	140 508	590 426	388 280	208 230	2 058 139
Nombre d'animaux (%)	35,5	6,8	28,7	18,9	10,1	100

(c) Elevage avicole en 2010

Catégories d'animaux	Poules et poulets de chair	Dindes et dindons	Poules pondeuses	Total avicole
Nombre d'animaux	281 234	28 591	22 409	332 234
Nombre d'animaux (%)	84,7	8,6	6,7	100

La majorité des élevages bretons sont des élevages hors-sol c'est-à-dire des élevages où les animaux sont élevés dans des bâtiments. Cela concerne tous les élevages de type porcins, et la plupart des élevages avicoles (poules pondeuses et poulets de chair). L'élevage de ces animaux engendre un important gisement de déjections animales estimé à plus de 36 millions de tonnes à l'échelle de la région, ce qui correspond à 91,7 % du gisement de déchets organiques total se répartissant comme suit : 20 millions de tonnes pour les bovins ; 13 millions de tonnes pour les porcins et 3 millions de tonnes pour les ovins (ADEME Bretagne, données estimées, 2007). Ces matières fécales, riches en nutriments, sont recyclées par épandage sur les sols agricoles. L'épandage se fait soit par retour direct au sol des déjections brutes, soit par retour de déjections préalablement transformées. Les transformations combinent une série de processus allant de l'addition de paille - dans le cas des déjections bovines, afin d'obtenir du fumier -, à de la centrifugation - cas des déjections porcines pour

lesquelles les fèces et l'urine sont séparées par centrifugation - en passant par des processus de transformation biologique (type digestion aérobie) impliquant par exemple de la dénitrification pour diminuer la charge azotée des déjections épandues.

La forte pression exercée par les activités d'épandage sur les sols de Bretagne place cette région parmi les premières régions françaises de ce point de vue. L'intensité de cette pression est démontrée par le nombre très important de cantons classés en zone d'excédent structurel (ZES) d'azote (apports au sol >170 Kg d'azote par hectare et par an), ce nombre atteignant plus de 50% des cantons de Bretagne au dernier recensement 2009, avec un nombre élevé de ces cantons se situant en bord de mer (dans le Finistère et les Côtes d'Armor), là où se développent les activités de baignade et la conchyliculture, ainsi que le ramassage et la consommation récréative de coquillages (Figure II.4).

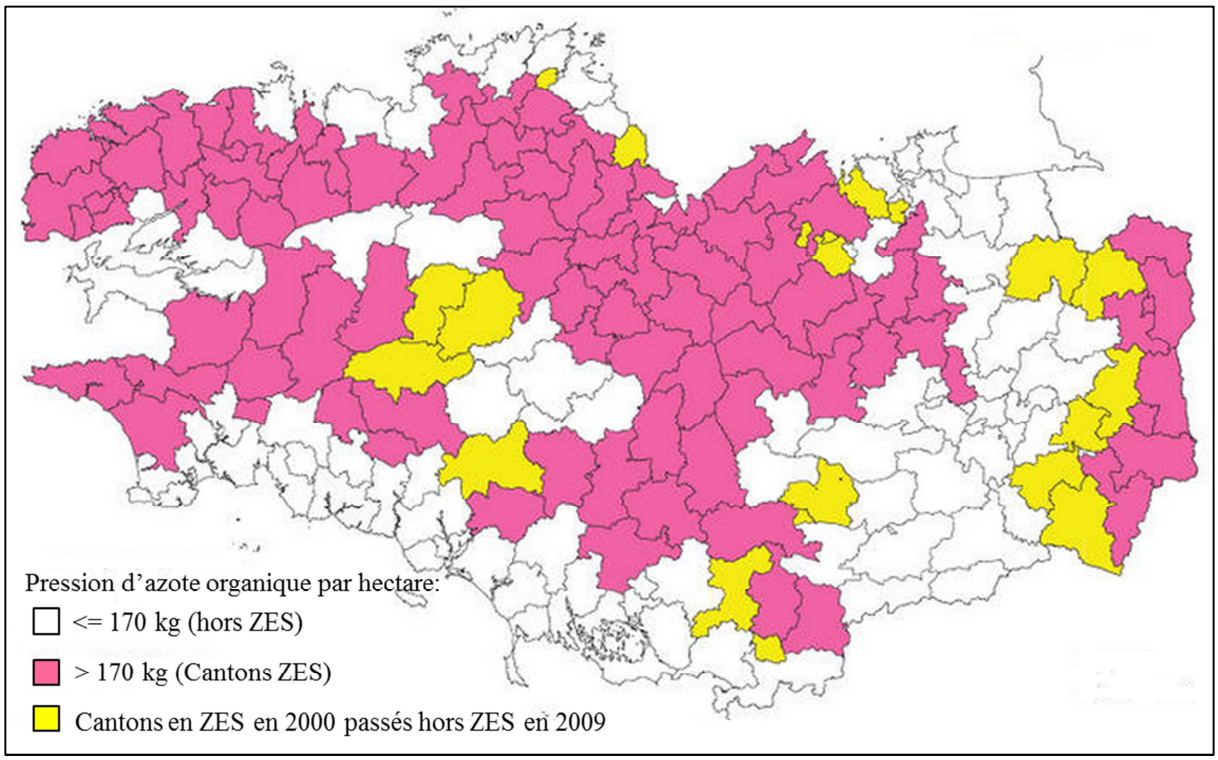


Figure II.4: Carte de répartition des cantons de Bretagne classés en zones d'excédent structurel (ZES) du point de vue des apports d'azote au sol en 2009 (Sources : BD Carto Diren Bretagne, édition le 16/11/2009).

Une étude conduite en 2009 sur un petit bassin versant (25 km^2) du centre Bretagne (bassin versant du Coët Dan), caractérisé par une forte présence d'élevage porcin, a mis en évidence des concentrations en *E. coli* atteignant 2.10^6 UFC/100 mL dans la rivière drainant ce bassin versant avec des flux sur 24h équivalents à ceux émis par une station d'épuration d'une taille égale à 100 000 équivalents habitants (Corre *et al.*, 1999). Cette même étude a

montré que les transferts de bactéries fécales enregistrés dans la rivière à l'exutoire de ce bassin versant se produisaient pendant les épisodes pluvieux, épisodes propices au développement de phénomènes de ruissellement sur les sols agricoles engendrant le lessivage et le transfert vers les rivières des résidus d'épandages. Cette voie indirecte de contamination, qui engendre une contamination diffuse et variable dans le temps et dans l'espace, est conceptuellement la voie de contamination la plus fréquente des eaux continentales et marines de Bretagne (Etat sanitaire des eaux de baignade en mer et en eau douce – Bilan de la saison balnéaire 2008 – Ministère de la santé et des sports DGS/DDASS, 2009). Cependant, des voies directes impliquant le rejet, accidentel ou volontaire, de déjections animales directement dans les eaux peuvent être observées localement comme le démontre l'extrait d'article de journal reproduit ci-dessous (Figure II.5).

Depuis jeudi soir il n'y a plus un poisson qui vive dans le ruisseau de Loc-Eguiner (Finistère).

« Tout est mort jusqu'à l'Elorm : des milliers de poissons sur trois kilomètres…» C'est impuissant que Guy Le Maout, président de l'association des pécheurs de l'Elorn, compte les cadavres livrés aux flots du ruisseau de Loc-Eguiner, à quinze kilomètres à l'est de Landerneau, dans le Finistère.

Depuis jeudi soir, 17h30, cet affluent de l'Elorn déverse en effet truites fario, saumons, loches et même anguilles, par centaine et sans vie. Les effets d'une pollution survenue dans un élevage de porcs – celui d'Henri Billon, également maire de la commune -, situé quelques centaines de mètres au-dessus du ruisseau.

Il s'agit d'un « rejet accidentel de produits nocifs avec mortalité, précise le capitaine Bodiou, à la gendarmerie de Landerneau. Mais la pollution a cessé dès lors que l'employé, qui nettoyait l'exploitation, s'est aperçu qu'il rejetait les eaux dans le ruisseau et non dans la lagune. »

Cantonné aux trois kilomètres de ce ruisseau sans nom de Loc-Eguiner, le rejet toxique, probablement à base de lisier, n'a guère atteint l'Elorn voisin. Mais **« sur le plan piscicole, il faudra au moins cinq ans pour reconstituer le ruisseau »,** calcule déjà le président de l'AAPPMA, écœuré.

Chargé des investigations, l'office national de l'eau et des milieux aquatiques (ONEMA) s'est rendu sur l'exploitation agricole pour dresser le procès-verbal. Le dossier sera ensuite transmis au procureur de la république. **« Comme c'est le cas depuis trois ou quatre ans, l'affaire sera classée sans suite car considérée comme accidentelle,** anticipe, Guy Le Maout. **Mais pour moi, il s'agit d'une négligence. Nous attaquons au civil. »**

Laurence Texier

Figure II. 5: Article paru le 12 Juin 2011 dans le Ouest France, journal quotidien régional, à propos d'une pollution d'un affluent de l'Elorn suite à un rejet accidentel de lisier directement dans un cours d'eau.

I/-3 Rappels concernant la pression exercée par les autres sources de contamination

A l'instar des autres régions européennes, les eaux continentales et littorales de Bretagne sont soumises à des risques de contamination fécale d'origine humaine, avec deux sources différentes : 1) des sources ponctuelles liées aux rejets de STEP ; 2) des sources diffuses liées aux rejets issus des assainissements autonomes. Aux sources diffuses s'ajoute celles liées à l'épandage des boues de station d'épuration sur les sols agricoles pouvant impacter directement les cours d'eaux ou les eaux littorales. Les quantités de boues de stations d'épuration urbaines épandues sur les sols de Bretagne ne sont en rien comparables avec les quantités de déjections animales épandues. En effet, 20 000 tonnes de boues de STEP sont recyclées en agriculture contre 6 millions de tonnes pour les déjections animales (ADEME Bretagne, données estimées, 2007).

Les causes de la contamination par les rejets de STEP peuvent être multiples. La contamination peut provenir de la vétusté des installations ou de leur mauvais dimensionnement. La question d'un dimensionnement inadapté est critique dans une région touristique comme la Bretagne dans laquelle un grand nombre de communes côtières voient leur population multipliée par un facteur pouvant aller jusqu'à 10 en période estivale. Une autre cause peut être l'absence de séparation entre la collecte des eaux pluviales et celle des eaux usées. Cette absence peut conduire à des débordements en cas d'orage, débordements dont les conséquences seront amplifiées si les orages surviennent en été, c'est-à-dire précisément au moment où les stations ont à traiter un excédent d'eaux usées dû à l'arrivée d'une population touristique, et précisément dans des lieux où les zones de baignade sont le plus fréquentées.

L'autre mécanisme principal pouvant entraîner des contaminations fécales d'origine humaine dans le milieu naturel est l'infiltration des eaux usées d'un système d'assainissement autonome dans le sol et le transfert de ces eaux jusqu'aux cours d'eaux, notamment en cas de vétusté et/ou de mauvais entretien des installations. D'après les données des conseils généraux des quatre départements bretons, en 2009, 33 % des habitations bretonnes ne sont pas raccordées à une STEP, ce qui correspond à un nombre de 453 000 installations autonomes en Bretagne (Conseils généraux 22, 29, 35 et 56). La loi sur l'eau et les milieux aquatiques (LEMA) du 31 décembre 2006 a introduit de nouvelles dispositions sur l'assainissement non collectif. En effet, la réglementation prévoit une prise en charge des

communes pour le conseil auprès des particuliers et le contrôle des installations des systèmes d'assainissement non collectif. A la date d'aujourd'hui, 70 à 85 % des installations ont déjà été contrôlées et 15 à 25 % de ces installations ont été déclarées non conformes en raison d'un mauvais état des installations avec des pollutions avérées (par infiltration des eaux usées dans le sol) et pour lesquelles une mise aux normes est exigée dans les quatre prochaines années.

Les contaminations fécales des eaux continentales et littorales bretonnes peuvent également être engendrées par les animaux domestiques et sauvages. Cependant les apports 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 et porcine.

I/-4 Rappel concernant les besoins en traçage et les difficultés inhérentes aux traçages des sources de contamination dans la région d'étude

La Bretagne a été choisie comme région d'étude du fait : 1) de son importante facade maritime siège de nombreuses activités de baignade et de conchyliculture, 2) du nombre très important de sources possibles, animales et humaine, ainsi que 3) de la superposition de rejets diffus et ponctuels dans les deux cas. Le choix de cette région d'étude s'appuie aussi sur le fait qu'il s'agit d'une région qui bénéficie d'une sectorisation en bassins versants sièges de pratiques agricoles contrastées (notamment du point de vue du type des déjections animales épandues). Cette sectorisation fournit donc un laboratoire naturel pour la validation de tel ou tel marqueur spécifique.

II/- STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE

Cette partie décrit l'ensemble des échantillons qui ont été analysés au cours de cette thèse. Conformément aux verrous identifiés lors de la synthèse bibliographique (Chapitre 1), trois types d'échantillons ont été prélevés et analysés:

1. Des échantillons sources (déjections animales, effluents et boues de station d'épuration). L'objectif est de vérifier la spécificité des stéroïdes: homogénéité des sources, absence d'effet des processus de traitement et de stockage sur les profils des stéroïdes).

2. Des échantillons provenant d'expériences de ruissellement sur parcelles agricoles ou d'expériences d'eaux dopées par des effluents de STEP afin de vérifier la conservation des signatures « source » pendant le transfert lors des changements de matrice, ainsi que l'effet de dilution depuis les échantillons sources jusqu'au milieu naturel.
3. Des échantillons provenant de milieux récepteurs complexes soumis à des contaminations d'origine variée dans lesquels les stéroïdes ont été utilisés en association à d'autres marqueurs chimiques et microbiologiques dans le but d'en valider l'utilisation en tant que marqueurs de l'origine de la contamination fécale.

II/-1 Echantillons utilisés pour la caractérisation des sources et l'analyse des effets des processus de traitement sur les stéroïdes

II/-1-1 Déjections bovines

Deux types de déjections bovines ont été prélevés : des bouses et des fumiers (mélange de bouse et de paille). Les bouses sont émises directement au champ. Elles peuvent contaminer les eaux par ruissellement pendant un épisode pluvieux, mais la contamination peut également se produire de façon plus directe lors de l'abreuvement des animaux dans les cours d'eaux. Les fumiers, quant à eux, sont épandus sur les sols agricoles après un temps de stockage (minimum deux mois), et peuvent contaminer les eaux en cas de ruissellement pendant un épisode pluvieux.

Plusieurs campagnes d'échantillonnage ont été réalisées dans 10 exploitations de vaches laitières en 2007 et 2008. Ces campagnes ont permis de collecter 19 échantillons : 1) 6 bouses fraîches, 2) 9 fumiers frais, et 3) 4 fumiers stockés (stockage aérobie entre 4 à 6 mois avant épandage). Chaque échantillon représente un mélange de déjections d'environ une cinquantaine d'animaux. Les principales caractéristiques (régime alimentaire, temps de stockage des échantillons et localisation des exploitations) des échantillons collectés sont présentées dans le tableau II.3

L'analyse d'échantillons de fumier frais et de fumier stocké doit permettre de déterminer l'effet du stockage sur les stéroïdes, l'effet de l'addition de paille étant déterminé, lui, par la comparaison des signatures des bouses fraiches avec celles des fumiers frais.

Tableau II.3: Description des échantillons de déjections bovines.

Type d'élevage	Localisation	Types de déjections et nombre d'échantillons	Temps de stockage	Régime alimentaire	Date d'échantillonnage
Vache laitière	Ille-et-Vilaine (35)	Bouse (1) Fumier (1) Fumier (1)	Frais 4 mois 6 mois	Pâturage et maïs d'ensilage	Avril 2007
		Bouse (1) Fumier (1)	Frais 5 mois	Pâturage	
		Bouse (1)	Frais	Pâturage et maïs	
	Inconnue	Fumier (1)	Frais	Herbe et/ou maïs d'ensilage + compléments alimentaires (protéines) et pâturage	
		Fumier (1)	Frais		
		Fumier (3)	Frais	Inconnu	Avril 2008
		Fumier (1)	Frais		Février 2007
		Bouse (1) Fumier (1) Fumier (1)	Frais Frais 4 mois	Pâturage	Avril 2007
		Bouse (1) Fumier (1)	Frais Frais	Herbe et/ou maïs d'ensilage + compléments alimentaires (protéines)	Février 2007
		Bouse (1) Fumier (1)	Frais Frais	Herbe et/ou maïs d'ensilage + compléments alimentaires (protéines) et pâturage	Avril 2007

II/-1-2 Déjections porcines

Comme indiqué dans le chapitre 1, la plupart des études consacrées à l'établissement des signatures en stéroïdes des déjections porcines se basent sur des déjections fraîches, négligeant par-là les effets éventuels des procédures de traitement et de stockage subis par ces déjections. Il s'agit là d'un défaut majeur des études sachant que les déjections porcines sont rarement épandues fraîches dans les régions d'élevage intensif. En effet, pour répondre aux exigences réglementaires, les élevages de porcs de ces régions doivent 1) respecter les périodes d'épandage (d'où un stockage fréquent du lisier), 2) limiter les apports d'azote au sol que leur épandage occasionne (170 unités d'azote par hectare, Directive européenne du 12 Décembre 1991 – 91/676/CEE dite Directive Nitrate, d'où un traitement fréquent du lisier incluant des étapes de dénitrification anaérobie et/ou de séparation des fèces et des urines par centrifugation). Les exploitations bretonnes réalisent le traitement du lisier principalement de façon individuelle et pour un faible pourcentage (inférieur à 5%), elles font appel à des filières de traitement.

Les procédures de traitement du lisier de porc consistent soit en un simple stockage en fosse pendant une période de 6 à 12 mois avant épandage, soit en des traitements plus complexes destinés à éliminer l'azote et le phosphore. La figure II.6 présente une illustration schématique des principaux procédés de traitement des lisiers de porcs. Les traitements utilisés sont des combinaisons de traitements biologiques (digestion aérobie et anaérobie), mécaniques (tamisage, pressage, centrifugation, filtration membranaire) et physico-chimiques (flottaison, décantation). Les lisiers traités sont stockés en fosse avant épandage. Celui-ci est réglementé selon un calendrier régional.

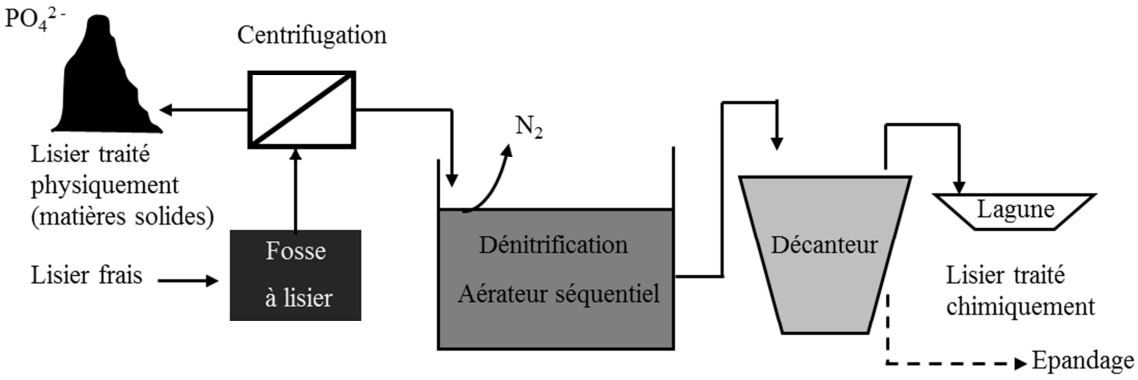


Figure II.6: Représentation schématique des étapes de traitement du lisier de porc.

Un total de 16 échantillons provenant de 6 élevages porcins bretons et d'une ferme expérimentale rattachée à l'UMR INRA SENAH (Systèmes d'Elevages, Nutrition Animale et Humaine, St Gilles(35)) a été collecté en 2007 et 2009. Quatre types d'échantillons sont représentés, incluant i) des lisiers bruts frais, ii) des lisiers bruts stockés (1 mois), iii) des lisiers traités physiquement (frais et stockés 1 à 6 mois), et iv) des lisiers traités chimiquement (frais et stockés 6 à 9 mois). Chaque échantillon représente un mélange de déjections d'environ une centaine d'animaux. Les principales caractéristiques (type d'animaux, régime alimentaire, temps de stockage des échantillons et localisation des exploitations) de ces échantillons sont présentées dans le tableau II.4.

Cet échantillonnage inclut de manière explicite des déjections porcines ayant subi soit un stockage prolongé, soit un traitement physico-chimique, soit une combinaison des deux. Il est en cela représentatif du compartiment « déjections porcines épandues ». L'analyse des déjections fraiches et des déjections stockées et/ou traitées devrait permettre de déterminer l'effet des processus de stockage et de traitements physico-chimiques sur les signatures en stéroïdes des échantillons de lisiers.

Tableau II.4: Description des échantillons de déjections porcines.

Type d'élevage	**Localisation**	**Types de déjections et nombre d'échantillons**	**Temps de stockage**	**Régime alimentaire**	Date d'échantillonnage
Porcs à l'engraissement	Ille-et-Vilaine (35)	Lisiers bruts (4)	Frais	Blé et soja (80% et 20%) Blé et soja (80% et 10%) Blé et soja (90% et 10%) Blé, soja et colza (70%, 10% et 20%)	Juin 2009
Truies et porcelets	Côtes d'Armor (22)	Lisiers bruts (4)	1 mois	Mélange de céréales et compléments alimentaires*	Avril 2007
Truies	Côtes d'Armor (22)	Lisier traité physiquement (2)	Frais 4 mois		Mars 2009
		Lisier traité physiquement (1)	6 mois		
		Lisier traité chimiquement (1)	9 mois		
		Lisier traité chimiquement (1)	8 mois		Avril 2009
	Finistère (29)	Lisier traité physiquement (1) Lisier traité chimiquement (1)	Frais 6 mois		Mars 2009
		Lisier traité chimiquement (1)	8 mois		Avril 2009

* Sels minéraux, vitamines, micronutriments et antibiotiques.

II/-1-3 Effluents et boues de station d'épuration

Le pôle « déjections humaines » a été caractérisé du point de vue de ses signatures en stéroïdes en analysant 17 effluents d'entrée et 16 effluents de sortie de STEP ainsi que 2 boues de STEP. Ces échantillons ont été prélevés dans vingt STEP, seize situées dans la zone d'étude (dont treize en Ille-et-Vilaine (35), une dans le Finistère (29) et deux dans les Côtes d'Armor (22)) et quatre dans la région limitrophe des Pays de la Loire (dont trois en Maine-et-Loire (49) et un en Loire Atlantique (44)), ces dernières étant rajoutées pour des raisons de facilité d'accès et de comparaison inter-régionale. Elles ont été choisies de manière à constituer un panel comprenant des stations d'épuration urbaines et rurales de capacité différente et de procédés de traitement différents. Les principales caractéristiques (localisation, capacité, rendement, traitements, type d'échantillon et date de prélèvement) des échantillons sont présentées dans le tableau II.5.

Le schéma classique d'épuration est représenté sur la figure II.7 et comprend trois étapes successives (prétraitement, traitement biologique, clarification). L'étape de prétraitement consiste à éliminer les matières en suspension dans l'eau (dégrillage, tamisage et dégraissage), l'étape de traitement biologique (traitement des composés organiques par boues activées en bassin d'aération, nitrification et dénitrification) sert à transformer les matières organiques dissoutes et colloïdales en matières biologiques qui sédimentent et il peut être suivi d'une déphosphatation. L'étape finale est réalisée dans un clarificateur, lieu où les matières biologiques sédimentent.

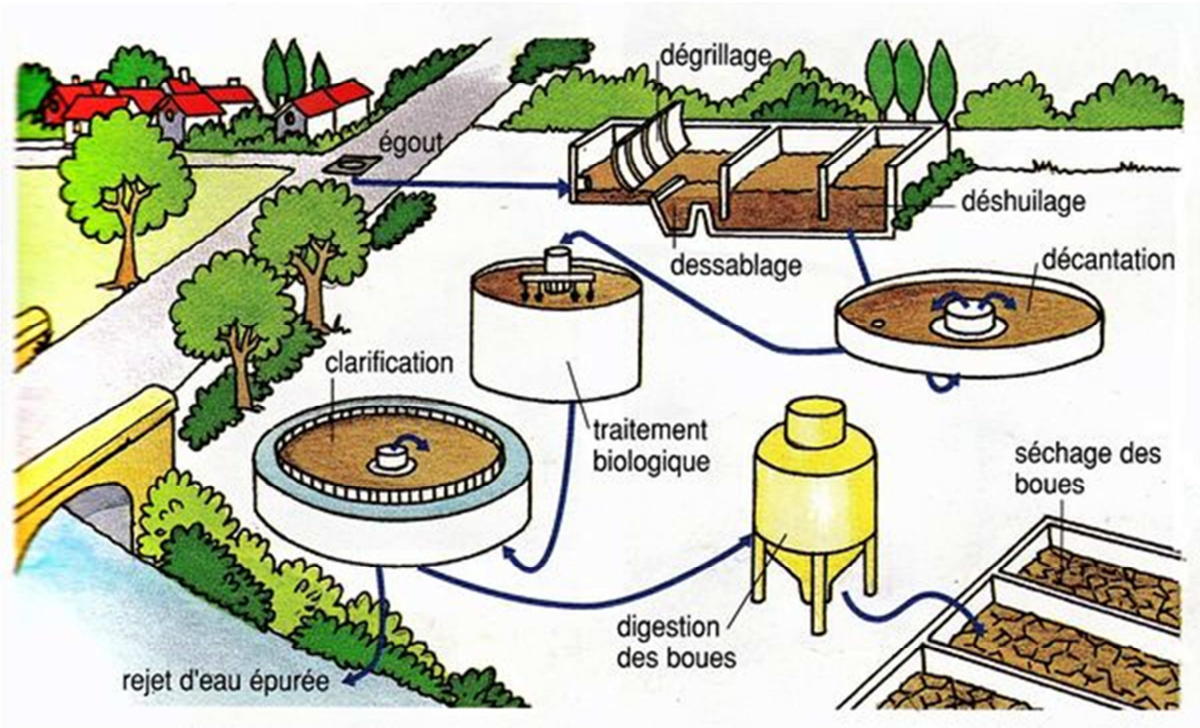


Figure II.7: Schéma du fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées.

Tableau II.5: Description des échantillons de station d'épuration.

Localisation	Capacité en EH$^{\alpha}$	Rendement m^3/jour$^{\beta}$	Traitements	Type d'échantillon et nombre par type	Date d'échantillonnage
Cantenay-Epinard (49)	1 300	240	a, b	Effluent d'entrée (1)	Avril 2009
Feneu (49)	1 100	165	a, b	Effluent d'entrée (1)	Avril 2009
La Meignanne (49)	1 850	280	a, b	Effluent d'entrée (3) Effluent de sortie (1)	Juin 2008 Mars 2009 Mars 2010
Lamballe (22)	8000	3 500	a, e	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Saint-Brieuc (22)	140 000	30 240	a, b, e	Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Plouneventer (29)	1 200	220	a, c	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Rennes (35)	360 000	80 000	a, c, f, h	Boue (1)	Février 2010
Noyal-sur-Vilaine (35)	6 000	1 620	a, c, f, h	Boue (1)	Février 2010
Saint-Médard sur Ille (35)	650	98	d	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Montreuil sur Ille (35)	1 800	400	a, e, h	Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Saint-Malo (35)	122 000	32 000	a, c, g, h	Effluent de sortie (1)	Mai 2011

Localisation	Capacité en EH[α]	Rendement m^3/jour[β]	Traitements	Type d'échantillon et nombre par type	Date d'échantillonnage
Cancale (35)	12 000	1 800	a, c	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Servon sur Vilaine (35)	5000	1100	a, c, d, e	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Brécé (35)	5000	1 100	a, c, d, e.	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Chateaubourg (35)	8000	1 500	a, c, e	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Liffré (35)	14000	2600	a, c, d, , g, h	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Acigné (35)	9700	1170	a,c, e, h	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
La Bouexière (35)	3100	730	a, d, e h	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Cesson-Sévigné (35)	18300	4200	a, c, e	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011
Nantes (44)	600000	100 000	a, c, e	Effluent d'entrée (1) Effluent de sortie (1)	Mai 2011

[α] EH = équivalent habitant, qui correspond à la quantité journalière de matières polluantes produites par habitant.
[β] rendement moyen.
a: aération, b: décantation, c: prétraitement, d: lagunage naturelle, e: déphosphoration physico-chimique, f: déphosphatation biologique, g: nitrification et h: dénitrification biologique.

II/-2 Echantillons utilisés pour l'évaluation de la persistance des stéroïdes pendant le transport et leur introduction dans le milieu aquatique et pour leur validation

Cette deuxième série d'échantillons a pour but de vérifier si les stéroïdes sont conservatifs lors du transfert des matières fécales dans l'environnement. Deux situations ont été examinées :

1. Le transfert des matières fécales d'origine animale par ruissellement sur le sol. Il s'agit là de la voie prépondérante par laquelle les matières fécales d'origine animale peuvent contaminer les eaux de surface. L'enjeu ici est de savoir si les signatures spécifiques en stéroïdes établies pour les différents types de déjections animales seront conservées une fois que les déjections animales seront épandues au sol.
2. Le transfert du signal au cours de la dilution des signatures « humaines » issues des STEP une fois celles-ci injectées dans les eaux. Ce transfert a été évalué au laboratoire en diluant des rejets de STEP avec de l'eau douce et de l'eau de mer. Il s'agit ici de déterminer si : 1) les dilutions par mélange des déjections avec des eaux de mer ou des eaux douces ou 2) la présence d'un bruit de fond en stéroïdes du milieu naturel n'engendrera pas de perte du caractère spécifique de ces signatures voire une perte complète du signal dans le milieu naturel.

II/-2-1 Echantillons issus du dispositif expérimental d'analyse du transfert des marqueurs animaux pendant le ruissellement

Une simulation de pluie d'orage, dans des conditions similaires à celles relevées en période printanière lors des épandages d'avril en Bretagne, a été réalisée sur des parcelles témoins et des parcelles ayant reçu des épandages de lisier de porc et de fumier bovin. Les expérimentations ont été réalisées en avril 2008 à la station de recherche de la Chambre Régionale d'Agriculture de Bretagne à Kerguéhennec (56). Le dispositif expérimental utilisé est décrit schématiquement dans la figure II.7. Les expérimentations ont été réalisées sur une parcelle expérimentale avec une pente de 3 % labourée sur 15 cm de profondeur. Pour chacune des modalités (sol témoin, sol amendé avec lisier de porc et sol amendé avec fumier bovin), trois réplicats ont été réalisés. Neuf placettes (0,75 m × 1,5 m) ont été délimitées dans

la parcelle. Le sol est un cambisol (16 % argile, 42 % limon, 41 % sable) à 2,5 % de matière organique.

Avant chaque simulation de pluie, les placettes ont été isolées hydrologiquement avec de l'acier galvanisé (15 cm en dessous et au-dessus de la surface du sol). Le collecteur de ruissellement est composé d'une gouttière en polychlorure de vinyle de 10 cm de diamètre avec une fente de 1 cm placée face à la micro parcelle. Elle est connectée à un bécher de 5 L en plastique permettant de collecter les eaux de ruissellement (Figure II.8).

Le simulateur de pluie est placé sous une tente pour prévenir toute perturbation liée à la pluie naturelle ou au vent. Pour représenter un épisode pluvieux intense observé en Bretagne au printemps à la période des épandages, la simulation de pluie a été conduite à une intensité moyenne de 67 $mm.h^{-1}$.

Le lisier de porc a été prélevé dans un élevage à Meslin (près de Lamballe, 35) et le fumier de bovin dans un élevage à proximité du centre d'expérimentation. Le fumier de bovin a été transféré dans des sacs en plastique et le lisier dans des jerricans en plastique de 15 L. Le lisier de porc a été appliqué manuellement sur les placettes à l'arrosoir à la dose de 2,4 $kg.m^{-2}$, ce qui correspond à la dose agronomique pour une culture de maïs. Le fumier de bovin a été épandu également manuellement à la dose de 3,2 $kg.m^{-2}$ (dose agronomique réglementée). Les apports ont été réalisés deux heures avant le début de la simulation de pluie.

L'eau utilisée pour la simulation de pluie a été prélevée dans un forage à 6 m de profondeur et stockée dans une citerne. Cette eau a été au préalable analysée ce qui a permis de montrer qu'elle n'était contaminée ni en bactéries, ni en stéroïdes fécaux.

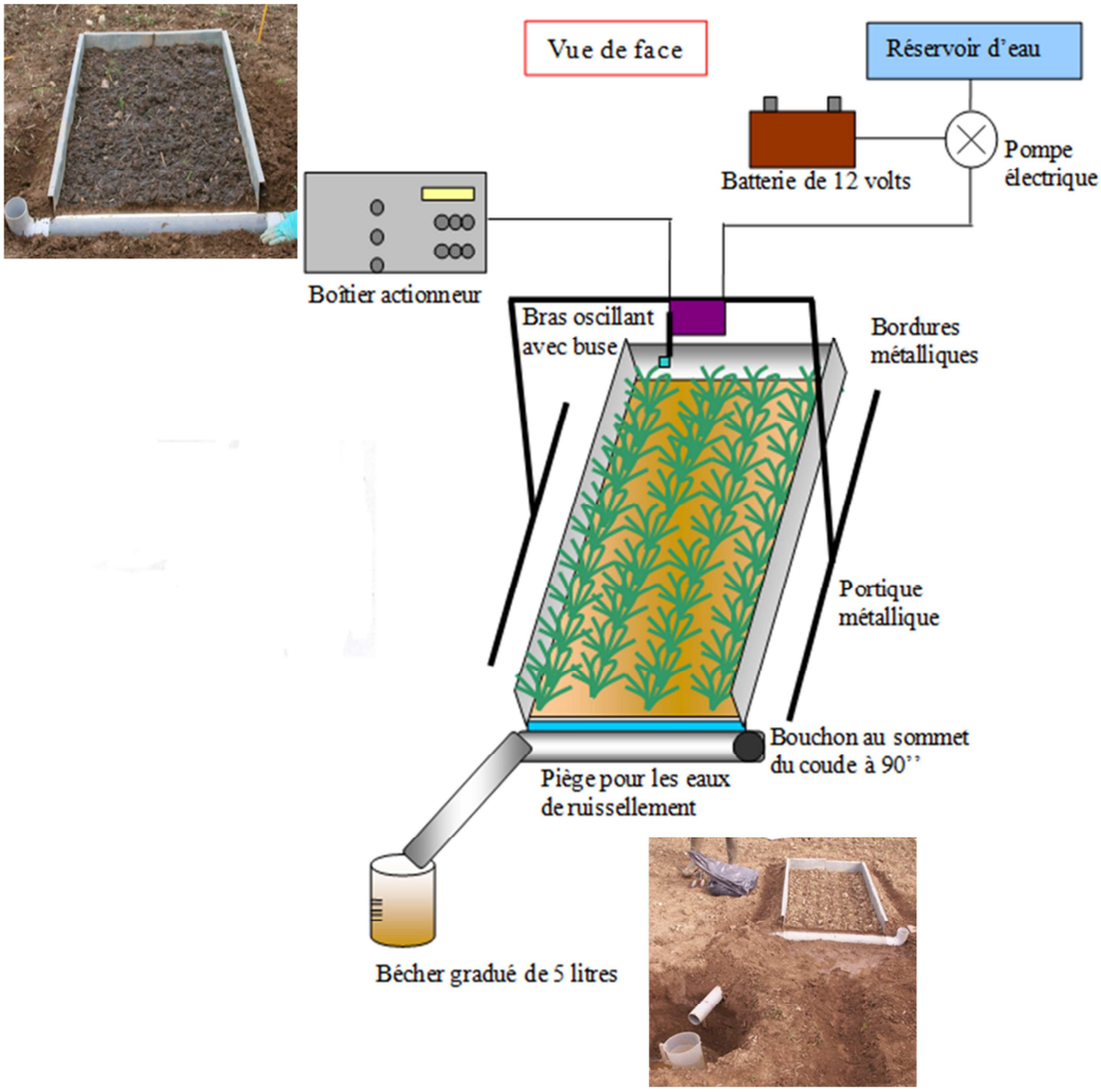


Figure II.8: Schéma du dispositif de simulation de pluie et de collecte des eaux de ruissellement.

II/-2-2 Echantillons issus du dispositif expérimental d'analyse de transfert du signal en condition de dilution des marqueurs humains dans des eaux naturelles

Un effluent d'entrée de station d'épuration a été dilué au 1/18ème (ce qui est représentatif d'un rejet d'effluent de sortie dans le milieu naturel) dans deux types d'eaux (eau de mer et eau douce). L'effluent a été prélevé à la station d'épuration de la Meignanne en mars 2010. L'eau de mer a été prélevée en mars 2010 dans l'océan Atlantique à Argenton (29) et l'eau douce a été échantillonnée dans le lac du Drennec à Commana (29). Pour l'eau de mer aucun indicateur de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques) n'a été détecté et les stéroïdes ont été détectés à de faibles concentrations comprises entre 0 et 0,06 $\mu g.L^{-1}$ sauf le cholestérol qui a été détecté à une concentration de 0,16 $\mu g.L^{-1}$. Pour l'eau douce, *E. coli* a été détecté à une concentration de 60 UFC/100mL et les stéroïdes ont été détectés à des concentrations

comprises entre 0 et 0,07 $\mu g.L^{-1}$, là encore des concentrations très faibles avec tout de même des concentrations un petit peu plus élevées pour le cholestérol, le stigmastérol et le sitostérol de 0,18, 0,10 et 0,16 $\mu g.L^{-1}$ respectivement.

II/-3 Echantillons utilisés pour l'évaluation des stéroïdes en tant que traceurs de l'origine de la contamination fécale en région d'élevage intensif

II/-3-1 Echantillons de la rivière du bassin versant du Daoulas

Le bassin versant de Daoulas (29) est situé à 20 km au sud-est de Brest et a une superficie de 113 km², avec 90 km de rivière. Ce bassin versant est principalement caractérisé par un élevage intensif (5 300 vaches laitières, 151 000 porcs et 782 000 volailles) et un nombre total d'habitant estimé à 15 000 (Pommepuy *et al.*, 2008, Mieszkin, 2010). Une campagne de prélèvement a été réalisée le 27 avril 2009 sur le sous-bassin versant d'Irvillac dans une zone d'élevage intensif bovin. Au niveau de ce site, 3 prélèvements ont été réalisés avec 500 m de distance entre chaque point : un prélèvement (point 0) dans le ruisseau d'Irvillac au niveau d'un champ dans lequel des bovins pâturent, un prélèvement en amont (point -1) et un prélèvement en aval (point +1) de ce point (figure II.9).

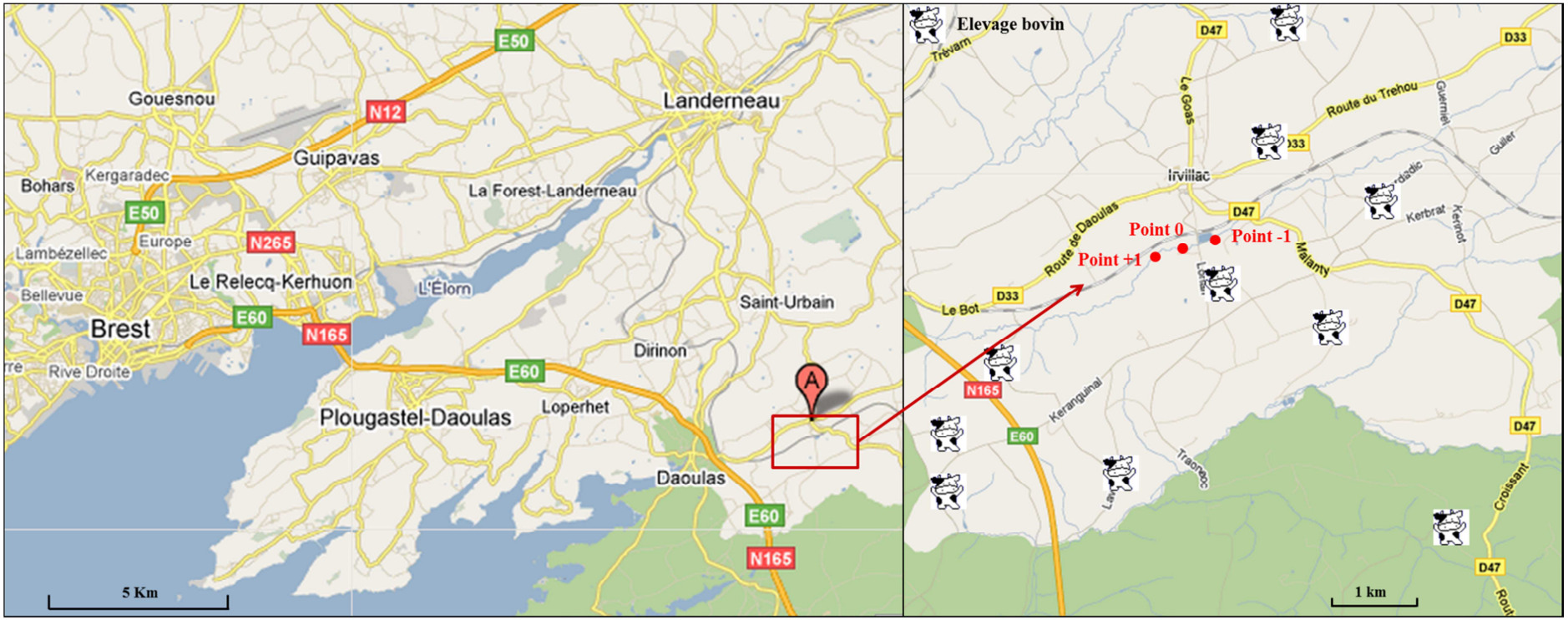


Figure II.9: Carte de localisation des prélèvements d'eaux effectués sur le bassin versant de Daoulas (29).

II/-3-2. Echantillons de la rivière du bassin versant de Pénerf et de sa zone conchylicole

Dans cette partie, sont présentés les échantillons d'eaux naturelles prélevés sur le bassin versant de Pénerf (56) où les risques de contamination fécale sont avérés avec des contaminations sporadiques des élevages conchylicoles. Ce bassin versant a subi des contaminations bactériologiques à répétition en 2005 et 2006 entraînant des interdictions de commercialisation ponctuelles des coquillages. Or, ce bassin compte cinquante-trois entreprises d'ostréiculture réparties sur 235 ha. Limiter ces contaminations est donc un enjeu économique important. C'est pourquoi, les collectivités ont décidé la mise en place d'un suivi du bassin avec pour objectif d'identifier les sources en plus de les quantifier. Suite à ce suivi, des sources avérées de contamination fécale ont été identifiées, elles sont issues de l'assainissement collectif, non collectif et pluvial ainsi que des élevages présents sur l'ensemble du bassin. Malgré la mise en place d'actions correctives en particulier avec la mise en place d'un Programme de Maîtrise des Pollutions d'Origine Agricole (PMPOA), depuis 2007, toutes les zones conchylicoles de Pénerf ont été déclassées de la qualité A à B, et encore aujourd'hui une forte mortalité des huîtres est observée (Rapport National REMI 2008 – édition 2009).

Le bassin versant de Pénerf s'étend sur 136 km² près de Sarzeau (56) et débouche sur une zone de conchyliculture. Il comprend 8 sous-unités hydrographiques, 5 étiers, 3 rivières et 12 communes. La zone étudiée s'étend sur 12 km de Berric au Tour du Parc (Figure II.10). Les cours d'eaux analysés traversent des zones impactées par des effluents de stations d'épuration urbaines et/ou d'industries agro-alimentaires, des zones de pâturages bovins. Les points d'échantillonnage incluent quatre prélèvements sur le cours d'eau du Drayac notés W1, W2, W3 et W4 ainsi que deux sur la rivière Surzur W5 et W6. Trois prélèvements ont été réalisés dans des zones en aval des rejets des stations d'épuration de deux industries agro-alimentaires; (1) une usine de transformation de viandes déshydratées et de bouillons sur la commune de Berric (W1), et (2) une usine de production, d'abattage et de transformation de canards sur la commune de Lauzach (W2 et W3). Le dernier prélèvement sur la Surzur a été effectué dans une zone de pâturage. Deux points sur la rivière de Surzur (W5 et W6) ont été prélevés en aval d'un rejet de station d'épuration urbaine. La campagne de prélèvement a été réalisée le 25 mai 2010.

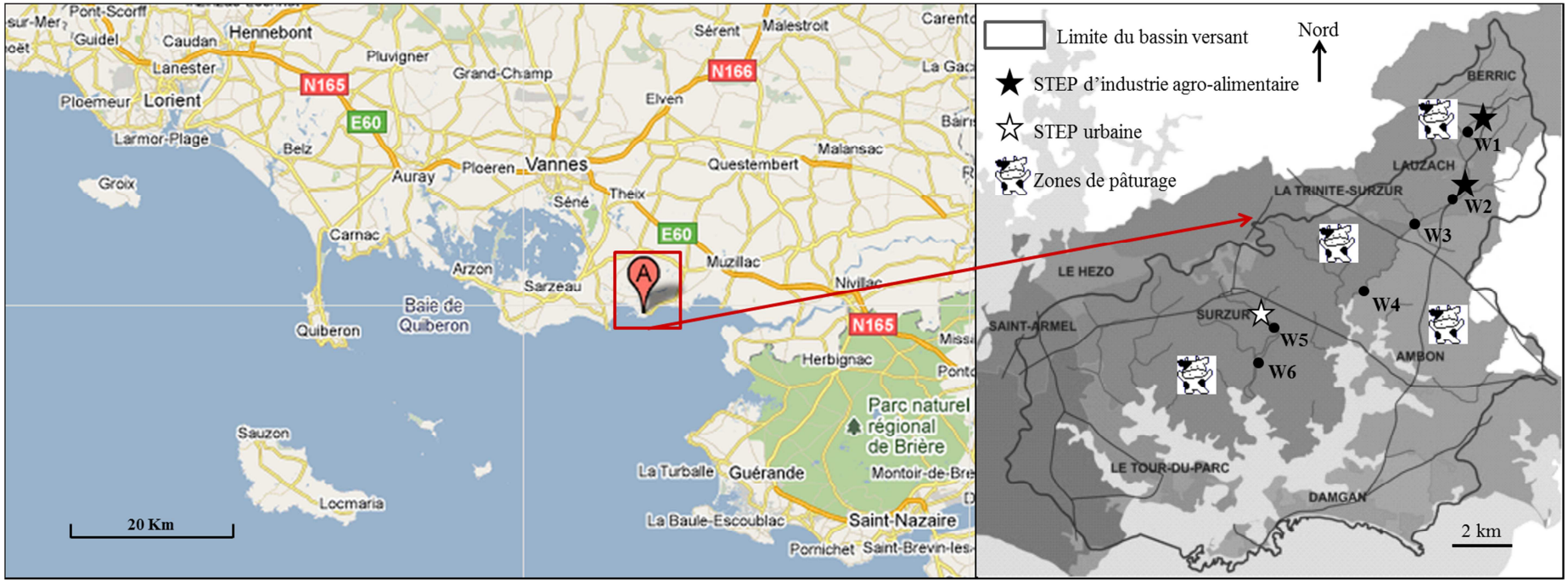


Figure II.10: Carte de localisation des prélèvements d'eaux sur le bassin versant de Pénerf (56).

III/- METHODES ANALYTIQUES

III/-1 Extraction organique des matrices solides

Après prélèvement, les matrices solides ont été congelées pendant 8 jours, puis lyophilisées pendant 5 jours, et enfin broyées jusqu'à obtenir une poudre homogène dont les grains sont inférieurs à 500 µm.

La technique d'extraction utilisée est une extraction accélérée aux solvants automatisée (ASE 200, Dionex). Elle permet d'extraire la matière organique à haute pression (sous flux d'azote) et à haute température ce qui a pour effet d'augmenter la mobilité des molécules organiques et du solvant, minimisant ainsi le temps d'extraction et la quantité de solvant utilisée.

L'extraction se fait dans des cellules d'extraction de 11 mL. Un filtre de verre de porosité 0,7 µm (Whatman GF/F) est ajouté en bas de la cellule, ainsi que des billes de verres d'un diamètre de 2 mm (environ 1/3 de la cellule). Le filtre évite le colmatage de la cellule et des tubulures. Les billes de verre dans la matrice favorisent la bonne circulation du solvant. Un à 2 g d'échantillon sont ensuite introduits dans la cellule puis mélangés avec les billes de verre.

Trois extractions par échantillon ont été réalisées avec du dichlorométhane (DCM). Les conditions d'extraction sont les suivantes : cellule de 11 mL, 130 bar, 100 °C, 2 cycles de 5 minutes d'extraction en mode statique, flush de 150 % et purge pendant 200 s sous flux d'azote.

III/-2 Extraction organique des matrices aqueuses

Les échantillons d'eau sont d'abord filtrés à 0,7 µm avec un filtre en fibre de verre (Whatman GF/F) afin de séparer la fraction particulaire (>0,7µm) de la fraction dissoute (<0,7µm), objet de l'étude.

La technique d'extraction utilisée est basée sur le caractère hydrophobe des molécules à extraire. L'extraction se fait sur une phase solide, et est communément appelée extraction sur phase solide (ESP). Elle utilise des disques de silice greffée avec des chaînes hydrocarbonées comprenant 18 atomes de carbone (ENVI-DiskTM, Supelco) et l'utilisation de différents mélanges de solvants.

Le montage expérimental (Figure II.11) se compose d'un vase de 1 L dans lequel l'échantillon est placé, d'un support de disque, d'un flacon collecteur d'1 L pour la phase aqueuse et d'un tube de collection de 125 mL pour l'extrait organique. L'élution à travers le disque d'extraction est assurée au moyen d'une pompe.

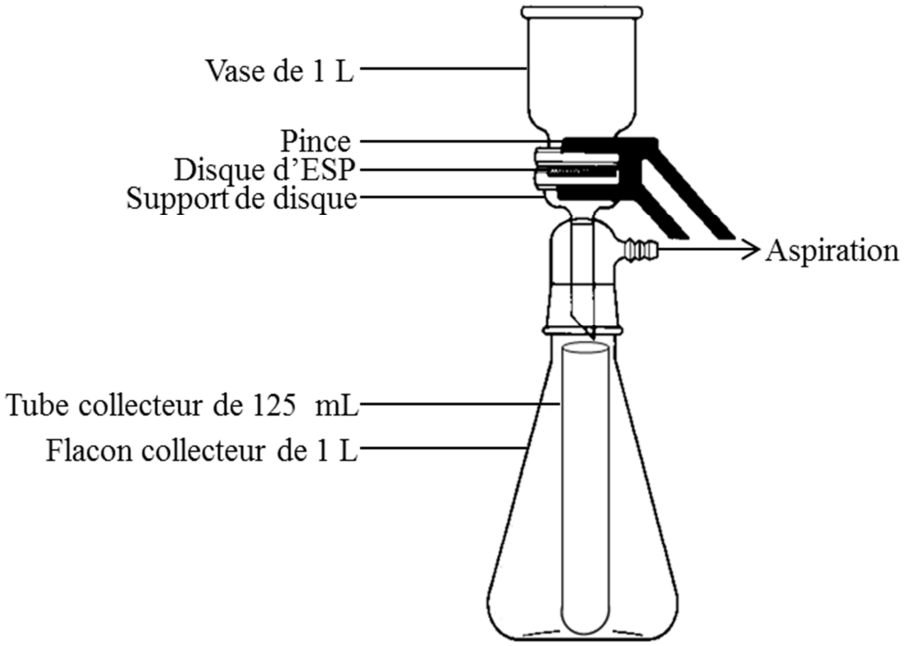


Figure II.11: Schéma du montage expérimental utilisé pour l'extraction sur phase solide des stéroïdes présents dans des échantillons aqueux.

Une fois le système en place et le disque déposé sur son support, celui-ci est au préalable nettoyé avec 10 mL de DCM. Ce solvant est élué par le système d'aspiration, et l'aspiration est maintenue afin d'éliminer toute trace de solvant. Le disque est ensuite conditionné avec 10 mL de méthanol et 30 mL d'eau ultra-pure. Une fois ce conditionnement effectué, le disque doit être maintenu humide faute de diminuer le rendement de l'extraction. Pendant le conditionnement du disque, l'échantillon d'eau à analyser (1 L) est acidifié avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10 % en masse. Un surfactant est aussi ajouté à l'échantillon pour éviter aux chaînes hydrocarbonées greffées sur silice de se condenser, diminuant ainsi la surface hydrophobe disponible (Jeanneau *et al.*, 2007, 2011). Le surfactant ajouté est l'isopropanol, qui est rajouté à l'échantillon à raison d'un volume d'isopropanol pour 10 volumes d'échantillons (1:10 ; v:v).

Une fois le disque conditionné et l'échantillon préparé, l'échantillon est versé dans le vase puis passé sur le disque à l'aide du système d'aspiration. L'aspiration est laissée en route jusqu'au séchage complet du disque. Un flacon collecteur de 125 mL est alors placé dans la

fiole de 1L. La phase organique est collectée après ajout de 10 mL de DCM et aspiration. Une fois l'extraction réalisée, du sulfate de magnésium anhydre est ajouté à la phase organique afin d'éliminer toute trace d'eau dans cette phase. Le sulfate de magnésium est ensuite éliminé de l'extrait par filtration sous vide à travers un filtre en fibre de verre de 0,7 µm (Wathman GF/F).

III/-3 Fractionnement par chromatographie liquide

Les fractions organiques solubles obtenues après extraction sur matrices solides ont des mélanges complexes de molécules. Afin d'isoler la fraction polaire dans laquelle se trouvent les stéroïdes et de permettre l'analyse moléculaire par chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse, un fractionnement préalable sur micro-colonne doit être réalisé.

Ce fractionnement a été réalisé par chromatographie liquide, en faisant interagir les fractions organiques obtenues par extraction avec deux phases solides successives, d'abord de l'alumine ce qui permet d'extraire la fraction hydrocarbure (aliphatiques et aromatiques) et la fraction polaire composée de macromolécules des extraits, puis de la silice ce qui permet de séparer les aliphatiques des aromatiques et de récupérer le reste de la fraction polaire composée des molécules légères.

Les séparations sur alumine se font de la manière suivante. Tout d'abord, les quantités d'extraits sont limitées à 30 mg de manière à éviter toute saturation des colonnes chromatographiques. La première étape de la chromatographie consiste à rincer la phase stationnaire avec du cyclohexane puis avec du DCM afin d'enlever toute trace de matière organique due à la fabrication et au conditionnement de l'alumine. La phase solide est ensuite séchée une nuit à l'étuve à 100 °C. L'alumine (environ 1 g) ainsi préparée est mise dans une pipette pasteur équipée d'un bouchon en coton au préalable rincé au DCM. L'extrait organique est transféré de la fiole à la tête de colonne avec une pipette pasteur. L'éluât (correspondant au mélange d'hydrocarbures et aux molécules polaires légères) est récupéré dans un flacon intégré à un évaporateur rotatif Buchi MultivaporTM. Les macromolécules polaires sont ensuite éluées en augmentant la polarité de la phase mobile grâce à un mélange Dichlorométane/Méthanol (DCM/MeOH) en proportion volumique 1:1. La fraction obtenue après cette première chromatographie liquide est une fraction contenant des hydrocarbures et des composés polaires légers qui sont dilués dans le DCM. Afin de séparer les hydrocarbures des composés polaires légers, il est réalisé un changement de solvant de polarité inférieure, le

cyclohexane. L'efficacité du changement de solvant est vérifiée en mettant la fraction au réfrigérateur à 4 °C. A cette température, le DCM est sous forme liquide alors que le cyclohexane est solide. Si une phase liquide persiste, une étape supplémentaire d'échange de solvant est effectuée.

Le mélange est ensuite élué sur une colonne chromatographique contenant de la silice. La silice utilisée pour cette étape de fractionnement est pré-conditionnée de la même manière que l'alumine. Le mélange contenant les hydrocarbures et les molécules polaires légères dilué dans le cyclohexane est injecté en tête de colonne de silice. Le cyclohexane permet d'éluer les molécules aliphatiques. Une fois cette fraction éluée, la polarité du solvant est augmentée en utilisant un mélange Cyclohexane/DCM (65/35). Cette augmentation de polarité permet d'éluer les aromatiques. La polarité de la phase mobile est encore augmentée en utilisant un mélange DCM/MeOH (1/1) et ainsi la fraction contenant les molécules polaires légères va pouvoir être récupérée et ajoutée à celle obtenue avec le fractionnement sur alumine.

III/-4 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les concentrations en stéroïdes sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (SM).

III/-4-1 Principe de la CPG-SM

La chromatographie en phase gazeuse est une technique extrêmement sensible qui permet de séparer des constituants de mélange très complexe contenant jusqu'à 200 composés. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse repose sur la séparation des composés de l'échantillon par un gaz vecteur (phase mobile) qui balaie en permanence la colonne (phase stationnaire). La phase mobile entraîne progressivement les molécules à séparer, une à une, en fonction de leur taille, de leur polarité et de leur affinité pour la phase stationnaire. L'arrivée fractionnée dans le temps des molécules constitue ce que l'on appelle le chromatogramme.

Le chromatographe est relié à un spectromètre de masse (détecteur) par une ligne de transfert chauffée par laquelle les molécules séparées le long de la colonne sont amenées dans la source d'ionisation du spectromètre de masse. Le spectromètre de masse est constitué d'une chambre d'ionisation dans laquelle des filaments génèrent un faisceau d'électrons de 70 eV lequel, en bombardant les molécules introduites, les ionise, soit directement en conservant

l'architecture des molécules, soit en les fragmentant en plus petites molécules qui sont à leur tour ionisées. Chaque molécule est caractérisée par son ion moléculaire principal et une série d'ions secondaires, l'ensemble constituant ce que l'on appelle le fragmentogramme de la molécule cible.

Les ions produits sont ensuite focalisés, accélérés, puis envoyés dans le quadripôle du spectromètre de masse où ils sont séparés et analysés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le quadripôle est formé de quatre barreaux sous tension. En pénétrant dans celui-ci, les ions suivent tout d'abord un cheminement parallèle aux barreaux et avec une vitesse constante, avant d'être soumis à des oscillations complexes, perpendiculaires à leurs trajets. Pour chaque fragment ionique, il existe une oscillation stable qui permet à celui-ci de traverser le quadripôle et d'être détecté par le multiplicateur d'électrons. Toutes les fréquences d'oscillation sont balayées, permettant d'obtenir la répartition de tous les fragments composant le fragmentogramme qui est caractéristique d'une molécule donnée. La figure II.12 présente le fragmentogramme du coprostanol (5β-cholestan-3β-ol) sous sa forme éther de triméthylsilyle à titre d'exemple.

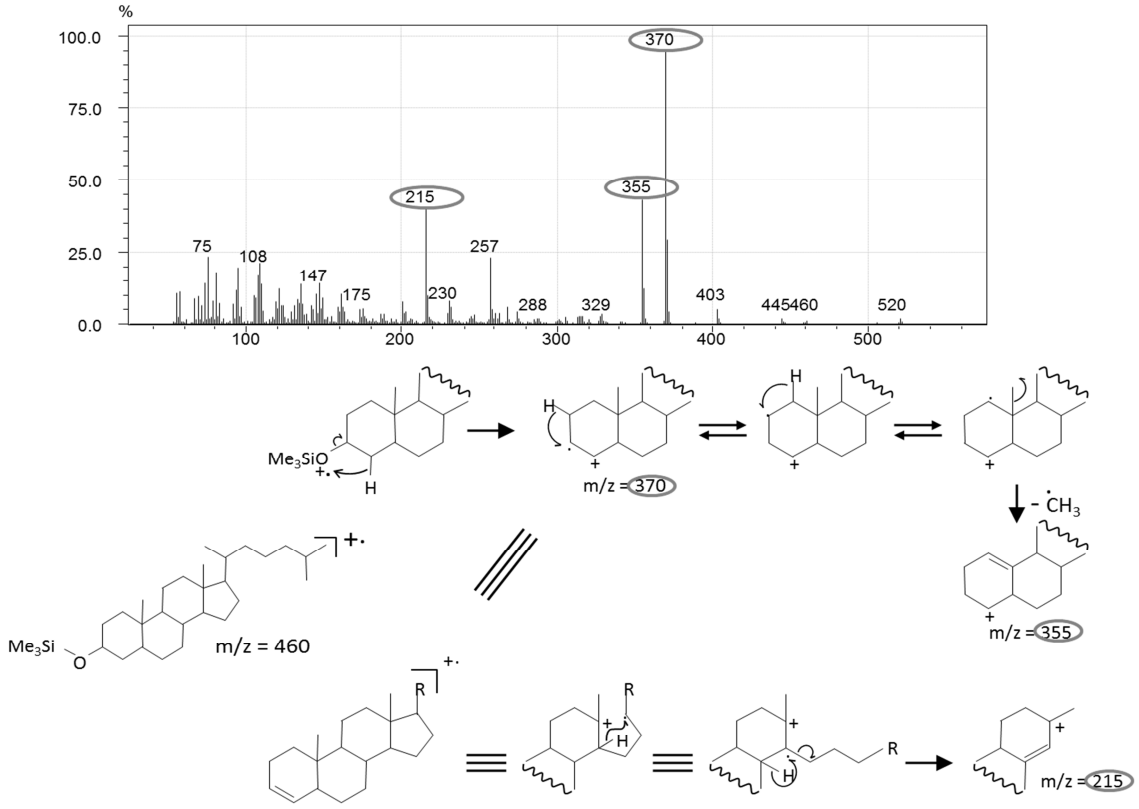


Figure II.12: Fragmentogramme et fragmentation du coprostanol sous sa forme éther de triméthylsilyle.

III/-4-2 Appareillage

Les analyses ont été réalisées avec un chromatographe en phase gazeuse et un spectromètre de masse Shimadzu QP 2010+MS. L'injecteur utilisé est un injecteur Split-Splitless maintenu à une température de 310 °C. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne capillaire en silice fondue SLB-5ms Supelco (longueur : 60 m ; diamètre : 0,25 mm ; épaisseur du film : 0,25 µm), selon le programme de température suivant : 70 °C-130 °C à 15 °C/min, 130 °C-300 °C à 3 °C/min, palier de 15 min à 300 °C et le débit du gaz vecteur (hélium) est fixé à 1 mL/min. Le chromatographe est couplé au spectromètre de masse par une ligne de transfert chauffé à 250 °C. L'hélium est éliminé par pompage (le vide dans le spectromètre de masse est inférieur à 10^{-5} Torr) alors que les molécules arrivant successivement dans la chambre d'ionisation sont bombardées par un faisceau d'électrons à 70 eV. La température du détecteur est maintenue à 200 °C.

III/-4-3 Silylation des stéroïdes

Les stéroïdes sont des molécules difficilement analysables directement par CPG-SM. En effet, la phase stationnaire du chromatographe en phase gazeuse est un polymère contenant des groupements méthyle et phényle. Ces polymères vont interagir avec les molécules polaires contenant des groupements oxygénés possédant un hydrogène via des liaisons hydrogènes. Ce type d'interaction augmente l'affinité des molécules pour la phase stationnaire diminuant ainsi l'efficacité de la séparation chromatographique. L'analyse des molécules polaires contenant des groupements oxygénés possédant un hydrogène du type stéroïdes comporte donc une étape dite de silylation des groupements oxygénés ou de dérivation dont le but est précisément d'empêcher cette interaction. Le réactif utilisé est une combinaison de N,O-bis(triméthylsilyl)trifuoroacétamide (BSTFA) et de triméthylchlorosilane (TMCS) qui permet de protéger les groupements alcools et acides carboxyliques sous la forme de triméthylsilyl éthers et de triméthylsilyl esters. La figure II.13 présente un exemple de réaction du silylation sur le cholestérol (cholest-5-en-3β-ol). Concrètement, la fraction polaire dans laquelle sont présents les stéroïdes est séchée après séparation par chromatographie liquide. Elle est ensuite diluée au DCM. Un volume de 50 µl de ces solutions est mis à sec et un volume équivalent de BSTFA + TMSC (99:1, v:v) (Supelco) est ajouté. Le flacon est ensuite placé à 70 °C pendant 15 minutes pour accélérer la cinétique de la réaction de silylation. Les stéroïdes sont donc analysés sous leur forme éther de triméthylsilyle.

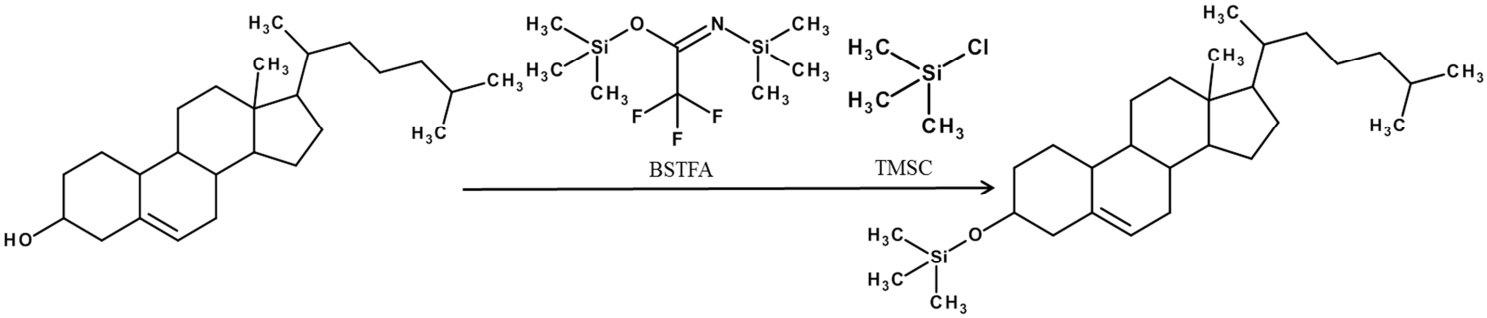


Figure II.13: Schéma de la réaction de silylation du cholestérol.

III/-4-4 Quantification des stéroïdes

La quantification par CPG-SM est réalisée par une méthode combinant l'ajout d'un standard interne aux échantillons et l'analyse répétée d'une solution standard contenant des stéroïdes en quantité connue. La réponse du détecteur par spectrométrie de masse pour une molécule M est proportionnelle à la concentration de la molécule M dans la solution. Cette proportionnalité se traduit par l'équation 1 :

$Aire_M = K_M * C_M + cste$ (Equation 1)

Dans cette équation, C est la concentration en $mol.L^{-1}$ ou $g.L^{-1}$, et K une constante dépendant de la nature de la matrice dans laquelle se trouve la molécule à analyser. Les interactions entre la molécule à analyser et les autres molécules qui l'entourent sont nommées «effets de matrice».

L'injection de solution standard permet d'approcher les valeurs de K et de la constante dans l'équation 1 pour chaque stéroïde, mais cette procédure ne permet pas de quantifier les variations de ces deux paramètres induites par les effets de matrice propres aux échantillons complexes naturels. C'est pourquoi un standard interne (SI) est rajouté à chaque échantillon, seule manière de corriger ces effets. Le SI rajouté est une molécule qui ne se trouve pas dans la nature, et qui est chimiquement et structurellement proche de la molécule à analyser de manière à ce que ces deux molécules subissent les mêmes effets de matrice.

L'équation 1 peut être appliquée au SI et devient l'équation 2 :

$Aire_{SI} = K_{SI} * C_{SI} + cste$ (Equation 2)

Le rapport de l'équation 1 sur l'équation 2 donne l'équation 3 :

$Aire_M/Aire_{SI} = K * (C_M/C_{SI}) + cste$ (Equation 3)

Les deux molécules subissent des effets de matrice proches à identiques. Le facteur K qui représente le rapport des facteurs de réponse n'est plus fonction de l'environnement de la molécule M et du SI mais simplement de la molécule M, du SI et du détecteur. La calibration du détecteur avec les solutions dont les concentrations en molécule M et en SI sont connues permet d'obtenir les constantes K et cste qui serviront à la quantification de la molécule M dans les différentes matrices environnementales analysées.

Les solutions de calibration sont réalisées à partir de 9 stéroïdes purs : cholestérol (cholest-5-en-3β-ol), coprostanol (5β-cholestan-3β-ol), épicoprostanol (5β-cholestan-3α-ol), cholestanol (5α-cholestan-3β-ol), α-cholestanol (5α-cholestan-3α-ol), campéstérol (24-méthylcholest-5-en-3β-ol), stigmastérol (24-éthylcholesta-5,22E-dien-3β-ol), sitostérol (24-éthylcholest-5-en-3β-ol) et sitostanol (24-ethyl-5α-cholestan-3β-ol). Cinq solutions de concentration croissante (0,1 ; 0,3 ; 0.5 ; 0,7 et 1 $\mu g.mL^{-1}$) ont été préparées. Dans ces 5 solutions, la concentration en SI est de 0,4µg.mL-1. La calibration est donc valable pour des concentrations en molécule à quantifier comprises entre 0,1 et 1 $\mu g.mL^{-1}$.

Les aires des molécules à quantifier et du standard interne (α-cholestane) sont récupérées en intégrant les signaux correspondant à ces molécules.

Etant à volume constant, l'équation 3 devient la suivante :

$Aire_M/Aire_{SI} = K * (m_M/m_{SI}) + cste$ (Equation 4)

Soit : $m_M = (Aire_M/Aire_{SI} – cste) * m_{SI}/K$ (Equation 5)

(avec m la masse de la molécule à quantifier)

La masse de molécule M est obtenue en injectant les aires et la masse de standard interne dans l'équation 5 dont les constantes sont obtenues par calibration. La masse déterminée correspond à la quantité de molécule M dans la fraction analysée. Pour obtenir la teneur en molécule par rapport à la matrice analysée, il faut corriger par les différents volumes et par la masse de la matrice analysée. La quantification n'est juste que pour les molécules dont l'équation de calibration a été déterminée, donc pour les molécules disponibles au laboratoire. La quantification des autres molécules passe par l'approximation des coefficients de corrélation à partir des coefficients de molécules structurellement proches. Le tableau II.6

présente les ions identifiants et quantifiants caractéristiques des stéroïdes analysés dans le cadre de cette thèse, ainsi que les standards de quantification utilisés pour les deux types de matrices (solides et aqueuses).

Tableau II.6: Ions identifiants et quantifiants caractéristiques des stéroïdes analysés dans le cadre de cette thèse, et standards de quantification utilisés pour les deux types de matrices.

Noms systémiques	m / z		Standard de quantification	
	Identification	Quantification	Matrice solide	Matrice aqueuse
Cholest-5-en-3β-ol	255, 353, 368	129	Cholest-5-en-3β-ol	Cholest-5-en-3β-ol
5β-Cholestan-3β-ol	257, 355, 370	215	5β-Cholestan-3β-ol	5β-Cholestan-3β-ol
5β-Cholestan-3α-ol	257, 355, 370	215	5β-cholestan-3α-ol	5β-Cholestan-3α-ol
5α-Cholestan-3β-ol	257, 355, 384	215	5α-Cholestan-3β-ol	5α-Cholestan-3β-ol
24-Methylcholest-5-en-3β-ol	255, 343, 382	129	24-Methylcholest-5-en-3β-ol	24-Methylcholest-5-en-3β-ol
24-Methyl-5α-cholestan-3β-ol	369, 398, 484	215	5β-Cholestan-3β-ol	5β-Cholestan-3β-ol
24-Ethylcholesta-5,22E-dien-3β-ol	255, 355, 394	129	24-Ethylcholesta-5,22E-dien-3β-ol	24-Ethylcholesta-5,22E-dien-3β-ol
24-Ethylcholest-5-en-3β-ol	255, 357, 396	129	24-Ethylcholest-5-en-3β-ol	24-Ethylcholest-5-en-3β-ol
24-Ethyl-5α-cholesta-22E-dien-3β-ol	215, 383	215	5β-Cholestan-3β-ol	5β-Cholestan-3β-ol
24-Ethyl-5β-cholesta-22-en-3β-ol	257, 353, 486	215	5β-Cholestan-3β-ol	5β-Cholestan-3β-ol
24-Ethyl-5β-cholesta-22-en-3α-ol	257, 486	215	5β-Cholestan-3β-ol	5β-Cholestan-3β-ol
24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol	383, 398, 473	215	24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol	24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol
24-Ethyl-5β-cholestan-3β-ol	257, 383, 398	215	5α-Cholestan-3β-ol	5α-Cholestan-3β-ol
24-Ethyl-5β-cholestan-3α-ol	257, 383, 398	215	5α-Cholestan-3β-ol	5α-Cholestan-3β-ol

IV/- ANALYSES STATISTIQUES

Les méthodes d'analyse statistique multivariées ont démontré leur efficacité dans l'étude de population d'échantillons caractérisés par un nombre important de variables. Ces méthodes se proposent de fournir des représentations synthétiques de vastes ensembles de valeurs numériques, en générale sous forme de visualisations graphiques.

Dans le cadre de cette thèse, l'analyse en composante principale (ACP) et l'analyse factorielle discriminante (AFD) ont été appliquées à l'ensemble de l'information fournit par la quantification des stéroïdes dans nos échantillons. Ces analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT (Addinsoft, 2010).

IV/-1 L'ACP

L' ACP est une méthode qui permet d'explorer la structure de *n* individus avec un nombre élevé *p* de données quantitatives par individu. Ainsi, l'analyse propose, à partir d'un tableau de données contenant les *p* variables quantitatives pour les *n* individus, des représentations géométriques de ces individus et de ces variables. Le principe consiste à remplacer une famille de variables par de nouvelles variables de variance maximale, non corrélées deux à deux et qui sont les combinaisons linéaires des variables d'origine. Ces nouvelles variables, appelés composantes principales, définissent des plans factoriels qui servent de base à la représentation graphique plane des variables initiales. Les représentations individuelles permettent d'établir la ou les relation(s) entre les individus. Chaque plan factoriel est caractérisé par un pourcentage qui correspond au pourcentage d'explication de la variance. Ainsi la combinaison des pourcentages des plans factoriels donne la variance totale expliquée. Par convention, la fiabilité d'une ACP est validée à partir du moment où l'explication de la variance totale exprimée est supérieure à 60%.

La représentation des variables souligne la corrélation linéaire entre les variables considérées (Figure II.14a). Les variables projetées se trouvent à l'intérieur d'un cercle de rayon unité. Plus une variable est projetée vers le bord du cercle, mieux elle est représentée. Par ailleurs deux variables bien représentées et proches l'une de l'autre (par exemple les variables 1 et 2 sur la figure II.14a) sont corrélées positivement tandis que deux variables qui s'opposent diamétralement (par exemple la variable 6 et la variable 7) sont anti-corrélées. Une orthogonalité entre deux variables traduit l'absence de corrélation linéaire (par exemple la

variable 6 et la variable 2). De la même façon, la représentation des individus dans le nouveau plan factoriel (Figure II.14b) définis par les nouveaux jeux de variables fait apparaître des groupes d'échantillons séparés graphiquement les uns des autres et auxquels on peut attribuer des caractéristiques communes et particulières relatives aux variables décrivant les échantillons. Par exemple, les échantillons représentés par des points blancs sont caractérisés par des contributions importantes des variables 1 et 2 alors que ceux en noirs sont caractérisé par celles des variables 6 et 3. Les points gris sont caractérisés par les variables 5, 7 et 8, en notant une contribution de cette dernière moins importante pour ce regroupement d'individus par rapport aux deux autres (5 et 7).

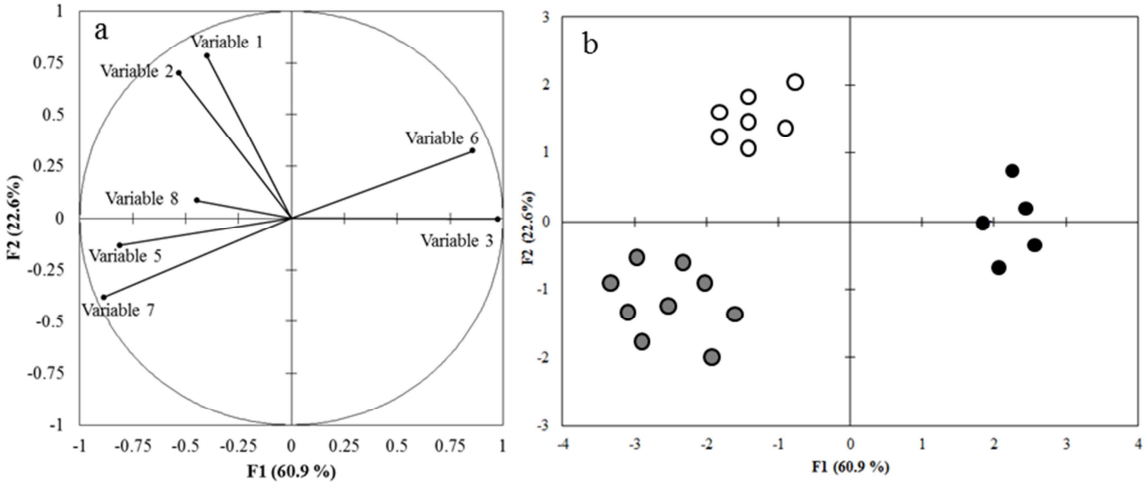


Figure II.14: Exemple de représentations des plans factoriels F1xF2 projetant les variables (a) et les individus (b).

IV/-2 L'AFD

L'AFD est une méthode descriptive et explicative, apparentée à l'ACP, s'appliquant à des données qualitatives et quantitatives sur lesquelles est déjà définie une partition. Le but de la méthode, comme en ACP, est de réduire le nombre de dimensions des données, en recherchant celles suivant lesquelles les classes se séparent le mieux et ainsi de prédire l'appartenance à des groupes prédéfinis d'un ensemble d'observations à partir d'une série de variables prédictives. Les directions factorielles discriminantes successives sont déterminées, tandis que des graphiques factoriels plans permettent ici encore de visualiser les individus ou les variables. Des regroupements sont ainsi faits basés sur les ressemblances entre les individus et l'analyse fournit une information sur la distinction quantitative (pourcentage) entre les groupes.

Chapitre 3 - Extrême variabilité des signatures de stéroïdes dans les déjections bovines et porcines à une échelle régionale : implications de l'utilisation des stéroïdes pour identifier les sources de contamination fécale dans les eaux

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les régions d'agriculture intensive sont particulièrement sujettes aux contaminations fécales. En effet la pratique de l'épandage et la présence d'animaux en pâturage peuvent générer des contaminations fécales par transfert des micro-organismes pathogènes des déjections vers les sols puis vers les eaux via : 1) le lessivage, 2) le ruissellement, 3) l'érosion et 4) l'infiltration.

Parmi le panel de marqueurs de contamination fécale, les stéroïdes semblent être un bon candidat de par leur spécificité pour chaque espèce animale. Cette spécificité forme un profil, « empreinte stéroïde » qui est la combinaison de trois facteurs : le régime alimentaire, la présence (ou l'absence) de bactéries anaérobie capable de biohydrogéner les stérols en stanols de configuration isomérique variée et la capacité de l'animal à biosynthétiser les stérols (Leeming et al., 1996). Plusieurs rapports de stéroïdes ont été développés dans la littérature cependant un problème de spécificité s'est posé après examen des valeurs du rapport 5β-stanols/C_{27}, rapport capable de distinguer les déjections bovines des déjections porcines. En effet, une variabilité assez importante a été mise en avant à une échelle (Jardé et al., 2007), pouvant mettre en péril l'utilisation des stéroïdes comme traceurs de contamination fécale. Il apparaît donc essentiel d'étudier les causes possibles de cette variabilité en analysant un plus grand nombre d'échantillons et des échantillons ayant subis différents traitements avant leur introduction dans l'environnement.

Les objectifs de cette étude sont triples et visent à : 1) quantifier l'ampleur de la variabilité des « empreintes stéroïdes » des déjections animales à l'échelle de la Bretagne, liée à l'effet combiné de facteurs primaires et secondaires et 2) développer une méthode statistique illustrant les empreintes stéroïdes des déjections porcines et bovines et 3) évaluer la spécificité des stéroïdes à distinguer une contamination des eaux d'origine bovine ou porcine. Les résultats et interprétations de cette étude sont présentés en anglais sous la forme d'un article publié dans la revue *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*

Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011, 59 (13), 7394-7302.

Extreme variability of steroid profiles in cow faeces and pig slurries at the regional scale: implications for the use of steroids to specify faecal pollution sources in waters

Morgane Derrien, Emilie Jardé, Gérard Gruau and Anne-Catherine Pierson-Wickmann

UMR CNRS 6118 Geosciences Rennes, Université Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France

ABSTRACT

Thirty-five samples of cow faeces (cowpat and cow manure) and pig slurries subjected to different treatment processes and different storage times before land spreading were extracted and analysed by gas chromatography-mass spectrometry to determine their faecal stanol profiles. The fresh pig slurry data presented here increase considerably the classical range of values obtained for steroid ratios, resulting in an overlap of the range for cow faeces. These results lead to an inability to distinguish species source of faeces on the basis of steroid ratio alone. The cause of these differences is not known, though it appears likely to be related to differences in the metabolism of animals in relation to their age and/or variations in diet, rather than to secondary mechanisms of steroid degradation during storage or/and treatment of the faeces. Nevertheless, the specificity of steroids to serve as a tool to differentiate cow faeces from pig slurries is restored if we consider the faecal stanol profile, notably the six most diagnostic stanol compounds, which are: 5β-cholestan-3β-ol (coprostanol), 5β-cholestan-3α-ol (epicoprostanol), 24-methyl-5α-cholestan-3β-ol (campestanol), 24-ethyl-5α-cholestan-3β-ol (sitostanol), 24-ethyl-5β-cholestan-3β-ol (24-ethylcoprostanol) and 24-ethyl-5β-cholestan-3α-ol (24-ethylepicoprostanol). In this study, chemometric analysis of the fingerprint of these six stanols using principal components analysis (PCA) distinguished pig

slurries from cow faeces. The application of PCA to the stanol profiles, as developed in this study, could be a promising tool to identify the animal source in faecal contamination of waters.

Key words: faecal stanols; animal faeces; faecal contamination; molecular markers; principal component analysis.

I/- INTRODUCTION

Animal manures are valuable fertilizers which provide macro- and micro-nutrients at low-cost alternative to mineral fertilizers (1, 2). However, excessive application of manure to soil may ultimately contaminate surface water with faecal matter, causing risks to human through possible exposure to pathogenic bacteria, viruses, and (or) protozoa (3-6).

Different methods grouped together under the generic term of 'Microbial Source Tracking' (MST) have been developed to identify faecal contamination sources in water, with the aim of obtaining a full characterisation of the contamination (i.e. source, timing, severity, etc.) (7-10). Among animal-specific markers, steroids have the potential to discriminate between different animal sources (11-18). Steroid profiles in animal faeces depend on three factors: (i) the animal's diet, (ii) the animal's ability to biosynthesize sterols and (iii) the presence/absence of anaerobic bacteria able to biohydrogenate sterols into stanols of various isomeric configurations (11). For example, herbivore faeces are dominated by steroids with 29 carbon atoms such as 24-ethylcholest-5-en-3β-ol (sitosterol), 24-ethylcoprostanol and sitostanol, whereas omnivore faeces mainly contain steroids with 27 carbon atoms such as coprostanol, cholest-5-en-3β-ol (cholesterol), 5α-cholestan-3β-ol (cholestanol) and epicoprostanol (11-18).

Insofar as faecal steroids undergo dilution during their transfer from soil to water, steroid ratios rather than absolute steroid compound concentrations are used for tracking purposes. Several ratios have been proposed as biomarkers suitable to differentiate between faecal matters of different animal origin (11, 16-18).

However, the limits of steroid ratios as faecal source indicators were previously point out by Jardé and coworkers (14). They reported values of 5β-stanols/C_{27} ratio ranging from 3.8 to 8.3 for five samples of fresh pig slurry originating from Brittany, France. The sources of variations in steroid relative concentrations within a given animal faeces type can have several origins. They can arise from exogenous factors such as different physico-chemical treatments and storage conditions of the animal faeces prior to land application. In areas of intensive farming such as Brittany, the problem of tracking faecal contamination sources is particularly acute due to the production of large amounts of animal faeces (14). Here the faeces are often stored in tanks for extended periods of time to comply with regulations that limit land

application to only certain periods of the year. Various physico-chemical treatments are often utilized including centrifugation, aerobic digestion, and anaerobic denitrification, during this long-term storage. All of these treatment processes, particularly those intended to stimulate microbial degradation of the animal faeces, can create variations in the steroid concentration profiles, and thus also in the steroid ratios. These changes are a result of differences in lability of steroids compounds to microbial degradation or/and microbial biosynthesis (17-21). For example, it is well established that the activity of aerobic bacteria are responsible for relative losses of 5β-stanols (17, 22-25). Therefore, it has become essential to quantify the potential increase in the variability of steroid ratios caused by storage and treatment processes, and distinguish it from the variations primarily created by differences in animal diet and animal metabolism. To assess the secondary source of variability, the present study reports the analyses of faecal steroids in thirty-five samples of pig slurries and cow faeces subject to different treatment processes, and following storage for different periods of time. Pig slurry and cow manure were preferentially selected because they represent the two most intensively spread types of manure in Brittany, the target region of this study. Our aim is to i) quantify the extent of changes in steroid profiles that can be encountered within each animal faeces type at the regional scale, due to the combined effects of variations in animal diet and metabolism, in addition to faeces storage time and treatment and ii) establish whether faecal steroids can still be used to distinguish water contamination by pig slurries or by cow faeces, despite the variability generated by these primary and secondary variation sources.

II/- MATERIALS AND METHODS

II/-1 Samples and sample preparation

Nineteen samples of cow faeces and sixteen samples of pig slurries were collected and analysed. All the samples come from Brittany, north-western France. Figure III.1 shows the location of the farms where the samples were collected.

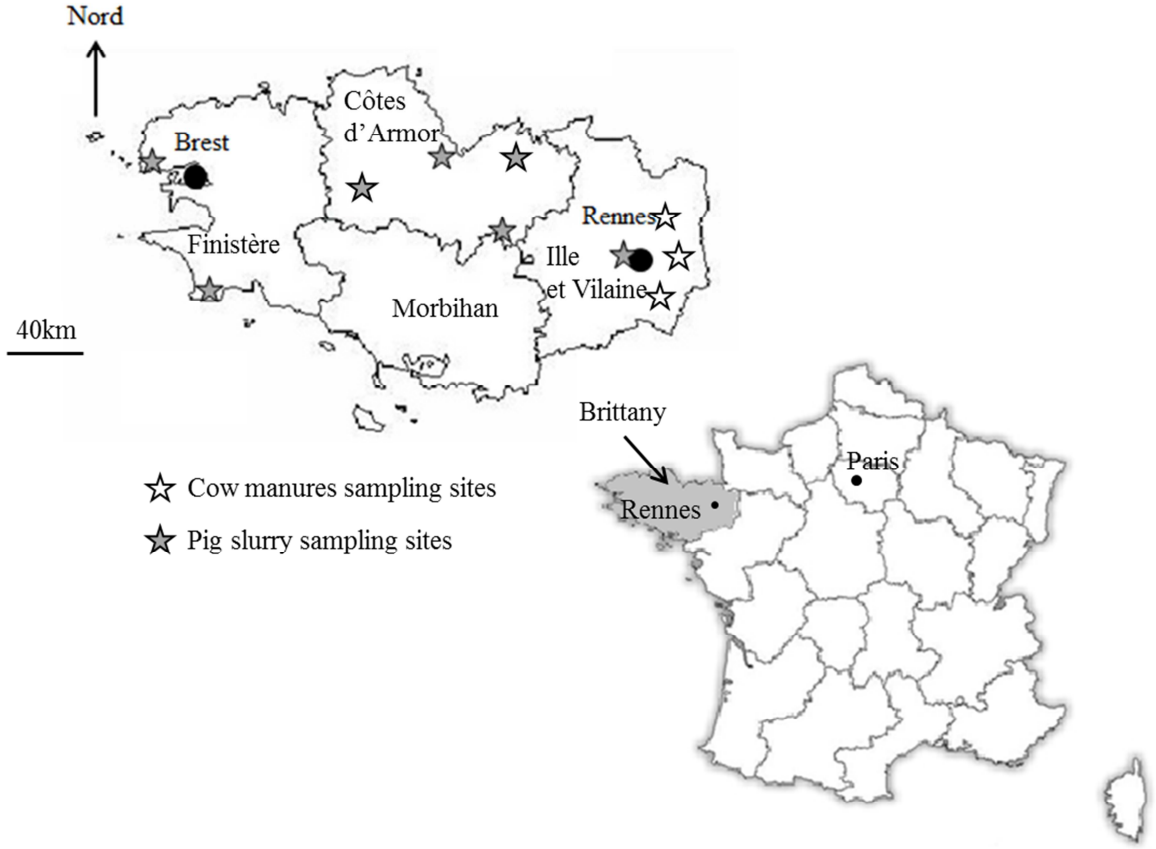


Figure III.1: Sample location map. Open stars: cow manures; filled stars: pig slurries.

The nineteen samples of cow faeces were collected at ten different dairy farms. Each sample is a composite of faeces produced by a group of fifty animals. In detail, the sampling includes the following specific wastes: (i) six fresh cowpats, (ii) nine fresh cow manures (i.e. cow faeces mixed with straw), and (iii) four aged cow manures. The different samples collected are representative of the cow faeces that were either directly deposited on meadows (cowpats) or spread onto agricultural soils (cow manures). Table III.1 summarizes the main characteristics of the studied cow samples, including farm location and sampling date, storage time and animals' diet.

Table III.1: Description of cow faeces samples.

Livestock farming type	Farm location	Faeces type and sample number by type	Storage time	Animal diet	Sampling date
Dairy farming	Ille-et-Vilaine	Cowpat (1) Cow manure[a] (1) Cow manure (1)	Fresh 4 months 6 months	Pasture and a corn silage	April 2007
		Cowpat (1) Cow manure (1)	Fresh 5 months	Pasture	April 2007
		Cowpat (1)	Fresh	Pasture and corn	April 2007
	Unknown	Cow manure (1)	Fresh	Grass and/or corn silage, food supplements (protein) and pasture	April 2007
		Cow manure (1)	Fresh	Grass and/or corn silage, food supplements (protein) and pasture	April 2007
		Cow manures (3)	Fresh	Unknown	April 2008
		Cow manure (1)	Fresh	Unknown	February 2007
		Cowpat (1) Cow manure (1) Cow manure (1)	Fresh Fresh 4 months	Pasture	April 2007
		Cowpat (1) Cow manure (1)	Fresh Fresh	Grass and/or corn silage, food supplements (protein) and pasture	February 2007
		Cowpat (1) Cow manure (1)	Fresh	Grass and/or corn silage, food supplements (protein) and pasture	April 2007

[a] All cow manure samples contained straw.

The sixteen samples of pig slurry were collected from a pig fattening experimental farm and from six different piggeries containing sows associated in some cases with piglets. Each sample is a composite of faeces produced by a group of one hundred sows. Brittany supports more than half of the total French pig livestock and generates from 8 to 10 million tons of pig slurry each year. To limit contamination of soils and waters by pathogens, nitrogen and phosphorus, the French regulations require storage and treatment of the slurry before land application. In Brittany, between 50 to 100 % of the raw pig slurry is treated, primarily by physical treatment (physical separation of urine from solid faeces by centrifugation) followed in some cases by chemical treatment (aerobic digestion and anaerobic denitrification). The storage period before treatment ranges from two to eight weeks. Once treated, the slurries are again stored before land application. This second storage is carried out in anaerobic tanks, and usually lasts from three to nine months. Among the sixteen collected pig slurry samples, twelve were used to investigate the combined effects of storage and treatment. These samples include: (i) four fresh raw pig slurries collecting in a pig fattening farm, (ii) four aged raw pig slurries, (iii) four physically treated pig slurries and (iv) four chemically treated pig slurries. Groups (ii) – (iv) were collected from sow farrowing/nursery farms. Table III.2 summarizes the main characteristics of the studied pig slurry samples, including farm location and sampling date, animal diet, and manure treatment type and storage time.

About 5 kg of raw manure were collected for each sample. After homogenization, about 0.5 kg were frozen for two days, then freeze-dried for five days and finally crushed (<250 µm) before chemical extraction and subsequent steroid analysis.

Table III.2: Description of pig faeces samples.

Livestock farming type	Farm location	Faeces type (including treatment type) and sample number by type	Storage time	Animal diet	Sampling date
Pig fattening	Ille et Vilaine	Raw pig slurries (4)	Fresh	Wheat and soybean (80% and 20%) Wheat and soybean (90% and 10%) Wheat and soybean (90% and 10%) Wheat, soybean and rapeseed (70%, 10% and 20%)	June 2009
Sow and piglet	Côtes d'Amor	Raw pig slurries (4)	1 month	Mixture of cereals and food supplements*	April 2007
Sow	Côtes d'Amor	Physically treated pig slurries (2)	Fresh 4 months	Mixture of cereals and food supplements*	March 2009
		Physically treated pig slurry (1) Chemically treated pig slurry (1)	6 months 9 months	Mixture of cereals and food supplements*	March 2009
		Chemically treated pig slurry (1)	8 months	Mixture of cereals and food supplements*	April 2009
	Finistère	Physically treated pig slurry (1) Chemically treated pig slurries (1)	Fresh 6 months	Mixture of cereals and food supplements*	March 2009
		Chemically treated pig slurry (1)	8 months	Mixture of cereals and food supplements*	April 2009

*Mineral salts, vitamins, micronutrients and antibiotics.

II/-2 Reagent and chemicals

Organic solvents were of HPLC grade. Dichloromethane (DCM) was purchased from Carlo-Erba SDS (Val de Reuil, France), methanol and cyclohexane were purchased from VWR (West Chester, Pennsylvania, USA). The mixture of N,O-bis(trimethylsilyl)trifuoroacetamide and trimethylchlorosilane (99/1, v/v) (BSTFA + TMCS) was purchased from Supelco (St. Quentin Fallavier, France). Coprostanol, cholestanol, stigmasterol (24-ethylcholesta-5,22-dien-3β-ol), sitosterol (24-ethylcholest-5-en-3β-ol), α-cholestane were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Epicoprostanol, epicholestanol (5α-cholestan-3α-ol), campesterol (24-methylcholest-5-en-3β-ol) and sitostanol were purchased from Steraloids (Newport, Rhode Island, USA). Cholesterol was purchased from Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

II/-3 Calibration solutions of sterol and stanol compounds

Solutions of individual compounds (coprostanol, cholestanol, epicoprostanol, epicholestanol, sitostanol, cholesterol, campesterol, stigmasterol, sitosterol) were dissolved in DCM at 1,000 µg/mL. 5α-cholestane was used as an internal standard and was dissolved in DCM at 40 µg/mL. The determination of the limits of detection was performed using three solutions containing coprostanol, cholestanol, epicoprostanol, epicholestanol, sitostanol, cholesterol, campesterol, stigmasterol, sitosterol at 5, 10 and 15 ng/mL. The calibration was performed by the internal standard method using five-point calibration curves (0.1, 0.5, 1, 5 and 10 µg/mL) with a constant internal standard concentration at 4 µg/mL.

II/-4 Extraction – Fractionation

The extraction protocol used in our laboratory is modified from Li et al. (26). None recovery standard was used to account for losses in extraction. The organic extractions of the animal faeces were performed using an Accelerated Solvent Extractor (ASE200 by Dionex) with dichloromethane (DCM). Between 1 and 2 g of freeze-dried sample were used, and the three extractions performed on each sample were pooled. The extractions were carried out under the following conditions: 11 ml cells, with 5 min heat-up to 100 °C, 130 bar followed by two cycles of 5 min each, completed with a 150 % flush and 200 s purge with nitrogen.

The organic extracts were then fractionated by two-step liquid chromatography into aliphatic, aromatic and polar compounds. In the first step, alumina retained high-molecular-weight polar compounds while hydrocarbons and low-molecular-weight polar molecules were eluted by DCM. High-molecular-weight polar compounds were then been eluted by a mixture of DCM/methanol (1/1, v/v). After solvent exchange of dichloromethane with cyclohexane, hydrocarbons and low-molecular-weight polar molecules were fractionated on a silica column by successive elutions with cyclohexane, followed by cyclohexane/dichloromethane (2/1, v/v) and methanol/dichloromethane (1/1, v/v). The two polar fractions thus obtained were then pooled together, dried under a gentle flux of nitrogen and finally weighed for quantification. The present study is focused on the steroids present in the polar fraction.

II/-5 Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS)

Polar fractions were analysed after derivatisation using BSTFA + TMCS (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and trimethylchlorosilane). One µL of the derivatized sample was injected onto a Shimadzu QP2010+MS gas chromatograph/mass spectrometer (Shimadzu, Tokyo, Japan). The injector used was in splitless mode and maintained at a temperature of 310°C. The chromatographic separation was performed on a fused silica SLB-5ms capillary column (from Supelco, length: 60 m, diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.25 µm) under the following temperature program: 70°C (held at 1 min) to 130°C at 15°C min^{-1}, then 130°C to 300°C (held at 15 min) at 3°C min^{-1}. The helium flow was maintained at 1 $mL.min^{-1}$. The chromatograph was coupled to the mass spectrometer by a transfer line heated to 250°C. The analyses were performed in SIM mode (Selective Ion Monitoring). Quantification was based on the internal standard α-cholestane (CDN isotope, CIL Cluzeau, Sainte-Foy-la-Grande, France) which was added to the sample post-extraction, and prior to derivatization. The quantification method utilizes a five-point calibration curves (0.1, 0.5, 1, 5 and 10 µg/mL) with a constant internal standard concentration at 4 µg/mL. The limit of detection (LD) of each compound was estimated by calculating the signal-to-noise ratio (S/N) for three solutions containing the target compounds at 5, 10 and 15 ng/mL. Each solution was analysed 10 times. LDs were defined as the concentration at which S/N > 3. Table III.3 presents the different steroid compounds quantified in this study, information on the linearity, the limits of detection and the m/z fragments used for the identification and the quantification of the steroids analysed.

Table III.3: Usual, trivial names, formula, symbols, m/z used for the identification and quantification and information on quantification compounds (name, linearity and limit of detection).

IUPAC name	Trivial name	Symbol	m/z		Quantification characteristics		
			Identification	Quantification	Standard	Linearity	LD* (ppb)
Cholest-5-en-3β-ol	Cholesterol	1	255,353, 368	129	Cholesterol	0.995	5
5β-Cholestan-3β-ol	Coprostanol	2	257, 355, 370	215	Coprostanol	0.996	5
5β-Cholestan-3α-ol	Epicoprostanol	3	257, 355, 370	215	Epicoprostanol	0.996	5
5α-Cholestan-3β-ol	Cholestanol	4	257, 355, 384	215	Cholestanol	0.995	10
24-Methylcholest-5-en-3β-ol	Campesterol	5	255, 353, 382	129	Campesterol	0.997	5
24-Methyl-5α-cholestan-3β-ol	Campestanol	6	369, 398, 484	215	Coprostanol	0.997	5
24-Ethylcholesta-5,22E-dien-3β-ol	Stigmasterol	7	255, 355, 394,	129	Stigmasterol	0.997	5
24-Ethylcholest-5-en-3β-ol	Sitosterol	8	255, 357, 396	129	Sitosterol	0.998	10
24-Ethyl-5α-cholesta-22E-dien-3β-ol	Stigmastanol	9	215, 383	215	Coprostanol	0.997	5
24-Ethyl-5β-cholesta-22-en-3β-ol	5β-Stigmastanol	10	257, 353, 486	215	Coprostanol	0.997	5
24-Ethyl-5β-cholesta-22-en-3α-ol	5β-Epistigmastanol	11	257, 486	215	Coprostanol	0.997	5
24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol	Sitostanol	12	383, 398, 473	215	Sitostanol	0.989	10
24-Ethyl-5β-cholestan-3β-ol	24-Ethylcoprostanol	13	257, 383, 398	215	Coprostanol	0.997	5
24-Ethyl-5β-cholestan-3α-ol	24-Ethylepicoprostanol	14	257, 283, 398	215	Coprostanol	0.997	5

II/-6 Statistical analysis

PCA, a descriptive multivariate method based on a geometric model (27-28), was used to analyse and quantify the statistical relationships between the different steroid compounds at the sample population scale. This method is useful for revealing correlation patterns in complex databases such as the steroid profile matrix obtained in this study. Based on a rectangular data matrix containing the values of p quantitative variables having n units (also called individuals), PCA provides geometric plots of these variables and individuals. The different plots allow us to identify the relationships between the individuals. In the same way, a representation of the variables (i.e. correlation circle) can be used to highlight the linear correlation of the considered variables (29).

In this study, we considered thirty-five individuals (i.e. the thirty-five investigated samples of animal faeces) and ten variables (relative abundances, in percent, of the ten stanols quantified in this study). A first PCA has been performed using those variables. The results of this PCA showed redundancy between two variables (5β-epistigmastanol and 24-ethylepicoprostanol) and a low contribution (<5%) of three variables (cholestanol, stigmastanol and 5β-stigmastanol) to the F1 axis. After elimination of cholestanol, stigmastanol and 5β-stigmastanol and 5β-epistigmastanol, a second PCA was performed using only the six most significant variables (i.e. coprostanol, epicoprostanol, 24-ethylcoprostanol, 24-ethylepicoprostanl, campestanol and sitostanol).

The PCA and relative statistical tests were performed with XLSTAT (Addinsoft, 2010), using non-parametric tests for small samples of unknown distribution (Mann-Whitney).

III/- RESULTS AND DISCUSSION

III/-1 Differences in steroid profiles between cow faeces and pig slurries, and the effect of diet variation and animal metabolism

Figure III.2 shows the average relative distribution profiles (in weight %) of steroids in the samples of fresh cowpat, fresh cow manure and aged cow manure.

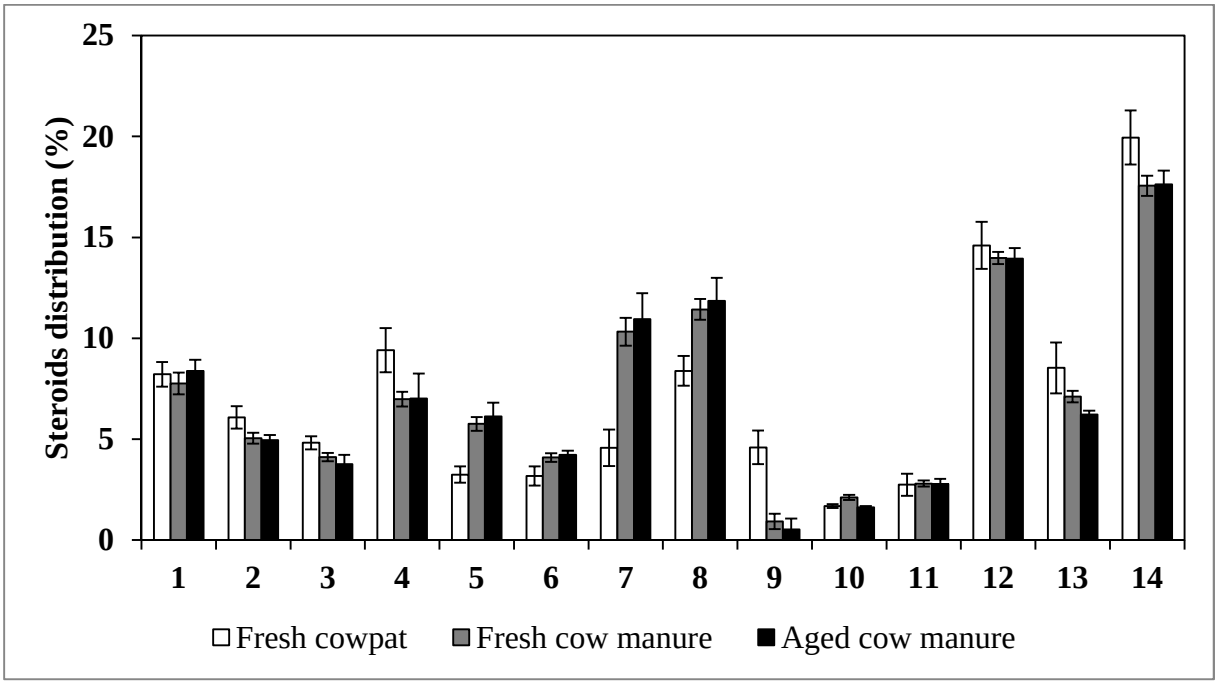


Figure III.2: Average steroid profiles (in weight % ± standard deviations) in samples of cowpat, fresh cow manure and aged cow manure.

Cow faeces samples are characterized by high proportions of C_{29} steroids, the latter representing between 63 and 68% of the total steroids, as against only 4-11% and 21-31% for the C_{28} and C_{27} steroids, respectively. Of the C_{29} steroids, 24-ethylepicoprostanol (#14, 18% to 20%) and sitostanol (#12, 14% to 15%) are the most abundant with ~ twice the proportion of the C_{27} steroids. Cholesterol (#1, 8%) and cholestanol (#4, 7% to 9%) dominate the C_{27} steroids. Relatively little variation was observed between the states of cow manures. In fact, the only notable difference is a ~ twofold increase ($p < 0.05$) of the campesterol (#5), 24-ethylcholesta-5.22E-dien-3β-ol (stigmasterol, #7) and sitosterol (#8) abundances in the cow manure samples (fresh and aged) compared to the cowpat samples.

Figure III.3 shows the average relative distribution profiles (in weight %) of steroids in the samples of fresh raw pig slurry, aged raw pig slurry, physically treated pig slurry and chemically treated pig slurry.

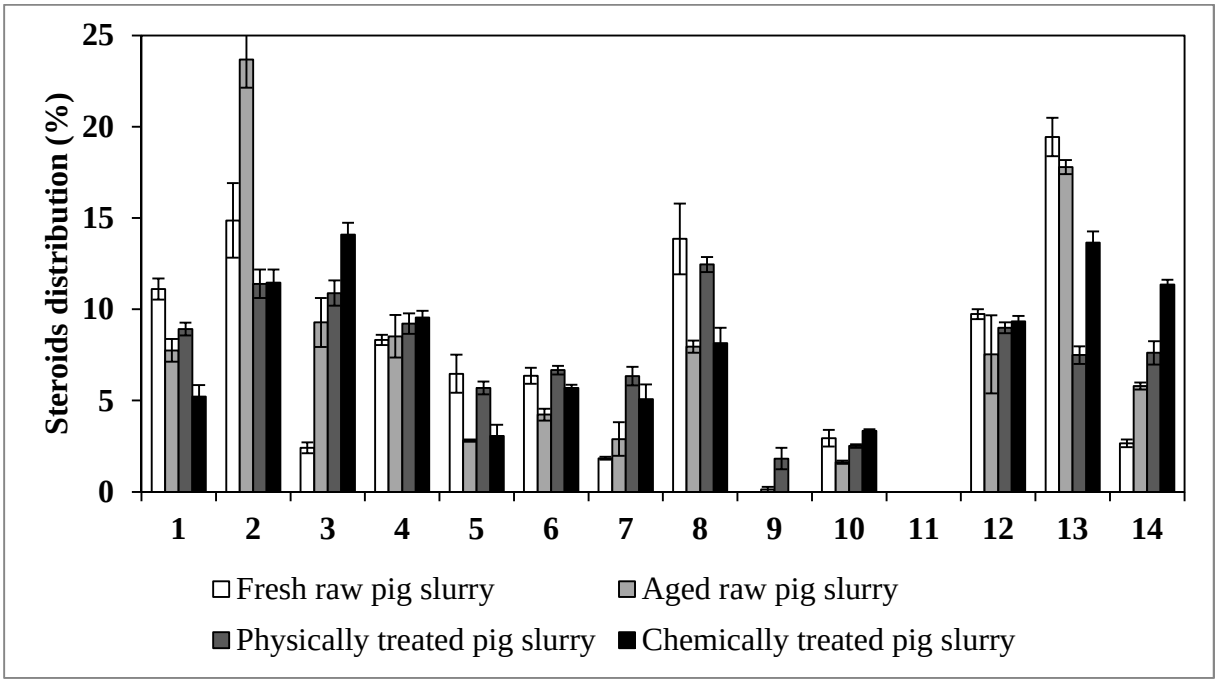


Figure III.3: Average steroid profiles (in weight % ± standard deviations) in samples of fresh raw pig slurry, aged raw pig slurry, physically treated pig slurry and chemically treated pig slurry.

Compared to cow manure, the pig slurry profiles are marked by relatively higher proportions of 3β,5β-stanols (coprostanol (#2), 24-ethylcoprostanol (#13)) and relatively lower proportions of sitostanol (#12) and of 24-ethylepicoprostanol (#14). Those two features were already noted in previous studies by Leeming et al. (11), Tyagi et al. (12) and Jardé et al. (14). Another difference is the lower relative proportion of C_{29} (between 41 and 52%) steroids as compared to C_{27} steroids (between 32 and 53%). Coprostanol (#2, between 15 to 24%) is the most abundant C_{27} steroids in samples of raw (both fresh and aged) slurry. In contrast, proportions of coprostanol (#2) and epicoprostanol (#3) in treated samples were similar (from 11 to 14%) for both chemically and physically treated slurry. Moreover, two trends are revealed between profiles of the raw (fresh and aged) slurry samples, and profiles of the physically and chemically treated slurry samples, namely treated samples showed i) an increase ($p<0.05$) of the relative proportion of stigmasterol (#7), and ii) a decrease ($p < 0.05$) of the relative proportion of 3β,5β-stanols (coprostanol (#2), 24-ethylcoprostanol (#13), accompanied by an increase ($p < 0.05$) of the relative proportion of the 3α,5β corresponding epimers (epicoprostanol (#3) and 24-ethylepicoprostanol (#14)).

The steroid profiles of the fresh cowpat and fresh pig slurry samples should be entirely controlled by the animal's diet and metabolism (11-21). In fact, the C_{29} sterols (notably

stigmasterol (#7) and sitosterol (#8)), which are common compounds of plants, dominate the sterol profiles of the cow faeces samples, in agreement with the mainly herbivorous diet of cows. 5β-C29 stanols are also abundant in cow faeces samples and are known to originate from the biohydrogenation of sitosterol (#8). These compounds reflect the cow's metabolism and the presence of anaerobic bacteria in the intestinal tract. By contrast, C27 and C29 steroids are approximately evenly distributed in the steroid profiles of the fresh pig slurry samples. As usually observed, the steroids profiles of fresh pig slurry samples are characterized by high concentration of coprostanol (#2) and 24-ethylcoprostanol (#13) (11, 14), which reflect metabolic effects (11, 17). Note that 5β-epistigmastanol (#11) is not present in the pig slurry samples, whereas this compound represents ~3 % of the quantified steroids in cow faeces (Figures III.2 and III.3).

III/-2 Effects of straw addition, storage and treatment processes on steroid profiles

Figures III.2 and III.3 illustrate the effects of straw addition, storage and physico-chemical treatment on the steroid profiles of cow faeces and pig slurries. The main effects of straw addition in cow faeces are an increase in the relative proportions of stigmasterol (#7, $p<0.05$) and sitosterol (#8, $p < 0.05$) (Figure III.2). These compounds are the main constituents of plant lipid membranes and waxes (30-31), and their relative proportions are increased in the manure samples. However, storage has no visible effect on the steroid profiles of cow manures, since the profiles of the fresh and aged cow manure samples are statistically indistinguishable ($p > 0.05$) from each other (Figure III.2).

On the contrary, both storage and treatment have major effects on the steroid profiles of pig slurries, leading to a marked decrease in the proportions of coprostanol (#2) and 24-ethylcoprostanol (#13), associated with a concomitant increase in the epicoprostanol (#3) and 24-ethylepicoprostanol (#14) proportions (Figure III.3). Studies on the fate of steroids in waste water treatment plants have established that coprostanol (#2) is degraded by bacteria during the microbial digestion process (17, 22-25), and it is likely that the decrease in coprostanol (#2) content observed in the treated slurries is caused by the same microbial degradation process. The observed concomitant decrease in the proportion of 24-ethylcoprostanol (#13) might have the same origin. This "microbial hypothesis" is consistent

with the observed increase in relative abundances of epicoprostanol (#3) and 24-ethylepicoprostanol (#14) which also characterizes the transition from fresh to stored/treated pig slurries. A previous study (32) has indeed demonstrated that anaerobic digestion could produce epicoprostanol, the 3α-epimer of coprostanol. This might be due to the survival of bacterial communities during storage and treatment processes, which can reduce the sterols present in the faeces into their 3α, 5β-stanol epimer. This process might also possibly account for the increase in the proportion of 24-ethylepicoprostanol (#14), which is seen to accompany the increase in epicoprostanol in the aged and treated pig slurry samples.

III/-3 Evidence for a loss of specificity of the steroid ratios used so far to distinguish cow from pig faeces

As highlighted in the introduction, faecal steroids were identified as compounds that could help distinguish between faecal contaminations of cow or pig origin. The validity of using the absolute abundance of a single steroid for source tracking is called into question by the low to very low concentrations of steroids in waters and the propensity of some key steroid compounds such as coprostanol to be degraded under aerobic conditions (see previous section). This explains why ratios of two or more steroids, instead of the absolute concentration of a single steroid, have been proposed as possible proxy indicators suitable to discriminate between cow and pig faecal pollution sources. Six such ratios have been proposed over the past twenty years, with reference values typical of each source (11, 14, 33). Table III.4 reports these six ratios for cow and pig faeces based on the present dataset, compared with the different reference values obtained from the literature. The results in this table clearly show a loss of specificity for five of the six ratios. Only the sitostanol/coprostanol ratio preserves its specificity, while being nevertheless significantly reduced.

Table III.4: Comparison of published and measured diagnostic values (i.e. maximum and minimum) for the six steroid ratios cited in the literature (11,14 and 32) as capable of discriminating between pig and cow faeces.

Ratios	Diagnostic values (literature)	Diagnostic values (this study)
$5\beta C_{27+29}/C_{27+29}$ (*)	R ≈ 1 (cows)[1] R > 2 (pigs)[1]	1.3 < R < 3.4 (cows) 1.2 < R < 4.8 (pigs)
$5\beta C_{27+29}/C_{27+29}$ (**)	R ≈ 1 (cows)[1] R > 2 (pigs)[1]	0.6 < R < 1.3 (cows) 1.1 < R < 4.0 (pigs)
$5\beta C_{27+29}/C_{27+29}$ (***)	R ≈ 1 (cows)[1] R > 2 (pigs)[1]	0.5 < R < 1.1 (cows) 0.8 < R < 3 (pigs)
5β-stanols/C_{27} (§)	R < 0.7 (cows)[2] R > 3.7 (pigs)[2]	0.9 < R < 2.2 (cows) 1.5 < R < 6.8 (pigs)
[cop/(cop+24-ethylcop)]*100 (§§)	38 < R < 47 (cows)[3] 51 < R < 61 (pigs)[3]	33 < R < 47 (cows) 44 < R < 67 (pigs)
Sitostanol/Coprostanol	2.3 < R < 3.3 (cows)[3] 0.2 < R < 0.7 (pigs)[3]	1.5 < R < 3.3 (cows) 0.2 < R < 1.0 (pigs)

* Coprostanol+Epicoprostanol+24-Ethylcoprostanol+24-Ethylepicoprostanol/Cholesterol+Sitosterol
** Coprostanol+Epicoprostanol+24-Ethylcoprostanol /Cholesterol+Sitosterol
*** Coprostanol+24-Ethylcoprostanol /Cholesterol+Sitosterol
§ Coprostanol+Epicoprostanol /Cholesterol
§§[Coprostanol/(Coprostanol+24-Ethylcoprostanol)]*100
[1]Leeming et al. (1996) (11)
[2]Jardé et al. (2007) (14)
[3]Gourmelon et al. (2010) (32)

Figure III.4 compares all the available data, allowing an estimation of the values of 5β-stanols/C_{27} ratio in pig and cow faeces. The data presented here includes i) the thirty-five cow and pig manure/slurry samples investigated in this study; ii) the five pig slurry and two cow manure samples investigated earlier by Jardé et al. (14); iii) the six pig and cow faeces samples investigated by Leeming et al. (11); iv) the two cow and pig faeces samples analysed by Shah et al. (18) and Rogge et al. (34). What is the cause of the loss of specificity observed in Figure III.4? Is it a side effect of the storage and treatment of slurries and manures before their land application? Or, on the contrary, is it a consequence of variations in animal diet and/or animal metabolism?

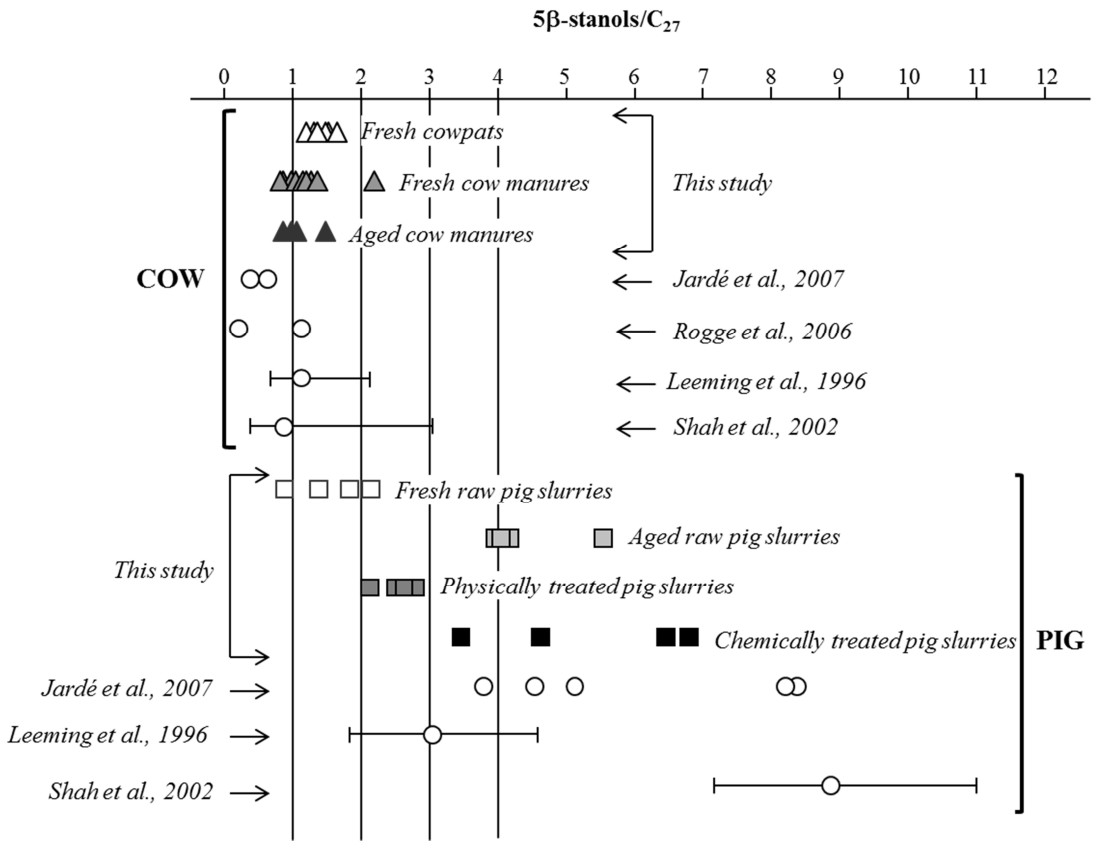


Figure III.4: Variation of the 5β-stanols/C27 ratio in cow and pig faeces: comparison of literature data (11, 14, 18 and 33) with the present dataset.

Figure III.4 clearly shows that the loss of specificity of the 5β-stanols/C_{27} ratio is due mainly to the addition of the four fresh pig slurry samples collected in a pig fattening farm. This result is particularly important since these samples are representative of the most applied swine manure. This new data shifts the entire pig faeces sample population towards lower

values of the 5β-stanols/C_{27} ratio (down to 0.9), thereby leading to an overlapping of the pig (0.9-11.1) and cow (0.2-3.8) faeces fields. From this observation, we infer that the extreme variation of the 5β-stanols/C_{27} ratio now displayed by the pig faeces end-member might be more likely caused by primary factor, rather than a secondary process that might develop during storage or treatment of the pig faeces. However, the respective roles of diet and metabolism are difficult to establish precisely because the necessary data are not available from the literature. Therefore, we are left to consider the present dataset, which, although containing more analyses than the entire published dataset, remained nevertheless of rather limited extent. If we consider just the four fresh pig slurry samples, we observe that two come from animals fed with exactly the same proportions of wheat (90%) and soybean (10%) (Table III.2). Yet, the 5β-stanols/C_{27} ratio of these two samples exhibit a dispersion (1.4 as against 2.1). The addition of rapeseed in the diet could be regarded as a factor which reduces the 5β-stanols/C_{27} ratio in pig faeces, since the sample representative of this type (Table III.2) of diet yield the lowest 5β-stanols/C_{27} ratio (0.9) observed in the fresh raw slurry sub-population. However, the fact that different 5β-stanols/C_{27} ratios are obtained for animals fed with exactly the same diet casts doubt on the hypothesis that the observed effects could be linked to diet variations.

The role of metabolism is also quite difficult to evaluate in the absence of accurate data on important indicators included in the samples taken as representative of the different pig populations. In fact, in the case of human steroid profiles, the conversion of cholesterol to coprostanol (and thus the relative abundance of coprostanol) strongly depends on the age of the individual from which the faeces are produced. According to Midtvedt et al. (35), mammal intestines are devoid of intestinal flora at birth, the latter being gradually developed later, during the growth of individuals. Because pigs are mammals like humans, it is possible that the metabolism of pigs also might evolve with age as regards to the capacity to convert sterols into stanols, with piglets producing much lower amounts of coprostanol (and thus having much lower 5β-stanols/C_{27} ratios) than adult pigs. To test this hypothesis, we clearly require further studies based on fresh pig faeces samples coming from pig populations of different known ages.

III/-4 Implication for the use of steroids to specify pollution sources in waters

Inclusion of the new series of samples produces an extreme variability in ratios such as 5β-stanols/C_{27}, which evidently compromises the use of steroid ratios to discriminate between cow and pig faecal contamination sources. The question that arises is whether steroids, taken together, may nonetheless serve as indicators to differentiate between cow and pig pollution sources. This question is addressed here by treating all samples by the PCA method. PCA methods are commonly used in chemometric data analysis of pollutants (36-39). Figure III.5 shows a plot of the PCA analysis based on 35 faecal samples using the 6 most significant stanol compounds.

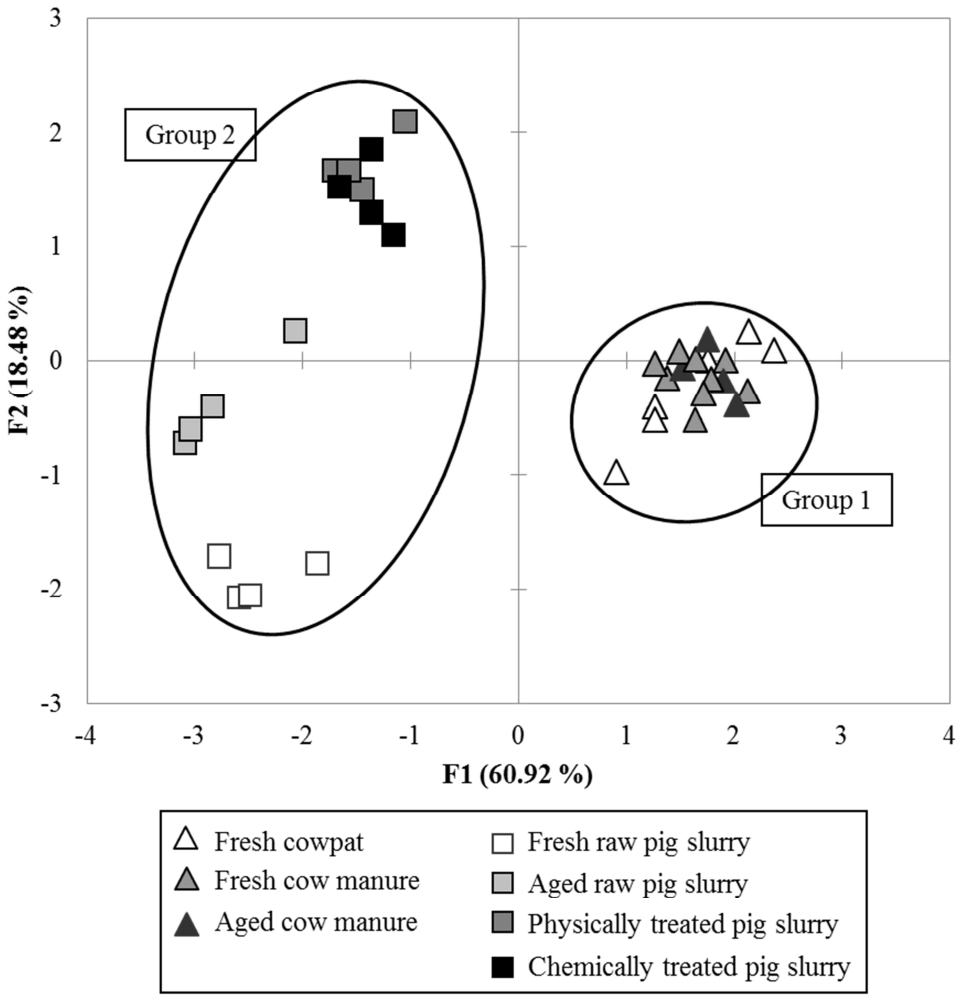


Figure III.5: Plot of principal components analysis of the 35 analysed samples using the six most discriminant stanol compounds. F1 axis = principal component 1; F2 axis = principal component 2.

The first two components of the PCA explained 79% of the total variance, with the first (F1) and second (F2) components of the PCA accounting for 61% and 18%, respectively. The figure illustrates a clear separation of the pig and cow faeces samples. The main contributive variables on the F1 axis (Table III.5), in decreasing order of importance, are 24-ethylepicoprostanol (26.0 %), coprostanol (23.3 %), sitostanol (21.1 %) and 24-ethylcoprostanol (18.0 %), while epicoprostanol (68.7 %) is the main contributive variable on the F2 axis (68.7 %). The PCA reveals that, in cow faeces (group 1 in Figure III.5), the stanol sub-series is dominated by 24-ethylepicoprostanol and sitostanol, whereas, in pig slurries (group 2 in Figure III.5), this sub-series is dominated by coprostanol, epicoprostanol and 24-ethylcoprostanol. It also indicates that the distinction between cow and pig faeces depends mainly on four stanol compounds, namely coprostanol, 24-ethylcoprostanol, 24-ethylepicoprostanol and sitostanol. Hence, we propose that these stanols, taken together, represent a valuable tool to differentiate pig from cow faeces.

Table III.5: Factorial coordinates of variables (percentage of each stanol) and relative contributions (in %) of variables to principal components 1 (F1) and 2 (F2).

	Factorial coordinates of variables		Contributions of variables (%)	
	F1	F2	F1	F2
Coprostanol	-0.92	-0.16	23.3	2.2
Epicoprostanol	-0.44	0.87	5.4	68.7
24-ethylcoprostanol	-0.81	-0.51	18.0	23.6
24-ethylepicoprostanol	0.97	0.06	26.0	0.3
Campestanol	-0.48	0.16	6.2	2.4
Sitostanol	0.88	-0.17	21.1	2.7

This study investigated the effects of storage and treatment processes on the steroid profile of a large number of cow faeces and pig slurry samples collected at a regional level. The pig faeces data considerably increases the range of values obtained for steroid ratios previously considered as having the potential to discriminate between pig and cow faeces. The range of values is increased to such an extent that both types are now combined, making it impossible to use these ratios for purposes of discrimination. The cause of this increase is not known, although it seems likely to be linked to differences in the metabolism of animals in relation to their age and/or variations in the animal diet, rather than secondary mechanisms of steroid degradation during storage or/and treatment of the pig slurry. However, the specificity of steroids to serve as a tool to differentiate cow and pig faeces is restored if we

consider not just a few steroid compounds, but the entire stanol family, notably the 6 most diagnostic stanol compounds, i.e.: coprostanol, epicoprostanol, 24-ethylcoprostanol, 24-ethylepicoprostanol, campestanol and sitostanol. Chemometric analysis of the fingerprint of these six stanol compounds using PCA allows us to distinguish pig from cow faeces, despite the strong variability and lack of specificity of classical steroid ratios. The PCA analysis of stanol profiles developed in this study could appear as a first step promising approach to identify further faecal contamination sources in waters.

ACKNOWLEDGMENTS:

This study was funded by ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, France) through the "TRACES" project (EST-2006/1/36). We thank Anne-Marie Pourcher (CEMAGREF) and co-workers (CEMAGREF), as well as Jean-Noel Thibault (UMR SENAH-INRA) for the collection and provision of animal faeces samples. Dr. M.S.N. Carpenter post-edited the English style.

REFERENCES

1. Kowalchuk, G. A.; Naoumenko, Z. S.; Derikx, P. J. L.; Felske, A.; Stephen, J. R.; Arkhipchenko, I. A. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted materials. Appl. Environ. Microbiol. **1999**, 65, 396-403.

2. Moral, R.; Moreno-Caselles, J.; Perez-Murcia, M.D.; Perez-Espinosa, A.; Rufete, B.; Paredes, C. Characterisation of the organic matter pool in manures. Bioresour. Technol. **2005**, 96, 153-158.

3. Sinton, L.W.; Finlay, R.K.; Hannah, D.J. Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. N. Z. J. Mar. Freshwat. Res. **1998**, 32, 323-348.

4. Pruss, A. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. Int. J. Epidemiol. **1998**, 27, 1-9.

5. van Asperen, I. A.; Medema, G.; Borgdorff, M. W.; Sprenger, M. J. C.; Havelaar, A. H. Risk of gastroenteritis among triathletes in relation to faecal pollution of fresh waters. Int. J. Epidemiol. **1998**, 27, 309-315.

6. Fleisher, J. M.; Kay, D.; Salmon, R. L.; Jones, F.; Wyer, M. D.; Godfree, A. F. Marine waters contaminated with domestic sewage: nonenteric illnesses associated with bather exposure in the United Kingdom. Am. J. Public Health. **1996**, 86, 1228-1234.

7. Scott, T. M.; Rose, J. B.; Jenkins, T. M.; Farrah, S. R.; Lukasik, J. Microbial source tracking: current methodology and future directions. Appl. Environ. Microbiol. **2002**, 68, 5796-5803.

8. Simpson, J. M.; Santo Domingo, J. W.; Reasoner, D. J. Microbial source tracking: state of the science. Environ. Sci. Technol. **2002**, 36, 5279-5288.

9. Meays, C. L.; Broersma, K.; Nordin, R.; Mazumder, A. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of currents methods. J. Environ. Manage. **2004**, 73, 71-79.

10. Cimenti, M.; Hubberstey, A.; Bewtra, J.K.; Biswas, N. Alternative methods in tracking sources of microbial contamination in waters. Water SA. **2007**, 33, 183-194.

11. Leeming, R.; Ball, A.; Ashbolt, N.; Nichols, P. D. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. Water Res. **1996**, 30, 2893-2900.

12. Tyagi P., Edwards D.R., Coyne M.S. Use of sterol and bile acid biomarkers to identify domesticated animal sources of fecal pollution. Water Air Soil Pollut. **2008**, 187, 263-274.

13. Evershed, R. P.; Bethell, P. H.; Reynolds, P. J.; Walsh, N. J. 5β-stigmastanol and related 5β-stanols as biomarkers of manuring: analysis of modern experimental material and assessment of the archaeological potential. J. Archae. Sci. **1997**, 24, 485-495.

14. Jardé, E.; Gruau, G.; Mansuy-Huault, L.; Peu, P.; Martinez, J. Using sterols to detect pig slurry contribution to soil organic matter. Water Air Soil Pollut. **2007**, 178, 169-178.

15. Jardé, E.; Gruau, G.; Mansuy-Huault, L. Detection of manure-derived organic compounds in rivers draining agricultural areas of intensive manure spreading. Appl. Geochem. **2007**, 22, 1814-1824.

16. Jardé, E.; Gruau, G., Jaffrezic, A. Tracing and quantifying sources of fatty acids and steroids in amended cultivated soils. J. Agric. Food Chem. **2009**, 57, 6950-6956.

17. Bull, I. D.; Lockheart, M. J.; Elhmmali, M. M.; Roberts, D. J.; Evershed, R. P. The origin of faeces by means of biomarker detection. Environ. Int. **2002**, 27, 647-654.

18. Shah, V. G.; Dunstan, R. H.; Geary, P. M.; Coombes, P.; Roberts, T. K.; Von Nagy-Felsobuki, E. Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. Water Res. **2007**, 41, 3691-3700.

19. Pratt, C.; Warnken, J.; Leeming, R.; Arthur, M. J.; Grice, D. I. Degradation and responses of coprostanol and selected sterol biomarkers in sediments to a simulated major sewage pollution event: a microcosm experiment under sub-tropical estuarine conditions. Org. Geochem. **2008**, 39, 353-369.

20. Björkhem, I.; Gustafsson, J-Ä. Mechanism of microbial transformation of cholesterol into coprostanol. Eur. J. Biochem. **1971**, 21, 428-432.

21. Eyssen, H.; Parmentier, G. Biohydrogenation of sterols and fatty acids by the intestinal microflora. Am. J. Clin. Nutr. **1974**, 1329-1340.

22. Krichmer, C. J. 5β-cholestan-3β-ol: an indicator of faecal pollution. PhD dissertation. University of Florida, USA, 1971; pp. 118.

23. Bartlett, P. D. Degradation of coprostanol in an experimental system. Mar. Pollut. Bull. **1987**, 27-29.

24. Elhmmali, M. M.; Roberts, D. J.; Evershed, R. P. Bile acids as a new class of sewage pollution indicator. Environ. Sci. Technol. **1997**, 3663-3668.

25. Takada, H. and Eganhouse, R. P. In Molecular markers of anthropogenic waste. R. A. Meyers, Eds.; Encyclopedia of environmental analysis and remediation, Wiley and Sons: New York, USA, 1998; pp. 2883–2940.

26. Li, Y.; Michels, R.; Mansuy, L.; Fleck, S.; Faure, P. Comparison of pressurized liquid extraction with classical solvent extraction and microwave-assisted extraction – application to the investigation of the artificial maturation of Mahakam coal. Fuel. **2002**, 747-755.

27. Fraley, C.; Raftery, A. E. How many clusters? Which clustering method? Answers via model-based cluster analysis. Comp. J. **1998**, 41, 578-588.

28. Vega, M.; Pardo, R.; Barrado, E.; Deban, L. Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. Water Res. **1998**, 32, 3581-3592.

29. Kim, J. O.; Mueller, C. W. In Introduction to factor analysis: what it is and how to do it. Sage University Press; Newbury Park, 1987.

30. Oros, D. R.; Mazurek, M. A.; Baham, J. E.; Simoneit, B. R. T. Organic tracers from wild fire residues in soils and rain/river wash-out. Water Air Soil Pollut. **2002**, 137, 203-233.

31. Puglisi, E.; Nicelli, M.; Capri, E.; Trevisan, M.; Del Re, A. A. M. Cholesterol, β-sitosterol, ergosterol, and coprostanol in agricultural soils. J. Environ. Qual. **2003**, 32, 466-471.

32. McCalley, D. V.; Cooke, M.; Nickless, G. Effect of sewage treatment on faecal sterols. Water Res. **1981**, 15, 1019-1025.

33. Gourmelon, M.; Caprais, M. P.; Mieskin, S.; Marti, R.; Wéry, N.; Jardé, E.; Derrien, M.; Jadas-Hécart, A.; Communal, P. Y.; Jaffrezic, A.; Pourcher, A. M. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. Water Res. **2010**, 16, 4812-4824.

34. Rogge, W. F.; Medeiros, P. M.; Simoneit, B. R. T. Organic marker compounds for surface soil and fugitive dust from open lot dairies and cattle feedlots. Atmos. Environ. **2006**, 40, 27-49.

35. Midtvedt, A-C.; Midtvedt, T. Conversion of cholesterol to coprostanol by the intestinal microflora during the first two years of human life. J. Pediatr. Gast. Nutr.**1993**, 17, 161-168.

36. Helena, B.; Pardo, R.; Vega, M.; Barrado, E.; Fernandez, J. M.; Fernan, L. Temporal evaluation of groundwater composition in an alluvial aquifer (Pisurga River, Spain) by Principal Component Analysis. Water Res. **2000**, 34, 807-816.

37. Singh, K. P.; Malik, A.; Mohan, D.; Sinha, S.; Singh, V. K. Multivariate statistical techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality of Gomti River (India) – a case study. Water Res. **2004**, 38, 3980-3992.

38. Kannel, P. R., Lee, S., Kanel, S. R., & Khan, S. P. Chemometric application in classification and assessment of monitoring locations of an urban river system. Analytica Chimica Acta. **2007**, 582, 390–399.

39. Saim, N.; Osman, R.; Abg Spian, D. R. S.; Jaafar, M. Z.; Juahir, H.; Abdullah, M. P.; Ghanin F. A. Chemometric approach to validating faecal sterols as source tracer for faecal contamination in water. Water Res. **2009**, 43, 5023-5030.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude avait pour but d'étudier la variabilité à une échelle régionale de la distribution des stéroïdes dans des déjections bovines et porcines et les implications sur l'utilisation des stéroïdes comme traceur de contaminations fécales. Le grand nombre d'échantillons et leurs différentes modalités (traitements physico-chimiques et temps de stockage différents) par rapport aux précédentes études publiées ont permis de mettre en lumière une grande variabilité des distributions en stéroïdes au sein de chaque famille de déjections. Cette grande variabilité a notamment été mise en évidence en calculant le rapport 5β–stanols/C_{27} avec, pour le pôle porcin, des valeurs comprises entre 0,9 à 11,1. Une telle étendue dans les valeurs de ce rapport entraîne un chevauchement avec celles du pôle bovin (comprises entre 0,2 et 3,8). Les causes de cette variabilité n'ont pas été clairement identifiées, malgré la diversité des échantillons analysés. Les résultats ont montré que la variabilité était sans doute liée à la fois à des facteurs primaires (différences de métabolisme des animaux en fonction de leur âge, sexe et/ou régime alimentaire) et à des facteurs secondaires (traitements physico-chimiques et/ou stockage). Cette étude a également clairement posé la question de la spécificité des stéroïdes comme marqueurs potentiels pour différencier les déjections bovines et porcines sous l'angle des rapports entre composés. Une analyse statistique a donc été appliquée aux échantillons de déjections basée les six stanols les plus discriminants pour ces deux origines afin d'évaluer si les stéroïdes gardaient leur spécificité pour le tracage au sein de ces deux sources de déjections. Les résultats ont été très encourageants, puisque ce type d'analyse a permis de distinguer parfaitement les deux pôles de déjections animales. Cet outil apparaît être prometteur pour tracer les sources de contamination fécale dans les eaux.

Cependant, cet outil a été développé et testé sur des échantillons sources et non pas sur des matrices environnementales (sol/eau), or le transfert d'une matrice à une autre peut impliquer une perte de signal ou une dilution du signal. Ainsi, pour vérifier et valider l'utilisation de l'analyse statistique des stanols comme traceur de contamination fécale, des expérimentations en conditions contrôlées ont été mises en place afin de tester si les distributions en stanols des échantillons de déjections brutes étaient conservées lors du transfert des déjections des sols vers les eaux. Cette étude fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 4 - Marqueurs microbiologiques et chimiques : transfert dans les eaux de ruissellement de sols amendés par des déjections animales

CONTEXTE ET OBJECTIFS

L'étude précédente a montré que les stéroïdes pouvaient être utilisés pour distinguer deux types de déjections animales : bovine et porcine. Cependant les risques de contamination fécale par les déjections animales dans les eaux sont engendrés majoritairement par la pratique d'épandage via le transfert des déjections vers les eaux via les sols sur lesquels les déjections sont épandues par des mécanismes de transfert type érosion/lessivage, ruissellement et infiltration. La précédente étude a été réalisée sur des déjections brutes, il est donc nécessaire de vérifier le transfert des stéroïdes après changement de matrice afin de pouvoir les valider comme outil de traçage de contamination fécale.

Une expérimentation au champ en conditions contrôlées a été réalisée. Elle a consisté à épandre des déjections animales (lisier porcin et fumier bovin) sur une parcelle agricole puis à simuler une pluie afin de récupérer les eaux de ruissellements. L'enjeu ici étant de savoir si les signatures spécifiques en stéroïdes établies pour les différents types de déjections animales seront conservées une fois que les stéroïdes animaux apportés au sol auront été mélangés aux stéroïdes initialement présents dans les sols et de vérifier le transfert des signatures animales lors du changement de matrice déjections/sols/eaux. Pour cette étude un panel de marqueurs microbiologiques et chimiques (Rum-2-Bac, marqueur bovin; Pig-2-Bac, marqueur porcin; *Lactobacillus amylovorus*, marqueur porcin; fluorescence tridimensionnelle de la matière organique) a été également testé car dans le cas de contamination mixte dans le milieu naturel, un seul marqueur ne peut pas permettre de distinguer toutes les sources de contaminations fécales.

Les objectifs de cette étude sont : 1) d'étudier le transfert des marqueurs microbiens et chimiques dans les eaux de ruissellement après une simulation de pluie et 2) évaluer l'efficacité et la pertinence des marqueurs dans le but de les valider pour l'identification de l'origine des contaminations fécales.

Les résultats et interprétations de cette étude ont fait l'objet d'un article en anglais publié dans la revue *Journal of Environmental Quality*. Dans cette étude, les stéroïdes sont utilisés sous la forme de rapports (R1 [(coprostanol/coprostanol + 24-ethycoprostanol) x 100] exprimé en pourcentage et R2 (sitostanol/coprostanol)). Le but de cette étude n'étant pas de

distinguer les deux sources (bovine ou porcine) mais d'étudier le transfert du signal au cours du ruissellement, l'utilisation des stéroïdes sous forme de rapport est encore viable. De plus, les deux rapports (R1 et R2) sont discriminants pour les échantillons utilisés dans cette étude.

Journal of Environmental Quality 2011, 40 (3), 959-968.

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

Anne Jaffrezic[1,2], Emilie Jardé[2,3,*], Anne-Marie Pourcher[2,4], Michèle Gourmelon[5], Marie-Paule Caprais[5], Djilali Heddadj[6], Patrice Cottinet[6], Muhamad Bilal[7], **Morgane Derrien**[2.3], Romain Marti[2.4] and Sophie Mieszkin[5]

[1]INRA Agrocampus Ouest, UMR 1069, Rennes, France

[2]Université européenne de Bretagne, France.

[3]Geosciences Rennes, UMR 6118 CNRS-Rennes 1 University, France

[4]Cemagref, UR GERE, F-35044 Rennes, France

[5]Ifremer, EMP, Laboratoire de Microbiologie, Plouzané, France

[6]Chambre d'Agriculture, pôle agronomie, Rennes, France

[7]COMSATS institute of information technology, Abbotabad, Pakistan

ABSTRACT

Faecal contamination of water resources is currently evaluated by the enumeration of the faecal coliforms, *Escherichia coli* and enterococci. 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. The concentration of faecal indicators (*E. coli*, enteroccoci 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) were 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 greater 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 were transferred to runoff water, allowing discrimination between swine and cattle faecal contamination in the environment *via* runoff after manure spreading. Host-specific bacterial and chemical markers were quantified for the first time in runoff waters samples following the experimental spreading of swine slurry or cattle manure.

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

I/- 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 waters 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 increase the amount of organic matter in river water. 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. 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 between 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 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 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 greater 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 al.*, 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 are 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, α-cholestanol, campesterol, campestanol, stigmasterol, stigmastanol, 5β-stigmastanol, 5β-epistigmastanol, sitosterol, sitostanol, 24-ethylcoprostanol and 24-ethylepicoprostanol), based on 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 swine and cattle faecal contamination in the environment via runoff after manure spreading.

II/- MATERIALS AND METHODS

II/-1 Study site

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 a randomized 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. IV.1.

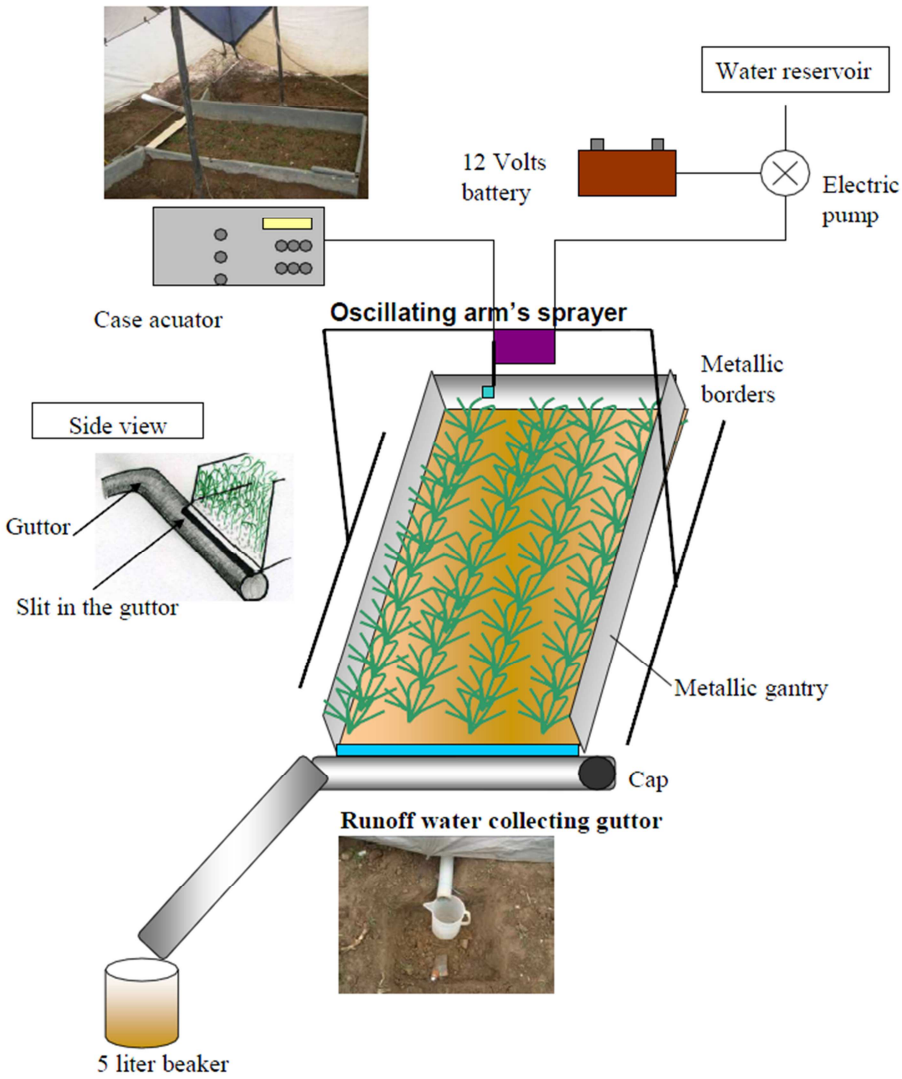


Figure IV.1: Schematic diagram of the rainfall experiment.

II/-1-1 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 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 $kg.m^{-2}$, corresponding to the agronomic nitrogen requirement for maize cultivation (60 $kg.N.ha^{-1}$). Cattle manure was also manually applied at 3.2 $kg.m^{-2}$ (54 $kg.N.ha^{-1}$). The carbon content of the swine slurry and cattle manure, respectively, was 41.7 and 47.2 $g.kg^{-1}$ on a dry matter basis, while the nitrogen content was 2.2 and 1.6 $g.kg^{-1}$ on a dry matter basis. Applications were carried out two hours before the rainfall simulation.

II/-1-2 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^2 flask after one minute. As presented in Table IV.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 mm h^{-1} (on swine slurry-amended soils) to 69 $mm.h^{-1}$ (on cattle manure-amended soils). The average rainfall intensity was about 67 $mm.h^{-1}$. The volume of cumulated runoff was similar for the three treatments (control, swine slurry and cattle manure; 11.6 to 11.8 mm*)*. 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 IV.1: Hydrological characteristics of rainfall simulation events. Average and Standard error of three replicates are reported.

Treatment	Rainfall intensity ($mm.h^{-1}$)	Cumulated runoff (mm)	Simulation time (min)
Control	63 ±2	11.8 ±0.3	50 ±11
Swine 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 4L 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. Microbial and chemical analysis were carried out on both groundwater and soil samples.

II/-1-3 Runoff water sampling

Before sample collection, runoff water 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.

II/-2 Microbial methods

II/-2-1 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™ 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).

II/-2-2 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. For swine slurry, cattle manure and runoff water samples, DNA was extracted by using a FastDNA spin kit for soil (MP Biomedical, Illkirsh, France) according to the supplier's instructions, with an additional wash using SEWS-M reagent as suggested by Dick et al (2005).

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 7×10^5 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 *Not*I enzyme (Roche Diagnostics), as described in Mieszkin *et al.* (2009). Dilutions ranged from 1.6×10^7 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.,* 2004; 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.

II/-3 Chemical methods

II/-3-1 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 ±5%, based on repeated measurements of standard solutions (K-phtalate).

II/-3-2 Steroid analyses

For the steroids, 100 g of swine slurry and cattle manure samples were kept frozen for 2 days at -10 °C, and then freeze-dried for 3 days before analysis. 400 ml of runoff water sample were filtered at 0.7 µm 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 described in 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 °C, 130 bar, 5 min heat-up time, two cycles of 5 min, static time, 150 % flush, 200 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)trifuoroacetamide (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 °C. The chromatographic separation was performed on a capillary fused silica SLBTM-5ms (from Supelco, length: 60 m; diameter: 0.25 mm; film thickness: 0.25 µm) under the following heating program: 70°C (held for 1 min) to 130 °C at 15 °C min^{-1}, then 130 °C to 300 °C (held for 15 min) at 3 °C min^{-1}. The flow of helium was maintained at 1 $mL.min^{-1}$. The chromatograph was coupled to the mass spectrometer by a transfer line heated at 250°C. 1µl of the polar fraction was injected into the GC-MS. The steroid compounds were quantified by adding $^{2}H_{6}$-cholestane as internal standard in the solution.

II/-3-3 Fluorescence

Swine slurry, cattle manure and soil were air dried and analysed for fluorescence properties the day following storage at 4°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°C for 16 hours with periodic manual shaking. For the soil samples, dissolved organic matter was extracted using 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 µm 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 $mg.L^{-1}$ 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. IV.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±0.5 (*n=10*)).

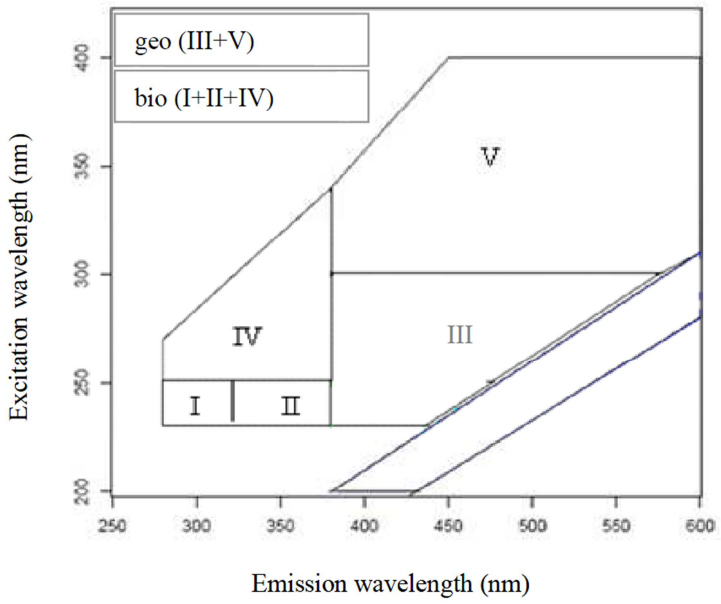


Figure IV.2: 3-D fluorescence regions.

II/-4 Statistical Analysis

Before statistical analysis all microbial parameter values for each replicate were log10 transformed as appropriate. The arithmetic means and the standard errors are presented in all the tables. Analysis of variance (ANOVA) was used to test for differences according to the fertilization modality and the 2 step of rain simulation, and the resulting mean separations were performed using the protected least significant difference (PLSD) fisher test. All statistical analysis were performed using Statistica version 7 (statsoft).

III/- RESULTS AND DISCUSSION

III/-1 Swine slurry, cattle manure and soil

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

The average concentrations of faecal indicators were 3×10^4 *E. coli*/g and 3.5×10^4 enterococci /g in the swine slurry and 5.1×10^4 *E. coli*/g and 8.5×10^4 enterococci/g in the cattle manure (Table IV.2). These values were 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 IV.2: Faecal indicators, microbiological and chemical markers in swine slurry and cattle manure.

	Swine slurry	**Cattle manure**
Faecal indicator		
*E. coli (*UFC/g)	$3x10^4\pm 7.1x10^{3\ a}$	$5.1x10^4 \pm 4.5x10^{4\ a}$
Enterococci (UFC/g)	$3.5x10^4\pm 9.5x10^{3\ a}$	$8.5x10^4\pm 1x10^{4\ b}$
F-specific coliphages (UFP/g)*	$1.5x10^{3\ a}$	$8.5x10^{2\ b}$
Host-specific bacterial markers		
L. amylovorus (cells/g)	$1.8x10^7\pm 1.5x10^7$	< LQ
Pig-2-bac (copies/g)	$8.5x10^6\pm 7.1x10^6$	<LQ
Rum-2-bac (copies/g)	<LQ	$2.4x10^7\pm 2.4x10^6$
Chemical markers		
Coprostanol/(Cop+24-ethylcop), in %	58.8±1.5 [a]	45.4±1.0 [b]
Sitostanol/Coprostanol	0.22±0.02 [a]	2.70±0.13 [b]
Bio/Geo	0.47±0.003 [a]	0.30±0.003 [b]
Geochemical Fluorescence Index	1.33±0.01 [a]	1.26±0.02 [b]

LQ : limit of quantification
*Swine slurry has been artificially spiked with bacteriophages
mean ± SE (n=3) except for F-pecific coliphages (one analysis)
For each parameter, values are not significantly different ($p < 0,05$) if they have the same letter.

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 1.5×10^3 PFU/g. In the cattle manure, the average concentration of F specific coliphages was 8.5×10^2 PFU/g. This value is

of the same order as results obtained by Schaper *et al.* (2002), who found averages of 3×10^3 PFU and 1.2 10^2 per g in swine slurry and cattle manure, respectively.

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

The steroid profiles of swine slurry and cattle manure were dominated by C_{27}, C_{28} and C_{29} compounds. The major steroids detected in swine slurry were coprostanol (25.7 %), 24-ethylcoprostanol (17.1 %) and cholestanol (9.5 %), while the dominant sterols in cattle manure were 24-ethylepicoprostanol (16.5 %), sitostanol (13.6 %) and sitosterol (10.7 %). 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.*, 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_{27} steroids are major compounds of omnivorous and carnivorous animal faeces, while C_{28} and C_{29} 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_{27} steroid compounds (% C_{27} steroids) and C_{28}+C_{29} steroid compounds (%C_{28}+C_{29} steroids) in our samples. The results showed that swine slurry had similar proportions of C_{27} (47.4 %) and C_{28}+C_{29} steroids (44.2 %), whereas cattle manure was enriched in C_{28}+C_{29} (63.8 %) compared to C_{27} steroids (28.1 %). Moreover, several ratios between sterol and stanol can be used to discriminate between the sources of steroid compounds (Takada and Eganhouse, 1998; Standley *et al.*, 2000; Bull *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2008). Two ratios were 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 IV.2 reports the ratios obtained in the present study. Swine slurry was characterised by an R1 ratio of 59 % whereas cattle manure had a R1 ratio < 50 %. Moreover, swine slurry samples had an R2 <1, whereas cattle manure were characterised by R2 ratios >1. These two ratios (R1 and R2) allow us to distinguish significantly ($p < 0.05$) 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) were significantly different ($p<0.05$) and were 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 were detected in the soil used for the experiment. Nevertheless, the fluorescence fingerprint measured in the animal manures was significantly ($p < 0.05$) different from that measured in the soil (Bio/Geo: 0.10; GFI: 1.11).

III/-2 Rainfall event

III/-2-1 Dynamics of faecal indicators and dissolved organic carbon concentrations in runoff waters

Figure IV.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 were not detected in runoff water from the control soil. In these samples, concentrations of DOC were very low and ranged from 3 to 4 $mg.L^{-1}$. After spreading of swine slurry, both faecal indicators were carried away in the runoff water. Their average concentrations in runoff waters ranged from 7×10^4 *E. coli* and 5×10^4 enterococci /100 mL in the first sample to 8×10^3 *E. coli* and 5×10^3 enterococci /100 mL in the second sample. Concentrations of F specific coliphages exhibited a similar pattern, and DOC concentrations decreased from 67 to 23

mg.L^{-1} in runoff waters. After spreading of cattle manure, the time-evolution of the bacterial indicators, F specific coliphages and DOC differed from the pattern observed for runoff samples from swine-slurry-amended soils. Indeed, average bacterial indicator concentrations firstly increased in the first five litres of cumulated runoff from 1×10^5 to 5×10^5 CFU/100 mL, and then decreased slightly to 8×10^4 CFU/100 mL at the end of the experiment. DOC concentrations followed the same trend throughout the experiment on cattle-manure-amended soils. They firstly increased from 22 to 47 mg L^{-1} in the first five litres of cumulated runoff, then decreased to 30 mg L^{-1} 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: 10^9 to 10^5 CFU/100 mL and 10^8 to 10^3 CFU/100 mL, respectively, for a rainfall intensity of 90 mm h^{-1} lasting 30 min (Soupir *et al.*, 2006) or 10^7 to 10^6 CFU/100 mL in the case of enterococci for a rainfall intensity of 27 mm h^{-1} lasting 30 min (Brooks *et al*., 2009). As described by Heinonen-Tanski and Uusi-Kämppä (2001), there can be a significant runoff of faecal microorganisms if the soil is wet and if there are heavy rains after the animal manure application. These results also indicated that the application of animal manure strongly increased (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).

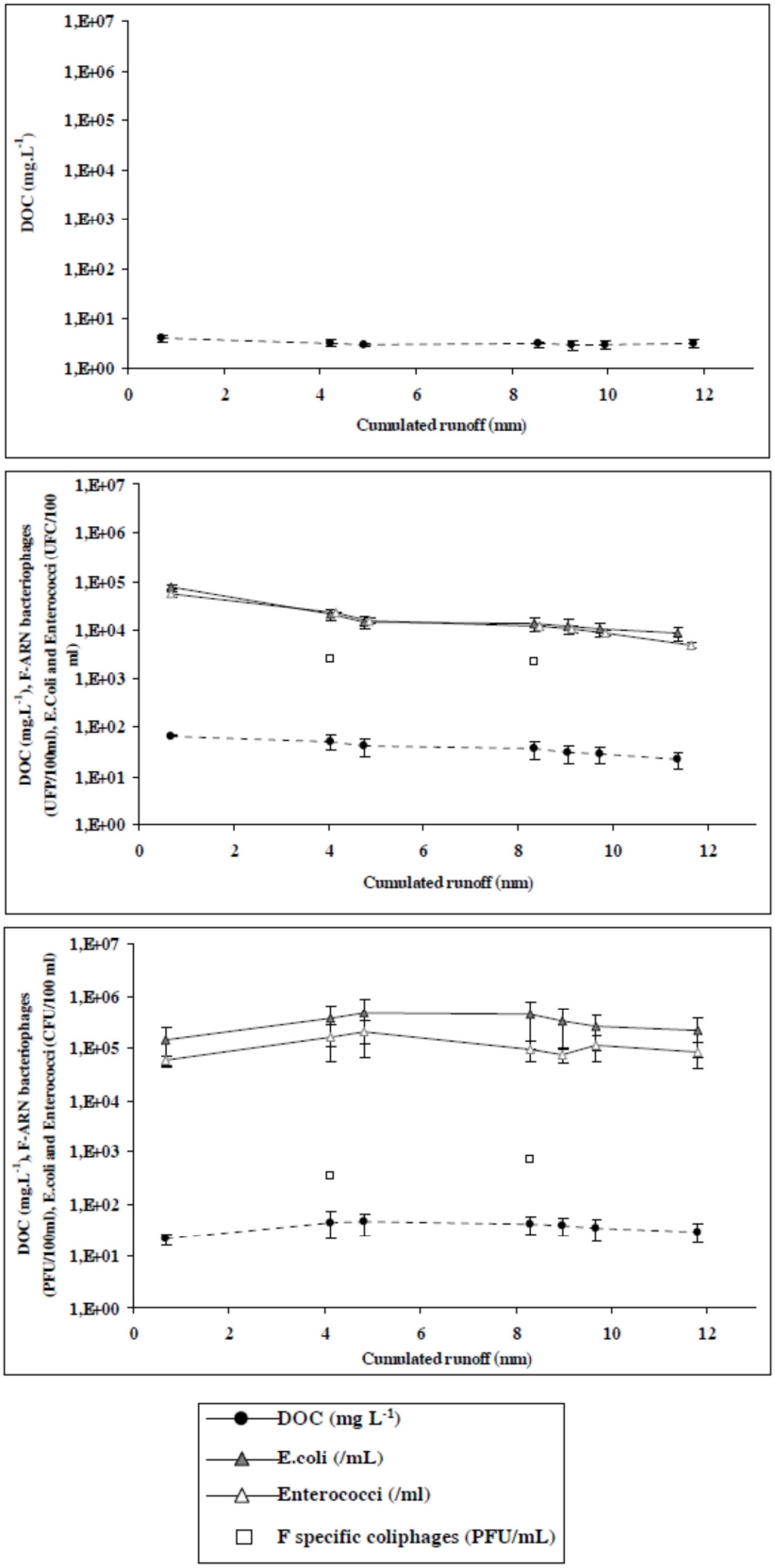


Figure IV.3: Faecal indicators and chemical parameters in the runoff water.

The results showed 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 were probably mobilized in the first few litres of runoff water. The concentrations regularly decreased during the course of the experiment. Cattle manure is a heterogeneous mixture of cowpat and straw. During the rain simulation experiment, we hypothesized that the rain firstly washed the cow manure by preferentially carrying away cowpat in the runoff water. This hypothesis was supported by visual observation during the experiment, and was 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-Kämppä, 2001; Berry *et al*., 2007; Lapen *et al*., 2008), whereas solid wastes enhance retention of the micoorganisms by the soil surface (Chetochine *et al.*, 2006; Gottschall *et al*., 2009; Horswell *et al*., 2010).

During the rainfall simulation, the entire runoff event was collected. Table IV.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 ranged 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 were not retained in the surface, and they were released in runoff water in greater proportions ranging from 4.1 to 15.5 %.

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

	Swine slurry				**Cow manure**			
	cumulated runoff (L)	**% release**			**cumulated runoff (L)**	**% release**		
		E. coli	Enterococci	Coliphages		*E. coli*	Enterococci	Coliphages
Replicate 01	11.7	2.3	1.9	8.0	11.6	28.3	8.7	2.8
Replicate 02	11.9	2.0	2.3	4.1	11.8	5.2	2.6	2.9
Replicate 03	11.9	4.7	2.9	15.5	11.5	5.6	1.1	0.4

III/-2-2 Dynamics of host-specific bacterial and chemical markers in runoff waters

Table IV.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 were less than the quantification limit. After spreading of swine slurry or cattle manure, *L. amylovorus*, the Pig-2-Bac and the Rum-2-Bac markers were quantified at a level ranging between 7.1×10^5 and 4.8×10^7 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 $\log_{10}$ 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 was 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 were: 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 were: 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 IV.4 showed that average R1 and R2 ratios ranged 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 ranged 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 and are significantly different from those measured in swine slurry runoff. The results did 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 showed that R1 and R2 ratios in runoff samples from animal manure-amended soils were 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 were 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) are significantly different ($p < 0,05$) and remained 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 were 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 not significantly different ($p<0.05$) from the values measured on swine slurry raw faeces (1.33). GFIs in runoff from the cattle manure treatment (1.28 - 1.22) were similar to the values measured in cattle manure raw faeces (1.26), while runoff waters from swine slurry and cattle manure treatments yield values not significantly different from 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 swine 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 microbial and chemical markers were 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 application of both microbial and chemical markers in a field study of a rain

simulation is an original approach. In the future, the minimum data set to discriminate bovine from swine or human faecal contamination in river catchments will be investigated.

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

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

n.d : not detected, LQ : limit of quantification, mean ± SE (n=3)
For each parameter, values are not significantly different (p<0,05) if they have the same letter.

IV/- CONCLUSIONS

Swine slurry and cattle manure application was linked to increased microbial and dissolved organic carbon in runoff after storm events. Our study demonstrated 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 between swine and cattle faecal contamination in the environment *via* runoff after manure spreading. Among all the tested markers in this study, the fluorescence geochemical GFI could not be used for faecal contamination detection and can not be improved.

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.

ACKNOWLEDGMENTS:

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 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 SourceSpecific 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. Verocytoxigenic 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. Rodehutskors, 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 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. 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: comparaison 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-Kämppä. 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 5b-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. McLaughlint 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. Llaneza, 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 CO2 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 waster-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.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude avait pour but d'étudier le transfert des marqueurs chimiques et microbiens au cours de changement de matrices (déjections/sols/eaux) et de valider ces marqueurs pour tracer la contamination fécale dans le milieu naturel. Pour cela, un épisode de pluie caractéristique d'une pluie moyenne (67 $mm.h^{-1}$) en Bretagne fréquente au printemps à la période des épandages a été reproduit sur une parcelle agricole expérimentale ayant reçus des déjections.

L'ensemble des marqueurs microbiens et chimiques (sauf les marqueurs de fluorescence) initialement trouvés dans les déjections ont été retrouvés dans les eaux de ruissellement et ont permis la différenciation des deux sources. Ainsi les mécanismes de transfert n'interfèrent pas sur la capacité des marqueurs sélectionnés à identifier et différencier ces deux sources de contaminations, ils sont donc tous validés.

Dans cette étude, les stéroïdes sont utilisés sous la forme de deux rapports (R1 et R2). Ces rapports ont permis de montrer qu'il y avait bien un transfert du signal pendant le changement de matrice et donc conservation du signal. Dans la précédente étude sur les déjections brutes, les rapports de stéroïdes avaient été remis en cause par manque de spécificité. Une analyse par ACP de six stanols avait alors été développée permettant discriminer l'ensemble des échantillons de déjections porcines et bovines analysés. Cette analyse a été appliquée avec succès aux eaux de ruissellement utilisées au cours de la présente étude et fait l'objet du chapitre 5.

Les déjections animales ne sont pas la seule source potentielle de contamination fécale au sein d'un système naturel. En effet, la synthèse bibliographique réalisée au chapitre 1 a mis en exergue que les contaminations fécales sont majoritairement liées à des insuffisances structurelles de stations d'épuration domestique. Le pôle humain via des rejets directs de STEP et/ou de systèmes autonomes ou via des épandages de boues de STEP n'a pas encore été exploré au cours de cette thèse. Il est donc apparu essentiel de le caractériser comme cela a pu être fait pour les déjections animales et de le valider là encore en conditions contrôlées (eaux dopées par un effluent de STEP) et en milieu naturel (suivi d'eaux de rivière en sortie de STEP).

Chapitre 5 - Les stanols sont-ils aptes à identifier l'origine des contaminations fécales dans les eaux dans le cas de contaminations multi-sources: comparaison avec les marqueurs microbiologiques?

CONTEXTE ET OBJECTIFS

La synthèse bibliographique du chapitre 1 a mis en évidence que le développement et la validation d'un marqueur se fait en plusieurs étapes. La première étape - qui a fait l'objet du premier article de cette thèse (Chapitre 3) - a consisté à tester la capacité des stéroïdes à différencier deux pôles sources d'origine animale (i.e. déjections d'origine bovine et d'origine porcine). Dans cette étude, il a été montré que l'utilisation d'une analyse statistique (ACP) basée sur la distribution de 6 stanols (coprostanol, epicoprostanol, campestanol, sitostanol, 24-ethylcoprostanol et 24-ethylépicoprostanol) était capable de différencier aisément ces deux types de déjections. La deuxième étape a consisté à étudier, en conditions contrôlées, le transfert de la signature des stéroïdes des déjections animales via les sols vers les eaux.

Deux questions restent en suspens à la suite de ces deux premières études : 1) est-ce que l'outil développé est apte à distinguer les rejets de STEP d'origine humaine des déjections animales ? et 2) est-ce que l'outil développé est suffisamment viable et robuste pour discriminer les contaminations fécales dans le milieu naturel soumis à des contaminations multi-sources ?

C'est pourquoi cette étude vise à :

- Tester la capacité de la méthode développée à discriminer trois pôles différents (bovin, porcin et humain) en analysant des échantillons d'influents et d'effluents de STEP et en les injectant à l'ACP développée préalablement. ;
- Etudier le transfert des « signatures stéroïdes » des pôles sources vers les eaux en analysant des expérimentations en milieu contrôlé sur le terrain ou au laboratoire.
- Appliquer l'analyse statistique de la distribution des stanols à deux bassins versants subissant des contaminations récurrentes mono- (d'origine animale) et multi-sources (d'origine animale et humaine) et comparer les résultats obtenus à d'autres marqueurs microbiens et chimiques. L'enjeu ultime étant de fournir une boîte à outils aux collectivités pour répondre aux demandes imposées par les nouvelles réglementations européennes et identifier l'origine des contaminations fécales.

En préparation pour la revue *Water Research*.

Testing the capacity of stanols to identify the origin of faecal contamination in waters: comparison of human and animal signatures and comparison with microbial markers

Morgane Derrien[a], Emilie Jardé [a,*], Gérard Gruau [a], Anne-Marie Pourcher [b], Michèle Gourmelon [c], Alain Jadas-Hécart [d] and Anne-Catherine Pierson Wickmann [a]

[a] Géosciences Rennes, UMR CNRS-Université de Rennes I, France

[b] Cemagref, Rennes, France

[c] Ifremer, EMP, Laboratoire de Microbiologie, Plouzané, France

[d] Université d'Angers, France

ABSTRACT

Improving the microbiological quality of coastal and river waters relies on the development of reliable markers capable of determining faecal contamination sources. Recently, a principal component analysis (PCA) method based on six stanol compounds (i.e. coprostanol, epicoprostanol, campestanol, sitostanol, 24-ethylcoprostanol, 24-ethylepicoprostanol) has been shown to be suitable for distinguishing between porcine and

bovine faeces. In this study, we tested whether this 6-stanol-based PCA method could become a method of more general interest, suitable for tracking faecal contamination sources in waters from areas of intensive agriculture where the contamination context is often marked by the co-existence of human, bovine and porcine faecal contamination sources. In particular, well-defined and stable clusters have been found in PCA score plots gathering samples of "pure" human, bovine and porcine faeces along with runoff and diluted waters on known contamination origin, which should allow *a priori* to determine clearly which of these three sources is dominantly involved in the faecal contamination of given water. A good consistency has also been observed between the source assignments made by the 6-stanol-based PCA method for river waters contaminated by faecal matters of unknown origin. More generally, the tests conducted in this study argue for an introduction of the 6-stanol-based PCA method in the MST toolbox to help identifying faecal contamination sources. The data presented in this study show that this introduction could improve determination of faecal contamination sources in conditions where microbiological tools may be poorly or not operating, including the cases of relatively old contaminations or of a contamination of moderate to relatively low intensity.

Key words: stanols; faecal contamination; microbial source tracking; microbial markers; Bacteroidales; principal component analysis.

I/- INTRODUCTION

Faecal contaminations from human and animal wastes not only contribute to the degradation of aquatic systems but also affect water quality posing serious threat to human health from exposure to pathogenic bacteria, viruses, and protozoa (Sinton *et al.*, 1998; Pruss *et al.*, 1998; van Asperen *et al.*, 1998). Health risks are particularly acute in bathing and shellfish haversting waters and could result in negative touristic impacts and economic losses due to bathing prohibition or shellfish farming areas closure (Yoder *et al.*, 2008). In order to limit these risks and improve water quality, management plans and methods are required which need the development of tools capable of identifying faecal contamination sources. This need is even stronger than the water quality regulations issued by public authorities tend to be more demanding. This is particularly the case in Europe where the revised Bathing Water European Directive (2006/7/EC) recently introduced more stringent microbial concentration limits together with the need of establishing bathing water profiles requiring determination of the animal or human origin of the faecal contamination, a requirement also included in the revised European Shellfish Directive (Regulation (EC) 854/2004). Yet, the faecal indicator bacteria (FIB) such as Escherichia coli (E. coli) and enterococci used in the regulations to evidence a faecal contamination occurrence are not source specific as they are found in the faeces of most warm-blooded animals (e.g., birds, wild animals and livestock, humans; see Sinton *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2002, and references therein), thus calling to the development of other, more specific indicators.

During the past decade, several microbial and chemical markers associated with human and animal faeces, or their related effluents, have been proposed as methods to identify faecal contamination sources (Scott *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2002; Meays *et al.*, 2004; Glassmeyer *et al.*, 2005; Cimenti *et al.*, 2007). These methods collectively referred as to "Microbial Source Tracking" (MST) methods have been developed to discriminate between human and nonhuman sources of faecal contamination, and between different animal species. Chemical makers such as faecal steroids, caffeine and synthetic compounds released into urban wastewaters have been for example used to distinguish human and animal contamination (Leeming *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2008, 2009). Microbial markers including bacteria, *Archeabacteria*, viruses and protozoa have also been tested

(Bernhard and Field, 2000; Jimenez-Clavero *et al.*, 2003; Ufnar *et al.*, 2007) and compared in a few cases to the chemical MST toolbox (Blanch *et al.*, 2006; Gourmelon *et al.*, 2010).

One of the methods that may have significant advantages is the use of chemical markers such as faecal steroids. In fact, unlike bacterial methods which require in-situ treatment of samples because microbiota cannot be stored for a long time, steroids are less demanding in term of sampling and sample storage precautions making them easier to implement. Furthermore and most importantly, animal and human faeces contain considerable amount of steroids with different relative proportions, leading to the possibility of using particular sterol and/or stanol ratios as faecal contamination source markers. Six such ratios (i.e. $5\beta C_{27+29}/C_{27+29}$; $5\beta C_{27+29}/C_{27+29}$; $5\beta C_{27+29}/C_{27+29}$; 5β-stanols/$C_{27}$; [cop/(cop+24-ethylcop)]*100; Sitostanol/Coprostanol) have been developed and used in this way in the recent past (Grimalt et al., 1990; Fattore et al., 1996; Leeming et al., 1996; Bull et al., 2002; Jardé et al., 2007a, 2007b; Shah et al., 2007; Gourmelon et al., 2010). This use of steroid ratios, however, was very recently questioned by the demonstration of an overlapping of values of certain animal sources (namely porcine and bovine) hitherto supposed to have specific values for these ratios (Derrien et al., 2011). Does this mean that faecal steroids are no longer usable for tracking faecal contamination sources? The answer to this question might be negative insofar as it has been shown that a principal component analysis (PCA) method based on 6 stanol compounds (i.e. 5β-cholestan-3β-ol (coprostanol), 5β-cholestan-3α-ol (epicoprostanol), 24-methyl-5α-cholestan-3β-ol (campestanol), 24-ethyl-5α-cholestan-3β-ol (sitostanol), 24-ethyl-5β-cholestan-3β-ol (24-ethylcoprostanol) and 24-ethyl-5β-cholestan-3α-ol (24-ethylepicoprostanol)) allowed to circumvent the above mentioned ratio specificity loss problem (Derrien *et al.*, 2011). However, this 6-stanol-based PCA method has been so far tested only on two animal sources - namely porcine and bovine - and its ability to discriminate between animal and human sources remains thus to be established. Also to be established is the ability of the 6-stanol-based PCA method to allow discrimination between porcine and bovine sources, after the faeces will have been transported from the soils to the water. Indeed, the discriminating capacity of the method has been so far established by confronting stanol analyses only of porcine and bovine faeces (Derrien *et al.*, 2011). However, animal faeces are usually only accidentally discharged directly into water. Most commonly, they are applied onto agricultural soils and it is their transfer by runoff during rainfall events which can lead to

water contamination. The question therefore arises whether the transport of the faeces by runoff could lead to a loss of specificity of the 6-stanol-based PCA method. Finally, the method also lacks a test in the context of waters impacted by several faecal contamination sources, as well as a comparison with other MST methods, particularly those relying on viral and bacterial markers. Indeed, no single source tracking microbial or chemical method appears sufficiently discriminatory to identify the origin of faecal contamination in water (Griffith *et al.*, 2003; Blanch *et al.*, 2006; Field and Samadpour, 2007), making it very important to compare the methods one against each other. Also, chemical markers may not behave like microorganisms in waters (half-lifes may be for example different; see Solecki *et al.*, 2011), and it is therefore essential to compare chemical-based MST methods with microbial-based MST methods before validating the formers as reliable contamination source tracking methods.

Given the problems outlined above, a three-step study was conducted. In the first step, the samples previously used by Derrien *et al.* (2011) to set up the 6-stanol-based PCA method were pooled and treated together with a series of influent/effluent samples from urban wastewater treatment plants (WWTP) to verify the ability of the method to discriminate between "pure" porcine, bovine and human faecal sources. In a second step, results obtained earlier on i) runoff waters from soils amended with porcine and bovine faeces (Jaffrezic *et al.*, 2010) and ii) WWTP effluent samples diluted in fresh- and sea-water (Solecki *et al.*, 2011; Jeanneau *et al.*, 2011) were added to the "pure" faecal source data base and treated along with this data base to test the capacity of the 6-stanol-based PCA method to resist to faeces dilution and to faeces transport by runoff. Finally, in a third step, the method was applied to water samples from two coastal river basins (the *Daoulas* and *Pénerf* river basins) undergoing recurrent animal and human faecal contaminations, and its results compared with information provided by microbial and other chemical tracers (Gourmelon *et al.*, 2010; Mieszkin *et al.*, 2009, 2010) as regards the true source(s) of the faecal contamination.

This study aims at (i) developing further a chemometric analysis of the stanol part of the steroid fingerprint in order to discriminate human, from bovine and porcine faecal contamination sources, and (ii) validating this tool in natural waters impacted by multiple contamination sources in comparison with microbial and other chemical markers. This study

will contribute to further development and validation of the MST toolbox, especially in the context of coastal areas subjected to intensive agriculture.

II/- MATERIALS AND METHODS

II/-1 Type and origin of samples

All samples analysed and treated statistically in this study come from Brittany by a majority and from Maine et Loire, western France. Brittany supports more than half of the total French pig livestock that generates from 8 to 10 million tons of pig slurry each year (the major part of it is spread onto agricultural land), and is also the first French agricultural region for dairy production that lead to the production of 20 million of tons of bovine manure annually (the major part of it is also spread onto agricultural land). Brittany also combines an important tourist activity along its 1000 km of coastline with many bathing areas. It is also one of the leading French regions as regard shellfish production. Finally, a significant proportion of the population is concentrated along the coast. Taken together, these features make Brittany an area potentially prone to a faecal contamination of its coastal waters of mixed agricultural-urban origin, and also an ideal target for developing, testing and comparing MST methods, in the context of coastal areas subjected to intensive agriculture.

II/-1-1 Concentrated and diluted "pure" animal source samples

The "pure" animal manure data include published stanol results from i) nineteen samples of concentrated bovine faeces and ii) six samples of diluted bovine faeces investigated previously by Mieszkin *et al.* (2010), Derrien *et al.* (2011) and Jaffrézic *et al.* (2011). The concentrated bovine faeces samples comprise a mixed population of six fresh cowpats, nine fresh manure and four aged (between 4 and 6 months old) aged bovine manures while the six samples of diluted bovine faeces correspond to runoff waters collected during rainfall simulations performed on an agricultural experimental plot previously spread with bovine manure.

Published stanol results for "pure", concentrated and diluted porcine samples which were included in the present study comprise i) four fresh raw pig slurries, four aged (between 1 and

9 months old) raw pig slurries, four physically treated pig slurries and four chemically treated pig slurries previously analyzed by Derrien *et al.* (2011), and ii) six samples of runoff water collected during rainfall simulations carried out on an agricultural experimental plot previously spread with porcine manure and analyzed earlier by Jaffrézic *et al.* (2011).

Details regarding sampling techniques, sample characteristics and sample storage conditions can be found in Mieszkin *et al.* (2010), Derrien *et al.* (2011) and Jaffrézic *et al.* (2011).

II/-1-2 Concentrated and diluted "pure" human source samples

Thirty five samples of WWTP influents (i.e. 17), effluents (i.e. 16) and sludge (i.e. 2) coming from 20 different WWTP were also included in the statistical analysis. Among these thirty five samples, four correspond to samples previously investigated by Gourmelon *et al.* (2010), the thirty one remaining being new samples whose steroid profiles were determined in this study.

Six diluted WWTP samples were also included. The later were prepared by artificially seeding three fresh water samples and three seawater samples with a WWTP effluent at a 1:18 dilution ratio. The total mixing procedure including the seawater, freshwater and WWTP effluent provenance is described in Jeanneau *et al.* (in submission), who also provided the steroid analyses of these samples.

II/-1-3 Samples from the *Daoulas* and *Pénerf* river basins

Three samples from the *Daoulas* river and six samples from the *Pénerf* river basin were used to confront the diagnosis made by the 6-stanol-based ACP method with the information provided by the microbial markers in the context of real rivers suffering bacterial contamination. The *Daoulas* river is a river located in Western Brittany flowing through an agricultural area associated with intensive bovine grazing. Stanol chemical and microbial marker data from the three samples come from the study of Gourmelon et al. (2011) (samples C1-C3), and the reader is referred to this study for information on the sampling protocols and analytical methods used. Samples from the *Pénerf* river basin are in contrast new samples, specifically analyzed for this study.

The *Pénerf* river basin is a small (136 km^2) coastal river basin located in SW Brittany, near the city of Vannes (Figure 1). The estuarine portion of the basin near *Damgan* and *La Tour du Parc* is the site of an important shellfish activity, with no fewer than 53 shellfish farms spread over 235 ha. The two main rivers draining the basin (namely the *Drayac* and the *Surzur* rivers) were sampled (see Figure V.1 for sample location). Microbial contamination is recurrent in these rivers, as shown by the monthly monitoring of *E. coli* concentrations performed in 2008 and 2009, and which revealed concentrations temporarily as high as 1.10^5 cells/100 mL in both rivers. Two sources are believed to be involved in this contamination, including i) non-point sources mobilizing the dairy farms occupying the river basin and ii) point sources comprising the one municipal and two industrial (food industries) WWTPs that discharge wastewaters in the *Drayac* and *Surzur* rivers (see Figure V.1). The sampling strategy was adapted to the first situation with two samples (W5 and W6) and to the second situation with one sample (W6) taken a few meters downstream of one of the two municipal WWTPs, and three (W1, W2, W3) taken between 5 and 25 m downstream of the two industrial WWTPs. All samples were collected the same day, May 25, 2010.

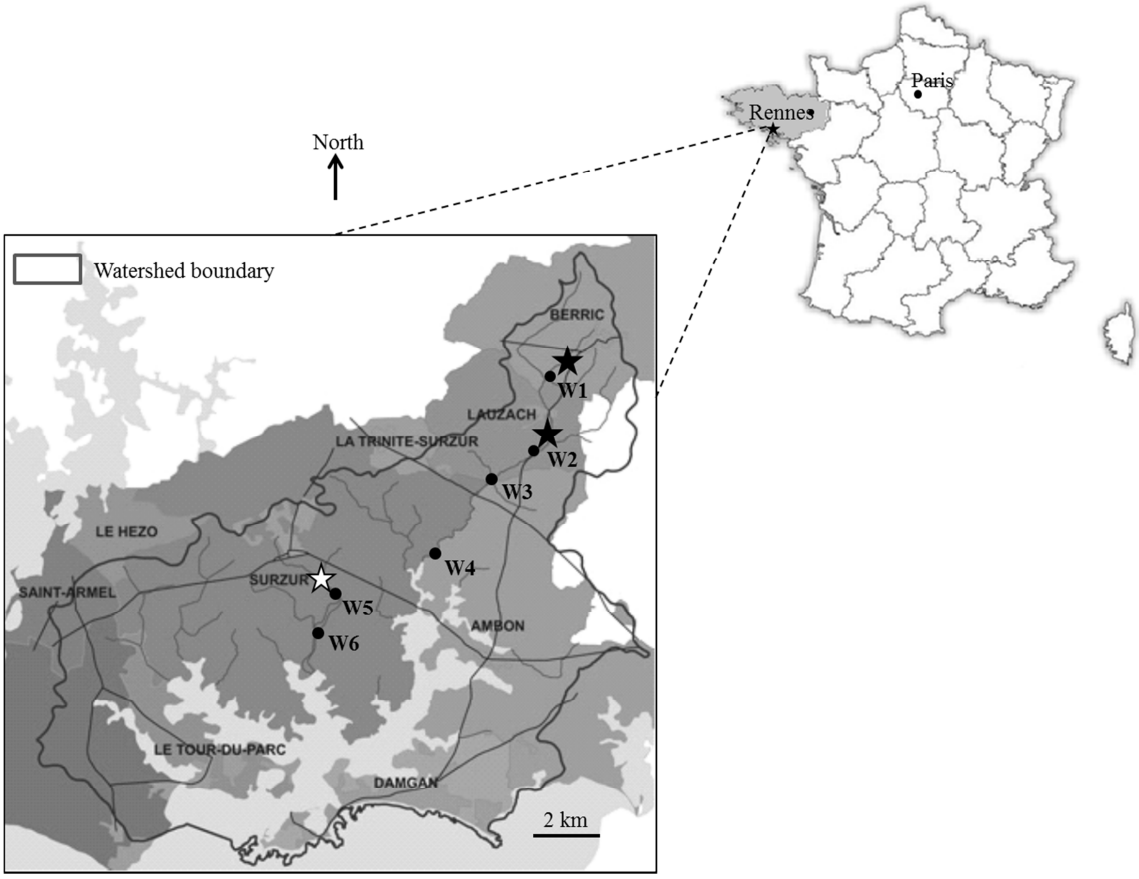


Figure V.1: Location map of the Pénerf river basin showing the position of the analyzed river samples. Also indicated is the location of the municipal (open star) and industrial (filled star) waste water treatment plant.

II/-2 Analytical methods

Only the methods used to obtain the new data presented in this article are briefly described below. The reader interested in the analytical protocols used to acquire other data used in this study is referred to articles by Mieszkin *et al.* (2009, 2010), Gourmelon *et al.* (2010), Jaffrézic *et al.* (2011), Derrien *et al.* (2011), and Jeanneau *et al.* (2011).

II/-2-1 Stanols

Samples from the *Pénerf* river basin and from the WWTP newly analyzed in this study (about 1L) were first filtered through glass fiber filters (0.7 µm, Whatman GF/F). Faecal stanols were then extracted from the dissolved phase using Supelco ENVI Disk C18 (Jeanneau et al., 2011) and susequently quantified using a Shimadzu QP2010+MS gas chromatography/mass spectrometry (Shimadzu, Tokyo, Japan). All stanol compounds were

analysed as their trimethylsilyl derivatives. The GC-MS analysis and quantification of steroid compounds has been described in Derrien *et al.* (2011) and Jeanneau *et al.* (2011). The linearity of the calibration curves, as well as information regarding the detection limits and nature of the m/z fragments used for the identification and quantification of the 6 stanols investigated in this study are presented in Table V.1.

Table V.1: Usual and trivial names of the six stanol compounds used in this study. Also given in the table are the chemical formula of the compounds as well as the m/z values used for their identification and quantification. Regression coefficient of calibration curves and detection and quantification limits are also indicated. The numerical symbols encrypted in column 3 allow location of the compounds in Figure 2.

IUPAC name	Trivial name	Symbol	m/z		Quantification characteristics		
			Identification	*Quantification*	Standard	Linearity	DL[1] (ppb)
5β-Cholestan-3β-ol	Coprostanol	1	257, 355, 370	215	Coprostanol	0.996	5
5β-Cholestan-3α-ol	Epicoprostanol	2	257, 355, 370	215	Epicoprostanol	0.996	5
24-Methyl-5α-cholestan-3β-ol	Campestanol	3	369, 398, 484	215	Campesterol	0.997	5
24-Ethyl-5α-cholestan-3β-ol	Sitostanol	4	383, 398, 473	215	Sitostanol	0.989	10
24-Ethyl-5β-cholestan-3β-ol	24-Ethylcoprostanol	5	257, 383, 398	215	Campesterol	0.997	5
24-Ethyl-5β-cholestan-3α-ol	24-Ethylepicoprostanol	6	257, 283, 398	215	Campesterol	0.997	5

II/-2-2 Microbial markers

The enumeration of *E.coli* was performed using the culture methods described previously by Solecki *et al.* (2011). Briefly, counts were achieved either by serial dilution or by filtration of 100 mL of sample on a 0.45 µm cellulose membrane. The filter or 0.1 mL of appropriate dilution was then plated on TBX agar. The detection limit was 1 colony forming units (CFU) per 100mL.

Along with E. coli, three microbial markers were investigated in this study. These include two host-specific *Bacteriodales* markers - namely i) HF 183 which is known to specifically trace human contamination and ii) Rum-2-Bac which traces bovine contamination (Mieszkin *et al.*, 2010) - and one pig-specific bacterial marker *Lactobacillus amylovorus* (*L. amy*) (Marti *et al.*, 2010). The quantification of HF183, Rum-2-bac and *L. amy* were performed by real-time PCR using the methods described by Gourmelon *et al.* (2010), Mieszkin *et al.* (2010) and Konstantinov *et al.* (2005), respectively. The limits of quantification were $1x10^3$ genes copies/100mL for HF183 and Rum-2bac, and 10^3 CFU equivalents/ 100mL for L. *amy.*

II/-2-3 Caffeine and TCEP

Two compounds - caffeine and tri(2-chloroethyl)phosphate (TCEP) – among the 35 chemical compounds recognized to be indicative of anthropogenic contamination have been analyzed in the *Pénerf* samples along with the stanols and above microbial markers. Both compounds were extracted from the dissolved phase (<1.2 µm) by solid phase extraction using Oasis HLB cartridge and then quantified using a gas chromatography coupled to a tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) using an ion trap mass spectrometer following the method described in details in Gourmelon *et al.* (2010). The limit of quantification of these two compounds was 0.04 µg/L.

II/-3 Statistical analysis

Among multivariate methods (Fraley *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1998), Principal Component Analysis (PCA) is useful for revealing correlation patterns in complex databases as already emphasized by Leeming *et al.* (1996) and Saim *et al*. (2009), among others, for the whole steroid family and more recently by Derrien *et al.* (2011) for its stanol part. Based on a

rectangular data matrix containing the values of *p* quantitative variables having *n* units (also called individuals), PCA provides geometric plots of the *p* variables and *n* individuals. These plots allow identifying relationships between individuals, thereby highlighting the individuals that share common characteristics. In the same way, a representation of the variables in the so-called correlation circles can be used to evidence the type of correlation (e.g. positive or negative linear correlation) existing among the considered variables (Kim and Mueller, 1987).

In this study, we used the same 6-stanol-based PCA method as that previously set up by Derrien *et al.* (2011) to distinguish human, porcine and bovine faeces. All PCA presented hereafter were performed using the same six variables, namely coprostanol, epicoprostanol, campestanol, sitostanol, 24-ethylcoprostanol and 24-ethylepicoprostanol. Discriminant analyses were performed in each case to establish similarities within identified groups of samples or dissimilarities between sample groups. The PCA and related statistical tests were performed with XLSTAT (Addinsoft, 2010).

III/- RESULTS

III/-1 Stanol profiles of "pure" bovine, porcine and human sources

Figure V.2 displays average relative distributions (in weight %) of the six stanols used in the PCA for the bovine (cowpats and bovine manure), porcine (fresh and aged porcine manure) and human (WWTP influent, effluent and sludge samples) source samples statistically analyzed in this study. These distributions reflect the 6-stanol fingerprints as observed in three "pure" faecal contamination sources before their spreading onto agricultural land (bovine and porcine faeces) or their processing into WWTP and further discharge in river waters.

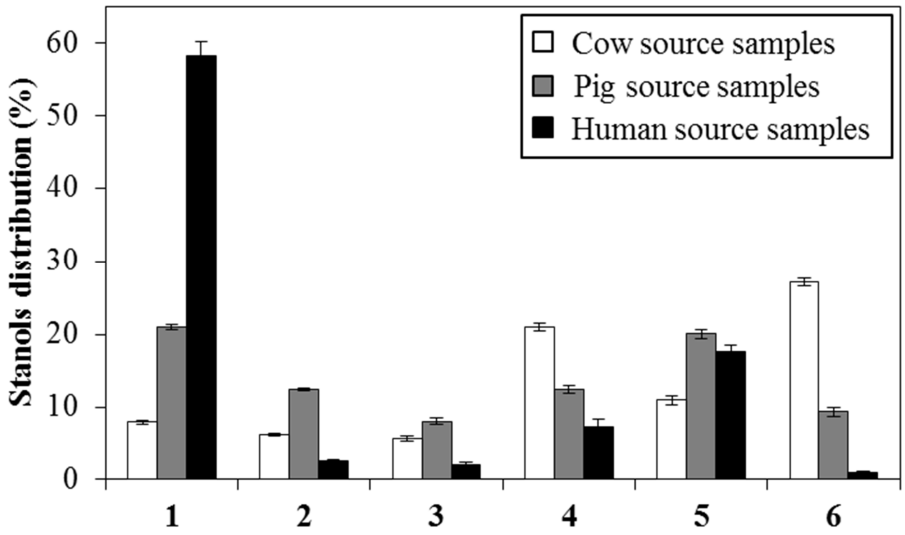


Figure V.2: Average stanols profiles (in weight % ± standard error) for the "pure" bovine, porcine and human sources as defined by the source samples analyzed in this study. Average concentrations were calculated with reference to the entire stanol series. The name of the stanol compounds is obtained by comparing the numerical symbols on the x axis of the histogram with Table 1.

As can be seen, the bovine manures samples are characterized by high proportions of 24-ethylepicoprostanol (#6, 27±0.6 %), sitostanol (#4, 21±0.6 %) and 24-ethylcoprostanol (#5, 11±0.6 %). The predominance of 5α and 5β–C_{29} stanols in these samples is typical of herbivorous animals, and is explained by the biohydrogenation of plant-derived sitosterol (Leeming *et al.*, 1996). Compared to the bovine manure, the porcine manure samples are marked by higher proportions of coprostanol (#1, 21±0.3 %), proportions that are even higher in the WWTP samples (#1, 58±1.9 %). The second most abundant stanol in both porcine manure and WWTP samples is 24-ethylcoprostanol (#5) with average relative concentrations of 20±0.6 % and 18±0.8 %, respectively. WWTP samples distinguish themselves from bovine and porcine manure samples by low to very low concentrations (<4%) of epicoprostanol (#2), campestanol (#3), sitostanol (#4), and 24-ethylepicoprostanol (#6). The elevated proportions of coprostanol observed in human and porcine source samples are typical of human and porcine faeces and are known to be due to the presence in the gut of these two animal species of specific anaerobe bacteria capable of reducing sterols to 5β-stanols (e.g. Leeming *et al.*, 1996).

III/-2 Statistical comparison of human and animal stanol signatures and effect of dilution and runoff on "pure" source stanol signatures

Figure V.3 displays the PCA analysis performed using the fifty-five porcine and bovine samples previously used by Derrien *et al.* (2011) to define these two faecal sources, along with the thirty-five WWTP samples used in this study to define human faecal sources. The first two components of this PCA explained 77.0 % of the total variance, with the first (F1) and second (F2) components of the PCA accounting for 58.6% and 18.4 %, respectively. The figure illustrates clear separation of the three sample types, evidencing that the 6 stanol-based PCA method shown by Derrien *et al.* (2001) to be capable of distinguishing bovine from porcine faeces is also capable of discriminating human faeces from bovine and porcine faeces. The main contributive variables on the F1 axis (Table V.2), in decreasing order of importance, are coprostanol (25.9 %), 24-ethylepicoprostanol (23.0 %), and sitostanol (18.4%), while 24-ethylcoprostanol (37.4 %), campestanol (25.6%) and epicoprostanol (23.1 %) are the main contributive variable on the F2 axis. Consistently with the distribution profiles, the PCA analysis reveals that coprostanol discriminates the sub-stanol series of human samples, while the bovine and porcine samples are discriminated mainly by sitostanol and 24-ethylepicoprostanol, respectively.

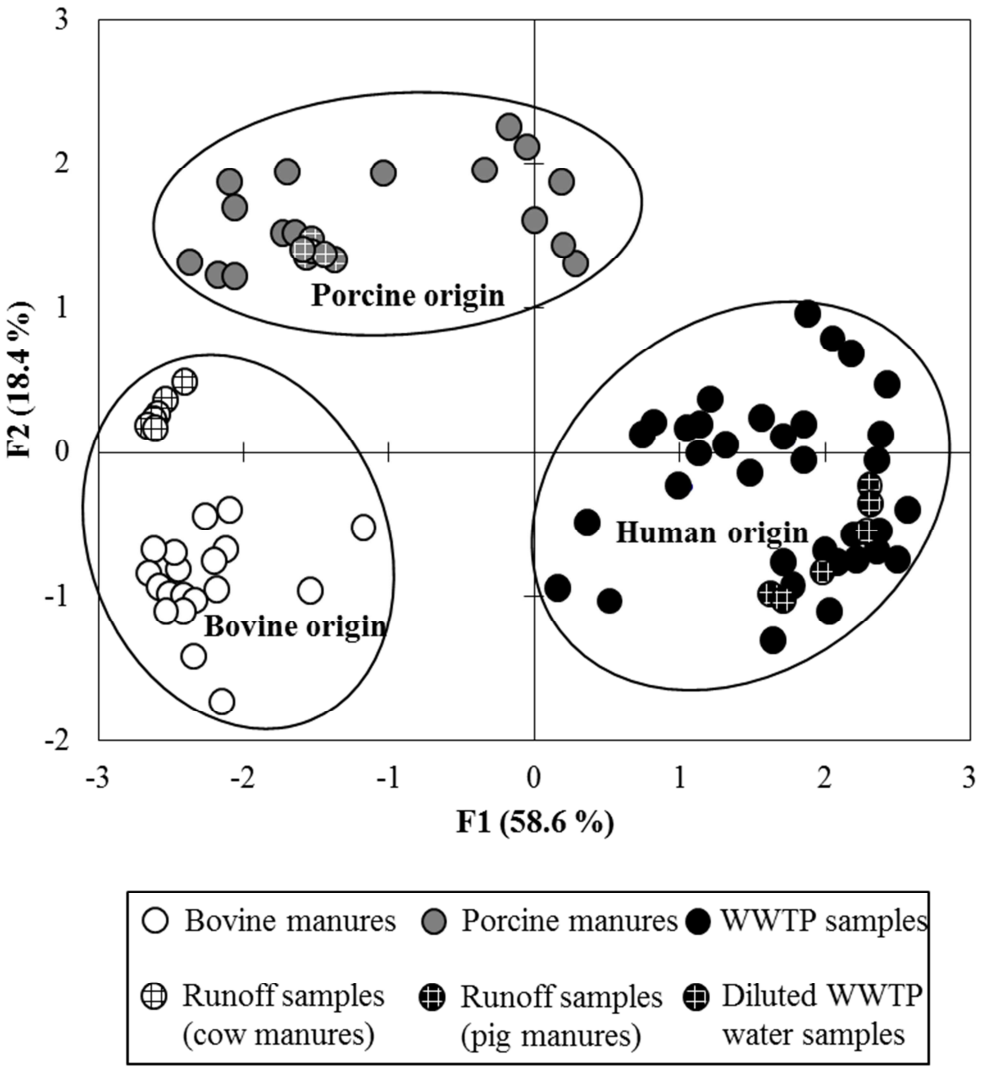


Figure V.3: Plot of the principal component analysis of the 88 source samples investigated in this study using the six most discriminant stanol compounds proposed by Derrien et al. (2011) for discrimination porcine from bovine faecal sources. Runoff and diluted samples were used supplementary individuals. F1 axis: principal component 1; F2 axis: principal component 1.

Table V.2: Factorial coordinates of variables and relative contributions (in %) of variables to principal components 1 (F1) and 2 (F2) of the principal component analysis carried out with the runoff samples used as supplementary individuals.

	Factorial coordinates variables		Contributions of variables (%)	
	F1	F2	F1	F2
Coprostanol	0.95	-0.08	25.9	0.5
Epicoprostanol	-0.64	0.51	11.7	23.1
Campestanol	-0.71	0.53	14.4	25.6
Sitostanol	-0.80	0.24	18.4	5.3
24-Ethylcoprostanol	0.48	0.64	6.7	37.4
24-Ethylepicoprostanol	0.90	-0.30	23.0	8.1

The addition of samples from runoff and dilution experiments used in this study as supplementary individuals in the PCA to test whether the 6-stanol-derived PCA method would survive to possible modifications of the stanol profiles of faecal sources after their introduction and further transfer into the environment show that the differences observed between the "pure" source samples are essentially maintained (see Figure V.3). It is particularly notable that the freshwater and seawater samples spiked with WWTP influent waters lie right within the "human" group defined by the raw WWTP samples alone, as do the runoff samples from plots amended with porcine manure as regard to the "porcine" group defined by the porcine manure samples. In fact, the only significant difference occur with the bovine samples for which the runoff samples from the experimental plot amended with bovine manure lie significantly above the field of the "bovine" group defined by the bovine manure samples. A detailed survey of the stanol profiles of the former samples show that their upward shift in Figure V.3 is due to a decrease in the relative proportion of the 24-ethylepicoprostanol, which is basically the stanol that defines the bovine cluster.

Discriminant analysis (DA) was applied to verify whether groups defined by the PCA differ with regard to variable means, and to use the variables defining each group to verify that the supplementary individuals are true members of the corresponding groups. DA results using the confusion matrix evidenced a 100% reclassification of all the individuals. As all the eighty-eight individuals, including the animal manure, WWTP, and runoff and diluted samples, were found to be correctly classified, a new PCA was performed using the entire

sample suite ("pure" source samples + runoff and diluted samples). The results of this new PCA are given in Table V.3 and portrayed further in Figure V.4. The first two components of the new PCA explained 78.2 % of the total variance with the first (F1) and second (F2) accounting for 61.3% and 16.9 % of this total variance, respectively. The main contributive variables on the F1 axis and on the F2 axis are the same than those controlling the F1 and F2 axes of the PCA gathering only the "pure" source samples. As evidenced in Figure V.4, the new PCA maintains the separation of the "human", "bovine" and "porcine" groups reinforcing the above interpretation that the 6 stanol-based PCA method shown by Derrien *et al.* (2011) to be capable of distinguishing bovine from porcine faeces is also capable of discriminating human faeces from bovine and porcine faeces, and this taking into account the possible fractionation effects induced by the dilution and transport of the stanols.

Table V.3: Factorial coordinates of variables and relative contributions (in %) of variables to principal components 1 (F1) and 2 (F2) of the principal component analysis carried out with all source samples (including the runoff samples) used as individuals.

	Factorial coordinates variables		Contributions of variables (%)	
	F1	F2	F1	F2
Coprostanol	0.96	-0.07	24.7	0.5
Epicoprostanol	-0.67	0.56	12.0	31.9
Campestanol	-0.76	0.47	15.6	21.9
Sitostanol	-0.81	0.29	17.8	8.3
24-Ethylcoprostanol	0.57	0.53	8.7	28.2
24-Ethylepicoprostanol	0.88	-0.30	21.1	9.2

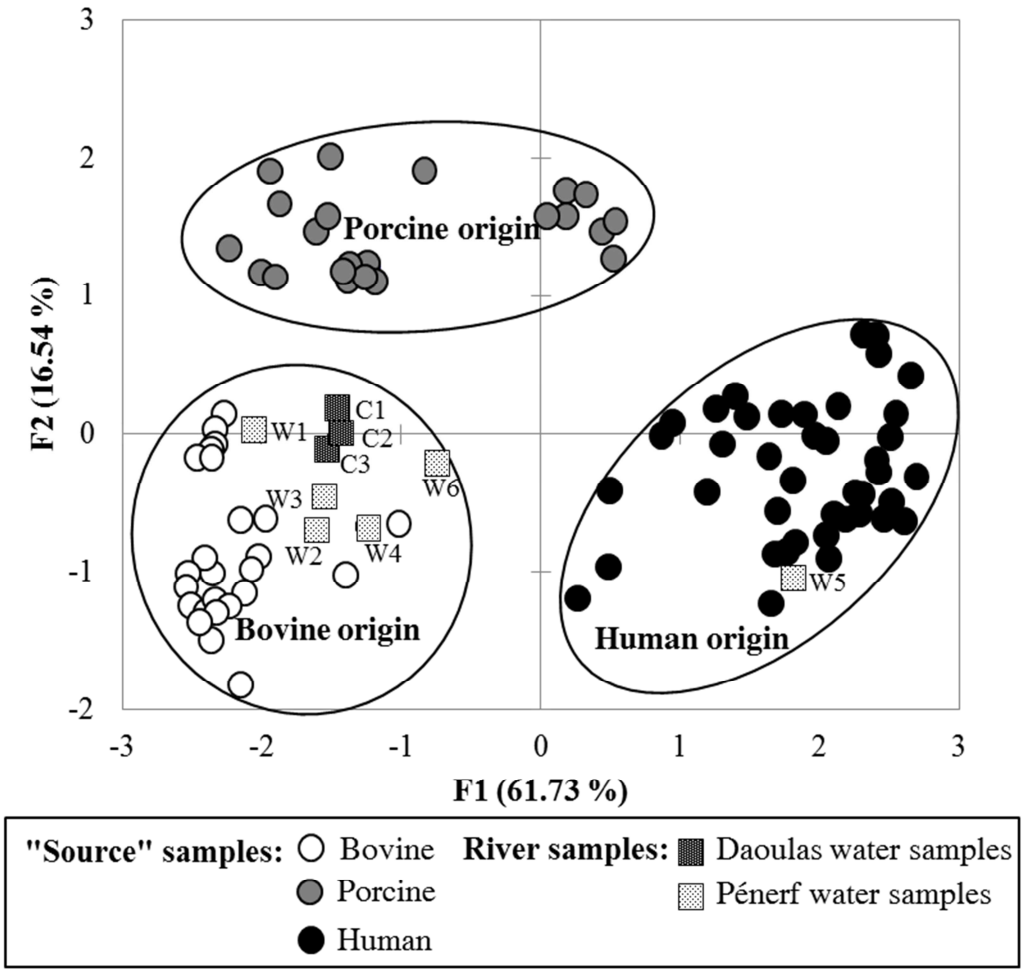


Figure V.4: Plot of the principal component analysis comparing of the 88 source samples and the 9 river water samples investigated in this study using the six most discriminant stanol compounds proposed by Derrien et al. (2011) for discrimination porcine from bovine faecal sources. All source samples (i.e. manure, WWTP, runoff and diluted samples) were used as individuals, in contrast to river water samples which were used as supplementary individuals. F1 axis: principal component 1; F2 axis: principal component 2.

III/-3 Comparison with river samples

River samples from the *Daoulas* and *Pénerf* river basins have been pooled with the above sample suite and treated as supplementary individuals in the PCA (Figure V.4). As can be seen all the samples lie inside the "bovine" group of the PCA, except sample W5 from the *Pénerf* river basin which reports within the "human" source group.

The PCA results can be compared with microbial data and caffeine and TCEP results. Results of *E. coli* enumerations show that *E. coli* concentrations were higher than the inland water guidelines of the European Directive on the management of bathing water quality in all

samples (i.e. 500 CFU/100 mL, Directive 2006/7/EC). The highest *E. coli* concentration was recorded in sample W5 from *Pénerf* river basin: 1.4×10^5 CFU/100 mL. Concentrations in other samples from this basin were two order of magnitude lower: between 1.4 and 6.1 $\times 10^3$ CFU/100 mL. Concentrations in samples from the *Daoulas* river were intermediate: between 1.5 and 1.9 $\times 10^4$ CFU/100 mL.

As regard microbial marker results (Table V.4), the porcine-specific *L. amy* marker was detected in sample W5 from the *Pénerf* river basin and in all sample from *Daoulas* river basin, but at a concentration lower than the limit of quantification (10^3 CFU/100 mL). Concentrations of this marker were below the limit of detection in the remaining 5 samples. The human-specific marker HF 183 was quantified, for its part, only in one sample, i.e. sample W5 from *Pénerf* river basin. Concentration in this sample was, however, quite high, of 7.3×10^5 gene copies/100mL, which is close to concentrations found in WWTP effluents (Gourmelon et al., 2011). Concentrations in all other samples were below the quantification or detection limit of this marker (i.e. $< 1 \times 10^3$ gene copies/100mL). As regard the bovine specific marker Rum-2, concentrations were high in the three samples from the *Daoulas* river and in one sample (W2) from *Pénerf* river basin (between 1.7×10^5 and 5.9×10^5 gene copies/100mL). Traces of this marker were also detected in another sample from the *Pénerf* river basin (W4). Concentrations were below detection limit in all other *Pénerf* samples.

Results for the human-specific caffeine and TCEP were also quite variable. TCEP concentrations were below quantification limit (< 0.04 $\mu g/L^{-1}$) in all samples, except samples W5 and W6 from the *Pénerf* river basin. Concentration in these two samples were however quite different, that of W5 (0.29 $\mu g/L^{-1}$) being >5 times higher than that of W6 (0.05 $\mu g/L^{-1}$). For caffeine, concentration was very high in W5 sample from *Pénerf* river basin (12.40 $\mu g/L^{-1}$). Some caffeine was also quantified in samples W2, W3, W4 and W6 from this basin at much lower concentration levels (between 0.08 and 0.22 $\mu g/L^{-1}$). By contrast, caffeine could not be quantified in *Pénerf* sample W1 nor in the three *Daoulas* river samples (< 0.04 $\mu g/L^{-1}$).

Table V.4: Comparison between concentrations of faecal microbial and chemical indicators in river water samples and the source provenances assigned by the PCA analysis of stanol distributions.

		Microbial markers			Chemical markers		
Samples	***E. Coli*** (CFU/100 mL)	**L. amy[1]** (CFU/100mL)	**HF183[2]** (copies/100mL)	**Rum-2-Bac[3]** (copies/100mL)	**Caffeine[2]** (µg/L)	**TCEP[2]** (µg/L)	**Source assigned by stanols**
C1	1.9×10^4	bql[a]	bql	3.6×10^5	bql	bql	Cow
C2	1.5×10^4	bql	bql	3.0×10^5	bql	bql	Cow
C3	1.7×10^4	bql	bql	5.9×10^5	bql	bql	Cow
W1	1.9×10^3	bql	bql	bql	bql	bql	Cow
W2	6.1×10^3	bql	bql	1.7×10^5	0.09	bql	Cow
W3	2.2×10^3	bql	bql	bql	0.18	bql	Cow
W4	1.4×10^3	bql	bql	bql	0.22	bql	Cow
W5	1.4×10^5	bql	7.3×10^5	bql	12.40	0.29	Human
W6	3.2×10^3	bql	bql	bql	0.08	0.05	Cow

[a] Below quantification limit. Quantification limit were $<1 \times 10^3$ gene copies or cells/100mL for bacterial markers and <0.04 µg.L^{-1} for caffeine and TCEP.

[1] Pig specific marker.

[2] Human specific marker.

[3] Ruminant specific marker.

IV/- DISCUSSION

An efficient MST toolbox is critical for identifying the origin of faecal contamination in waters and limit or eliminate the health risks that faecal contamination poses on activities such as bathing or shellfish harvesting. In area of intensive livestock activities such as Brittany, the purpose is mainly to distinguish between faecal contamination of human origin and faecal contamination from two main types of animal sources, namely bovine and porcine, bovine and porcine breeding being generally the most prevalent livestock activities in these regions. In this study, we tested whether the 6-stanol-based PCA method developed by Derrien *et al.* (2011) to distinguish between porcine and bovine faeces could be also suitable for discriminating these two faeces types from human faeces, and whether this method would survive to possible modifications of the stanol signatures of these three sources during dilution and further transport of the faeces in water. We also tested whether the source assignment deduced from analysis of the stanol fingerprints in waters being affected by a faecal contamination of unknown origin were consistent with the information provided on the origin of this contamination by microbial markers thought to be source-specific such as Rum-2-Bac (bovine specific microbial marker), *L. amy* (porcine specific microbial marker) and HF 183 (human specific microbial marker), and other chemical markers like caffeine and TCEP. This intercalibration of MST methods is crucial since no single source tracking microbial or chemical method has been proved so far to be sufficiently discriminatory to unmistakably identify the origin of faecal contamination in water (Griffith *et al.*, 2003; Blanch *et al.*, 2006; Field and Samadpour, 2007). From this point of view, our study joins the few studies published to date that have intended to compare different MST methods with each other (Griffith *et al.*, 2003; Blanch *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2007; McQuaig *et al.*, 2009; Gourmelon *et al.*, 2011), which is an essential task for the purpose of building a reliable and efficient MST toolbox for effective management and remediation of water resources.

As regard the test of discrimination between faeces of human origin on the one hand and faeces of bovine and porcine origin on the other hand, we found that the 6-stanol-based PCA method was successful as it allows unambiguous separation of the three faeces types (Figure V.3). The respective position of coprostanol and sitostanol on the F1 axis of the PCA show that these two compounds are the two most important stanol in differentiating human from

bovine faeces, while the differentiation between porcine and human faeces is done mainly by epicoprostanol and 24-ethylcoprostanol, as shown by the respective position of these two stanols on the F2 axis of the PCA (Table V.2). We consider the fact that the discriminatory power of the 6-stanol-based PCA method is based on a large sample population (88), comprising a large variety of storage time conditions and secondary treatment processes (see Derrien *et al.*, 2011), as the demonstration that this method may provide a suitable tool to discriminate between the three main faeces types which we may infer are dominant in threatening water quality in those regions like Brittany where high population densities stand next to intensive porcine and bovine livestock activities.

The test was also successful as regard the capacity of the method to survive to the possible modifications of the stanol signatures during dilution and further transport of the faeces by runoff. It should be remembered here that stanols are naturally present in soils and that these "natural" soil stanols have specific distribution profiles (e.g. Jardé *et al.*, 2009). Mixing of the "soil" stanols with the bovine and porcine stanols upon manure spreading such as might have occurred during the runoff experiments carried out by Jaffrézic *et al.* (2011) could have led to modifications of the original bovine and porcine stanol signatures. These modifications, if significant, could have in turn led to a specificity loss of the 6-stanol-based PCA method, which could no more be able to distinguish between porcine and bovine faecal sources in the runoff waters. Yet, runoff waters are the true, effective sources through which the bovine and porcine faecal contaminations are expected to reach water in agricultural regions. Quite clearly, this specificity loss did not occur for the porcine source as the corresponding runoff water samples were found to lie right in the center of the porcine faeces cluster in the PCA score plot (Figure V.3). Only the stanol signature of the bovine–derived runoff samples appears to have suffered some modifications, which was manifested mainly by a decrease of the relative 24-ethylepicoprostanol concentration in the runoff water samples as compared to the original bovine manure source (Figure V.3). The resulted shift in the PCA score plot was however quite insignificant as revealed by the 100% reclassification of the corresponding samples as belonging to the bovine type. The reclassification was also 100% successful for the diluted samples, suggesting that dilution also had essentially no effects on the discriminant power of the 6 selected stanols. Taken together, results of this second test are very important. Indeed, they are not intended to concentrated, raw faeces that do not impact

directly water resources but to diluted by-products such as runoff waters that are the true vectors through which the faecal contamination is effectively transferred to water. The fact that the introduction of these samples does not affect the resolving power of the 6-stanol-based PCA analysis is the true test of the applicability of this method to real contaminated waters.

All the analyzed river water samples gave *E. coli* exceeding the limit value of the inland water guidelines of the European Directive (i.e. 500 CFU/100 mL, 2006/7/EC) on the management of bathing water quality, indicating in turn the presence of faecal contamination in the rivers from which they come from. The use of the 6 stanol-based PCA method allow assignment of the faecal contamination to a bovine source for all samples, except sample W5 from the *Pénerf* river basin for which a clear assignment to a human source is revealed (Figure 4). These assignments are consistent with the microbial marker data. Indeed, W5 is the only sample in which the human-specific *Bacteroidales* marker HF 183 was found to occur in significant proportion. In fact, this marker was not detected in all the other samples, concentrations being in all cases below the detection limit (< 100 gene copies/100 mL). The consistency between the assignment made for W5 by the 6-stanol-based method and the source information provided by the *Bacteroidales* marker HF 183 is important as the latter microbial marker was already found to be highly human-specific in Brittany (Gourmelon *et al.*, 2010), in line with other successful specificity test obtained for this marker elsewhere in EU (Seurinck *et al.*, 2005; Mieszkin *et al.*, 2009), in the USA (Kildare *et al.*, 2007) and in Australia (Ahmed *et al.*, 2009). Thus, a strong consistency is achieved between the 6-stanol-based PCA method and the the human-specific *Bacteroidales* marker HF 183, confirming the capacity of the 6-stanol-based PCA method to become a valuable tool for determining the presence of a faecal contamination of human origin in water. The assignment of the faecal contamination detected in W5 sample to a human source is also confirmed by the high caffeine and TCEP concentrations measured in this sample (Table V.4). Finally, and most importantly, it is also consistent with the location of this sample, which come from a sampling point located 20 meters downstream of the discharge pipe of the municipal WWTP in operation on the *Pénerf* river basin (Figure V.1).

The consistency is also very strong in the case of the remaining *Pénerf* river samples and of the three *Daoulas* river samples whose faecal contamination appears clearly to be

dominantly of bovine origin. Two important arguments supporting this interpretation are i) the close grouping of all these samples in the bovine cluster in the PCA score plot (Figure V.4), and ii) the detection in four samples out of eight of high concentrations of the bovine specific microbial marker Rum-2-Bac (between $1.7x10^5$ and $5.9x10^5$ gene copies/100mL) with no traces of the two other, human- and porcine-specific microbial markers (Table V.4). The host specificity of Rum-2-Bac has already been established (Mieszkin *et al.*, 2010; Gourmelon *et al.*, 2010), and the consistency of the microbial results with results of the 6-stanol-based PCA method obtained for these samples may be consider as an *a posteriori* validation of the capacity of the 6-stanol-based PCA method to reliably detect a faecal contamination of bovine origin in water.

It should be noted, however, that the Rum-2-Bac microbial marker was not detected in all the bovine-contaminated samples. In fact, three *Pénerf* samples (W1, W3 and W6) whose faecal contamination is otherwise assigned to a bovine origin based on their stanol profiles showed no traces of this marker. This might be due to a difference in the sensitivity of the markers in relation with differences in the contamination load. There is indeed a positive correlation in the bovine-contaminated samples between the *E. coli* concentration and the Rum-2-Bac concentration (Figure V.5). However, the obtained correlation does not intercept the *E. coli* axis at a *E. coli* concentration = 0. In fact, there seems to have a minimum *E. coli* concentration level of about $5x10^3$ CFU/100 mL to be reached to allow the Rum-2-Bac microbial marker to become detectable (Figure 5). The possible higher detection capacity of the stanols as compared to the Rum-2-Bac microbial marker was already evidenced by Gourmelon et al. (2010) who could not find traces of this marker in water samples with low levels of E. Coli (< $5x10^2$ CFU/100 mL), while the stanols could be detected, and even quantified, in these same samples. An interesting conclusion which arises of this study is thus that the 6-stanol-based PCA method could be more sensitive than the microbial marker-based methods in low-contaminated waters, and could therefore come to support the latter method to identify contamination sources in these waters. In any cases and to conclude, it should be pointed out that the evidence which is provided by the 6-stanol-based PCA method that waters from the *Daoulas* and *Pénerf* river basins suffer from a diffuse contamination of bovine origin is fully consistent with the agricultural context of these two basins. As already

noted, indeed, both basins are the site of intensive dairy farming activities, with massive return of manure and cowpats to the soil, particularly in lowland cattle pastures.

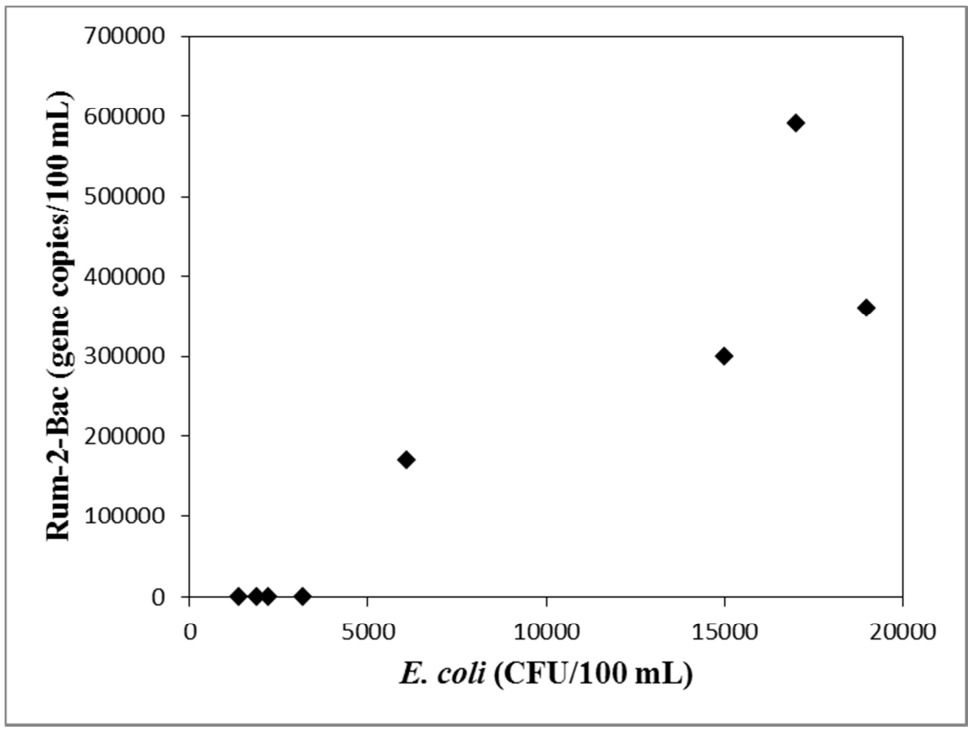


Figure V.5: Diagram illustrating positive correlation between E. Coli and Rum-2-Bac concentrations in those samples for which the 6 stanol-based PCA method indicates a faecal contamination of bovine origin. The existence of samples showing no traces of Rum-2- Bac while having *E. Coli* concentrations >>0 suggests existence of a minimum faecal contamination load to insure detection of the Rum-2-Bac marker.

V/- CONCLUSION

This study has tested whether the 6-stanol-based PCA method set up earlier by Derrien *et al.* (2011) to distinguish between bovine from porcine faeces could become a method of more general interest, suitable for tracking faecal contamination sources in waters from areas of intensive agriculture where the contamination context is often marked by the co-existence of human, bovine and porcine faecal contamination sources. The different tests conducted for this purpose proved to be globally positive. In particular, well-defined and stable clusters have been found in the PCA score plots gathering pure faeces samples along with runoff and diluted waters on known contamination origin, which should allow *a priori* to determine clearly which of these three sources is dominantly involved in the faecal contamination of given water. A good consistency has also been observed between the source assignment made by the 6-stanol-based PCA method and those made by some of the few existing specific

microbial markers. More generally, the tests conducted in this study argue for an introduction of the 6-stanol-based PCA method in the MST toolbox to help identifying faecal contamination sources. This introduction would seem to be particularly welcome in the case of waters only moderately contaminated, as the stanol method appears significantly more sensitive than the microbial marker methods, at least in the case of a contamination of bovine origin. Another advantage of introducing the 6-stanol-based PCA method in the MST toolbox is that these compounds might have higher persistence times in waters than microbial markers. A recent experimental study for example showed that the persistence time of stanols in waters was 27 to 55 days against only 4 days for the porcine-specific microbial marker Pig-2-Bac (Solecki *et al.*, 2011). Studies on the persistence of *Bacteroidales* have mainly been conducted in microcosms under the influence of physical and chemical parameters such as temperature, oxygen stress, predation, light and salinity (Seurinck *et al.*, 2005; Okabe and Shimazu, 2007; Marti *et al.*, 2009; Solecki *et al.*, 2011). Globally, these studies showed a decrease in the persistence of *Bacteroidales* with an increase of temperature; with higher concentration of oxygen, low salinity and also that the persistence depended on the host-specific *Bacteroidales* markers. Thus, by introducing the 6-stanol-based PCA method in the MST toolbox, we could be able to improve the determination of faecal contamination sources in conditions where microbiological tools may be poorly or not operating, including the cases of relatively old contaminations or of contaminations of moderate to relatively low intensity.

ACKNOWLEDGMENT

This study was funded by ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, France) through the "TRACES" project (EST-2006/1/36). The CNRS and Région Bretagne are greatly acknowledged for the grant provided to Morgane Derrien to enable her to carry this study. We thank C. Treguier (Ifremer, La Trinité) and G. Moguedet (Université d'Angers) for their assistance during field sampling. Dr. M.S.N. Carpenter post-edited the English style of this paper.

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.

Asperen, I.A., Medema, G., Borgdorff, M.W., Sprenger, M.J.C., Havelaar, A.H. (1998) Risk of gastroenteritis among triathletes in relation to faecal pollution of fresh waters. International Journal of Epidemiology 27(2), 309-315.

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 (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., 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 and Environmental Microbiology 72 (9), 5915-5926.

Bull, I.D., Lockheart, M.J., Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., Evershed, R.P. (2002) The origin of faeces by means of biomarker detection. Environment International 27(8), 647-654.

Cimenti, M., Hubberstey, A., Bewtra, J.K., Biswas, N. (2007) Alternative methods in tracking sources of microbial contamination in waters. Water SA. 33(2), 183-194.

Derrien, M., Jardé, E., Gruau, G., Pierson-Wickmann, A.C. (2011) Extreme variability of steroids profils 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 and Chemistry 59(13), 7294-7302.

Fattore, E., Benfenati E., Marelli, R., Cools, E., Fanelli R. (1996) Sterols in sediment samples from Venice lagon, Italy. Chemosphere 33(12), 2383-2393.

Field, K.G., Samadpour, M. (2007) Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. Water Research 41 (16), 3517-3538.

Fraley, C., Raftery, A. E. (1998) How many clusters? Which clustering method? Answers via model-based cluster analysis. The Computer Journal 41(8), 578-588.

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(14), 5157-5169.

Gourmelon, M., Caprais, M.P., Mieskin, S., Marti, R., Wéry, N., Jardé, E., Derrien, M., Jadas-Hécart, A., Communal, P.Y., Jaffrezic, A., Pourcher, A.M. (2010) 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.

Griffith, J.F., Weisberg, S.B., McGee, C.D. 2003. Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. Journal of Water and Health 1(4), 141-151.

Grimalt, J.O., Fernandez, P., Bayona, J.M., Albaiges, J. (1990) Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. Environmental Science and Technology 24(3), 357-363.

Jaffrézic, A., Jardé, E., Pourcher, E., Gourmelon, M., Caprais, M.P., Heddadj, D., Cottinet, P., Bilal, M., Derrien, M., Marti, R., Mieszkin, S. (2011) Microbial and chemical markers: runoff transfer in animal manure-amended soils. Journal of Environmental Quality 40(3), 959-968.

Jardé, E., Gruau, G., Mansuy-Huault, L., Peu, P., Martinez, J. (2007) Using sterols to detect pig slurry contribution to soil organic matter. Water, Air and Soil Pollution 178(1-4), 169-178.

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., 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.

Jeanneau, L., Jardé, E., Gruau, G. (2011) Influence of salinity and natural organic matter on the solid phase extraction of sterols and stanols: Application to the determination of the human sterol fingerprint in aqueous matrices. Journal of Chromatography A 1218(18), 2513-2520.

Jeanneau, L., Solecki, O., Communal, P.Y., Jadas-Hécart, A., Gourmelon, M., Caprais, M.P., Wéry, N., Jardé, E., Gruau, G., Pourcher, A.M. (in submission) Relative decay of fecal indicator bacteria and human-specific markers: a microcosm study simulating wastewater input into seawater and fresh water.

Jimenez-Clavero, M.A., Fernandez, C., Ortiz, J.A., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V., Roblas, N., 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., Wuertz, S. (2007) 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dogspecific faecal Bacteroidales: a Bayesian approach. Water Research 41 (16), 3701-3715.

Kim, J. O., Mueller, C. W. (1987) In Introduction to factor analysis: what it is and how to do it. Sage University Press, Newbury Park.

Konstantinov, S.R., Smidt, H., 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.

Leeming, R., Ball, A., Ashbolt, N., Nichols, P.D. (1996) Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. Water Research 30(12), 2893-2900.

Marti, R., Dabert, P., Ziebal, C., Pourcher A.M. (2010) Evaluation o*f Lactobacillus sobrius/L.amylovorus* as a new microbial marker of pig manure. Applied and Environmental Microbiology 76(5), 1456-1461.

Marti R., Dabert P. and Pourcher A.M. (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.

McQuaig, S.M., Scott, T.M., Lukasik, J.O., Paul, J.H., Harwood, V.J. (2009) Quantification of human polyomaviruses JC virus and BK virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. Applied and Environmental Microbiology 75 (11), 3379-3388.

Meays, C.L., Broersma, K., Nordin, R., Mazumder, A. (2004) Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of currents methods. Journal of Environmental Management 73(1), 71-79.

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 Environmental Microbiology 75(10), 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(3), 974-984.

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.

Pruss, A. (1998) Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. International Journal of Epidemiology 27(1), 1-9.

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.

Saim, N., Osman, R., Abg Spian, D.R.S., Jaafar, M.Z., Juahir H., Abdullah, M.P., Ghanin, F.A. (2009) Chemometric approach to validating faecal sterols as source tracer for faecal contamination in water., Water Research, 43(20), 5023-5030.

Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R., Lukasik, J. (2002) Microbial source tracking: current methodology and future directions. Applied and Environmental Microbiology 68(12), 5796-5803.

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(2), 249-259.

Shah, V.G., Dunstan, R.H., Geary, P.M., Coombes, P., Roberts, T.K., 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.

Simpson, J.M., Santo Domingo, J.W., Reasoner, D.J. (2002) Microbial source tracking: state of the science. Environmental Science and Technology 36(24), 5279-5288.

Sinton, L.W., Finlay, R.K., Hannah, D.J. (1998) Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 32 (2), 323-348.

Solecki, O., Jeanneau, L., Jardé, 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 45(15), 4623-4633.

Tyagi P., Edwards D.R., Coyne M.S. (2008) Use of sterol and bile acid biomarkers to identify domesticated animal sources of fecal pollution. Water Air Soil and Pollution 187(1-4), 263-274.

Tyagi P., Edwards D.R. (2009) Distinguishing between human and animal sources of fecal pollution in waters: a review. International Journal of Water 5 (1), 15-34.

Ufnar, J.A., Ufnar, D.F., Wang, S.Y., 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.

Vega, M., Pardo, R., Barrado, E., Deban, L. (1998) Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. Water Reearch 32(12), 3581-3592.

Yoder, J.S., Hlavsa, M.C., Craun, G.F., Hill, V., Roberts, V., Yu, P.A., Hicks, L.A., Alexander, N.T., Calderon, R.L., Roy, S.L. et Beach, M.J. "Surveillance for waterborne disease and outbreaks assoicated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events—United States, 2005-2006," Morbidity and Mortality Weekly Report, vol. 58, no. 57/SS-9, pp. 1–38, 2008.

CONCLUSIONS

Cette étude a permis de tester et valider la capacité de l'analyse statistique de six stanols à distinguer entre une contamination d'origine humaine ou animale (bovine ou porcine) en milieu naturel. Pour cela, la première étape a consisté à injecter dans l'ACP les échantillons d'origine humaine (influents, effluents et boues de STEP). Les échantillons des trois origines se sont regroupés les uns avec les autres en fonction de leur origine, montrant clairement que la distinction de ces trois origines était possible via cet outil. Afin de vérifier la conservation des signatures spécifiques en stanols pendant le transfert, les échantillons issus de ces différentes expérimentations ont été eux aussi intégrés dans l'ACP. Chacun d'eux s'est retrouvé dans le pôle source identifié au préalable correspondant et l'analyse factorielle discriminante a montré une classification 100% correcte pour tous les échantillons des trois pôles. Une fois validée en conditions contrôlées, la méthode développée a été utilisée pour tracer les sources de contamination fécale dans les bassins versants de Pénerf et de Daoulas, situés dans des zones d'agriculture intensive et où la contamination est généralement humaine et/ou animale. Les résultats ont montré que la méthode développée a permis d'identifier clairement l'origine principale de la contamination pour chacun des échantillons analysés. De plus, une bonne cohérence a également été observée entre les résultats fournis par les stanols et les marqueurs microbiologiques et chimiques spécifiques.

Les résultats ont également mis en avant un avantage certain de cet outil par rapport aux autres marqueurs dans certaines conditions. En effet, dans le cas d'eaux moyennement contaminées, l'outil ACP apparaît nettement plus sensible que les marqueurs microbiologiques spécifiques, au moins dans le cas d'une contamination d'origine bovine. Cela peut s'expliquer par le fait que les stéroïdes ont un temps de persistance plus élevé dans les eaux que les marqueurs microbiologiques. Des recherches sont encore a faire pour établir le temps de survie du marqueur microbiologique Rum-2-Bac pour appuyer cette conclusion. Toutefois, à titre d'exemple, une récente étude a montré que le temps de persistance de stanols dans les eaux est de 27 à 55 jours, contre seulement 4 jours pour le marqueur microbiologique porcin spécifique Pig-2-Bac (Solecki et al., 2011).

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse s'est attaché à valider l'utilisation des stéroïdes en tant que traceurs de sources de contaminations fécales des eaux de surface dans un contexte de contamination multi-sources. Ces contaminations sont à l'origine de pollutions microbiologiques pouvant entraîner des pathologies plus ou moins graves chez l'homme et déterminer la ou les sources de ces contaminations est un enjeu de santé publique. Cet enjeu est exacerbé en Europe par le durcissement des valeurs seuils des indicateurs microbiologiques des directives sur les eaux de baignade et les eaux conchylicoles et surtout par l'obligation pour les collectivités de procéder à l'identification et à la hiérachisation de toutes les sources potentielles ou effectives de contamination.

Plusieurs types d'outils, microbiologiques ou chimiques, peuvent être utilisés pour tracer l'origine de ces contaminations. Le choix fait dans cette thèse de cibler les stéroïdes comme traceurs découle des travaux publiés démontrant les potentialités de ces composés en terme de traçage en raison de leurs caractéristiques propres, telles que leurs spécificités élevées, leurs seuils de détection faible ou leurs persistances dans l'environnement (Leeming *et al.*, 1996; Bull *et al.*, 2002; Jardé *et al.*, 2007).

Le travail présenté ici ayant des visées opérationnelles, il s'est inscrit dans une région affectée par des problèmes de contaminations fécales récurrentes multi-sources, à savoir la région Bretagne. Cette région se définit également par la présence conjointe d'une densité humaine importante et de zones d'élevages intensifs (bovines et porcines, principalement).

Le travail réalisé au cours de cette thèse s'est articulé en trois grandes étapes.

La première étape a consisté à tester la spécificité et l'homogénéité des signatures en stéroïdes des principales déjections générées dans la zone d'étude (porcines, bovines et humaines) en travaillant sur les déjections brutes, avant leur injection dans l'environnement. Etablir cette spécificité et cette homogénéité était la première condition *sine qua non* à leur utilisation en tant qu'outils de traçage de l'origine des contaminations fécales des eaux. Celle-ci nous a amené à nous questionner sur le choix des méthodes à utiliser pour la discrimination des sources brutes (rapports d'abondance de certains stéroïdes spécifiques ou méthodes multivariées incluant l'analyse de tout ou partie de la distribution en stéroïdes). Les résultats obtenus ont montré une variabilité de la distribution des stéroïdes dans l'ensemble des déjections porcines. Cette variabilité étend considérablement les champs établis jusqu'ici pour ces déjections sur la base de rapports jugés aptes à discriminer les différentes déjections entre

elles (Leeming et al., 1996; Jardé et al., 2007; Gourmelon et al., 2010), et remet donc en cause l'utilisation de ces rapports comme outils possibles de traçage. L'origine de cette variabilité n'a pas pu être entièrement établie. Elle est probablement le fait d'une combinaison de facteurs primaires et secondaires, incluant des différences dans le régime alimentaire des animaux, leurs métabolismes, ainsi que des modifications induites lors du stockage et du traitement des déjections avant leur épandage. Cette perte de spécificité des rapports ne disqualifie cependant pas les stéroïdes en tant que marqueurs des déjections brutes. En effet, une analyse statistique globale des échantillons porcins, bovins et humains par analyse en composante principale (ACP) a montré que l'utilisation de six stanols (coprostanol, épicoprostanol, campestanol, sitostanol, 24-ethylcoprostanol et 24-ethylépicoprostanol) permettait de différencier de manière claire et non ambigüe le pôle des déjections porcines de celui des déjections bovines et humaines et ce malgré la forte variabilité des distributions notée dans le Chapitre 3. Ce résultat confirme le potentiel des méthodes statistiques globales à pallier la défaillance de spécificité des rapports de stéroïdes spécifiques.

La deuxième étape a eu pour objectif de vérifier la conservation des empreintes stéroïdes spécifiques au cours du transfert des déjections brutes vers le milieu naturel. Etablir cette persistance est une autre condition *sine qua non* requise pour qualifier les stéroïdes comme traceurs potentiels des sources de la contamination fécale. Cette étape a été réalisée au travers de deux expérimentations. La première a consisté à comparer les signatures en stéroïdes d'eaux de ruissellement générées artificiellement (par simulation de pluie) sur des parcelles agricoles expérimentales préalablement amendées avec des déjections bovines (fumiers) et porcines (lisiers) à celles des déjections brutes épandues. La deuxième expérimentation a consisté à mélanger un influent de station d'épuration rurale avec une eau de mer ou une eau douce (dilution 1/18) et à évaluer l'effet de dilution de l'empreinte stéroïde humaine. Ces différentes expériences ont permis de montrer qu'il y avait bien conservation des signatures propres aux différentes déjections brutes pendant leur injection et leur transfert dans l'environnement. Les échantillons issus de ces différentes expérimentations ont été intégrés dans l'ACP basée sur les six stanols discriminants établis à partir des déjections brutes. Les échantillons d'eaux de ruissellement des parcelles sur lesquelles du lisier porcin a été épandu sont dans le champ des déjections porcines ainsi que les mélanges influent et eau de mer/eau douce qui se retrouvent bien dans le pôle humain. Seuls, les échantillons d'eau de ruissellement des parcelles sur lesquelles du fumier bovin a été épandu présentent un déplacement par rapport au pôle correspondant. Malgré tout, une analyse discriminante de

l'ensemble des échantillons a montré une classification 100% correcte pour tous les échantillons des expérimentations dans chacun des trois pôles, démontrant ainsi de façon indéniable la conservation des signatures spécifiques en stanols pendant le transfert.

La troisième et dernière étape a eu comme objectif de tester de manière opérationnelle (c'est-à-dire dans le contexte d'eaux de rivière sujets à des contaminations fécales de différentes sources) la validité de l'outil stéroïde en le comparant aux marqueurs microbiologiques et chimiques développés en parallèle dans cette thèse, dans le cadre du projet "Traces" (financé par l'ANSES), dans lequel cette thèse était intégrée. Cette ultime étape de validation et de comparaison est un point de passage obligé avant la qualification finale des stéroïdes comme outils opérationnels de traçage des sources de contaminations fécales des eaux. Les résultats obtenus par l'ACP des six stanols ont été comparés aux informations fournies par les marqueurs microbiologiques (L. amy, HF183 et Rum-2-Bac) et chimiques (caféine, TCPE) mis au point et validés par Gourmelon et al. (2010). Pour cela, deux bassins versants situés dans des zones d'agriculture intensive sujets à des contaminations récurrentes mono-source (bovine) ou multi-sources (humaine et animale) ont été choisis. Les résultats obtenus ont montré une grande cohérence entre les sources indiquées par l'outil stéroïde basé sur l'utilisation de l'ACP de six stanols et les marqueurs microbiologiques et chimiques spécifiques utilisés en parallèle. Les résultats ont également mis en avant l'un des intérêts des marqueurs stéroïdes, à savoir leur grande sensibilité. En effet, dans le cas d'eaux moyennement contaminées, c'est-à-dire des eaux où le niveau *E. coli* est inférieur à 10^4 UFC/100 mL, ceux-ci apparaissent plus sensibles que les marqueurs microbiologiques spécifiques dont la détection et/ou la quantification se sont avérées impossibles du fait de niveaux de concentrations trop bas.

Au final, les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse amènent des éléments de validation supplémentaire quant à l'utilisation des stéroïdes en tant que traceurs opérationnels de l'origine des contaminations fécales. Ils démontrent néanmoins que l'approche par des rapports de stéroïdes doit être utilisée avec prudence du fait de la non-spécificité de la plupart de ces rapports en matière de source. La méthode alternative mise au point et testée dans le cadre de ce travail, basée sur une analyse statistique globale de six stanols, fournit une alternative plus robuste car moins sensible à la variabilité interne des différentes sources. L'autre résultat majeur et très positif de ce travail est la cohérence des informations fournies par les marqueurs microbiologiques, chimiques et l'ACP des six stanols pour identifier les

sources de contaminations fécales. Cette cohérence et la complémentarité des avantages et inconvénients de ces deux types de traceurs constitue sans conteste un argument pour leur introduction combinée et systématique dans la "boîte" des outils à préconiser pour un traçage fiable des sources de contaminations fécales des eaux.

Au terme de ce travail de thèse, un certain nombre de perspectives apparaissent. Elles sont de différents ordres et peuvent être classées sous trois items.

Les perspectives mécanistiques :

L'étude sur les déjections bovines et porcines a permis de mettre en avant une variabilité des signatures en stéroïdes sans démontrer les mécanismes à l'origine de cette variabilité. En effet, en raison de l'échantillonnage réalisé, seules des hypothèses ont été émises sur les causes pouvant être à l'origine de cette variabilité ; facteurs primaires (différences de métabolisme des animaux en fonction de leur âge, sexe et/ou régime alimentaire) et/ou facteurs secondaires (traitements physico/chimiques et/ou stockage). Il serait donc intéressant de poursuivre les efforts de recherche pour déterminer précisément le rôle des facteurs primaires et secondaires dans la variabilité. D'une part, une étude pourrait être menée sur des déjections brutes issues de différents élevages avec des groupes d'animaux d'âge, de sexes et de régimes alimentaires différents afin de tester un à un ces paramètres susceptibles d'influencer la distribution. D'autre part, le rôle des facteurs secondaires pourrait être étudié en effectuant des prélèvements de déjections dans une ou plusieurs exploitations tout au long de la chaîne de traitements physico/chimiques, du produit brut au produit fini. En parallèle, des expérimentations en laboratoire en conditions contrôlées pourraient être menées pour mieux isoler les facteurs un à un. L'ensemble de ces études permettrait de mieux comprendre les origines de la variabilité des signatures en stéroïdes et les mécanismes mis en jeu.

Les perspectives pour l'amélioration de la boîte à outils :

Dans le cadre de cette thèse, trois origines (bovine, porcine et humaine) considérées comme majoritaires ont été étudiées pour développer le marqueur stéroïde. Cependant, au sein des bassins versants en zones agricoles, d'autres sources potentielles de contaminations fécales peuvent être envisagées. En effet, il semblerait pertinent d'étudier deux autres sources liées aux élevages pouvant contribuer à des contaminations fécales via l'épandage ou le ruissellement des zones de pâturage: la source ovine (16 millions de tonnes de déjections/an en France) et avicole (10 millions tonnes de déjections/an en France). La source de

contamination fécale liée à la faune sauvage et en particulier celle liée aux oiseaux sauvages (tels que les goélands, les mouettes) qui sont présents sur les zones littorales devrait également être étudiée.

Une autre perspective serait le développement d'autres marqueurs tels que les acides biliaires en raison de leurs caractéristiques telles que leurs spécificités, leurs seuils de détection faibles ou leurs résistances à la dégradation. Ils pourraient utilement compléter la palette de la boîte à outils, notamment dans le cas où les études à venir élargiraient encore le champ de sources possibles pouvant engendrer une perte d'efficacité de la méthode "ACP aux six stanols".

Les perspectives qui visent à étendre l'application de la boîte à outils :

Jusqu'à aujourd'hui, l'ensemble des travaux sur le traçage des contaminations fécales n'ont pas encore abordé le problème de la quantification des différentes sources dans le cas d'une contamination multiple. Les directives européennes sur la qualité des eaux de baignades et des eaux conchylicoles demandent pourtant non seulement d'identifier les sources de contaminations fécales, mais également de les hiérarchiser. A terme, il faudrait pouvoir être capable de modéliser les flux de contaminations fécales afin de pouvoir déterminer le poids de chaque source de contamination fécale tout au long du bassin et cela jusqu'à l'exutoire. Cette approche par modèle permettrait d'avoir une approche quantitative des contaminations fécales.

Une dernière perspective consisterait à appliquer la méthode développée et validée au cours de ces travaux de thèse aux coquillages, organismes particulièrement sensibles aux contaminations fécales.

Bibliographie

Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME). Fiche technique EPANDAGE – Panorama de l'épandage en agriculture. http://www.ademe.fr/partenaires/boues/pages/f21.htm

Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME). Les déchets en chiffre – Données et références. Edition 2007.

Ahmed W., Neller R., Katouli M. (2005) "Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and Escherichia coli and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters." Applied and Environmental Microbiology, 71(8): 4461-4468.

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.

Arrêté du 21 mai 1999, relative au classement de salubrité et à la surveillance des zones de production et des zones de reparcage des coquillages vivants. Journal Officiel de la République française du 10 juin 1999.

Asperen I.A., Medema G., Borgdorff M.W., Sprenger M.J.C., Havelaar A.H. (1998) "Risk of gastroenteritis among triathletes in relation to faecal pollution of fresh waters." International Journal of Epidemiology, 27(2): 309-315.

Baker A. (2002) "Fluorescence properties of some farm wastes: implications for water quality monitoring." Water Research, 36(1):189–195.

Barataud D., Doyle A., Gallay A., Thiolet J.M., Le Guyader F., Kholi E., Vaillant V. (2003). "Toxi-infections alimentaires collectives à Norovirus, liées à la consommation d'huîtres de l'étang de Thau, France, décembre 2002." Bulletin épidémiologique hebdomadaire, Institut de Veille sanitaire 38: 177-179.

Bartlett P.D. (1987) "Degradation of coprostanol in an experimental system." Marine Pollution Bulletin, 18(1): 27-29.

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.

Berry E.D., Woodbury B.L., Nienaber J.A., Eigenberg R.A., Thurston J.A., Wells J.E. (2007) “Incidence and persistence of zoonotic bacterial and protozoan pathogens in a beef cattle feedlot runoff control-vegetative treatment system.” Journal of Environmental Quality, 36(6):1873–1882.

Bilal M., Jaffrezic A., Dudal Y., Le Guillou C., Menasseri S., Walter C. (2010) “Discrimination of farm waste contamination by fluorescence coupled with multivariate analysis during biodegradation study.” Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(5):3093–3100.

Björkhem I., Gustafsson J-Ä. (1971) “Mechanism of microbial transformation of cholesterol into coprostanol.” European Journal of Biochemistry, 21(3): 428-432.

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 and Environmental Microbiology, 72 (9): 5915-5926.

Bonjoch X., Ballesté E., 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.

Bordalo A.A., Onrassami R., Dechsakulwatana. (2002) “Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong river, Thailand).” Journal of Applied Microbiology, 93(5): 864-871.

Bower P.A., Scopel C.O., Jensen E.T., Depas M.M., McLellan S.L. (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.” Applied and Environmental Microbiology, 71(12): 8305–8313.

Brion G.M. and Mao H.H. (2000) “Use of total coliform test for watershed monitoring with respect to atypicals.” Journal of Environmental Engineering, 126(2): 175-182.

Brooks P.B., Adeli A., Read J.J., McLaughlin M.R. (2009) “Rainfall simulation in greenhouse microcosms to assess bacterial-associated runoff from land-applied poultry litter.” Journal of Environmental Quality, 38(1): 218–229.

Buerge IJ., Poiger T., Müller MD., Buser HD. (2003) “Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination and surface waters.” Environmental Science and Technology, 37(4): 691-700.

Bull I.D., Lockheart M.J., Elhmmali M.M., Roberts D.J., Evershed R.P. (2002) “The origin of faeces by means of biomarker detection.” Environment International, 27(8): 647-654.

Campbell P.G.C, Hansen H.J., Dubreuil B., Nelson W.O. (1992) “Geochemistry of Quebec North Shore salmon rivers during snowmelt-organic-acid pulse and aluminium mobilization.” Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 49(9): 1938–1952.

Carriera R.S., Wagener A.L.RL, Readman J.W. (2004) “Sterols as markers of sewage contamination in a tropical urban estuary (Guanabara Bay, Brazil): space-time variations.” Estuarine, Coastal and Shelf Science, 60(4): 587-598.

Carson C.A., Shear B.L., Ellersieck M.R., Schnell J.D. (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): 1836-1839.

Chaler R., Simoneit B.R.T., Grimalt J.O. (2001) “Bile acids and sterols in urban sewage treatment plants.” Journal of Chromatography A, 927(1-2): 155-160.

Chan K-H., Lam M.H.W., Poon K-F., Yeung H-Y., Chiu T.K.T. (1998) “Application of sedimentary fecal stanols and sterols in tracing sewage pollution in coastal waters.” Water Research, 32(1): 225-235.

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(3-4): 357–380.

Chen W., Westerhoff P., Leenheer J.A., Booksh K. (2003) “Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter.” Environmental Science and Technolnology, 37(24): 5701–5710.

Chetochine A.S., Brusseau M.L., Gerba C.P., Pepper I.L. (2006) “Leaching of phage from class B biosolids and potential transport through soil.” Applied and Environmental Microbiology, 72(1): 665–671.

Chinivasagam H.N., Thomas R.J., Casey K., McGahan E., Gardner E.A., Rafiee M., Blackall P.J. (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.

Cimenti M., Hubberstey A., Bewtra J.K., Biswas N. (2007) “Alternative methods in tracking sources of microbial contamination in waters.” Water SA, 33(2): 183-194.

Cole D., Long S.C., Sobsey M.D. (2003) “Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as SourceSpecific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters.” Applied and Environmental Microbiology, 69(11): 6507–6514.

Corre S., Jacq E., Moullec B. (1999) “Quantification and survival rates of bacteria in the waters of Coet-Dan.” Actes de colloques. Institut Francais de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER). Brest 24, 157-168.

Côté C., Villeneuve A., Lessard L., Quessy S. (2006) “Fate of pathogenic and nonpathogenic microorganisms during storage of liquid hog manure in Quebec.” Livestock Science, 102(3): 204–210

Craig D.L., Fallowfield H.J., Cromar N.J. (2004) “Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements.” Journal of Applied Microbiology, 96(5): 922-930.

Culley J.L.B. and Phillips P.A. (1982) “Bacteriological quality of surface and subsurface runoff from manured sandy clay loam soil.” Journal of Environmental Quality, 11(1): 155–158.

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.

Derrien M., Jardé E., Gruau G., Pierson-Wickmann A.C. (2011) “Extreme variability of steroids profils 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 and Chemistry, 59(13): 7294-7302.

Delolme H., Boutin J.P., Andre L.J. (1992) « Eau douce et pathologie. » Medecine d’Afrique Noire, 39(3): 165-170.

Delpeuch B. (1995) « Bactéries entériques dans le milieu marin – survie cellulaire et pathogénécité – exemple des salmonelles. » Bibliographie dans le cadre du DEA ‘Biologie des populations et eco-ethologie’.

DePaola A., Jones J.L., Woods J., Burkhardt W., Calci K. R., Krantz J. A., Bowers J. C., Kasturi K., Byars R.H., Jacobs E., Williams-Hill D. and Nabe K. (2010) “Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey.” Applied and Environmental Microbiology, 76(9): 2754-2768.

Direction Générale de la Santé, Qualité des eaux de baignade – Dossier de presse, mai 2004.

Dick L.K., Bernhard A.E., Brodeur T.J., Santo Domingo J.W., Simpson J.M., Walters S.P., Field K.G. (2005) “Host distributions of uncultivated faecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for faecal source identification.” Applied and Environmental Microbiology, 71(6): 3184–3191.

Direction Régionale de l’Alimentation de l’Agriculture et de la Forêt. Statistique Agricole Annuelle 2010. Service Régional de l’Information Statistique et Economique. Agreste Bretagne, Juin 2011. http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/en-region/bretagne/

Directive 76/160/CEE du Conseil, du 8 décembre 1975, concernant la qualité des eaux de baignade. Journal officiel n° L 031 du 05/02/1976 p. 1-7.

Directive 91/492/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991, fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants. Journal officiel n° L 268 du 24/09/1991 p. 1-14.

Directive 91/676/CEE du Conseil, du 12 décembre 1991, concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir des sources agricoles. Journal officiel n° L 375 du 31/12/1991 p. 1-8.

Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000, établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. Journal officiel n° L 327 du 22/12/2000 p. 1-73.

Directive 2006/7/CE du Parlement européen et du Conseil du 15 février 2006 concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE. Journal officiel n° L 064 du 03/04/2006 p. 37-51.

Directive 2006/113/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 décembre 2006 sur la qualité requise des eaux conchylicoles. Journal officiel n° L 376 du 27/12/2006 p. 14-20.

Dombek, P.E., Johnson L.K., Zimmerley S.T., Sadowsky M.J. (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.

Duffy G. (2003) "Verocytoxigenic Escherichia coli in animal faeces, manures and slurries." Journal of Applied Microbiology, 94(1): 94-103.

Dupoiron B. (2005) « Méthodologie d'élaboration des profils de baignade prévus par la future directive européenne : faisabilité de la construction d'un index de fragilité vis-à-vis des contaminations microbiologiques. » Mémoire de fin d'études – Formation des ingénieurs du génie sanitaire, Ecole National de la Santé Publique.

Dutka B.J., Chau A.S.Y, Coburn J. (1974) "Relationship between bacterial indicators of water pollution and fecal stanols." Water Research, 8(12): 1047-1974.

Edge, T. A. and Hill S. (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.

Eganhouse R.P., Blumfield D.L., Kaplan I.R. (1983) "Long-Chain Alkylbenzenes as Moleculars Tracers of Domestics Wastes in the Marine Environment." Environmental Science and Technology, 17(9): 523-530.

Elhmmali M.M., Roberts D.J., Evershed R.P. (1997) “Bile acids as a new class of sewage pollution indicator.” Environmental Science and Technology, 31(12): 3663-3668.

Elhmmali M.M., Roberts D.J., Evershed R.P. (2000) “Combined analysis of bile acids and sterols/stanols from riverine particulates to assess sewage discharges and other fecal sources.” Environmental Science and Technology, 34(1): 39-46.

Evershed R.P., Bethell P.H., Reynolds P.J., Walsh N.J. (1997) “5β-stigmastanol and related 5β-stanols as biomarkers of manuring: analysis of modern experimental material and assessment of the archaeological potential.” Journal of Archaeological Science, 24(6): 485-495.

Eyssen H., Parmentier G. (1974) “Biohydrogenation of sterols and fatty acids by the intestinal microflora.” American Journal of Clinical Nutrition, 1329-1340.

Fattore E., Benfenati E., Marelli R., Cools E., Fanelli R. (1996) “Sterols in sediment samples from Venice lagon, Italy.” Chemosphere, 33(12): 2383-2393.

Ferguson C.M., Davies C.M., Kaucner C., Krogh M., Rodehutskors J., Deere D.A., Ashbolt N.J. (2007) “Field scale quantification of microbial transport from bovine faeces under simulated rainfall events.” Journal of Water and Health, 5(1): 83-95.

Fidskal L., Maki J.S., La Croix S.J., Staley J.T. (1985) “Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria.” Applied and Environmental Microbiology, 49(1): 148-150.

Field K.G. and Samadpour M. (2007) “Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality.” Water Research, 41 (16): 3517-3538.

Fleisher J.M., Kay D., Wyer M.D., and Godfree A.F. (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.

Fraley C., Raftery A. E. (1998) How many clusters? Which clustering method? Answers via model-based cluster analysis. The Computer Journal, 41(8): 578-588.

Fong T.T., Lipp E.K. (2005) “Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools.” Microbiology and Molecular Biology Reviews, 69(2): 357-371.

Froehner S., Martins F.R., Errera M.R. (2009) “Assessment of fecal sterols in Barigui river sediments in Caritiba, Brazil.” Environmental Monitoring and Assessment, 157(1-4): 591-600.

Furuse K., Ando A., Osawa S., Watanabe I. (1981) “Distribution of ribonucleic acid coliphages in raw sewage from treatment plants in Japan.” Applied and Environmental Microbiology, 41(5): 1139-1143.

Geldreich E.E. and Kenner B.A. (1969) “Concepts of fecal streptococci in stream pollution.” Journal of Water Pollution and Control Federation, 41(8): 336-352.

Gerba C.P., Smith J.E.Jr. (2005) “Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes.” Journal of Environmental Quality, 34(1): 42-48.

Gilpin B.J., Gregor J.E., Savill M.G. (2002) “Identification of the source of faecal pollution in contaminated waters.” Water Science and Technology, 46(3): 9-15.

Gilpin B.J., James T., Nourozi F., Saunders D., Scholes P., Savill M. (2003) ‘The use of chemical and molecular microbial indicators for faecal source identification.” Water Science and Technology, 47(3): 39-43.

Given S., Pendleton L.H., Boehm A.B. (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., 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(14): 5157-5169.

Goodfellow R.M., Cardoso J., Eglinton G., Dawson J.P., Best G.A. (1977) “A faecal sterol survey in the Clyde estuary.” Marine Pollution Bulletin, 8(12): 272-276.

Gordon M.H. (1905) “Report of some characters by which various streptococci and staphylococci may be differentiated and identified.” Supplement to the Thirty-third Annual Report of the Local Government Board Containing the Report of the Medical Officer for 1903, p. 388-430.

Gottschall N., Edwards M., Topp E., Bolton P., Payne M., Curnoe W.E., Coelho B.B., Lapen D.R. (2009) “Nitrogen, phosphorus, and bacteria tile and groundwater quality following direct injection of dewatered municipal biosolids into soil.” Journal of Environmental Quality, 38(3): 1066-1075.

Gourmelon M., Caprais M.P., Mieskin S., Marti R., Wéry N., Jardé E., Derrien M., Jadas-Hécart A., Communal P.Y., Jaffrezic A., Pourcher A.M. (2010) “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.

Graves A.K., Hagedorn C., Brooks A., Hagedorn R.L., Martin E. (2007) “Microbial source tracking in a rural watershed dominated by cattle.” Water Research. 41(16): 3729-3739.

Gregor J., Garret N., Gilpin B., Randall C., Saunders D. (2002) “Use of CART analysis with chemical indicators of faecal contamination.” New Zealand Journal of Marine and Freswater Research, 36(2): 387-398.

Griffin D.W., Gibson C. J., Lipp E.K., Riley K., Paul J.H., Rose J.B. (1999) “Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys.” Applied and Environmental Microbiology, 65(9): 4118-4125.

Griffith J.F., Weisberg S.B., McGee C.D. (2003) “Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples.” Journal of Water and Health, 1(4): 141-151.

Grimalt J.O., Fernandez P., Bayona J.M., Albaiges J. (1990) “Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters.” Environmental Science and Technology, 24(3): 357-363.

Guan S., Xu R., Chen S., Odumeru J., Gyles C. (2002) “Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animal and human sources.” Applied and Environmental Microbiology, 68(6): 2690-2698.

Guan T.Y. and Holley R.A. (2003) “Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness - A Review.” Journal of Environmental Quality, 32(2): 383-392.

Guber A.K., Shelton D.R., Pachepsky Y.A., Sadeghi A.M., Sikora L.J. (2006) “Rainfall-induced release of faecal coliforms and other manure constituents: comparaison and modeling.” Applied and Environmental Microbiology, 72(12): 7531-7539.

Haack S. K., Duris J.W., Fogarty L.R., Kolpin D.W., Focazio M.J., Furlong E.T., Meyer M.T. (2009) “Comparing Wastewater Chemicals, Indicator Bacteria Concentrations, and Bacterial Pathogen Genes as Fecal Pollution Indicators.” Journal of Environmental Quality, 38(1): 248-258.

Hagedorn C., Crozier J.B., Mentz K.A., Booth A.M., Graves A.K., Nelson N.J., Reneau R.B.Jr. (2003) “Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water.” Journal of Applied Microbiology, 94(5): 792-799.

Hagedorm C., and Weisberg S.B. (2009) “Chemical-based fecal source tracking methods: current status and guidelines for evaluation.” Environmental and Science Biotechnology, 8(3): 275-287.

Halling-Sorensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lutzhoft H.C., Jorgensen S.E. (1998) “Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review.” Chemosphere, 36(2): 357-393.

Harwood V.J., Wiggins B., Hagedorn C., Ellender R.D., Gooch J., Kern J., Samadpour M., Chapman A.C., Robinson B.J., Thompson B.C. (2003) “Phenotypic library-based microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study.” Journal of Water and Health, 1(4): 153-166.

Havelaar A.H., Pot-Hogeboom W.M., Furuse K., Pot R., Hormann M.P. (1990) “F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin.” Journal of Applied Microbiology, 69(1): 30-37.

Heberer T., Reddersen K., Mechliski A. (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.

Helena B., Pardo R., Vega M., Barrado E., Fernandez J.M., Fernan L. (2000) “Temporal evaluation of groundwater composition in an alluvial aquifer (Pisurga River, Spain) by Principal Component Analysis.” Water Research, 34(3): 807-816.

Heinonen-Tanski H. and Uusi-Kämppä J. (2001) “Runoff of faecal microorganisms and nutrients from perennial grass ley after application of slurry and mineral fertiliser.” Water Science and Technology, 43(12): 143-146.

Hill V.R. and Sobsey M.D. (1998) “Microbial indicator reductions in alternative treatment systems for swine wastewater.” Water Science and Technology, 38(12): 119-122.

Hill V.R. and Sobsey M.D. (2003) “Performance of swine waste lagoons for removing Salmonella and enteric microbial indicators.” American Society of Agricultural and biological Engineers, 46(3): 781-788.

Hodgson C.J., Bulmer N., Chadwick D.R., Oliver D.M., Heathwaite A.L., Fish R.D., Winter M. (2009) “Establishing relative release kinetics of faecal indicator organisms from different faecal matrices.” Letters in Applied Microbiology, 49(1): 124-130.

Horswell J., Hewitt J., Prosser J., Van Schaik A., Croucher D., Macdonald C., Burford P., Susarla P., Bickers P., Speir T. (2010) “Mobility and survival of Salmonella Typhimurium and human adenovirus from spiked sewage sludge applied to soil columns.” Journal of Applied Microbiology, 108(1): 104-114.

Hundesa A., Maluquer de Motes C., Bofill-Mas S., Albinana-Gimenez N., Girones R. (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.

Ifremer, Direction des Opérations Départementales Environnement, Microbiologie et Phycotoxines. (2009) « Bilan national REMI 2008. » Edition 2009.

Instruction N° DGS/EA4/2011/166 du 6 mai 2011 en vue d'établir un bilan national de l'état d'avancement des profils d'eaux de baignade au sens de la directive européenne 2006/7/CE. Ministère du travail, de l'emploi et de la santé.

Jaffrézic A., Jardé E., Pourcher E., Gourmelon M., Caprais M.P., Heddadj D., Cottinet P., Bilal M., Derrien M., Marti R., Mieszkin S. (2011) « Microbial and chemical markers: runoff transfer in animal manure-amended soils. » Journal of Environmental Quality, 40(3): 959-968.

Jardé E., Gruau G., Mansuy-Huault L., Peu P., Martinez J. (2007) "Using sterols to detect pig slurry contribution to soil organic matter." Water, Air and Soil Pollution, 178(1-4): 169-178.

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., 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.

Jeanneau, L., Faure, P., Jardé, E. (2007) "Influence of natural organic matter on the solid-phase extraction of organic micropolluantes – Application to the water-extract from highly contamined river sediment." Journal of Chromatography *A*, 1173 (1-2): 1-9.

Jeanneau, L., Jardé, E., Gruau, G. (2011) Influence of salinity and natural organic matter on the solid phase extraction of sterols and stanols: Application to the determination of the human sterol fingerprint in aqueous matrices. Journal of Chromatography A, 1218(18): 2513-2520.

Jeanneau, L., Solecki, O., Communal, P.Y., Jadas-Hécart, A., Gourmelon, M., Caprais, M.P., Wéry, N., Jardé, E., Gruau, G., Pourcher, A.M. (in submission) Relative decay of fecal indicator bacteria and human-specific markers: a microcosm study simulating wastewater input into seawater and fresh water.

Jimenez-Clavero M.A., Fernandez C., Ortiz J.A., Pro J., Carbonell G., Tarazona J.V., Roblas N., Ley V. (2003) “Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water.” Applied and Environmental Microbiology, 69 (10): 6311-6315.

Johnson L. K., Brown M.B., Carruthers E.A., Ferguson J.A., Dombeck P., Sadowsky M.J. (2004) “Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution.” Applied and Environmental Microbiology, 70(8): 4478-4485.

Kannel P.R., Lee S., Kanel S. R., Khan S.P. (2007) “Chemometric application in classification and assessment of monitoring locations of an urban river system.” Analytica Chimica Acta, 582(2): 390–399.

Kay D., Jones F., Wyer M.D., Fleisher J.M., Salmon R. L., Godfree A.F., Zelenauch-Jacquotte A. and Shore R. (1994) “Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure.” The lancet, 344(8927): 905-909.

Kildare B.J., Leutenegger C.M., McSwain B.S., Bambic D.G., Rajal V.B., Wuertz S. (2007) “16S-RNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific faecal Bacteroidales: A Bayesian approach.” Water Research, 41(16): 3701-3715.

Kim J. O., Mueller C. W. (1987) In Introduction to factor analysis: what it is and how to do it. Sage University Press, Newbury Park.

Kim G., Choi E., Lee D. (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.

King E.L., Bachoon D.S., 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., Awati A., Smidt H., Williams B.A., Akkermans A.D., Vos W.M.D. (2004) “Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets.” Applied and Environmental Microbiology, 70(7): 3821-3830.

Konstantinov S.R., Smidt H., 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.

Kowalchuk G.A., Naoumenko Z.S., Derikx P.J.L., Felske A., Stephen J.R., Arkhipchenko I.A. (1999) “Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted materials.” Applied and Environmental Microbiology 65(2): 396-403.

Kreader C.A. (1998) “Persistence of PCR-Detectable *Bacteroides distasonis* from Human Feces in River Water.” Applied and Environmental Microbiology, 64(10): 4103-4105.

Krichmer, C. J. 5β-cholestan-3β-ol: an indicator of faecal pollution. PhD dissertation. University of Florida, USA, 1971; pp. 118

Lapen D.R., Topp E., Edwards M., Sabourin L., Curnoe W., Gottschall N., Botton P., Rahman S., Ball-Coelho B., Payne M., Kleywegt S., McLaughlint N. (2008) “Effect of liquid municipal biosolid application method on tile and ground water quality.” Journal of Environmental Quality, 37(3): 925-936

Layton A., McKay L., Williams D., Garrett V., Gentry R., 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., Ball A., Ashbolt N., Nichols P.D. (1996) “Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters.” Water Research, 30(12): 2893-2900.

Leung K.T., Mackereth R., Tien Y., Topp E. (2004) “A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources.” FEMS Microbiology Ecology 47(1): 111-119.

Levesque B., Brousseau P., Simard P., Dewailly E., Meisels M., Ramsay D., Joly J. (1993) "Impact of the ring-billed gull (*Larus delawarensis*) on the microbiological quality of recreational water." Applied and Environmental Microbiology 59(4): 1228-1230.

Li Y., Michels R., Mansuy L., Fleck S., Faure, P. (2002) “Comparison of pressurized liquid extraction with classical solvent extraction and microwave-assisted extraction – application to the investigation of the artificial maturation of Mahakam coal.” Fuel, 51(6): 747-755.

Livingston S.J., Kominos S.D., Yee R.B. (1978) “New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteriodes fragilis* group.” Journal of Clinical Microbiology, 7(5): 448-453.

Macdonald I.A., Bokkenheuser V.D., Winter J., McLernon A.M., Mosbach E.H. (1983) “Degradation of steroids in the human guts.” Journal of Lipid Research, 24: 675-700.

Malicki J., Montusiewicz A., Bieganowski A. (2001) “Improvement of counting helminth eggs with internal standard.” Water Research, 35(9): 2333-2335.

Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. (2000) Introducing to Environmental Microbiology. Academic Press.

Mara, D.D. and Oragui J.I. (1983) “Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution.” Journal of Applied Microbiology 55(2): 349-357.

Marti R., Dabert P., Pourcher A.M. (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., Dabert P., Ziebal C., Pourcher A.-M. (2010) “Evaluation of Lactobacillus sobrius/L. amylovorus as a new microbial marker of pig manure.” Applied and Environmental Microbiology, 76(5): 1456-1461.

Martins C.C., Fillmann G., Montone R.C. (2007) “Natural and anthropogenic sterols inputs in surface sediments of Patos lagoon, Brazil.” Journal of the Brazilian Chemical Society, 18(1): 106-115.

Marty Y., Quéméneur M., Aminot A., Le Corre P. (1996) “Laboratory study on degradation of fatty acids and sterols from urban wastes in seawater.“ Water Research, 30(5): 1127-1136.

Matsumoto G. (1983.) “Changes in organic constituents in river water during incubation.” Water Research, 17(12): 1803-1810.

McCalley D.V., Cooke M., Nickless G. (1971) “Effect of sewage treatment on faecal sterols.” Water Research, 15(8): 1019-1025.

McQuaig S.M., Scott T.M., Lukasik J.O., Paul J.H., Harwood V.J. (2009) “Quantification of human polyomaviruses JC virus and BK virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples.” Applied and Environmental Microbiology, 75 (11): 3379-3388.

Meals D.W. and Braun D.C. (2006) “Demonstration of methods to reduce E-coli runoff from dairy manure application sites.” Journal of Environmental Quality, 35(4): 1088-1100.

Meays C.L., Broersma K., Nordin R., Mazumder A. (2004) “Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods.” Journal of Environmental Management, 73(1): 71-79.

Mendez J., Audicana A., Isern A., Llaneza J., Moreno B., Tarancon M.L., Jofre J., Lucena F. (2004) “Standardised evaluation of the performance of a simple membrane filtration-elution method to concentrate bacteriophages from drinking water.” Journal of Virological Methods, 117(1): 19-25.

Mezrioui N. and Baleux, B. (1992) “Effects of temperature, pH and solar radiation on survival sanitary interest bacteria, in wasre water treated by pufifying lagoon.” Revue des Sciences de l’Eau, 5(4): 573-591.

Midtvedt A-C., Midtvedt T. (1993) “Conversion of cholesterol to coprostanol by the intestinal microflora during the first two years of human life.” Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 17(2): 161-168.

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(10): 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(3): 974-984.

Ministère de la Santé et des Sports, DGS/DDASS. (2009) « Etat sanitaire des eaux de baignade en eau de mer et en eau douce – Bilan de la saison balnéaire 2008. » Juin 2009.

Ministère de la Santé et des Sports. (2009) « Guide national pour l'élaboration d'un profil de baignade. » Décembre 2009.

Mishra A., Benham B.L., Mostaghimi S. (2008) "Bacterial transport from agricultural lands fertilized with animal manure." Water, Air and Soil Pollution, 189(1-4): 127-134.

Miskimmin B.M., Rudd J.W.M., Kelly C.A. (1992) "Influence of dissolved organic-carbon, pH, and microbial respiration rates on mercury methylation and demethylation in lake water." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 49(1): 17-22.

Monfort P., Piclet G., Plusquellec A. (2000) "*Listeria innocua* and *Salmonella panama* in estuarine water and seawater : a comparative study." Water Research, 34(3): 983-989.

Moral R., Moreno-Caselles J., Perez-Murcia M.D., Perez-Espinosa A., Rufete B., Paredes C. (2005) "Characterisation of the organic matter pool in manures." Bioresource Technology, 96(2): 153-158.

Myoda, S.P., Carson C.A., Fuhrmann J.J., Hahm B.K., Hartel P.G., Yampara-Lquise H., Johnson L., Kuntz R.L., Nakatsu C.H., Sadowsky M.J., Samadpour M. (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., Old G.H., Eliot-Laize C., Granger S.J., Hawkins J.M.B., Bol R., Haygarth P. (2010) "Assessment of natural fluorescence as a tracer of diffuse agricultural pollution from slurry spreading in intensively-farmed grasslands." Water Research, 44(6): 1701-1712

Ohno T. (2002) "Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter." Environmental Science and Technology, 36(4): 742-746.

Okabe S. and Shimazu Y. (2007) "Persistence of host-specific Bacteroides-Prevotella 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity. Environmental biotechnology, 76(4): 935-944.

Omisakin F., MacRae M., Ogden I.D., Strachan N.J.C. (2003) “Concentration and prevalence of Escherichia coli O157 in cattle feces at slaughter.” Applied and Environmental Microbiology, 69(5): 2444-2447.

Oros D.R., Mazurek M.A., Baham J.E., Simoneit B.R.T. (2002) “Organic tracers from wild fire residues in soils and rain/river wash-out.” Water, Air and Soil Pollution, 137(1-4): 203-233.

Parveen S., Portier K.M., Robinson K., Edmiston L., Tamplin M.L. (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.

Parveen S., Hodge N.C., Stall R.E., Farrah S.R., Tamplin M.L. (2001) “Genotypic and phenotypic characterization of human and nonhuman *E.coli*.” Water Research, 35(2): 379-386.

Peck A.M. and Hornbuckle K.C. (2004) “Synthetic musk fragrances in Lake Michigan.” Environmental Science and Technology, 38(2): 367-372.

Peck A.M., Linebaugh E.K., Hornbuckle K.C. (2006) Synthetic musk fragrances in Lake Erie and Lake Ontario sediment cores. Environmental Science and Technology, 40(18): 5629-5635.

Pell A.N. (1997) “Manure and microbes: public and animal health problem?” Journal of Dairy Science, 80(10): 2673-2681.

Poiger T., Field J., Field TM., Siegrist H., Giger W. (1998) “Behavior of fluorescence whitening agents during sewage treatment.” Water Research, 32(6): 1939-1947.

Pommepuy M., Hervio-Heath D., Caprais M.P., Gourmelon M., Le Saux J.C. and Le Guyader F. (2005) “Fecal contamination in coastal areas: an engineering approach.” Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment, Book chapter: 331-359.

Pond K. (2005) “Water recreation and disease: An expert review of the plausibility of associated infections, their acute effects, sequelae and mortality.” IWA on behalf of the World Health Organization, London, UK.

Pratt C., Warnken J., Leeming R., Arthur M.J., Grice D.I. (2008) “Degradation and responses of coprostanol and selected sterol biomarkers in sediments to a simulated major sewage pollution event: a microcosm experiment under sub-tropical estuarine conditions.” Organic Geochemistry, 39(3): 353-369.

Pruss A. (1998) “Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water.” International Journal of Epidemiology, 27(1), 1-9.

Puglisi E., Nicelli M., Capri E., Trevisan M., Del Re A.A.M. (2003) “Cholesterol, β-sitosterol, ergosterol, and coprostanol in agricultural soils.” Journal of Environmental Quality, 32(2): 466-471.

Reeves A.D. and Patton D. (2005) “Faecal sterols as indicators of sewage contamination in estuarine sediments of the Tay Estuary, Scotland: an extended baseline survey.” Hydrology and Earth System Sciences, 9(1/2): 81-94.

Règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004, fixant les règles spécifiques d’organisation des contrôles officiels concernant les produits d’origine animal destinés à la consommation humaine. Journal officiel n° L 139 du30/04/2004.

Resnick I.G. and Levin M.A. (1981) “Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution.” Applied and Environmental Microbiology, 42(3): 433-438.

Reuter J.H. and Perdue E.M. (1977) “Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural-waters.” Geochimica et Cosmochimica Acta, 41(2): 325-334.

Rochette P., and Gregorich E.G. (1998) “Dynamics of soil microbial biomass C, soluble organic C, and CO_2 evolution after three years of manure application.” Canadian Journal of Soil Science, 78(2): 283-290.

Rogge W.F., Medeiros P.M., Simoneit B.R.T. (2006) “Organic marker compounds for surface soil and fugitive dust from open lot dairies and cattle feedlots.” Atmospheric. Environment, 40(1): 27-49.

Royer I., Angers D.A., Chantigny M.H., Simard R.R., Cluis D. (2007) “Dissolved organic carbon in runoff and tile-drain water under corn and forage fertilized with hog manure.” Journal of Environmental Quality, 36(3): 855-863

Saim N., Osman R., Abg Spian D.R.S., Jaafar M.Z., Juahir H., Abdullah M.P., Ghanin F.A. (2009) “Chemometric approach to validating faecal sterols as source tracer forfaecal contamination in water.” Water Research, 43(20): 5023-5030.

Schaper M., Jofre J., Uys M., 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(4): 657-667.

Scott T.M., Rose J.B., Jenkins T.M., Farrah S.R., Lukasik J. (2002) “Microbial source tracking: current methodology and future directions.” Applied and Environmental Microbiology, 68(2): 5796-5803.

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(2): 249-259.

Shah V.G., Dunstan R.H., Geary P.M., Coombes P., Roberts T.K., 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.

Sharpley A.N. and Smith S.J. (1995) “Nitrogen and phosphorus forms in soils receiving manure.” Soil Science, 159(4): 253-258.

Simpson J.M., Santo Domingo J.W., Reasoner D.J. (2002) “Microbial source tracking: state of the science.” Environmental Science and Technology, 36(24): 5279-5288.

Singh K.P., Malik A., Mohan D., Sinha S., Singh V.K. (2004) “Multivariate statistical techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality of Gomti River (India) – a case study.” Water Research, 38(18): 3980-3992.

Sinton L.W., Finlay R.K., Hannah D.J. (1998) “Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review.” New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 32(2): 323-348.

Solecki O., Jeanneau L., Jardé 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, 45(15) : 4623-4633.

Soupir M.L., Mostaghimi S., Yagow E.R., Hagedorn C., Vaughan D.H. (2006) “Transport of faecal bacteria from poultry litter and cattle manures applied to pastureland.” Water, Air and Soil Pollution, 169(1-4): 125-136.

Stablo C. (1998) « Conséquence sur la santé de la consommation des coquillages de pêche à pied dans le bassin d’Arcachon en période estivale. » Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux 137: 91-107.

Stadler RH. and Fay LB. (1995) “Antioxidative Reactions of Caffeine: Formation of 8-Oxocaffeine (1,3,7-Trimethyluric Acid) in Coffee Subjected to Oxidative Stress.” Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(5): 1332-1338.

Standley L.J., Kaplan L.A., Smith D. (2000) “Molecular tracers of organic matter sources to surface water resources.” Environmental Science and Technology, 34(15): 3124-3130.

Stephanou E. and Giger W. (1982) “Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography.” Environmental Science and Technology, 16(11): 800-805.

Surfrider Fondation Europe. (2008) « 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. » Juin 2009.

Takada H. and Eganhouse R. P. In Molecular markers of anthropogenic waste. R. A. Meyers, Eds.; Encyclopedia of environmental analysis and remediation, Wiley and Sons: New York, USA, 1998; pp. 2883–2940.

Thoumelin G., Marty Y., Lecorre P., Aminot, A. (1990) “Laboratory Investigation of the Degradation of Organic-Matter in Estuarine and Coastal Waters - Sterols Variations.” Oceanologica Acta 13(1): 53-60.

Thurston-Enriquez J.A., Gilley J.E., Eghball B. (2005) “Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry.” Journal of Water and Health, 3(2): 157-171.

Tyagi P., Edwards D.R., 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 fecal pollution in the environment.” Chemosphere, 69(10): 1617-1624.

Tyagi P., Edwards D.R., Coyne M.S. (2008) “Use of sterol and bile acid biomarkers to identify domesticated animal sources of fecal pollution”. Water, Air and Soil Pollution, 187(1-4): 263-274.

Tyagi P., Edwards D.R., Coyne M.S. (2009) “Fecal sterol and bile acid biomarkers: runoff concentrations in animal waster-amended pastures.” Water, Air and Soil Pollution, 198: 45-54.

Ufnar J.A., Wang S.Y., Ufnar D.F., Ellender R.D. (2007) “*Methanobrevibacter ruminantium* as an Indicator of domesticated-ruminant fecal pollution in surface waters.” Applied and Environmental Microbiology, 73(21): 7118-7121.

U.S. Environnmental Protection Agency. (2005) “Microbial source tracking guide document.” EPA Office of Research and Development, U.S. Environnmental Protection Agency, Washington, DC.

Vanotti M.B., Rice J.M., Ellison A.Q., Hunt P.G., Humenik F.J., Baird C.L. (2005) “Solid-liquid separation of swine manure with polymer treatment and sand filtration.” American Society of Agricultural and Biological Engineers, 48(4): 1567-1574.

Vega M., Pardo R., Barrado E., Deban L. (1998) Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. Water Research, 32(12): 3581-3592.

Venkatesan M.I. and Santiago C.A. (1989) “Sterols in ocean sediments: novel tracers to examine habitats of cetaceans, pinipeds, penguins and humans.” Marine Biology, 102(1): 431-437.

Venkatesan M.I. and Kaplan I.R. (1990) “Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica basin, southern California.” Environmental Science and Technology, 24 (2): 208-214.

Venieri D., Vantarakis A., Komninou G., Papapetropoulou M. (2004) “Differentiation of faecal *Escherichia coli* from human and animal sources by random amplified polymorphic DNAPCR (RAPD-PCR).” Water Science and Technology, 50(1): 193-198.

Verma S. and Sharma P.K. (2007) “Effect of long-term manuring and fertilizers on carbon pools, soil structure, and sustainability under different cropping systems in wet-temperate zone of northwest Himalayas.” Biology and Fertility of Soils, 44(1): 235-240.

Wallis J.L., Taylor H.D. (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.

Wright, M. E., Solo-Gabriele H.M., Elmir S., Fleming L.E. (2009) “Microbial load from animal feces at a recreational beach.” Marine Pollution Bulletin 58(11): 1649-1656.

Wu J., Rees P., Storrer S., Alderisio K., Dorner S. (2009) “Fate and transport modeling of potential pathogens: the contribution from sediments.” Journal of the American Water Resources Association, 45(1): 35-44.

Yoder, J.S., Hlavsa, M.C., Craun, G.F., Hill, V., Roberts, V., Yu, P.A., Hicks, L.A., Alexander, N.T., Calderon, R.L., Roy, S.L. et Beach, M.J. “Surveillance for waterborne disease and outbreaks assoicated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events—United States, 2005-2006,” Morbidity and Mortality Weekly Report, vol. 58, no. 57/SS-9, pp. 1–38, 2008.

Zsolnay A., and Görlitz H. (1994) “Water-extractable organic matter in arable soils: Effects of drought and long-term fertilization.” Soil Biology and Biochemistry, 26(9): 1257-1261.

http://www.observatoire-eau-bretagne.fr/Qualite-des-eaux/Eaux-littorales/Eaux-de-baignade

http://www.observatoire-eau-bretagne.fr/Qualite-des-eaux/Eaux-littorales/Sites-de-peche-a-pied

http://www.observatoire-eau-bretagne.fr/Media/Atlas/Cartes/Zones-d-excedent-structurel-en-azote/(categorie)/62224/(image)/79657

Annexes

ANNEXE 1: DIRECTIVE 2006/7/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL DU 15 FEVRIER 2006 CONCERNANT LA GESTION DE LA QUALITE DES EAUX DE BAIGNADE ET ABROGEANT LA DIRECTIVE 76/160/CEE

4.3.2006 FR Journal officiel de l'Union européenne L 64/37

DIRECTIVE 2006/7/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

du 15 février 2006

concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE

LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

vu le traité instituant la Communauté européenne, et notamment son article 175, paragraphe 1,

vu la proposition de la Commission ([1]),

vu l'avis du Comité économique et social européen ([2]),

vu l'avis du Comité des régions ([3]),

statuant conformément à la procédure visée à l'article 251 du traité ([4]), au vu du projet commun approuvé le 8 décembre 2005 par le comité de conciliation,

considérant ce qui suit:

(1) À la suite de la communication de la Commission relative au développement durable, le Conseil européen a fixé des objectifs comme orientations générales pour des développements futurs dans des domaines prioritaires tels que les ressources naturelles et la santé publique.

(2) L'eau est une ressource naturelle rare dont il faut protéger, défendre, gérer et traiter comme telle la qualité. Les eaux de surface, en particulier, sont des ressources renouvelables dont la capacité de restauration après des effets négatifs résultant d'activités humaines est limitée.

(3) La politique communautaire de l'environnement devrait viser un niveau élevé de protection et contribuer à la poursuite des objectifs de préservation, de protection et d'amélioration de la qualité de l'environnement ainsi que de protection de la santé des personnes.

(4) En décembre 2000, la Commission a adopté une communication au Parlement européen et au Conseil intitulée «Élaborer une nouvelle politique des eaux de baignade» et a entamé une consultation à grande échelle de toutes les parties prenantes et concernées. Le principal résultat de cette consultation a été un soutien général à l'élaboration d'une nouvelle directive, fondée sur les preuves scientifiques les plus récentes et accordant une attention particulière à une participation plus large du public.

(5) La décision n° 1600/2002/CE du Parlement européen et du Conseil du 22 juillet 2002 établissant le sixième programme d'action communautaire pour l'environnement ([5]) contient un engagement à assurer un niveau élevé de protection des eaux de baignade, notamment en modifiant la directive 76/160/CEE du Conseil du 8 décembre 1975 concernant la qualité des eaux de baignade ([6]).

(6) Conformément au traité, dans l'élaboration de sa politique de l'environnement, la Communauté tient notamment compte des données scientifiques et techniques disponibles. La présente directive devrait utiliser des preuves scientifiques pour mettre en œuvre les paramètres indicateurs les plus fiables permettant de prévoir un risque microbiologique pour la santé et d'assurer un niveau élevé de protection. De nouvelles études épidémiologiques devraient être entreprises d'urgence sur les risques pour la santé de la baignade, en particulier en eau douce.

(7) Pour favoriser une utilisation plus efficace et sage des ressources, la présente directive doit être étroitement coordonnée avec la législation communautaire sur l'eau, notamment la directive 91/271/CEE du Conseil du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux urbaines résiduaires ([7]), la directive 91/676/CEE du Conseil du 12 décembre 1991 concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles ([8]) et la directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau ([9]).

([1]) JO C 45 E du 25.2.2003, p. 127.

([2]) JO C 220 du 16.9.2003, p. 39.

([3]) JO C 244 du 10.10.2003, p. 31.

([4]) Avis du Parlement européen du 21 octobre 2003 (JO C 82 E du 1.4.2004, p. 115), position commune du Conseil du 20 décembre 2004 (JO C 111 E du 11.5.2005, p. 1) et position du Parlement européen du 10 mai 2005 (non encore parue au Journal officiel). Résolution du Parlement européen du 18 janvier 2006 (non encore parue au Journal officiel) et décision du Conseil du 20 décembre 2005.

([5]) JO L 242 du 10.9.2002, p. 1.

([6]) JO L 31 du 5.2.1976, p. 1. Directive modifiée en dernier lieu par le règlement (CE) n° 807/2003 (JO L 122 du 16.5.2003, p. 36).

([7]) JO L 135 du 30.5.1991, p. 40. Directive modifiée en dernier lieu par le règlement (CE) n° 1882/2003 du Parlement européen et du Conseil (JO L 284 du 31.10.2003, p. 1).

([8]) JO L 375 du 31.12.1991, p. 1. Directive modifiée par le règlement (CE) n° 1882/2003.

([9]) JO L 327 du 22.12.2000, p. 1. Directive modifiée par la décision n° 2455/2001/CE (JO L 331 du 15.12.2001, p. 1).

(8) Des informations appropriées sur les mesures prévues et les progrès enregistrés lors de la mise en œuvre doivent être diffusées aux parties concernées. Le public devrait disposer en temps opportun d'informations pertinentes sur les résultats de la surveillance de la qualité des eaux de baignade et des mesures de gestion des risques, afin de prévenir les risques pour la santé, notamment dans le cadre de pollutions prévisibles à court terme ou de situations anormales. Les nouvelles technologies qui permettent au public d'être informé d'une manière efficace et comparable sur les eaux de baignade à travers la Communauté devraient être utilisées.

(9) Aux fins du contrôle, il convient d'appliquer des méthodes et des pratiques d'analyse harmonisées. L'observation et l'évaluation de la qualité doivent être effectuées sur une période prolongée pour obtenir un classement réaliste des eaux de baignade.

(10) La conformité devrait être une question de dispositions appropriées de gestion et d'assurance de la qualité et non simplement de calcul et de mesure. L'instauration d'un mécanisme de profils des eaux de baignade est donc appropriée pour permettre une meilleure compréhension des risques en vue de prendre des mesures de gestion. Parallèlement, une attention particulière devrait être attachée à assurer la conformité aux normes de qualité et une transition cohérente avec la directive 76/160/CEE.

(11) Le 17 février 2005, la Communauté a ratifié la convention de la Commission économique pour l'Europe des Nations unies (UNECE) sur l'accès à l'information et la participation du public au processus décisionnel et l'accès à la justice en matière d'environnement (la «convention d'Aarhus»). Il convient dès lors que la présente directive comprenne des dispositions relatives à l'accès du public à l'information et prévoie la participation du public à sa mise en œuvre afin de compléter la directive 2003/4/CE du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2003 concernant l'accès du public à l'information en matière d'environnement [1] et la directive 2003/35/CE du Parlement européen et du Conseil du 26 mai 2003 prévoyant la participation du public lors de l'élaboration de certains plans et programmes relatifs à l'environnement [2].

(12) Étant donné que les objectifs de la présente directive, à savoir l'obtention par les États membres, sur la base de normes communes, d'une bonne qualité des eaux de baignade et d'un niveau élevé de protection dans toute la Communauté, ne peuvent pas être réalisés de manière suffisante par les États membres et peuvent donc être mieux réalisés au niveau communautaire, la Communauté peut prendre des mesures, conformément au principe de subsidiarité consacré à l'article 5 du traité. Conformément au principe de proportionnalité tel qu'énoncé audit article, la présente directive n'excède pas ce qui est nécessaire pour atteindre ces objectifs.

(13) Il y a lieu d'arrêter les mesures nécessaires pour la mise en œuvre de la présente directive en conformité avec la décision 1999/468/CE du Conseil du 28 juin 1999 fixant les modalités de l'exercice des compétences d'exécution conférées à la Commission [3].

(14) La politique communautaire concernant les eaux de baignade revêt une importance confirmée au fil des saisons balnéaires, puisqu'elle permet de protéger le public des pollutions qui surviennent de façon accidentelle ou chronique à l'intérieur et aux abords des zones de baignade communautaires. La qualité générale des eaux de baignade s'est considérablement améliorée depuis l'entrée en vigueur de la directive 76/160/CEE. Toutefois, la directive reflète l'état des connaissances et de l'expérience du début des années soixante-dix. Les modes d'utilisation des eaux de baignade ont changé depuis lors, et les connaissances techniques et scientifiques ont évolué. Il convient dès lors d'abroger ladite directive,

ONT ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

CHAPITRE I

DISPOSITIONS GÉNÉRALES

Article premier

Objet et champ d'application

1. La présente directive fixe des dispositions en ce qui concerne:

a) la surveillance et le classement de la qualité des eaux de baignade;

b) la gestion de la qualité des eaux de baignade, et

c) la fourniture au public d'informations sur la qualité des eaux de baignade.

2. La présente directive vise à préserver, à protéger et à améliorer la qualité de l'environnement ainsi qu'à protéger la santé humaine, en complétant la directive 2000/60/CE.

3. La présente directive s'applique à toute partie des eaux de surface dans laquelle l'autorité compétente s'attend à ce qu'un grand nombre de personnes se baignent et dans laquelle elle n'a pas interdit ou déconseillé la baignade de façon permanente (ci-après «eaux de baignade»). Elle ne s'applique pas:

a) aux bassins de natation et de cure;

b) aux eaux captives qui sont soumises à un traitement ou sont utilisées à des fins thérapeutiques;

---

[1] JO L 41 du 14.2.2003, p. 26.

[2] JO L 156 du 25.6.2003, p. 17.
décision du Conseil du 20 décembre 2005.

[3] JO L 184 du 17.7.1999, p. 23.
décision n° 2455/2001/CE (JO L 331 du 15.12.2001, p. 1).

c) aux eaux captives artificielles séparées des eaux de surface et des eaux souterraines.

Article 2

Définitions

Aux fins de la présente directive, on entend par:

1) «eaux de surface», «eaux souterraines», «eaux intérieures», «eaux de transition», «eaux côtières» et «bassin hydrographique»: la définition qui est donnée de ces termes dans la directive 2000/60/CE;

2) «autorité compétente»: l'autorité (ou les autorités) désignée(s) par l'État membre en vue d'assurer le respect des obligations prévues par la présente directive ou toute autre autorité ou organisme auquel ce rôle a été imparti;

3) «permanente»: relativement à l'interdiction de se baigner ou à l'avis déconseillant la baignade, une durée couvrant toute une saison balnéaire au moins;

4) «grand nombre»: relativement aux baigneurs, un nombre que l'autorité compétente estime élevé compte tenu, notamment, des tendances passées ou des infrastructures et des services mis à disposition ou de toute autre mesure prise pour encourager la baignade;

5) «pollution»: la présence d'une contamination microbiologique ou d'autres organismes ou déchets affectant la qualité des eaux de baignade et présentant un risque pour la santé des baigneurs, tel qu'il est précisé aux articles 8 et 9 et à l'annexe I dans la colonne A;

6) «saison balnéaire»: la période pendant laquelle la présence d'un grand nombre de baigneurs est prévisible;

7) «mesures de gestion»: les mesures suivantes prises concernant les eaux de baignade:

   a) élaboration et maintien d'un profil des eaux de baignade;

   b) élaboration d'un calendrier de surveillance;

   c) surveillance des eaux de baignade;

   d) évaluation de la qualité des eaux de baignade;

   e) classement des eaux de baignade;

   f) recensement et évaluation des sources possibles de pollution des eaux de baignade susceptibles d'affecter la santé des baigneurs;

   g) fourniture d'informations au public;

   h) actions visant à prévenir l'exposition des baigneurs à la pollution;

   i) actions visant à réduire le risque de pollution;

8) «pollution à court terme»: une contamination microbiologique visée à l'annexe I, colonne A, qui a des causes clairement identifiables, qui ne devrait normalement pas affecter la qualité des eaux de baignade pendant plus de soixante-douze heures environ à partir du moment où la qualité de ces eaux a commencé à être affectée et pour laquelle l'autorité compétente a établi des procédures afin de prévenir et de gérer de telles pollutions à court terme, telles qu'établies à l'annexe II;

9) «situation anormale»: un événement ou une combinaison d'événements affectant la qualité des eaux de baignade à un endroit donné et ne se produisant généralement pas plus d'une fois tous les quatre ans en moyenne;

10) «ensemble de données relatives à la qualité des eaux de baignade»: les données collectées conformément à l'article 3;

11) «évaluation de la qualité des eaux de baignade»: le processus permettant d'évaluer la qualité des eaux de baignade à l'aide de la méthode d'évaluation définie à l'annexe II;

12) «prolifération de cyanobactéries»: une accumulation de cyanobactéries sous la forme d'efflorescences, de nappes ou d'écume;

13) «public concerné»: la définition qui est donnée de ce terme dans la directive 85/337/CEE du Conseil du 27 juin 1985 concernant l'évaluation des incidences de certains projets publics et privés sur l'environnement ([1]).

CHAPITRE II

QUALITÉ ET GESTION DES EAUX DE BAIGNADE

Article 3

Surveillance

1. Les États membres recensent chaque année toutes les eaux de baignade et définissent la durée de la saison balnéaire, et cela pour la première fois avant le début de la première saison balnéaire, après le 24 mars 2008.

2. Les États membres veillent à ce que la surveillance des paramètres exposés à l'annexe I, colonne A, soit effectuée conformément à l'annexe IV.

([1]) JO L 175 du 5.7.1985, p. 40. Directive modifiée en dernier lieu par la directive 2003/35/CE du Parlement européen et du Conseil (JO L 156 du 25.6.2003, p. 17).

3. Le point de surveillance est l'endroit des eaux de baignade:

a) où l'on s'attend à trouver le plus de baigneurs, ou

b) où l'on s'attend au plus grand risque de pollution, compte tenu du profil des eaux de baignade.

4. Un calendrier de surveillance est établi pour chaque zone de baignade avant le début de chaque saison balnéaire et pour la première fois avant le début de la troisième saison balnéaire complète suivant l'entrée en vigueur de la présente directive. La surveillance est effectuée dans un délai maximal de quatre jours à compter de la date indiquée dans le calendrier de surveillance.

5. Les États membres peuvent instaurer la surveillance des paramètres exposés à l'annexe I, colonne A, au cours de la première saison balnéaire complète suivant l'entrée en vigueur de la présente directive. Dans ce cas, la surveillance est effectuée selon la fréquence prévue à l'annexe IV. Les résultats de cette surveillance peuvent être utilisés pour élaborer les ensembles de données relatives à la qualité des eaux de baignade visés à l'article 4. Dès que les États membres instaurent la surveillance prévue par la présente directive, la surveillance des paramètres figurant en annexe de la directive 76/160/CEE peut cesser.

6. Des échantillons prélevés pendant des pollutions à court terme peuvent être écartés. Ils sont remplacés par des échantillons prélevés conformément à l'annexe IV.

7. Lors de situations anormales, le calendrier de surveillance visé au paragraphe 4 peut être suspendu. Dès que possible après la fin de la situation anormale, ce calendrier est rétabli, et de nouveaux échantillons sont prélevés afin de remplacer les échantillons qui n'ont pu l'être en raison de cette situation.

8. Les États membres informent la Commission de toute suspension du calendrier de surveillance, en indiquant les raisons de la suspension. Cette information est transmise, au plus tard, à l'occasion du rapport annuel suivant, établi en vertu de l'article 13.

9. Les États membres veillent à ce que l'analyse de la qualité des eaux de baignade soit effectuée conformément aux méthodes de référence visées à l'annexe I et aux règles énoncées à l'annexe V. Toutefois, les États membres peuvent autoriser le recours à d'autres méthodes ou règles s'ils peuvent démontrer que les résultats obtenus sont équivalents à ceux obtenus à l'aide des méthodes visées à l'annexe I et des règles énoncées à l'annexe V. Les États membres qui autorisent le recours à ces méthodes ou règles équivalentes fournissent à la Commission toutes les informations pertinentes concernant les méthodes ou règles utilisées et leur équivalence.

Article 4

Évaluation de la qualité des eaux de baignade

1. Les États membres veillent à ce que des ensembles de données relatives à la qualité des eaux de baignade soient recueillis sur la base de la surveillance des paramètres visés à l'annexe I, colonne A.

2. Des évaluations de la qualité des eaux de baignade sont réalisées:

a) pour chaque eau de baignade;

b) à l'issue de chaque saison balnéaire;

c) sur la base de l'ensemble des données relatives à la qualité des eaux de baignade recueillies pour cette saison balnéaire et au cours des trois saisons balnéaires précédentes, et

d) conformément à la procédure décrite à l'annexe II.

Toutefois, un État membre peut décider d'effectuer des évaluations de la qualité des eaux de baignade sur la base de l'ensemble des données relatives à la qualité des eaux de baignade recueillies pour les trois saisons balnéaires précédentes seulement. Dans ce cas, il en informe la Commission au préalable. Il informe également la Commission s'il décide, ultérieurement, de recommencer à réaliser les évaluations sur la base de quatre saisons balnéaires. Les États membres ne peuvent pas modifier la durée de la période d'évaluation plus d'une fois tous les cinq ans.

3. Les ensembles de données relatives aux eaux de baignade utilisées pour effectuer des évaluations de la qualité des eaux de baignade se composent d'au moins seize échantillons, ou, dans les circonstances particulières prévues à l'annexe IV, point 2, de douze échantillons.

4. Cependant, à condition que:

— la condition énoncée au paragraphe 3 soit satisfaite, ou

— que l'ensemble des données relatives aux eaux de baignade utilisées pour réaliser l'évaluation comprenne au moins huit échantillons, dans le cas d'eaux de baignade pour lesquelles la saison balnéaire ne dépasse pas huit semaines,

l'évaluation de la qualité d'une eau de baignade peut être réalisée sur la base d'un ensemble de données relatives à la qualité des eaux de baignade concernant moins de quatre saisons balnéaires, si:

a) l'eau de baignade est nouvellement identifiée;

b) des changements sont intervenus, qui sont susceptibles d'affecter le classement des eaux de baignade conformément à l'article 5, auquel cas l'évaluation est réalisée sur la base d'un ensemble de données relatives à la qualité des eaux de baignade composé uniquement des résultats obtenus pour les échantillons prélevés depuis que les changements sont intervenus, ou

c) l'eau de baignade a déjà fait l'objet d'une évaluation conformément à la directive 76/160/CEE, auquel cas des données équivalentes recueillies conformément à ladite directive sont utilisées et, à cette fin, les paramètres 2 et 3 de l'annexe de ladite directive sont jugés équivalents aux paramètres 2 et 1 figurant à l'annexe I, colonne A, de la présente directive.

5. Les États membres peuvent diviser ou regrouper les eaux de baignade existantes à la lumière des évaluations de la qualité des eaux de baignade. Ils ne peuvent regrouper des eaux de baignade existantes que si celles-ci:

a) sont contiguës;

b) ont fait l'objet d'évaluations similaires pendant les quatre années précédentes conformément aux paragraphes 2 et 3 et au paragraphe 4, point c), et

c) ont des profils d'eaux de baignade indiquant tous des facteurs de risque communs ou leur absence.

Article 5

Classement et état qualitatif des eaux de baignade

1. À la suite de l'évaluation de la qualité des eaux de baignade effectuée conformément à l'article 4, les États membres classent les eaux de baignade, conformément aux critères établis à l'annexe II, comme étant, selon le cas, de qualité:

a) «insuffisante»;

b) «suffisante»;

c) «bonne», ou

d) «excellente».

2. Le premier classement effectué conformément aux exigences de la présente directive est achevé au plus tard à la fin de la saison balnéaire 2015.

3. Les États membres veillent à ce que, à la fin de la saison balnéaire 2015 au plus tard, toutes les eaux de baignade soient au moins de qualité «suffisante». Ils prennent les mesures réalistes et proportionnées qu'ils considèrent comme appropriées en vue d'accroître le nombre d'eaux de baignade dont la qualité est «excellente» ou «bonne».

4. Toutefois, nonobstant l'exigence générale faite au paragraphe 3, le classement temporaire d'une eau de baignade comme étant de qualité «insuffisante» est permis, sans pour autant entraîner la non-conformité à la présente directive. Dans de tels cas, les États membres veillent à ce que les conditions ci-après soient satisfaites:

a) En ce qui concerne toute eau de baignade de qualité «insuffisante», les mesures ci-après sont prises, avec effet à partir de la saison balnéaire qui suit le classement:

   i) des mesures de gestion adéquates, comprenant une interdiction de baignade ou un avis déconseillant la baignade, en vue d'éviter que les baigneurs ne soient exposés à une pollution;

   ii) l'identification des causes et des raisons pour lesquelles une qualité «suffisante» n'a pu être atteinte;

   iii) des mesures adéquates pour éviter, réduire ou éliminer les sources de pollution, et

   iv) conformément à l'article 12, l'avertissement du public par un signal simple et clair, ainsi que son information des causes de la pollution et des mesures adoptées sur la base du profil des eaux de baignade.

b) Si des eaux de baignade sont de qualité «insuffisante» pendant cinq années consécutives, une interdiction permanente de baignade ou une recommandation déconseillant de façon permanente la baignade est introduite. Toutefois, un État membre peut introduire une interdiction permanente de baignade ou une recommandation déconseillant de façon permanente la baignade avant la fin du délai de cinq ans s'il estime qu'il serait impossible ou exagérément coûteux d'atteindre l'état de qualité «suffisante».

Article 6

Profils des eaux de baignade

1. Les États membres veillent à ce que des profils des eaux de baignade soient établis conformément à l'annexe III. Chaque profil des eaux de baignade peut être établi pour une ou plusieurs eaux de baignade contiguës. Les profils des eaux de baignade sont établis pour la première fois le 24 mars 2011 au plus tard.

2. Les profils des eaux de baignade sont révisés et actualisés conformément à l'annexe III.

3. Lors de l'établissement, de la révision et de l'actualisation des profils des eaux de baignade, il convient d'utiliser adéquatement les données qui ont été obtenues lors des surveillances et des évaluations effectuées en application de la directive 2000/60/CE et qui sont pertinentes aux fins de la présente directive.

Article 7

Mesures de gestion à prendre dans des circonstances exceptionnelles

Les États membres veillent à ce que des mesures de gestion adéquates soient prises en temps utile lorsqu'ils ont connaissance de situations imprévisibles ayant, ou pouvant vraisemblablement avoir, une incidence négative sur la qualité des eaux de baignade et sur la santé des baigneurs. Ces mesures comprennent l'information du public et, si nécessaire, une interdiction temporaire de baignade.

Article 8

Risques liés aux cyanobactéries

1. Lorsque le profil des eaux de baignade indique un risque potentiel de prolifération de cyanobactéries, une surveillance appropriée est effectuée pour permettre d'identifier en temps utile les risques sanitaires.

2. En cas de prolifération de cyanobactéries et lorsqu'un risque sanitaire a été identifié ou est présumé, des mesures de gestion adéquates sont prises immédiatement afin de prévenir l'exposition, y compris des mesures pour informer le public.

Article 9

Autres paramètres

1. Lorsque le profil des eaux de baignade indique une tendance à la prolifération de macroalgues et/ou de phytoplancton marin, des enquêtes sont menées pour déterminer si leur présence est acceptable et pour identifier les risques sanitaires; des mesures de gestion adéquates sont prises, y compris des mesures pour informer le public.

2. Les eaux de baignade font l'objet d'un contrôle de pollution visuel visant à détecter la présence, par exemple, de résidus goudronneux, de verre, de plastique, de caoutchouc ou d'autres déchets. Lorsqu'une pollution de ce type est repérée, des mesures de gestion adéquates sont prises, y compris, le cas échéant, pour informer le public.

Article 10

Coopération concernant les eaux transfrontalières

Lorsqu'un bassin hydrographique induit des incidences transfrontalières sur la qualité des eaux de baignade, les États membres concernés coopèrent de manière appropriée à la mise en œuvre de la présente directive, y compris au moyen d'un échange approprié d'informations et d'actions conjointes visant à contrôler ces incidences.

CHAPITRE III

ÉCHANGE D'INFORMATIONS

Article 11

Participation du public

Les États membres encouragent la participation du public à la mise en œuvre de la présente directive et veillent à donner au public concerné l'occasion:

— de s'informer sur la manière de participer, et

— de formuler des suggestions, des remarques ou des réclamations.

Ceci s'applique notamment à l'établissement, à la révision et à l'actualisation des listes des eaux de baignade conformément à l'article 3, paragraphe 1. Les autorités compétentes prennent dûment en considération toute information obtenue.

Article 12

Information du public

1. Les États membres veillent à ce que les informations suivantes soient activement diffusées et rapidement disponibles, durant la saison balnéaire, à un endroit facilement accessible et situé à proximité immédiate de chaque site de baignade:

a) le classement actuel des eaux de baignade ainsi que tout avis interdisant ou déconseillant la baignade visé au présent article, au moyen d'un signe ou d'un symbole simple et clair;

b) une description générale des eaux de baignade, en termes non techniques, fondée sur le profil des eaux de baignade établi conformément à l'annexe III;

c) dans le cas d'eaux de baignade exposées à des pollutions à court terme:

— l'indication que ces eaux de baignade présentent des pollutions à court terme,

— une indication du nombre de jours pendant lesquels la baignade a été interdite ou déconseillée au cours de la saison balnéaire précédente à cause d'une telle pollution, et

— un avertissement chaque fois qu'une telle pollution est prévue ou se produit;

d) des informations sur la nature et la durée prévue des situations anormales au cours de tels événements;

e) si la baignade est interdite ou déconseillée, un avis en informant le public et en expliquant les raisons;

f) si une interdiction permanente de se baigner ou un avis permanent déconseillant la baignade sont établis, le fait que la zone concernée n'est plus une eau de baignade et les raisons de son déclassement, et

g) l'indication de sources d'informations plus complètes conformément au paragraphe 2.

2. Les États membres utilisent les moyens de communication et les technologies appropriés, y compris l'internet, pour diffuser activement et rapidement les informations concernant les eaux de baignade visées au paragraphe 1, ainsi que les informations suivantes, si nécessaire dans plusieurs langues:

a) une liste des eaux de baignade;

b) le classement de chaque eau de baignade au cours des trois dernières années ainsi que son profil, y compris les résultats de la surveillance effectuée conformément à la présente directive depuis le classement précédent;

c) pour les eaux de baignade classées comme étant de qualité «insuffisante», des informations sur les sources de pollution et les mesures prises en vue de prévenir l'exposition des baigneurs à la pollution et de s'attaquer à ses causes, comme mentionné à l'article 5, paragraphe 4, et

d) pour les eaux de baignade présentant des pollutions à court terme, des informations générales concernant:

— les conditions susceptibles de conduire à des pollutions à court terme,

— la probabilité de survenue d'une telle pollution et sa durée probable,

— les sources de pollution et les mesures prises en vue de prévenir l'exposition des baigneurs à la pollution et de s'attaquer à ses causes.

La liste visée au point a) est disponible chaque année avant le début de la saison balnéaire. Les résultats des surveillances visées au point b) sont disponibles sur l'internet après achèvement de l'analyse.

3. Les informations visées aux paragraphes 1 et 2 sont diffusées dès qu'elles sont disponibles et à dater du début de la cinquième saison balnéaire, après le 24 mars 2008.

4. Chaque fois que cela est possible, les États membres et la Commission fournissent au public des informations fondées sur la géoréférence et les présentent d'une manière claire et cohérente, notamment au moyen de signes et de symboles.

Article 13

Rapports

1. Pour chaque zone de baignade, les États membres fournissent à la Commission les résultats de la surveillance et l'évaluation de la qualité des eaux de baignade, ainsi qu'une description des mesures de gestion importantes qui ont été prises. Chaque année, le 31 décembre au plus tard, les États membres fournissent ces informations pour la saison précédente. Ils commenceront à fournir ces résultats une fois que la première évaluation de la qualité des eaux de baignade aura été effectuée conformément à l'article 4.

2. Les États membres notifient chaque année à la Commission, avant le début de la saison balnéaire, toutes les eaux identifiées comme eaux de baignade, y compris les raisons de toute modification par rapport à l'année précédente. Les États membres fournissent cette information pour la première fois avant le début de la première saison balnéaire, après le 24 mars 2008.

3. Lorsque la surveillance des eaux de baignade a commencé au titre de la présente directive, le rapport annuel transmis à la Commission conformément au paragraphe 1 continue à être élaboré en vertu de la directive 76/160/CEE jusqu'à ce qu'une première évaluation puisse être effectuée en vertu de la présente directive. Au cours de la période précitée, le paramètre 1 de l'annexe de la directive 76/160/CEE n'est pas pris en compte dans le rapport annuel, et les paramètres 2 et 3 de l'annexe à la directive 76/160/CEE sont considérés comme équivalents aux paramètres 2 et 1 de l'annexe I, colonne A, de la présente directive.

4. La Commission publie chaque année un rapport de synthèse sur la qualité des eaux de baignade dans la Communauté, indiquant les classements des eaux de baignade, la conformité à la présente directive et les mesures de gestion importantes adoptées. La Commission publie ce rapport avant le 30 avril de chaque année, y compris sur l'internet. En établissant son rapport, la Commission tire, dans la mesure du possible, le meilleur parti des systèmes de collecte, d'évaluation et de présentation des données instaurés en vertu de la législation communautaire pertinente, notamment la directive 2000/60/CE.

CHAPITRE IV

DISPOSITIONS FINALES

Article 14

Rapport et révision

1. En 2008 au plus tard, la Commission présente un rapport au Parlement européen et au Conseil. Le rapport accorde une attention particulière:

a) aux résultats d'une étude épidémiologique européenne appropriée, réalisée par la Commission en collaboration avec les États membres;

b) aux autres progrès scientifiques, analytiques et épidémiologiques pertinents pour les paramètres servant à la détermination de la qualité des eaux de baignade, y compris en ce qui concerne les virus, et

c) aux recommandations de l'Organisation mondiale de la santé.

2. Les États membres soumettent des observations écrites sur ledit rapport à la Commission, avant la fin de 2014, y compris en ce qui concerne la nécessité de recherches ou d'évaluations complémentaires qui pourraient être nécessaires afin d'aider la Commission dans son réexamen de la présente directive en vertu du paragraphe 3.

3. À la lumière du rapport, des observations écrites des États membres et d'une évaluation d'impact approfondie, et en gardant à l'esprit l'expérience acquise dans la mise en œuvre de la présente directive, la Commission réexamine la présente directive au plus tard en 2020, en accordant une attention particulière aux paramètres relatifs à la qualité des eaux de baignade et, le cas échéant, soumet des propositions législatives conformément à l'article 251 du traité.

Article 15

Adaptations techniques et mesures d'exécution

1. Il est décidé, conformément à la procédure prévue à l'article 16, paragraphe 2:

a) de préciser la norme EN/ISO pour l'équivalence des méthodes d'analyse microbiologique aux fins de l'article 3, paragraphe 9;

b) de fixer des règles détaillées pour la mise en œuvre de l'article 8, paragraphe 1, de l'article 12, paragraphe 1, point a), et de l'article 12, paragraphe 4;

c) d'adapter les méthodes d'analyse des paramètres figurant à l'annexe I pour tenir compte du progrès scientifique et technique;

d) d'adapter l'annexe V pour tenir compte du progrès scientifique et technique;

e) de fixer les orientations pour une méthode commune d'évaluation des échantillons individuels.

2. La Commission présente un projet des mesures à prendre conformément au paragraphe 1, point b), en ce qui concerne l'article 12, paragraphe 1, point a), au plus tard le 24 mars 2008. Elle consulte préalablement les représentants des États membres, des autorités régionales et locales, des organisations touristiques et de consommateurs pertinentes ainsi que les autres parties intéressées. Une fois que les règles pertinentes ont été adoptées, la Commission les rend publiques au moyen de l'internet.

Article 16

Procédure de comité

1. La Commission est assistée par un comité.

2. Dans le cas où il est fait référence au présent paragraphe, les articles 5 et 7 de la décision 1999/468/CE s'appliquent, dans le respect des dispositions de l'article 8 de celle-ci.

La période prévue à l'article 5, paragraphe 6, de la décision 1999/468/CE est fixée à trois mois.

3. Le comité adopte son règlement intérieur.

Article 17

Abrogation

1. La directive 76/160/CEE est abrogée avec effet au 31 décembre 2014. Sous réserve du paragraphe 2, cette abrogation est sans préjudice des obligations des États membres concernant les délais de transposition et de mise en application fixés dans la directive abrogée.

2. Dès qu'un État membre a pris toutes les mesures juridiques, administratives et pratiques nécessaires pour se conformer à la présente directive, celle-ci s'applique, remplaçant la directive 76/160/CEE.

3. Les références à la directive abrogée sont considérées comme faites à la présente directive.

Article 18

Mise en œuvre

1. Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive, au plus tard le 24 mars 2008. Ils en informent immédiatement la Commission.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence à l'occasion de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont arrêtées par les États membres.

2. Les États membres communiquent à la Commission le texte des dispositions essentielles de droit interne qu'ils adoptent dans le domaine régi par la présente directive.

Article 19

Entrée en vigueur

La présente directive entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Article 20

Destinataires

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Strasbourg, le 15 février 2006.

Par le Parlement européen	*Par le Conseil*
Le président	*Le président*
J. BORRELL FONTELLES	H. WINKLER

L 64/46 FR Journal officiel de l'Union européenne 4.3.2006

ANNEXE I

Pour les eaux intérieures

	A	B	C	D	E
	Paramètre	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante	Méthodes de référence pour l'analyse
1	Entérocoques intestinaux (UFC/100 ml)	200 (*)	400 (*)	330 (**)	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2
2	Escherichia coli (UFC/100 ml)	500 (*)	1 000 (*)	900 (**)	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1

(*) Évaluation au 95e percentile. Voir l'annexe II.
(**) Évaluation au 90e percentile. Voir l'annexe II.

Pour les eaux côtières et les eaux de transition

	A	B	C	D	E
	Paramètre	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante	Méthodes de référence pour l'analyse
1	Entérocoques intestinaux (UFC/100 ml)	100 (*)	200 (*)	185 (**)	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2
2	Escherichia coli (UFC/100 ml)	250 (*)	500 (*)	500 (**)	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1

(*) Évaluation au 95e percentile. Voir l'annexe II.
(**) Évaluation au 90e percentile. Voir l'annexe II.

4.3.2006 FR Journal officiel de l'Union européenne L 64/47

ANNEXE II

Évaluation et classement des eaux de baignade

1. **Qualité insuffisante**

Les eaux de baignade sont classées comme étant de «qualité insuffisante» si, sur la base de l'ensemble des données relatives à la qualité des eaux de baignade collectées au cours de la dernière période d'évaluation ([a]), les valeurs du percentile ([b]) pour les dénombrements bactériens sont moins bonnes ([c]) que les valeurs de la «qualité suffisante» indiquées à l'annexe I, colonne D.

2. **Qualité suffisante**

Les eaux de baignade doivent être classées comme étant de «qualité suffisante»:

1) si, sur la base de l'ensemble des données relatives à la qualité des eaux de baignade collectées au cours de la dernière période d'évaluation, les valeurs du percentile pour les dénombrements bactériens sont égales ou meilleures ([d]) que les valeurs «qualité suffisante» indiquées à l'annexe I, colonne D, et

2) si l'eau de baignade présente une pollution à court terme, à condition que:

i) des mesures de gestion adéquates soient prises, y compris le contrôle, l'alerte précoce et la surveillance, afin de prévenir l'exposition des baigneurs à la pollution, notamment au moyen d'un avertissement ou, si nécessaire, d'une interdiction de se baigner;

ii) des mesures de gestion adéquates soient prises pour prévenir, réduire ou éliminer les sources de pollution, et

iii) le nombre d'échantillons écartés conformément à l'article 3, paragraphe 6, à cause d'une pollution à court terme au cours de la dernière période d'évaluation ne représente pas plus de 15 % du nombre total d'échantillons prévu dans les calendriers de surveillance établis pour la période en question, ou pas plus d'un échantillon par saison balnéaire, la valeur la plus élevée étant retenue.

3. **Bonne qualité**

Les eaux de baignade doivent être classées comme étant de «bonne qualité»:

1) si, sur la base de l'ensemble des données relatives à la qualité des eaux de baignade collectées au cours de la dernière période d'évaluation, les valeurs du percentile pour les dénombrements bactériens sont égales ou meilleures ([d]) que les valeurs «bonne qualité» indiquées à l'annexe I, colonne C, et

2) si l'eau de baignade présente une pollution à court terme, à condition que:

i) des mesures de gestion adéquates soient prises, y compris le contrôle, l'alerte précoce et la surveillance, afin d'éviter une exposition des baigneurs à la pollution, notamment au moyen d'un avertissement ou, si nécessaire, d'une interdiction de se baigner;

ii) des mesures de gestion adéquates soient prises pour prévenir, réduire ou éliminer les sources de pollution, et

iii) le nombre d'échantillons écartés conformément à l'article 3, paragraphe 6, à cause d'une pollution à court terme au cours de la dernière période d'évaluation ne représente pas plus de 15 % du nombre total d'échantillons prévu dans les calendriers de surveillance établis pour la période en question, ou pas plus d'un échantillon par saison balnéaire, la valeur la plus élevée étant retenue.

4. **Excellente qualité**

Les eaux de baignade doivent être classées comme étant «d'excellente qualité»:

1) si, sur la base de l'ensemble des données relatives à la qualité des eaux de baignade collectées au cours de la dernière période d'évaluation, les valeurs du percentile pour les dénombrements bactériens sont égales ou supérieures aux valeurs «excellente qualité» indiquées à l'annexe I, colonne B, et

2) si les eaux de baignade présentent une pollution à court terme, à condition que:

   i) des mesures de gestion adéquates soient prises, y compris le contrôle, l'alerte précoce et la surveillance, afin d'éviter une exposition des baigneurs à la pollution, notamment au moyen d'un avertissement ou, si nécessaire, d'une interdiction de se baigner;

   ii) des mesures de gestion adéquates soient prises pour prévenir, réduire ou éliminer les sources de pollution, et

   iii) le nombre d'échantillons écartés conformément à l'article 3, paragraphe 6, à cause d'une pollution à court terme au cours de la dernière période d'évaluation ne représente pas plus de 15 % du nombre total d'échantillons prévu dans les calendriers de surveillance établis pour la période en question, ou pas plus d'un échantillon par saison balnéaire, la valeur la plus élevée étant retenue.

NOTES

([a]) L'expression «dernière période d'évaluation» désigne les quatre dernières saisons balnéaires ou, le cas échéant, la période précisée à l'article 4, paragraphe 2 ou 4.

([b]) Fondée sur l'évaluation du percentile de la fonction normale de densité de probabilité $\log_{10}$ des données microbiologiques obtenues pour la zone de baignade concernée, la valeur du percentile est calculée de la manière suivante:

i) Prendre la valeur $\log_{10}$ de tous les dénombrements bactériens de la séquence de données à évaluer (si une valeur égale à zéro est obtenue, prendre la valeur $\log_{10}$ du seuil minimal de détection de la méthode analytique utilisée.)

ii) Calculer la moyenne arithmétique des valeurs $\log_{10}$ (μ).

iii) Calculer l'écart type des valeurs $\log_{10}$ (σ).

La valeur au 90e percentile supérieur de la fonction de densité de probabilité des données est tirée de l'équation suivante: 90[e] percentile supérieur = antilog ($\mu + 1{,}282\ \sigma$).

La valeur au 95[e] percentile supérieur de la fonction de densité de probabilité des données est tirée de l'équation suivante: 95[e] percentile supérieur = antilog ($\mu + 1{,}65\ \sigma$).

([c]) «Moins bonnes» signifie «dont les concentrations exprimées en UFC/100 ml sont supérieures».

([d]) «Meilleures» signifie «dont les concentrations exprimées en UFC/100 ml sont inférieures».

4.3.2006 FR Journal officiel de l'Union européenne L 64/49

ANNEXE III

PROFIL DES EAUX DE BAIGNADE

1. Le profil des eaux de baignade visé à l'article 6 doit comporter:

   a) une description des caractéristiques physiques, géographiques et hydrologiques des eaux de baignade et des autres eaux de surface du bassin versant des eaux de baignade concernées, qui pourraient être sources de pollution, pertinentes aux fins de l'objectif de la présente directive et tel que prévu par la directive 2000/60/CE;

   b) une identification et une évaluation des sources de pollution qui pourraient affecter les eaux de baignade et altérer la santé des baigneurs;

   c) une évaluation du potentiel de prolifération des cyanobactéries;

   d) une évaluation du potentiel de prolifération des macroalgues et/ou du phytoplancton;

   e) si l'évaluation visée au point b) laisse apparaître un risque de pollution à court terme, les informations suivantes:

      — la nature, la fréquence et la durée prévisibles de la pollution à court terme à laquelle on peut s'attendre,

      — le détail de toutes les sources de pollution restantes, y compris des mesures de gestion prises et du calendrier prévu pour leur élimination,

      — les mesures de gestion prises durant les pollutions à court terme et l'identité et les coordonnées des instances responsables de ces mesures;

   f) l'emplacement du point de surveillance.

2. Dans le cas d'eaux de baignade classées comme étant de qualité «bonne», «suffisante» ou «insuffisante», le profil des eaux de baignade doit être réexaminé régulièrement afin de déterminer si un des aspects énumérés au point 1 a changé. Le cas échéant, il convient de le mettre à jour. La fréquence et l'ampleur des révisions doivent être déterminées sur la base de la nature et de la gravité de la pollution. Cependant, elles doivent au moins respecter les dispositions prévues et être au moins effectuées à la fréquence indiquée dans le tableau suivant:

Classement des eaux de baignade	Bonne qualité	Qualité suffisante	Qualité insuffisante
Réexamens à effectuer au moins tous les	4 ans	3 ans	2 ans
Aspects à réexaminer (au point 1)	a) à f)	a) à f)	a) à f)

   Dans le cas d'eaux de baignade classées précédemment comme étant de qualité «excellente», le profil des eaux de baignade ne doit être réexaminé et, le cas échéant, mis à jour que si le classement passe à la qualité «bonne», «suffisante» ou «insuffisante». Le réexamen doit porter sur tous les aspects mentionnés au point 1.

3. En cas de travaux de construction importants ou de changements importants dans les infrastructures, effectués dans les zones de baignade ou à proximité, le profil des eaux de baignade doit être actualisé avant le début de la saison balnéaire suivante.

4. Les informations visées au point 1, sous a) et b), doivent être fournies sur une carte détaillée, lorsque cela est faisable.

5. Toute autre information pertinente peut être jointe ou incluse si l'autorité compétente le juge nécessaire.

L 64/50 FR Journal officiel de l'Union européenne 4.3.2006

ANNEXE IV

Surveillance des eaux de baignade

1. Un échantillon doit être prélevé peu avant le début de chaque saison balnéaire. Compte tenu de cet échantillon supplémentaire et sous réserve du point 2, il ne peut y avoir moins de quatre échantillons prélevés et analysés par saison balnéaire.

2. Toutefois, trois échantillons seulement doivent être prélevés et analysés par saison balnéaire dans le cas d'une eau de baignade:

   a) pour laquelle la saison balnéaire ne dépasse pas huit semaines, ou

   b) qui est située dans une région soumise à des contraintes géographiques particulières.

3. Les échantillons doivent être prélevés à intervalles réguliers tout au long de la saison balnéaire, sans qu'il s'écoule plus d'un mois entre deux prélèvements.

4. En cas de pollution à court terme, un échantillon supplémentaire doit être prélevé afin de confirmer la fin de l'incident. Cet échantillon ne doit pas faire partie de l'ensemble de données relatives à la qualité des eaux de baignade. S'il s'avère nécessaire de remplacer un échantillon écarté, un échantillon supplémentaire doit être prélevé sept jours après la fin de la pollution à court terme.

4.3.2006 FR Journal officiel de l'Union européenne L 64/51

ANNEXE V

RÈGLES DE TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS EN VUE D'ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

1. POINT DE PRÉLÈVEMENT

Dans la mesure du possible, les prélèvements doivent être effectués trente centimètres en dessous de la surface de l'eau et dans des eaux profondes d'au moins un mètre.

2. STÉRILISATION DES BOUTEILLES POUR ÉCHANTILLON

Les bouteilles pour échantillon doivent:

— subir une stérilisation en autoclave pendant au moins quinze minutes à 121 °C, ou

— subir une stérilisation sèche à 160 °C — 170 °C pendant au moins une heure, ou

— être des récipients d'échantillonnage irradiés provenant directement du fabricant.

3. PRÉLÈVEMENT

Le volume de la bouteille/du récipient d'échantillonnage dépend de la quantité d'eau nécessaire pour chaque paramètre à contrôler. Le contenu minimal est généralement de 250 ml.

Le matériau des récipients d'échantillonnage doit être transparent et incolore (verre, polyéthène ou polypropylène).

Pour éviter toute contamination accidentelle de l'échantillon, l'échantillonneur doit appliquer une technique aseptique pour que les bouteilles de prélèvement restent stériles. Aucun autre matériel stérile n'est nécessaire (gants «chirurgicaux» stériles, pinces ou tiges d'échantillonnage) si la procédure est correctement suivie.

L'échantillon doit être clairement identifié à l'encre indélébile sur le récipient et sur le formulaire d'échantillonnage.

4. STOCKAGE ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS AVANT ANALYSE

Les échantillons d'eau doivent être protégés de l'exposition à la lumière, en particulier de la lumière directe du soleil, à tous les stades du transport.

Les échantillons doivent être conservés à une température d'environ 4 °C dans une glacière ou un réfrigérateur (selon le climat) jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Si le transport vers le laboratoire risque de durer plus de quatre heures, il doit être effectué dans un réfrigérateur.

Le délai entre le prélèvement et l'analyse doit être aussi court que possible. Il est conseillé d'analyser les échantillons le jour même de leur prélèvement. Si cela est impossible pour des raisons pratiques, les échantillons sont traités au plus tard dans les vingt-quatre heures. Dans l'intervalle, ils sont stockés dans l'obscurité et à une température de 4 °C ± 3 °C.

ANNEXE 2: DIRECTIVE 2006/113/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL DU 12 DECEMBRE 2006 RELATIVE A LA QUALITE REQUISE DES EAUX CONCHYLICOLES (VERSION CODIFIEE)

L 376/14 FR Journal officiel de l'Union européenne 27.12.2006

DIRECTIVE 2006/113/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

du 12 décembre 2006

relative à la qualité requise des eaux conchylicoles

(version codifiée)

LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

vu le traité instituant la Communauté européenne, et notamment son article 175, paragraphe 1,

vu la proposition de la Commission,

vu l'avis du Comité économique et social européen,

après consultation du Comité des régions,

statuant conformément à la procédure visée à l'article 251 du traité [1],

considérant ce qui suit:

(1) La directive 79/923/CEE du Conseil du 30 octobre 1979 relative à la qualité requise des eaux conchylicoles [2] a été modifiée de façon substantielle [3]. Il convient, dans un souci de clarté et de rationalité, de procéder à la codification de ladite directive.

(2) La protection et l'amélioration de l'environnement rendent nécessaires des mesures concrètes destinées à protéger les eaux contre la pollution, y compris les eaux conchylicoles.

(3) Il est nécessaire de sauvegarder certaines populations conchylicoles des différentes conséquences néfastes résultant du rejet dans les eaux de mer de substances polluantes.

(4) La décision n° 1600/2002/CE du Parlement européen et du Conseil du 22 juillet 2002 établissant le sixième programme d'action communautaire pour l'environnement [4] prévoit l'établissement en commun d'objectifs de qualité fixant les différentes exigences auxquelles un milieu doit satisfaire, et notamment la définition des paramètres valables pour l'eau, y compris les eaux conchylicoles.

(5) Une disparité entre les dispositions applicables dans les différents États membres en ce qui concerne la qualité requise des eaux conchylicoles peut créer des conditions de concurrence inégales et avoir, de ce fait, une incidence directe sur le fonctionnement du marché intérieur.

(6) Afin d'atteindre les objectifs de la présente directive, les États membres doivent désigner les eaux auxquelles elle s'applique et fixer les valeurs limites correspondant à certains paramètres. Les eaux désignées devront être rendues conformes à ces valeurs dans un délai de six ans après la désignation.

(7) Pour assurer le contrôle de la qualité requise des eaux conchylicoles, il y a lieu de procéder à un nombre minimal de prélèvements d'échantillons et d'effectuer les mesures des paramètres spécifiés à l'annexe I. Ces prélèvements pourront être réduits en nombre ou supprimés en fonction des résultats des mesures.

(8) Certaines circonstances naturelles échappent au contrôle des États membres, et, de ce fait, il faut prévoir la possibilité de déroger, dans certains cas, à la présente directive.

(9) Le progrès technique et scientifique peut rendre nécessaire une adaptation rapide de certaines des dispositions figurant à l'annexe I. Il convient, pour faciliter la mise en œuvre des mesures nécessaires à cet effet, de prévoir une procédure instaurant une coopération étroite entre les États membres et la Commission. Cette coopération doit se faire au sein du comité pour l'adaptation au progrès technique et scientifique, institué par l'article 13, paragraphe 1, de la directive 2006/44/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 septembre 2006 concernant la qualité des eaux douces ayant besoin d'être protégées ou améliorées pour être aptes à la vie des poissons [5].

(10) La présente directive ne devrait pas porter atteinte aux obligations des États membres concernant les délais de transposition en droit interne des directives indiqués à l'annexe II, partie B,

ONT ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

La présente directive concerne la qualité des eaux conchylicoles et s'applique aux eaux côtières et aux eaux saumâtres désignées par les États membres comme ayant besoin d'être protégées ou améliorées pour permettre la vie et la croissance des coquillages (mollusques bivalves et gastéropodes) et pour contribuer ainsi à la bonne qualité des produits conchylicoles directement comestibles par l'homme.

[1] Avis du Parlement européen du 12 octobre 2006 (non encore paru au Journal officiel) et décision du Conseil du 30 novembre 2006.

[2] JO L 281 du 10.11.1979, p. 47. Directive modifiée par la directive 91/692/CEE (JO L 377 du 31.12.1991, p. 48).

[3] Voir annexe II, partie A.

[4] JO L 242 du 10.9.2002, p. 1.

[5] JO L 264 du 25.9.2006, p. 20.

Article 2

Les paramètres applicables aux eaux désignées par les États membres figurent à l'annexe I.

Article 3

1. Les États membres fixent, pour les eaux désignées, des valeurs pour les paramètres indiqués à l'annexe I, dans la mesure où des valeurs apparaissent dans la colonne G ou I. Ils se conforment aux remarques figurant dans ces deux colonnes.

2. Les États membres ne fixent pas de valeurs moins sévères que celles figurant dans la colonne I de l'annexe I et s'efforcent de respecter les valeurs figurant dans la colonne G, compte tenu du principe énoncé à l'article 8.

3. En ce qui concerne les rejets des substances relevant des paramètres «substances organo-halogénées» et «métaux», les normes d'émission établies par les États membres en application de la directive 2006/11/CE du Parlement européen et du Conseil du 15 février 2006 concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté ([1]) sont appliquées en même temps que les objectifs de qualité ainsi que les autres obligations découlant de la présente directive, notamment celles relatives à l'échantillonnage.

Article 4

1. Les États membres désignent des eaux conchylicoles et peuvent par la suite effectuer des désignations supplémentaires.

2. Les États membres peuvent procéder à la révision de la désignation de certaines eaux en raison notamment de l'existence de facteurs non prévus à la date de la désignation, en tenant compte du principe énoncé à l'article 8.

Article 5

Les États membres établissent des programmes en vue de réduire la pollution et d'assurer que les eaux désignées soient conformes, dans un délai de six ans à compter de la désignation effectuée conformément à l'article 4, aux valeurs fixées par les États membres conformément à l'article 3 ainsi qu'aux remarques figurant dans les colonnes G et I de l'annexe I.

Article 6

1. Pour l'application de l'article 5, les eaux désignées sont censées être conformes à la présente directive si des échantillons de ces eaux prélevés selon la fréquence minimale prévue à l'annexe I, en un même lieu de prélèvement et pendant une période de douze mois, montrent qu'elles respectent les valeurs fixées par les États membres conformément à l'article 3 ainsi que les remarques figurant dans les colonnes G et I de l'annexe I, en ce qui concerne:

a) 100 % des échantillons pour les paramètres «substances organo-halogénées» et «métaux»;

b) 95 % des échantillons pour les paramètres «salinité» et «oxygène dissous»;

c) 75 % des échantillons pour les autres paramètres figurant à l'annexe I.

Si, conformément à l'article 7, paragraphe 2, la fréquence des prélèvements, pour tous les paramètres figurant à l'annexe I, à l'exception des paramètres «substances organo-halogénées» et «métaux», est inférieure à celle indiquée à l'annexe I, les valeurs et remarques visées au premier alinéa du présent paragraphe doivent être respectées pour tous les échantillons.

2. Le non-respect des valeurs fixées par les États membres conformément à l'article 3 ou des remarques figurant dans les colonnes G et I de l'annexe I n'est pas pris en considération dans le calcul des pourcentages prévus au paragraphe 1, lorsqu'il est la conséquence d'une catastrophe.

Article 7

1. Les autorités compétentes des États membres effectuent les échantillonnages dont la fréquence minimale est fixée à l'annexe I.

2. Lorsque l'autorité compétente constate que la qualité des eaux désignées est sensiblement supérieure à celle qui résulterait de l'application des valeurs fixées conformément à l'article 3 et des remarques figurant dans les colonnes G et I de l'annexe I, la fréquence des prélèvements peut être réduite. S'il n'y a aucune pollution et aucun risque de détérioration de la qualité des eaux, l'autorité compétente concernée peut décider qu'aucun prélèvement n'est nécessaire.

3. S'il se révèle, à la suite d'un prélèvement, qu'une valeur fixée conformément à l'article 3 ou une remarque figurant dans les colonnes G ou I de l'annexe I n'est pas respectée, l'autorité compétente détermine si cette situation est le fait du hasard, la conséquence d'un phénomène naturel ou est due à une pollution, et adopte les mesures appropriées.

4. Le lieu exact de prélèvement des échantillons, la distance de celui-ci au point de rejet de polluants le plus proche, ainsi que la profondeur à laquelle les échantillons doivent être prélevés sont définis par l'autorité compétente de chaque État membre en fonction, notamment, des conditions locales du milieu.

5. Les méthodes d'analyse de référence à utiliser pour le calcul de la valeur des paramètres concernés sont spécifiées à l'annexe I. Les laboratoires qui utilisent d'autres méthodes doivent s'assurer que les résultats obtenus sont équivalents ou comparables à ceux indiqués dans l'annexe I.

Article 8

L'application des mesures prises en vertu de la présente directive ne peut en aucun cas avoir pour effet d'accroître, directement ou indirectement, la pollution des eaux côtières ou des eaux saumâtres.

([1]) JO L 64 du 4.3.2006, p. 52.

Article 9

Les États membres peuvent, à tout moment, fixer pour les eaux désignées des valeurs plus sévères que celles prévues par la présente directive. Ils peuvent également arrêter des dispositions relatives à des paramètres autres que ceux prévus par la présente directive.

Article 10

Lorsqu'un État membre envisage de désigner des eaux conchylicoles à proximité immédiate de la frontière d'un autre État membre, ces États se consultent pour définir la partie de ces eaux à laquelle la présente directive pourrait s'appliquer ainsi que les conséquences à tirer des objectifs de qualité communs et qui seront déterminées après concertation par chaque État membre concerné. La Commission peut participer à ces délibérations.

Article 11

Les États membres peuvent déroger à la présente directive en cas de circonstances météorologiques ou géographiques exceptionnelles.

Article 12

Les modifications nécessaires pour adapter au progrès technique et scientifique les valeurs G des paramètres et les méthodes d'analyse figurant à l'annexe I sont arrêtées par le comité institué par l'article 13, paragraphe 1, de la directive 2006/44/CE et conformément à la procédure visée à l'article 13, paragraphe 2, de ladite directive.

Article 13

1. Aux fins de l'application de la présente directive, les États membres fournissent à la Commission les informations concernant:

a) les eaux désignées conformément à l'article 4, paragraphe 1, sous une forme synthétique;

b) la révision de la désignation de certaines eaux conformément à l'article 4, paragraphe 2;

c) les dispositions prises en vue de fixer de nouveaux paramètres conformément à l'article 9.

2. Lorsqu'un État membre a recours à l'article 11, il en informe immédiatement la Commission, en précisant les motifs et les délais.

3. Plus généralement, les États membres fournissent à la Commission, sur demande motivée de sa part, les informations nécessaires à l'application de la présente directive.

Article 14

Tous les trois ans, et pour la première fois pour la période de 1993 à 1995 inclus, les États membres communiquent à la Commission des informations sur la mise en œuvre de la présente directive dans le cadre d'un rapport sectoriel couvrant également les autres directives communautaires pertinentes. Ce rapport est établi sur la base d'un questionnaire ou d'un schéma élaboré par la Commission selon la procédure visée à l'article 6, paragraphe 2, de la directive 91/692/CEE du Conseil du 23 décembre 1991 visant à la standardisation et à la rationalisation des rapports relatifs à la mise en œuvre de certaines directives concernant l'environnement [1]. Le questionnaire ou le schéma est adressé aux États membres six mois avant le début de la période couverte par le rapport. Le rapport est transmis à la Commission dans les neuf mois suivant la fin de la période de trois ans qu'il couvre.

La Commission publie un rapport communautaire sur la mise en œuvre de la présente directive dans les neuf mois suivant la réception des rapports des États membres.

Article 15

Les États membres communiquent à la Commission le texte des dispositions essentielles de droit interne qu'ils adoptent dans le domaine régi par la présente directive.

Article 16

La directive 79/923/CEE est abrogée, sans préjudice des obligations des États membres en ce qui concerne les délais de transposition en droit interne des directives indiqués à l'annexe II, partie B.

Les références faites à la directive abrogée s'entendent comme faites à la présente directive et sont à lire selon le tableau de correspondance figurant à l'annexe III.

Article 17

La présente directive entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Article 18

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Strasbourg, le 12 décembre 2006.

Par le Parlement européen	*Par le Conseil*
Le président	*Le président*
J. BORRELL FONTELLES	M. PEKKARINEN

[1] JO L 377 du 31.12.1991, p. 48. Directive modifiée par le règlement (CE) n° 1882/2003 du Parlement européen et du Conseil (JO L 284 du 31.10.2003, p. 1).

27.12.2006 FR Journal officiel de l'Union européenne L 376/17

ANNEXE I

QUALITÉ REQUISE DES EAUX CONCHYLICOLES

	Paramètre	G	I	Méthodes d'analyse de référence	Fréquence minimale d'échantillonnage et de mesure
1.	pH unité pH		7 — 9	— Électrométrie La mesure s'effectue *in situ* en même temps que l'échantillonnage	Trimestrielle
2.	Température °C	L'écart de température provoqué par un rejet ne doit pas, dans les eaux conchylicoles influencées par ce rejet, excéder de plus de 2 °C la température mesurée dans les eaux non influencées		— Thermométrie La mesure s'effectue *in situ* en même temps que l'échantillonnage	Trimestrielle
3.	Coloration (après filtration) (mg Pt/l)		La couleur de l'eau après filtration, provoquée par un rejet, ne doit pas, dans les eaux conchylicoles influencées par ce rejet, s'écarter de plus de 10 mg Pt/l de la couleur mesurée dans les eaux non influencées	— Filtration sur membrane filtrante de 0,45 µm de porosité Méthode photométrique, aux étalons de l'échelle platine-cobalt	Trimestrielle
4.	Matières en suspension (mg/l)		L'accroissement de la teneur en matières en suspension provoqué par un rejet ne doit pas, dans les eaux conchylicoles influencées par ce rejet, excéder de plus de 30 % celle mesurée dans les eaux non influencées	— Filtration sur membrane filtrante de 0,45 µm de porosité, séchage à 105 °C et pesée — Centrifugation (temps minimal 5 minutes, accélération moyenne 2 800 à 3 200 g), séchage à 105 °C et pesée	Trimestrielle
5.	Salinité (‰)	12 — 38 ‰	≤ 40 ‰ La variation de la salinité provoquée par un rejet ne doit pas, dans les eaux conchylicoles influencées par ce rejet, excéder de plus de 10 % la salinité mesurée dans les eaux non influencées	Conductimétrie	Mensuelle
6.	Oxygène dissous (% de saturation)	≥ 80 %	≥ 70 % (valeur moyenne) Si une mesure individuelle indique une valeur inférieure à 70 %, les mesures sont répétées Une mesure individuelle ne peut indiquer une valeur inférieure à 60 % que lorsqu'il n'y a pas de conséquences nuisibles pour le développement des peuplements des coquillages	Méthode de Winkler Méthode électrochimique	Mensuelle, avec au moins un échantillon représentatif des faibles teneurs en oxygène se présentant le jour du prélèvement. Toutefois, s'il y a présomption de variations diurnes significatives, au moins deux prélèvements par jour seront effectués

L 376/18 FR Journal officiel de l'Union européenne 27.12.2006

	Paramètre	G	I	Méthodes d'analyse de référence	Fréquence minimale d'échantillonnage et de mesure
7.	Hydrocarbures d'origine pétrolière		Les hydrocarbures ne doivent pas être présents dans l'eau conchylicole en quantité telle: — qu'ils produisent à la surface de l'eau un film visible et/ou un dépôt sur les coquillages — qu'ils provoquent des effets nocifs pour les coquillages	Examen visuel	Trimestrielle
8.	Substances organo-halogénées	La limitation de la concentration de chaque substance dans la chair de coquillage doit être telle qu'elle contribue, conformément à l'article 1er, à une bonne qualité des produits conchylicoles	La concentration de chaque substance dans l'eau conchylicole ou dans la chair de coquillage ne doit pas dépasser un niveau qui provoque des effets nocifs sur les coquillages et leurs larves	Chromatographie en phase gazeuse après extraction par solvants appropriés et purification	Semestrielle
9.	*Métaux* Argent Ag Arsenic As Cadmium Cd Chrome Cr Cuivre Cu Mercure Hg Nickel Ni Plomb Pb Zinc Zn mg/l	La limitation de la concentration de chaque substance dans la chair de coquillage doit être telle qu'elle contribue, conformément à l'article 1er, à une bonne qualité des produits conchylicoles	La concentration de chaque substance dans l'eau conchylicole ou dans la chair de coquillage ne doit pas dépasser un niveau qui provoque des effets nocifs sur les coquillages et leurs larves Les effets de synergie de ces métaux doivent être pris en considération	Spectrométrie d'absorption atomique, éventuellement précédée d'une concentration et/ou d'une extraction	Semestrielle
10.	Coliformes fécaux/100 ml	≤ 300 dans la chair de coquillage et le liquide intervalvaire		Méthode de dilution avec fermentation en substrats liquides dans au moins trois tubes dans trois dilutions. Repiquage des tubes positifs sur milieu de confirmation. Dénombrement selon NPP (nombre le plus probable). Température d'incubation 44 ± 0,5 °C	Trimestrielle
11.	Substances influençant le goût du coquillage		Concentration inférieure à celle susceptible de détériorer le goût du coquillage	Examen gustatif des coquillages, lorsque la présence d'une telle substance est présumée	
12.	Saxitoxine (produite par les dinoflagellés)				

Abréviations:
G = guide
I = impérative

27.12.2006 FR Journal officiel de l'Union européenne L 376/19

ANNEXE II

PARTIE A

Directive abrogée avec sa modification

Directive 79/923/CEE du Conseil (JO L 281 du 10.11.1979, p. 47)	
Directive 91/692/CEE du Conseil (JO L 377 du 31.12.1991, p. 48)	uniquement l'annexe I, point e)

PARTIE B

Délais de transposition en droit interne

(visés à l'article 16)

Directive	Date limite de transposition
79/923/CEE	6 novembre 1981
91/692/CEE	1er janvier 1993

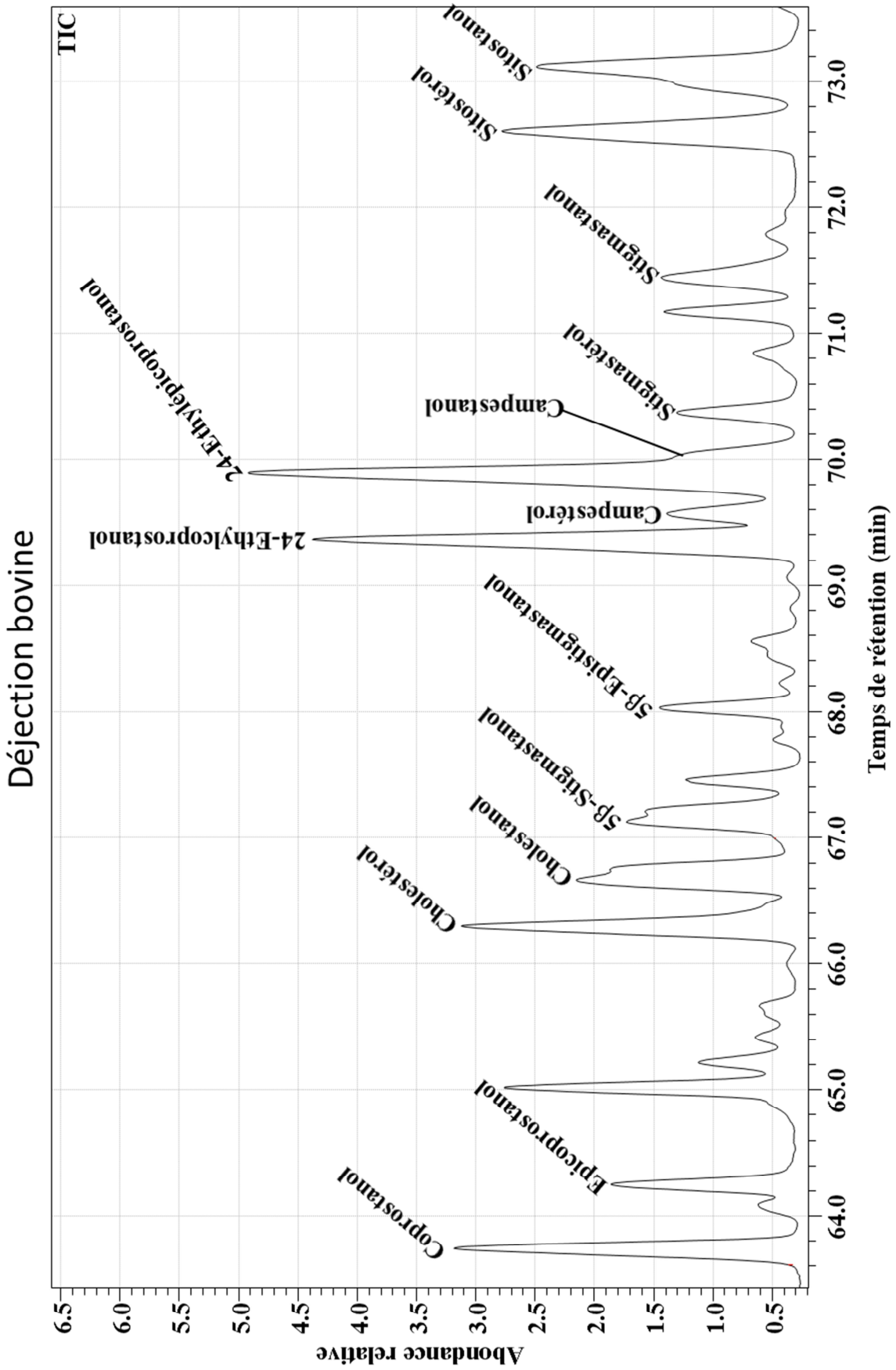
L 376/20 FR Journal officiel de l'Union européenne 27.12.2006

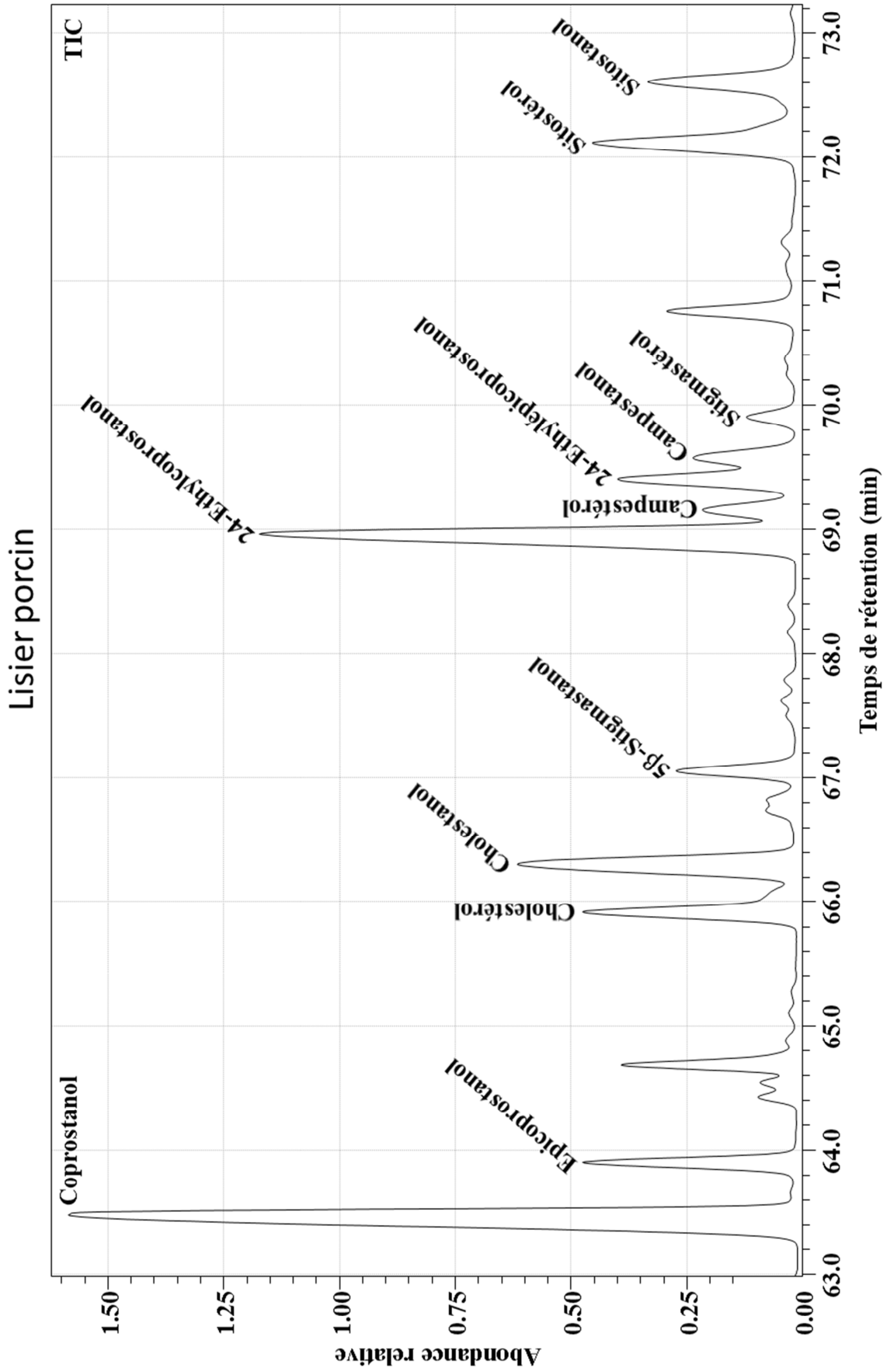
ANNEXE III

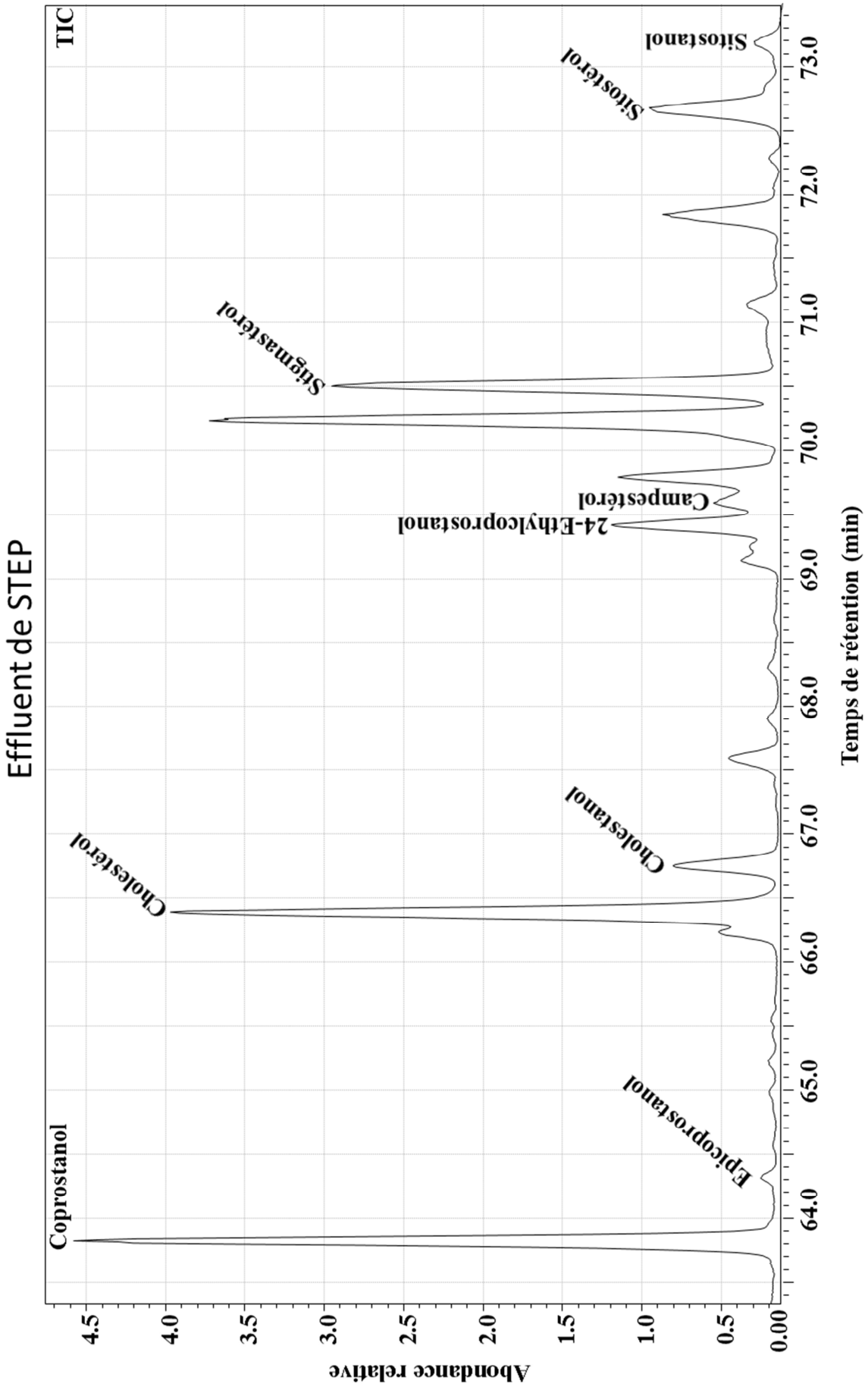
TABLEAU DE CORRESPONDANCE

Directive 79/923/CEE	Présente directive
Article 1er	Article 1er
Article 2	Article 2
Article 3	Article 3
Article 4, paragraphes 1 et 2	Article 4, paragraphe 1
Article 4, paragraphe 3	Article 4, paragraphe 2
Article 5	Article 5
Article 6, paragraphe 1, premier alinéa, phrase introductive	Article 6, paragraphe 1, premier alinéa, phrase introductive
Article 6, paragraphe 1, premier alinéa, premier tiret	Article 6, paragraphe 1, premier alinéa, point a)
Article 6, paragraphe 1, premier alinéa, deuxième tiret	Article 6, paragraphe 1, premier alinéa, point b)
Article 6, paragraphe 1, premier alinéa, troisième tiret	Article 6, paragraphe 1, premier alinéa, point c)
Article 6, paragraphe 1, deuxième alinéa	Article 6, paragraphe 1, deuxième alinéa
Article 6, paragraphe 2	Article 6, paragraphe 2
Article 7	Article 7
Article 8	Article 8
Article 9	Article 9
Article 10	Article 10
Article 11	Article 11
Article 12	Article 12
Article 13, premier alinéa, phrase introductive	Article 13, paragraphe 1, phrase introductive
Article 13, premier alinéa, premier tiret	Article 13, paragraphe 1, point a)
Article 13, premier alinéa, deuxième tiret	Article 13, paragraphe 1, point b)
Article 13, premier alinéa, troisième tiret	Article 13, paragraphe 1, point c)
Article 13, deuxième alinéa	Article 13, paragraphe 2
Article 13, troisième alinéa	Article 13, paragraphe 3
Article 14	Article 14
Article 15, paragraphe 1	—
Article 15, paragraphe 2	Article 15
—	Article 16
—	Article 17
Article 16	Article 18
Annexe	Annexe I
—	Annexe II
—	Annexe III

ANNEXE 3: EXEMPLES DE CHROMATOGRAMMES (TIC) DE DEJECTIONS BRUTES (DEJECTION BOVINE, LISIER PORCIN ET EFFLUENT DE STEP)


Déjection bovine
TIC
Coprostanol
Epicoprostanol
Cholestérol
Cholestanol
5β-Stigmastanol
5β-Epistigmastanol
24-Ethylcoprostanol
Campestérol
24-Ethylépicoprostanol
Campestanol
Stigmastérol
Stigmastanol
Sitostérol
Sitostanol
Abondance relative
Temps de rétention (min)
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
64.0
65.0
66.0
67.0
68.0
69.0
70.0
71.0
72.0
73.0


Lisier porcin
TIC
Coprostanol
Epicoprostanol
Cholestérol
Cholestanol
5β-Stigmastanol
24-Ethylcoprostanol
Campestérol
24-Ethylépicoprostanol
Campestanol
Stigmastérol
Sitostérol
Sitostanol
Abondance relative
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
63.0
64.0
65.0
66.0
67.0
68.0
69.0
70.0
71.0
72.0
73.0
Temps de rétention (min)


Effluent de STEP
TIC
Coprostanol
Cholestérol
Epicoprostanol
Cholestanol
24-Ethylcoprostanol
Campestérol
Stigmastérol
Sitostérol
Sitostanol
Abondance relative
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.00
64.0
65.0
66.0
67.0
68.0
69.0
70.0
71.0
72.0
73.0
Temps de rétention (min)