



HAL
open science

Dynamique et identification des sources de contamination fécale dans un espace littoral connaissant des pratiques de tourisme et de loisirs : l'exemple de la baie d'Aytré

Méry Ndione

► To cite this version:

Méry Ndione. Dynamique et identification des sources de contamination fécale dans un espace littoral connaissant des pratiques de tourisme et de loisirs : l'exemple de la baie d'Aytré. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2022. Français. NNT : 2022LAROS006 . tel-03813808

HAL Id: tel-03813808

<https://theses.hal.science/tel-03813808>

Submitted on 13 Oct 2022

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.



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

École doctorale 618 EUCLIDE

Direction de la Recherche, des Partenariats et de l'Innovation

Laboratoire LIENSs UMR 7266

THÈSE

Présentée par :

Méry NDIONE

Soutenue le 21 janvier 2022

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Dynamique et identification des sources de contamination fécale dans un espace littoral connaissant des pratiques de tourisme et de loisirs : l'exemple de la baie d'Aytré.

JURY :

Yann HECHARD
Françoise LUCAS
Jean-François HUMBERT
Michèle GOURMELON
Hélène AGOGUE
Luc VACHER
Tony AGION
Michaël TREILLES

Professeur, Université de Poitiers
Professeur, Université Paris-Est Créteil
Directeur de recherche, INRAE
Chercheur, HDR, IFREMER
Chargé de recherche, CNRS- LIENSs UMR 7266
MCF, HDR, La Rochelle Université
Directeur Services Eaux et environnement, Qualyse
Directeur Recherche et développement, Qualyse

Examineur
Rapportrice
Rapporteur
Examinatrice
Co-Directrice de thèse
Co-Directeur de thèse
Responsable scientifique
Responsable scientifique



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

École doctorale 618 EUCLIDE

Direction de la Recherche, des Partenariats et de l'Innovation

Laboratoire LIENSs UMR 7266

THÈSE

Présentée par :

Méry NDIONE

Soutenue le 21 janvier 2022

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Dynamique et identification des sources de contamination fécale dans un espace littoral connaissant des pratiques de tourisme et de loisirs : l'exemple de la baie d'Aytré.

JURY :

Yann HECHARD
Françoise LUCAS
Jean-François HUMBERT
Michèle GOURMELON
Hélène AGOGUE
Luc VACHER
Tony AGION
Michaël TREILLES

Professeur, Université de Poitiers
Professeur, Université Paris-Est Créteil
Directeur de recherche, INRAE
Chercheur, HDR, IFREMER
Chargé de recherche, CNRS- LIENSs UMR 7266
MCF, HDR, La Rochelle Université
Directeur Services Eaux et environnement, Qualyse
Directeur Recherche et développement, Qualyse

Examineur
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Co-Directrice de thèse
Co-Directeur de thèse
Responsable scientifique
Responsable scientifique

**« La science ne résout jamais un problème sans
en créer dix de plus »**

George Bernard Shaw

REMERCIEMENTS

Avant tout je tiens à dédier ce travail à Hélène Montanié. Je me rappellerais toujours de ses mots de soutien à travers lesquels elle m'a partagé sa force et son engagement.

Ce travail a été réalisé au sein des laboratoires LIENSs et Qualyse. Je tiens à remercier tout d'abord Monsieur Olivier de Viron et Madame Valérie Ballu pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire LIENSs ainsi que Philippe Jumel et Catherine Desprez pour l'accueil et le suivi au sein du laboratoire Qualyse.

Je remercie tous les financeurs du projet ICOMABIO : La communauté d'Agglomération de la Rochelle, la Mairie d'Aytré, La Région Nouvelle Aquitaine, le département de la Charente-Maritime ainsi que les partenaires de cette étude : l'agence régionale de santé-Nouvelle Aquitaine (ARS), l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) de Nancy, le port de plaisance des Minimes à la Rochelle, La station d'épuration de la Rochelle et la Ligue pour la protection des oiseaux (LPO).

Je tiens à remercier ensuite Monsieur Yann Héchard d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie Madame Françoise Lucas et Monsieur Jean-François Humbert d'avoir accepté d'évaluer ma thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également Madame Michèle Gourmelon d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour l'intérêt qu'elle a porté à ce projet depuis son commencement.

Mes sincères remerciements vont à l'encontre de mes directeurs de thèse qui ont assuré le bon déroulement de ce projet. Je tiens d'abord à exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à Hélène Agogué pour m'avoir encadrée durant ces années et pour son investissement. Elle a toujours été à l'écoute, disponible, compréhensible et m'a beaucoup soutenue durant ces trois longues années. Ton sens de l'organisation et ta générosité m'ont beaucoup marquée et aidée.

De même je remercie vivement Luc Vacher pour son soutien et plus particulièrement pour m'avoir « initié » aux SHS. Merci également pour son expertise sur cette problématique ainsi que ses remarques pertinentes.

Merci aussi à Tony Agion pour son investissement remarquable pour le bon déroulement de mon travail. Il a su mettre à ma disposition tous les moyens nécessaires pour la bonne réalisation de cette thèse.

Je tiens également à remercier Michaël Treilles pour sa disponibilité, ses conseils et remarques pertinents. Il m'a également apporté un soutien inconditionnel pour la réalisation de mes analyses.

Merci à tous les quatre pour avoir été présents et pour m'avoir fait confiance pour réaliser ce projet.

Je tiens à remercier également Benoit Gassilloud qui a suivi de très près ce projet et qui a fait montre d'une grande disponibilité et d'une expertise remarquable qui m'ont permis d'avancer efficacement dans la réalisation de mes travaux. Je remercie également Mickaël Guédon pour sa disponibilité et l'intérêt qu'il a porté à ce projet.

Je remercie également Pascaline Ory pour son soutien et son investissement dans la réalisation de ce projet. Ta disponibilité et tes remarques pertinentes m'ont beaucoup marquée.

Je remercie aussi Dimitri Kalenitchenko pour sa disponibilité et sa contribution à la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Pascal Brunello qui n'a ménagé aucun effort tant sur le terrain que sur les stratégies d'échantillonnage. Un grand merci aussi pour les belles cartes et les posters.

Cette thèse a demandé un grand travail de terrain avec des échantillonnages multiples (eau sédiment, fèces, quadrillage, balayage, survol drone...). J'adresse un grand merci à toutes les personnes qui m'ont aidée dans ces nombreuses tâches.

Je veux citer particulièrement Philippe Pineau, Nicolas Lachaussée et Valérie Huet qui ont été disponible et se sont investis remarquablement dans la réalisation de mes échantillonnages. Merci également à Martine Bréret, Jérôme Jourde, Clément Jourdan, Pierrick Bocher, Vincent Hamani.

De même je remercie toutes les personnes qui m'ont aidée pour mes nombreuses analyses de La Rochelle à Nancy en passant par Champdeniers. Je remercie Principalement Martine Bréret, Philippe Pineau, Pascaline Ory, Claire Emery et Vanessa Becquet pour le soutien technique au laboratoire LIENSs. Vous m'avez beaucoup aidée et appris ; travailler à vos côtés fut un réel plaisir. Je remercie également les plateformes et plateaux du laboratoire LIENSs.

Ce travail a été réalisé avec la contribution considérable du laboratoire Qualyse. Je tiens à remercier tous les préleveurs qui ont contribué à mes campagnes d'échantillonnage. Je

remercie particulièrement Yann, Thomas, Julien-thomas, Charlotte et Hugo pour leur disponibilité et leur investissement pour le bon déroulement des échantillonnages. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Éric Chadapeau pour toutes les analyses réalisées. Son intégrité, sa disponibilité et son engagement m'ont beaucoup touchée. Merci également à Samia, Magalie, Justine et Sylvie au laboratoire Qualyse à La Rochelle et à Cyril, Mélanie, Julien, Francis, Marie-Alice et Lola au laboratoire Qualyse à Champdeniers.

Je tiens à remercier également Maélig Le Beguec ainsi que tous les stagiaires qui m'ont beaucoup aidée au cours de ces années : Guillaume Heurtebize, Emma Chaperon, Sarah Ben Mohamed, Jessicka Mucy-Clavier et Rémy Hérissé.

Merci à tous les doctorants et amis que j'ai croisés durant ces trois années en particulier Camille, Clémence, Clément, Vincent, Yannick, Aurélie, Mélanie, Guillaume, Treden, Marc, Raphaël et Amélie. Merci pour les restos, les verres, les repas de famille, et les soirées jeux. Ce fut des moments formidables même avec mes médiocres talents en dessin.

En résumé, je remercie toutes les personnes que j'ai croisées au sein des laboratoires LIENSs et Qualyse durant ces années.

Je tiens également à citer mes amis de cœur Mélanie, Mathieu, Yacine, Joe, Corneille, Massylla et Cheikh qui m'ont toujours encouragée. J'espère vous revoir très vite !

Merci aussi à Bastien, heureusement que tu étais là...

Je remercie toute ma famille, mes parents, mes frères et sœurs, mes grands-parents, oncles et tantes, mes belles sœurs et beaux-frères. Merci pour le soutien et la confiance, même avec la distance vous avez été très présents. Promis, je serais plus présente et plus disponible à l'avenir !

Pour finir, je dédie ce travail à toutes mes nièces et tous mes neveux « mes petits monstres ».

Sommaire

LISTE DES ABBREVIATIONS	22
INTRODUCTION	25
CHAPITRE 1 – CADRAGE DE L'ETUDE ET ETAT DE L'ART	28
1.1 Un point sur le contexte sanitaire et la réglementation des eaux de baignade	30
1.1.1 Contexte sanitaire des eaux de baignade dans le monde	30
1.1.2 Le suivi de la qualité des eaux de baignade en Europe	32
1.2 Dynamique des contaminations fécales dans les écosystèmes aquatiques	42
1.2.1 Sources de contamination fécale dans les écosystèmes aquatiques	42
1.2.2 Adaptation des bactéries fécales dans les environnements aquatiques	48
1.2.3 Utilisation des traceurs de sources microbiennes pour caractériser une contamination fécale	49
1.3 Méthodes d'analyse de la qualité microbiologique des écosystèmes aquatiques	54
1.3.1 Méthodes de dénombrement des indicateurs de contamination fécale	55
1.3.2 Méthodes d'identification des germes fécaux	55
1.3.3 Méthodes de caractérisation de l'origine d'une contamination fécale	57
1.3.4 Analyse de la structure des communautés microbiennes des écosystèmes contaminés	57
.....	59
1.3.5 Modèle de caractérisation de l'origine des indicateurs de contamination fécale	61
1.4 Le cas de la contamination de la baie d'Aytré en Charente-Maritime	62
1.4.1 Contexte géographique : une grande plage de l'agglomération de La Rochelle	62
1.4.2 Usages et activités concernant la baie d'Aytré	63
1.4.3 Contexte sanitaire de la baie d'Aytré	65
1.4.4 Historique des suivis sanitaires des eaux de baignade de la plage d'Aytré	69
1.4.5 Hypothèses sur l'origine et les sources de la contamination	73
1.5 Questionnement et structuration de l'étude	76
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	79
1.1 Site d'étude et échantillonnage	80
1.1.1 Site d'étude	80
1.1.2 Méthode d'échantillonnage d'eau et de sédiment	80
1.1.3 Organisation des échantillons d'eau et de sédiment	83
1.1.4 Mesure in situ des paramètres physico-chimiques et météorologiques	87
1.2 Analyses en laboratoire	88
1.2.1 Analyse des paramètres physico-chimiques	88
1.2.2 Analyse du niveau de contamination fécale	89
1.2.3 Structure des communautés de microorganismes	97
1.2.4 Diversité des communautés bactériennes	98
1.3 Analyses statistiques	106

CHAPITRE 3 : DYNAMIQUE SPATIO-TEMPORELLE DES CONTAMINANTS FÉCAUX DANS LA BAIE D'AYTRÉ 107

1.1	Dynamique temporelle des contaminants fécaux dans les deux sites de baignade	109
1.1.1	Hypothèses et objectifs	109
1.1.2	Démarche expérimentale	111
1.1.3	Résultats	112
1.1.4	Conclusions.....	148
1.2	Répartition et dynamique spatiale des contaminants fécaux	149
1.2.1	Hypothèse et objectifs.....	149
1.2.2	Plan expérimental.....	150
1.2.3	Résultats	151
1.2.4	Publication B.....	159

SPATIAL DISTRIBUTION OF FECAL INDICATORS IN A SEMI-ENCLOSED BAY BY UTILIZING MARINE DRONE 159

1.3	Conclusion	178
------------	-------------------------	------------

CHAPITRE 4 : IMPACT DE LA CONTAMINATION FECALE DE LA BAIE D'AYTRE SUR LA STRUCTURE ET LA DIVERSITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES. 179

1.1	Hypothèses et objectifs	180
1.2	Publication C	181

PROKARYOTE SEASONAL VARIABILITY IN A CONTAMINATED RECREATIONAL AQUATIC ECOSYSTEM. 181

1.3	Conclusion	200
------------	-------------------------	------------

CHAPITRE 5 : SOURCES ET ORIGINES HUMAINE ET/OU NON HUMAINE (ANIMALE) DE LA CONTAMINATION FECALE 201

1.1	Hypothèse et objectifs	203
1.2	Plan expérimental	204
1.3	Résultats	205
1.3.1	Abondance des indicateurs de contamination fécale dans l'eau et le sédiment dans les deux baies 205	
1.3.2	Corrélation entre l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans l'eau et le sédiment dans les deux baies	208
1.3.3	Corrélation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans l'eau avec les paramètres physico-chimiques et météorologiques dans les deux baies.....	209
1.3.4	Corrélation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment avec les paramètres physico-chimiques et météorologiques des deux baies.	211
1.4	Conclusion	212

II. SOURCES POSSIBLES DE LA CONTAMINATION FECALE DE LA BAIE D'AYTRE	213
1.1 Hypothèse et objectifs	213
1.2 Plan expérimental	214
1.3 Résultats	216
1.3.1 Dépassements ponctuels des indicateurs de contamination fécale au niveau des exutoires lors des épisodes de pluies	216
1.3.2 Abondance des indicateurs de contamination fécale au large de la baie	217
1.3.3 Abondance des indicateurs de contamination fécale au niveau du port des Minimes	217
1.3.4 Hypothèse de l'accumulation/balayage des fientes d'oiseaux dans l'eau par la marée montante.	219
1.4 Conclusion	222
III. ORIGINE DE LA CONTAMINATION FECALE DE LA BAIE D'AYTRE	223
1.1 Problématique	223
1.2 Plan expérimental	224
1.2.1 Diversité des espèces d'entérocoques	224
1.2.2 Analyse des traceurs de sources microbiologiques	224
1.2.3 Origine des principales espèces bactériennes indicatrices d'une contamination fécale	224
1.2.4 Quantification de marqueurs génétiques	225
1.2.5 Quantification de marqueurs chimiques	225
1.3 Résultats	226
1.3.1 Place de l'origine fécale dans les indicateurs de contamination	226
1.4 Traceurs de sources microbiologiques	228
1.4.1 Origine humaine et origine non humaine (animale) des indicateurs de contamination fécale	228
1.4.2 Détermination de l'origine des indicateurs de contamination fécale	228
1.4.3 Traceurs génétiques	230
1.4.4 Traceurs chimiques	233
.....	234
1.5 Conclusion	235
1.6 Discussion	236
CHAPITRE 6 : PERCEPTION DE CETTE CONTAMINATION PAR LA POPULATION LOCALE ET ADAPTATIONS DES PRATIQUES RECREATIVES	239
RECEPTION DE L'INFORMATION ET ADAPTATION DES PRATIQUES SUITE A LA CONTAMINATION DES EAUX DE BAINADE D'UNE PLAGE PERI-URBAINE (AYTRE) DU LITTORAL ATLANTIQUE FRANÇAIS	241
1.1 Introduction	242
1. Une interdiction de la baignade due à une contamination de l'environnement ?	243

1.1 Une contamination invisible, sans goût et sans odeur	243
1.2 Une contamination qui s'inscrit dans le temps	244
1.3 Appréhender l'invisible implique connaissance et adhésion au discours	245
1.4 Une plage contaminée qui est aussi une plage interdite.....	246
2. Comment traiter de la réponse d'une population face à la contamination invisible d'un de ses espaces de loisirs ?	247
2.1 La construction d'une enquête en ligne	247
2.2 Une grille d'analyse pour traiter la réponse de la population enquêtée.....	249
3. Une réelle homogénéité de la réponse de la population	252
3.1 Réponse homogène ou population uniforme ?	253
3.2 La réception par les usagers de l'information sur la contamination et l'interdiction.....	254
1.1.2 3.3 Évolution de l'image de la plage et adaptation des pratiques	256
1.2 4. Des nuances dans la réponse des usagers en fonction des pratiques	262
1.2.1 4.1 La réponse des usagers ayant ou ayant eu des pratiques liées à l'eau	263
1.2.2 4.2 La réponse mesurée des usagers ayant des pratiques de sable	266
1.2.3 4.3 Une réponse des promeneurs vraiment uniforme ?	267
1.3 Conclusion	268
 CHAPITRE 7 : SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES	 275
 CONCLUSION	 285
 BIBLIOGRAPHIE	 287
 ANNEXES	 314

Listes des Figures

- Figure 1 : Schéma de Clermont décrivant l'arbre de décision dichotomique pour déterminer le groupe phylogénétique d'une souche d'E. coli en utilisant les résultats de l'amplification par PCR des gènes chuA et yjaA et TSPE4.C2. D'après (Clermont et al., 2000)..... 37
- Figure 2 : Les sources des indicateurs de contamination fécale dans les plans d'eau (flèches bleues) Modifié par M. Ndione et T. Guyot, d'après (Byappanahalli et al., 2012) 43
- Figure 3 : : Dynamique des germes fécaux dans les plans d'eau et facteurs influençant leur prolifération dans les écosystèmes aquatiques. Modifié par M. Ndione et T. Guyot, d'après Weikerger et al., (2019). 45
- Figure 4 : Relations phylogénétiques des séquences partielles du gène de l'ARNr 16S des Bacteroidales (526 positions) avec des isolats bactériens cultivés du genre Bacteroides (d'après Dick et al., 2005) . 50
- Figure 5 : Longueur des séquences du gène codant pour l'ARN 16S utilisées par les types méthodes de séquençages (D'après Falentin et al., 2019)..... 59
- Figure 6 : Principales avancées scientifiques et technologiques dans le domaine de l'écologie microbienne marine (Source Current biology, Salazar and Sunagawa, 2017)..... 60
- Figure 7 : : Localisation géographique de la baie d'Aytré. Carte : M. Ndione et P. Brunello, UMR LIENSs CNRS-La Rochelle Université (2021)..... 63
- Figure 8 : Sites suivis par des contrôles sanitaires (eaux de baignades et ostréiculture) dans la baie d'Aytré et sources potentielles de la contamination fécale (Source : ASCONIT, 2017) 66
- Figure 9 : Principaux travaux effectués dans la baie d'Aytré. A- Etude de la courantologie de la baie d'Aytré, B- Analyse de la résurgence karstique d'eau souterraine dans la baie, C- Réhabilitation des exutoires et construction d'écluse, D- Analyse des infrastructures dans le bassin versant, E- Analyse de la corrélation entre la densité de l'avifaune et le niveau de contamination fécale. Sources : SAFEGE, 2010 ; Egis eau, 2011 ; CREOCEAN, 2005 ; LPO, 2016. 67
- Figure 10 : Variation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale (E. coli et entérocoques) dans le Platin Nord. Les boxplots en orange et en vert représentent les distributions de l'abondance des deux bactéries E. coli et entérocoques respectivement. . Les lignes montrent la variation de l'abondance moyenne des deux indicateurs sur chaque année avec le même code couleur que les boxplots. Les lignes horizontales en rouge représentent les seuils réglementaires de E. coli (seuil= 1000 NPP/100 ml) et les entérocoques (seuil= 370 NPP/100ml)..... 70
- Figure 11 : Variation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale (E. coli et entérocoques) dans le Platin Sud. Les boxplots en orange et en vert représentent les distributions de l'abondance des deux bactéries E. coli et entérocoques respectivement. Les lignes montrent la variation de l'abondance moyenne des deux indicateurs sur chaque année avec le même code couleur que les boxplots. Les lignes horizontales en rouge représentent les seuils réglementaires de E. coli (seuil= 1000 NPP/100 ml) et les entérocoques (seuil= 370 NPP/100ml)..... 71
- Figure 12 : Historique des pourcentages d'abondance des indicateurs de contamination fécale (E. coli en orange et entérocoques en vert). Les barplots représentent la proportion des échantillons en

dépassement des seuils réglementaires par rapport aux échantillons « non contaminés ». A) Pourcentage des E. coli au Platin Nord, B) Pourcentage des entérocoques au Platin Nord, C) Pourcentage des E. coli au Platin Sud, D) Pourcentage des entérocoques au Platin Sud. Les chiffres représentent le nombre d'échantillons analysés pour déterminer les proportions d'abondance. 72

Figure 13 : Présentation du bassin versant de la baie d'Aytré. (En rose les habitations, en bleu sont représentés les stations de lagunage) – la photographie présente la situation de l'urbanisation en arrière de la plage avant la tempête de 2010, l'ensemble des bâtiments en avant de la voie ferrée ayant été déconstruit depuis..... 74

Figure 14 : Localisation des différents sites de prélèvement. Les points verts représentent les sites des suivis sanitaires déterminés par l'ARS et les points en rouge sont les sites considérés comme de potentielles sources de contamination fécale 80

Figure 15 : Prélèvement des échantillons d'eau au niveau des deux sites de baignade de la baie (Platin Nord et Platin Sud). Chaque échantillon d'eau a été prélevé en triplicats (à trois reprises 3 temps = T1, T2, T3) sur chaque site. L'image représente l'échantillonnage d'eau au Platin Nord. 81

Figure 16 : Prélèvement des échantillonnages de sédiment en triplicat au niveau des deux sites de baignade de la baie (Platin Nord et Platin Sud). A chaque temps (T1, T2, T3) le réplikat correspondant est prélevé. Les images représentent les différentes étapes d'échantillonnage, du prélèvement au conditionnement en terminant par la mesure in situ des paramètres physico-chimiques..... 81

Figure 17 : Détermination des sites du suivi en « quadrillage » A) Positions des cibles (C1 à C17) déterminant le plan des survols de drone aérien pour les photographies aériennes des microreliefs de la baie, B) Répartition des différents points de prélèvement. Les points en jaunes sont les deux sites officiels de baignade et les points en rouge représentent les sites avec du sédiment vaseux et les points en rose rouge représentent les sites avec du sédiment sablo-vaseux..... 85

Figure 18 : Localisation des deux transects de prélèvement pour le suivi “en balayage”. Les points en jaunes sont les deux sites officiels de baignade et les points en bleu représentent les autres points de prélèvement. 86

Figure 19 : Plan d'analyse des cibles MALDI-TOF pour l'acquisition de spectres protéiques des souches bactériennes. S (souches), BTS (Bacterial Test Standard). Les chiffres et les lettres représentent les différentes positions sur la cible. 96

Figure 20 : Principe de purification des produits de PCR par des billes SPRIselect (protocole de Biofidal) 103

Figure 21 : Principe du séquençage MiSeq paired-end (protocole de Biofidal®)..... 104

Figure 22 : Schémas de synthèse de l'analyse de la dynamique temporelle de la qualité microbiologique de l'eau et du sédiment de la baie d'Aytré avec les différents paramètres mesurés..... 111

Figure 23 : Cartographie de la texture du sédiment de la baie d'Aytré à partir de mesures de la teneur en eau, de matières sèches et de photographies aériennes. Carte : M. Ndione, P. Brunello, L. Vacher UMR LIENSs CNRS-La Rochelle Université (2020)..... 151

Figure 24 : Variation spatiale de l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment sur 20 sites de la baie d'Aytré. Dynamique spatiale des A) E. coli en mars et B) entérocoques en mars, C) E. coli en septembre et D) entérocoques en septembre. 153

Figure 25 : Diagramme de la texture du sédiment sur les 20 sites de « quadrillage » de la baie d'Aytré. A) campagne d'échantillonnage du mois de mars 2020 et B) campagne d'échantillonnage du mois de septembre 2020. Les différents sites sont représentés par les chiffres en brun. Les pourcentages des différentes fractions de sédiment argile, limon, sable sont représentés sur les côtés des diagrammes. Les différents types de texture sont indiquées par les lettres au niveau des diagrammes de texture : C : Textures grossières (Sableux) ; M : Textures Moyennes (Limoneux); F : Textures fines (Argilo-sableux); MF : Textures moyennement fines (Limoneux fin) ; VF : Textures très fines (Argileux)..... 154

Figure 26 : Présentation de la baie d'Aytré et de la baie d'Yves avec les différentes zones caractéristiques autour des deux écosystèmes littoraux. Les sites de prélèvements sont représentés sur les cartes par les étoiles en bleu. Carte : M. Ndione, P. Brunello, UMR LIENSs CNRS-La Rochelle Université (2021) 204

Figure 27 : Variation saisonnière des indicateurs de contamination fécale dans l'eau et le sédiment de la baie d'Aytré et de la baie d'Yves au cours d'un cycle annuel. E. coli en orange, entérocoques en vert. Échantillons d'eau (A, B, C, D) ; échantillons de sédiment (E, F, G, H). Les seuils réglementaires des indicateurs de contamination fécale dans les eaux de baignade (1000 NPP/100ml pour E. coli et 370 NPP/100ml pour entérocoques) sont représentés par les lignes rouges en pointillés sur les figures A, B, C et D. 207

Figure 28 : Corrélation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale entre le sédiment et l'eau dans les deux baies étudiées. A) corrélation de l'abondance des E. coli. B) corrélation de l'abondance des entérocoques. Les données de la baie d'Aytré sont représentées en noir et les données de la baie d'Yves sont représentées en gris. R2 représente les coefficients des courbes de tendance. Les astérisques en rouge représentent le degré de significativités des tests de Pearson (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$) effectués sur les coefficients de corrélation entre les abondances des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment et dans l'eau. 208

Figure 29 : Localisation des sites suivis pour déterminer les sources possibles de la contamination fécale dans la baie d'Aytré. Les sites en vert correspondent aux deux sites de baignade où sont réalisés les suivis sanitaires. Les sites en rouge correspondent aux exutoires où ont été effectués les différents prélèvements. Les sites en violet correspondent au transect réalisé au large de la baie. Les sites en bleu sont les pontons où ont été effectués les prélèvements dans le port de plaisance des Minimes. Carte : M. Ndione, P. Brunello, UMR LIENSs CNRS-La Rochelle Université (2021). 215

Figure 30 : Abondances des deux indicateurs de contamination fécale dans l'eau et le sédiment durant les deux dates de suivi en "balayage" effectué sur deux transects (transect Nord et transect Sud). A) Abondance des E. coli dans l'eau en juin. B) Abondance des E. coli dans le sédiment en juin. C) Abondance des Entérocoques dans l'eau en juin. D) Abondance des Entérocoques dans le sédiment en juin. E) Abondance des E. coli dans l'eau en septembre. F) Abondance des E. coli dans le sédiment en septembre. G) Abondance des Entérocoques dans l'eau en septembre. H) Abondance des Entérocoques dans le sédiment en septembre. 221

Figure 31 : Proportion (%) des différentes espèces d'entérocoques durant 3 campagnes d'échantillonnage (décembre 2019, février et septembre 2020) d'eau et de sédiment sur les deux sites de baignade de la baie d'Aytré. Les quantifications des entérocoques sont indiquées au-dessus de chaque histogramme et le nombre d'isolats obtenu est indiqué par le nombre N. A) Échantillons d'eau au Platin Nord, B) échantillons d'eau au Platin Sud, C) échantillons de sédiment au Platin Nord et D) échantillons de sédiment au Platin Sud. La légende indique les différentes espèces de bactéries suivant le code couleur. 227

Figure 32 : Abondance des marqueurs humain (HF183), aviaire (GDF), et équin (HoF597F) dans les différents échantillons d'eau en dépassement des seuils réglementaires sur les trois sites d'échantillonnage Platin Nord, Platin Sud et baie d'Yves. Les abondances des deux indicateurs de contamination fécale sont représentées par les courbes. A) Échantillons d'eau au Platin Nord, B) échantillons d'eau au Platin Sud, C) échantillons d'eau de la baie d'Yves. Les numéros des échantillons correspondent aux trois répliqués (1,2,3) de chaque échantillon..... 232

Figure 33 : Abondance des marqueurs chimiques (paracétamol et caféine) dans quelques échantillons d'eau en dépassement des seuils réglementaires de la baie d'Aytré et abondances des indicateurs de contamination fécale dans ces échantillons. Les numéros des échantillons correspondent aux trois répliqués de chaque échantillon..... 234

Liste des tableaux

Tableau 1 : Paramètres d'analyses des eaux de baignade déterminés en 1976 par la directive 76/160/CEE (European Parliament and Council., 2006)	33
Tableau 2 : Paramètres d'analyses des eaux de baignade déterminés en 2006 par la directive (2006/7/CE) (EC, 2006)	34
Tableau 3 : Habitats et facteurs de régulation des entérocoques. Occurrence, persistance, croissance et génétique des populations d'entérocoques dans les habitats extra-intestinales (d'après la review de Byappanahalli et al., (2012), références dans l'article).....	41
Tableau 4 : Les différentes molécules chimiques pouvant être considérées comme des indicateurs de contamination fécale.....	53
Tableau 5 : Principaux usages de la baie d'Aytré (source ASCONIT, 2017)	65
Tableau 6 : Résultats d'analyse d'échantillons d'eau pour rechercher des traceurs de sources microbiologiques pour caractériser des contaminants humains, ruminants, porcins, oiseaux de mer ou équins. Sources : Laboceca, 2015, (Pham Tan, 2016)	68
Tableau 7 : Inventaire des sources potentielles de pollution de la baie d'Aytré effectué en 2016 par la CdA	75
Tableau 8 : Détermination des dates de prélèvement du suivi annuel à partir des données de la station Météo La Rochelle - Pallice. Les dates ont été choisies en fonction de la hauteur d'eau à chaque heure de la journée et du coefficient de marée : exemple du mois de juillet 2019. Les dates surlignées en jaune sont les jours de prélèvement, en orange sont indiqués les horaires de prélèvements de sédiment et en bleu les horaires de prélèvements d'eau. Haut. (m) est la hauteur d'eau et Coef. est le coefficient de marée.	82
Tableau 9 : Fréquence d'échantillonnage d'eau et de sédiment durant le suivi sur une année dans les deux sites de baignade de la baie d'Aytré	84
Tableau 10 : Coordonnées géographiques des différents sites où sont effectués les prélèvements ponctuels d'eau. A chaque date un échantillonnage d'eau en triplicat a été effectué.....	87
Tableau 11 : Liste des marqueurs des traceurs de sources microbiologiques analysés.....	91
Tableau 12 : Fèces récoltées pour l'analyse de la spécificité et de la sensibilité des marqueurs génétiques	92
Tableau 13 : Collecte des souches de bactéries d'origine connue pour la création de modèles d'algorithme génétique MALDI-TOF	94
Tableau 14 : Nombre d'échantillons analysés par cytométrie en flux.....	97
Tableau 15 : Choix des échantillons pour analyser la diversité des communautés bactériennes en fonction de l'abondance des indicateurs de contamination fécale. Dans la colonne eau, « < Seuil » signifie sans dépassement des seuils réglementaires et « > Seuil » indique les échantillons pour lesquels au moins un des indicateurs de contamination fécale était supérieur aux seuils réglementaires. Les dates où les échantillons de sédiment ont été prélevés sont indiquées dans la colonne Sed (sédiment) par le signe +.	

En rouge sont représentés les échantillons pour lesquels au moins 2 des 3 réplicats étaient en dépassement des seuils réglementaires. En vert et en noir sont représentés les échantillons dont l'abondance des indicateurs de contamination fécale sont inférieures aux seuils réglementaires. PLN : Platin Nord, PLS : Platin Sud..... 99

Tableau 16 : Description des amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour l'ARNr 16S de la région V3-V57 102

Tableau 17 : Synthèse des produits utilisés pour les réactions de PCR..... 103

Tableau 18 : Corrélation des paramètres biologiques et physico-chimiques entre les deux campagnes (test de Pearson) (quadrillage 1 : (09/03/2020), quadrillage 2 : (17/09/2020)) : sur l'ensembles des 20 sites, entre les sites 11 vaseux (situés aux bords de la baie), entre les 9 sites sableux (situés au centre de la baie) 156

Tableau 19 : Corrélation entre l'abondance des indicateurs de contamination fécale et les différentes fractions de sédiment (test de Pearson) (Quadrillage 1 : 09/03/2020, Quadrillage 2 : 17/09/2020) . 157

Tableau 20 : Corrélation entre l'abondance des indicateurs de contamination fécale et les facteurs environnementaux sur deux dates (quadrillage 1 : 09/03/2020, quadrillage 2 : 17/09/2020) 158

Tableau 21 : : Fréquence des échantillonnages pour l'étude comparative au niveau des deux baies .. 205

Tableau 22 : Corrélation des indicateurs de contamination fécale dans l'eau avec les paramètres physico-chimiques et météorologiques du milieu dans les deux baies. Les chiffres en gras correspondent aux coefficients de corrélation et les astérisques représentent le degré de significativités des tests de Pearson (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$). 210

Tableau 23 : : Corrélation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment avec les paramètres physico-chimiques et météorologiques des deux baies. Les chiffres en gras correspondent aux coefficients de corrélation et les astérisques représentent le degré de significativités des tests de Pearson (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$) 211

Tableau 24 : Abondance des indicateurs de contamination fécale quantifiée lors des prélèvements ponctuels dans les différentes sources de contamination de la baie d'Aytré. Les prélèvements effectués en temps sec sont représentés en jaune et les prélèvements effectués en temps de pluie sont représentés en bleu. Les valeurs indiquées en gras en rouge correspondent à des dépassements des seuils réglementaires des indicateurs de contamination fécale..... 217

Tableau 25 : Abondance des indicateurs de contamination fécale quantifiée dans les échantillons d'eau prélevés dans les différentes sources de contamination de la baie d'Aytré. Les abondances des E. coli sont représentées en orange et les abondances des entérocoques sont représentées en vert. Les dates des prélèvements ponctuels effectués dans les exutoires et les quantifications des indicateurs de contamination fécale dans les deux sites de baignade mesurés entre 48 et 72 h après les analyses ponctuelles sont indiquées. Les valeurs indiquées en gras et en rouge correspondent à des dépassements des seuils réglementaires des indicateurs de contamination fécale. 218

Tableau 26 : Classification des différents isolats bactériens d'indicateurs de contamination fécale en fonction de leur origine humaine ou animale. 229

Liste des abréviations

ADN : acide desoxyribonucléique

API : Appareils et Procédés d'Identification

ARN : acide ribonucléique

ARN-F : bactériophages ARN F-spécifiques

ARS L'agence régionale de santé

EPEC : *E. coli* entéro-pathogène

ETEC : *E. coli* entérotoxique

EIEC : *E. coli* entéro-invasive

EHEC : *E. coli* entérohémorragiques,

EAEC : *E. coli* entéro-agrégatif

FISH : Fluorescent In Situ Hybridization

EPS : substances polymères extracellulaires

DAPI : Di Aminido Phenyl Indol

DDASS : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales

CDA : communauté d'agglomération de La Rochelle

ISO : International Organization for Standardization

LPEC : *E. coli* comme pathogènes pulmonaires

MALDI-TOF MS : matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry

MENEC : *E. coli* responsables de méningite néonatale

MUG : méthylumbelliféryl β -D-glucuronide

MUD : 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucoside

NPP : nombre le plus probable

OTU : *Operational Taxonomic Unit*

Pb : paires de bases

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PMMoV : Pepper Mild Mottle Virus

qPCR : réactions de polymérisation en chaîne quantitative

RDP : Ribosomal Data Project

STEP : station d'épuration

TSM : traceurs de sources microbiologiques ou encore « Microbial Source Tracking »

UFC : unité formant colonie

UPEC : *E. coli* uro-pathogène

UV : ultraviolet

VNC : viable mais non cultivable

TBX : Tryptone sels biliaires X-Glucuronide

INTRODUCTION

Dans le contexte actuel de changement climatique, les écosystèmes littoraux sont parmi les systèmes naturels les plus menacés dans le monde (Worm et al., 2006). Situés à l'interface du continuum terre et mer, ils constituent des milieux à forts enjeux environnementaux et économiques avec un large éventail de biens et de services (Luck et al., 2003). Au plan environnemental, ces écosystèmes jouent un rôle prépondérant et assurent de nombreuses fonctions biologiques et écologiques (Hughes et al., 1997). Ils représentent des habitats essentiels pour une vaste diversité d'organismes (virus, archées, bactéries, plancton, poissons, mammifères ...) et constituent une zone d'épuration, de stockage et de transformation d'apports terrigènes (Hughes et al., 1997; Vörösmarty et al., 2010). D'un point de vue socio-économique, ces environnements constituent un support majeur pour les populations littorales en permettant le développement économique : activités portuaires, activités dans les secteur primaire (pêcheries, ostréiculture), secondaire (industries nautiques...) et tertiaire avec le tourisme et les activités de loisirs (Newton et al., 2020). Ces zones littorales occupent approximativement 4% de la surface de la terre mais abritent environ la moitié de la population humaine mondiale (Barbier et al., 2011; Costanza et al., 1997). Ces écosystèmes sont ainsi soumis à de fortes pressions anthropiques (Duarte et al., 2015) qui les fragilisent et peuvent entraîner une perte de biodiversité, de fonctions écosystémiques et une altération de la qualité des eaux (Braatz et al., 2006; Cochard et al., 2008). Des études ont montré que la détérioration généralisée des écosystèmes côtiers est due à une augmentation des apports d'éléments tels que les nutriments, les matières organiques, les sédiments et les polluants chimiques ou organiques (Byappanahalli et al., 2012; Newton et al., 2020; Whitman et al., 2014). De plus, les écosystèmes littoraux, estuaires, rivières, baies etc., sont fréquentés, en particulier pendant la saison estivale, pour des activités récréatives comme les sports nautiques, la pêche à pied, les promenades et les activités de baignade qui mettent en contact les populations avec ces environnements potentiellement dégradés.

La détérioration des écosystèmes côtiers entraîne également un risque de santé publique dans le cadre des activités de baignade consécutive à une altération de la qualité microbiologique de l'eau. En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont confirmé que le contact avec des eaux récréatives contaminées par des matières fécales présente des risques pour la santé des usagers (Fleisher et al., 1998; Shuval, 2003). Afin de préserver la qualité de ces milieux et de garantir la sécurité sanitaire des usagers, le contrôle de la qualité des eaux de baignade fait l'objet en France d'un suivi réglementaire pendant les périodes estivales conformément à la directive européenne (2006/7/EC).

La baie d’Aytré sur le littoral atlantique français, au Sud de l’agglomération de La Rochelle dans le département de la Charente Maritime est ainsi interdite à la baignade depuis 2018 à cause d’une contamination fécale récurrente, enregistrée durant les périodes estivales. Les origines et les sources de cette pollution restent inconnues malgré de nombreuses investigations menées sur le site depuis les années 2000 (ASCONIT, 2017) à la demande des acteurs territoriaux (Mairie d’Aytré, Communauté d’Agglomération de La Rochelle, Département de la Charente-Maritime, Région Nouvelle-Aquitaine) et des services de l’État (Agence Régionale de Santé).

Dans ce contexte, un programme de recherche ambitieux, le programme ICOMABIO¹, impliquant le Laboratoire LIENSs (CNRS-La Rochelle Université) et le syndicat mixte QUALYSE (né du regroupement de plusieurs laboratoires départementaux de sécurité sanitaire) a vu le jour pour identifier l’origine et les dynamiques de la contamination fécale dans la baie. Mon projet de thèse prend place dans ce programme.

Les investigations menées depuis quelques années dans la baie d’Aytré ont mis en évidence plusieurs hypothèses qui permettraient d’expliquer l’origine de cette pollution fécale. Cette étude devra réinterroger l’origine et les dynamiques de la contamination en prenant en compte de nouvelles techniques et une analyse intégrée de multi-indicateurs.

Dans un premier chapitre, avant de préciser les objectifs précis de cette étude et la structuration de notre approche (1.5), nous ferons le point sur le cadrage de l’étude et sur l’état de l’art. Les questions de réglementation et d’indicateurs utilisés pour évaluer la qualité microbiologique des eaux de baignade seront traitées dans un premier temps (1.1). Ce chapitre présentera ensuite une analyse de la littérature scientifique sur deux questions : la dynamique des contaminations fécales dans les écosystèmes aquatiques (1.2) et les méthodes d’analyses de la qualité microbiologique des écosystèmes aquatiques (1.3). Pour terminer ce chapitre introductif et avant de développer la problématique retenue pour cette étude, nous ferons une présentation du terrain étudié et nous rappellerons les différents suivis réalisés et hypothèses explorées par les collectivités territoriales et services de l’État en charge de ces questions depuis une trentaine d’années (1.4).

¹ : *ICOMABIO : Identification des sources de contamination fécale dans un espace littoral connaissant des pratiques de tourisme et de loisir ; Utilisation combinée de marqueurs biologiques, chimiques : l’exemple de la baie d’Aytré*

Chapitre 1 – Cadrage de l'étude et état de l'art

La vulnérabilité des écosystèmes aquatiques est importante sur les littoraux urbanisés et elle est accentuée par le développement local, la croissance démographique et le tourisme (Newton et al., 2020). Ce phénomène est aussi intensifié par le contexte sanitaire de ces deux dernières années avec la pandémie de la covid-19 qui a incité les populations des grandes villes à migrer vers les campagnes et régions côtières à la recherche d'espaces considérés comme de meilleure « qualité » car moins peuplées et donc moins denses. La dégradation de ces environnements littoraux par des contaminations d'origine fécale est fréquente et récurrente dans différents types d'écosystèmes aquatiques dans le monde avec des contextes géographiques divers. Ainsi, les écosystèmes littoraux sont de plus en plus fragilisés par une pression anthropique intense et croissante engendrant une augmentation des risques pour la santé publique. Parmi ces risques, ceux engendrés par la contamination fécale des eaux de baignade peuvent avoir des conséquences négatives sur la santé humaine, notamment par l'apparition de certaines maladies telles que des otites, des gastro-entérites ou des irritations cutanées (Shuval, 2003). Préserver l'état de ces environnements littoraux mais également assurer la sécurité sanitaire des populations de ces régions est primordial. Aussi, parallèlement à l'accroissement de la pression, sont développés des dispositifs de suivi de la qualité des eaux toujours plus exigeants.

Depuis l'application de la directive européenne 2006/7/CE en 2012, la surveillance de la qualité des eaux de baignade est plus sévère et les normes d'analyse et de classement des zones de baignade sont plus restrictives par rapport aux directives précédentes. Ainsi, pour préserver la bonne qualité microbiologique de ces milieux et assurer la sécurité sanitaire des usagers, cette directive exige des suivis réguliers par l'analyse de la dynamique de ces contaminations. Elle demande également le recensement des sources potentielles des contaminants microbiologiques le cas échéant et exige l'information du public (EC, 2006). Actuellement plusieurs méthodes et outils de détermination de l'origine des contaminations fécales dans les écosystèmes aquatiques ont été développés et des stratégies de réhabilitation de ces écosystèmes sont adoptées dans les régions où ces problèmes persistent. La baie d'Aytré en Charente Maritime (France) est un exemple d'écosystème aquatique exposé à une contamination fécale récurrente depuis plus d'une vingtaine d'années. C'est ainsi que les évolutions de la réglementation ont obligé à une réflexion approfondie sur l'identification des causes de la contamination et sur l'avenir de cet espace.

1.1 Un point sur le contexte sanitaire et la réglementation des eaux de baignade

1.1.1 Contexte sanitaire des eaux de baignade dans le monde

Mis en évidence par John Snow en 1854, le choléra est l'une des premières maladies d'origine hydrique liées à l'usage d'eau contaminée par une bactérie d'origine fécale. Plusieurs autres maladies dues au contact avec l'eau ont également été mises en évidence notamment celles dues à des activités de baignade dans les eaux littorales. En effet, vers les années 1980, des études ont identifié des liens entre la fréquentation des écosystèmes aquatiques contaminés et l'apparition de certaines maladies comme les gastro-entérites, les infections auriculaires, oculaires et cutanées (Cheung et al., 1990; World Health Organization, 2003). (Cabelli et al., 1982; Ness and Hood, 1982) ont mis en évidence une relation directe et linéaire entre l'apparition de maladies gastro-intestinales liées aux entérocoques ou à *Escherichia coli* et les activités de baignade dans plusieurs écosystèmes aquatiques à New York, en Louisiane et au Massachusetts. Plus tard, (Cheung et al., 1991, 1990) ont observé les mêmes corrélations entre l'apparition de maladies hydriques et la présence de bactéries fécales dont des pathogènes comme les staphylocoques sur neuf plages à Hong Kong ; ces contaminations étaient principalement liées aux activités humaines (eaux usées, activités sous-marines, élevage ou eaux pluviales). Fleisher et al., (1998) ont effectué l'une des premières études analysant l'impact direct des écosystèmes contaminés sur les usagers. Leur étude réalisée dans quatre zones de baignade britanniques a montré que les baigneurs courent un risque accru de gastro-entérite, de maladie respiratoire aiguë fébrile, ou d'infections de l'oreille et de l'œil par rapport aux non-baigneurs. En Californie, Boehm et al., (2003) dans la baie d'Avalon et Turbow et al., (2002) dans les plages de Huntington et de Newport ont caractérisé une contamination fécale d'origine humaine due à la présence d'entérocoques ayant des risques majeurs sur la santé publique. Wade et al., (2006) ont démontré des corrélations entre l'apparition de maladies gastro-intestinales et la présence d'entérocoques dont l'impact est plus significatif avec l'augmentation du temps de contact avec l'eau.

Durant ces dernières décennies, de nombreuses autres études ont analysé l'origine des contaminations fécales dans différents types d'écosystèmes aquatiques pour lutter contre leurs impacts sur la santé humaine. Il s'agit notamment des écosystèmes d'eau douce comme les lacs

(Ishii et al., 2006; Knowlton and Jones, 2009; Whitman et al., 2006; Zimmer-Faust et al., 2017), les rivières (Bradshaw et al., 2016; McLellan, 2004; Rochelle-Newall et al., 2015; Staley et al., 2018), des mers situées dans des zones tropicales (Bouvy et al., 2008; Byamukama et al., 2005; Laureano-rosario et al., 2017; Rochelle-Newall et al., 2015) ou subtropicales (Boehm et al., 2003; Liang et al., 2013) ou encore des écosystèmes côtiers, îles, estuaires et bassins versants (Ackerman and Weisberg, 2003; Crowther et al., 2002; Jardé et al., 2018; Leboulanger et al., 2021; Mauffret et al., 2012; McCarthy et al., 2017; Mieszkin et al., 2009; Overbey, 2014). Quelques études ont effectué une étude comparative entre différents écosystèmes pour comprendre la dynamique de la contamination fécale dans ces environnements. Parmi les écosystèmes aquatiques, les zones côtières protégées (par des zones de marais ou d'autres écosystèmes) et abritées dans des baies ainsi que les lacs peu profonds sont plus fréquemment exposés à des charges microbiennes élevées (Bonilla et al., 2006; Donahue et al., 2017; Feng et al., 2016; Lipp et al., 2001). Ces milieux sont sujets à l'accumulation de sédiments, potentielle zone de multiplication des bactéries fécales, qui peuvent être remises en suspension dans l'eau par les utilisateurs et/ou les événements pluvieux. Cependant, les risques pour la santé, associés aux sédiments restent encore mal connus notamment dans les écosystèmes marins, mais ils doivent être considérés comme un risque potentiel lors des enquêtes sanitaires (Largier and Taggart, 2006; Moreno et al., 2019). Cette synthèse succincte sur les impacts de la contamination fécale des écosystèmes aquatiques montre que tous les types d'écosystèmes aquatiques à travers le monde peuvent être concernés par ce phénomène et particulièrement dans les pays développés et les pays émergents.

Les conséquences néfastes évidentes de la contamination fécale des zones de baignade ont conduit plusieurs études à déterminer l'origine des germes fécaux pour comprendre le déterminisme et caractériser l'origine de ce type de pollution dans le but d'adopter des stratégies efficaces pour contrôler voire éliminer cette contamination. Dans la majorité des pays en développement, des réglementations contrôlent et déterminent l'état sanitaire des eaux de baignade (USEPA, 2009). En Europe, deux directives principales ont défini les réglementations sur la surveillance de la qualité microbiologique des eaux de baignade des écosystèmes aquatiques pour préserver ces milieux et assurer la sécurité sanitaire des baigneurs. Divers outils d'analyse de la qualité microbiologique des écosystèmes aquatiques ont été développés et seront présentés dans la suite de ce chapitre.

1.1.2 Le suivi de la qualité des eaux de baignade en Europe

1.1.2.1 Les directives européennes sur les eaux de baignades

La qualité des eaux de baignade naturelles est réglementée au niveau européen depuis 1976 par la directive 76/160/CEE (European Parliament and Council., 2006). Cette directive était basée sur la détermination de la qualité microbiologique des plages en fonction de valeurs impératives et de valeurs guides de plusieurs paramètres microbiologiques (indicateurs de contamination fécale) et de paramètres physico-chimiques du milieu (Tableau 1).

En 2006, la directive 2006/7/CE abroge celle de 1976 pour mettre davantage l'accent sur la protection de la santé publique dans les eaux de baignade grâce à des méthodes de surveillance et de gestion plus efficaces que celles de la précédente directive (EC, 2006). En France, cette directive européenne est entrée en vigueur en 2012. Elle est caractérisée par une baisse du nombre de paramètres à analyser pour faciliter la détermination de la qualité microbiologique des eaux de baignade (2 paramètres contre 19 pour la directive de 1976). Cette directive fixe des seuils relativement élevés pour le dénombrement des deux indicateurs de contamination fécale *E. coli* et entérocoques intestinaux pour l'analyse de la qualité microbiologique des eaux de baignade (Tableau 2). En outre, cette directive exige l'élaboration de profils de vulnérabilité des zones de baignade. Il s'agit d'élaborer un bilan des analyses effectuées au cours des quatre dernières périodes estivales. Les profils de vulnérabilité doivent recenser les sources de contaminations microbiologiques présentes dans les zones à risques pour lutter contre ces pollutions. La directive européenne recommande également l'interdiction définitive de toute activité de baignade dans des eaux de baignade de qualité « insuffisante » pendant cinq années consécutives de mauvais résultats d'analyse. Ces restrictions peuvent amener les collectivités locales en collaboration avec les agences régionales de santé (ARS) à prendre des mesures de gestion adaptées à la protection sanitaire des baigneurs, comme l'interdiction des activités de baignade dans les zones contaminées (EC, 2006). De plus, la Direction générale de la santé dans la note d'information DGS/EA4 n° 2015-181 du 2 juin 2015 instruction DGS/EA4/2020/111 du 2 juillet 2020 a déterminé un seuil de 1000 NPP/100ml d'eau pour *E. coli* et 370 NPP/100ml d'eau pour les entérocoques pour l'analyse d'un unique échantillon pour déterminer la qualité microbiologique des eaux de baignade.

Tableau 1 : Paramètres d'analyses des eaux de baignade déterminés en 1976 par la directive 76/160/CEE (European Parliament and Council., 2006)

	Paramètres	G (Guide)	I (Impérative)	Fréquence d'échantillonnage minimale
Microbiologiques :				
1	Coliformes totaux/100ml	500	10 000	Bimensuelle (1)
2	Coliformes fécaux/100ml	100	2 000	Bimensuelle (1)
3	Streptocoques fécaux /100ml	100	-	(2)
4	Salmonelles /1l	-	0	(2)
5	Entérovirus PFU /10l	-	0	(2)
Physico-chimiques :				
6	pH	-	6-9 (0)	(2)
7	Coloration	-	Pas de changement anormal de la couleur (0)	Bimensuelle (1)
8	Huiles minérales mg/l	-	Pas de film visible à la surface de l'eau et absence d'odeur	Bimensuelle (1)
		≤0,3	-	(2)
9	Substances tensioactives réagissant au bleu de méthylène mg/l (laurylsulfate)	-	Pas de mousse persistante	Bimensuelle (1)
		≤ 0,3	-	(2)
10	Phénols (indice phénols) mg/l C6H5OH	-	Aucune odeur spécifique	Bimensuelle (1)
		≤ 0,005	≤ 0,05	(2)
11	Transparence m	2	1 (0)	Bimensuelle (1)
12	Oxygène dissous % saturation O ₂	80-120	-	(2)
13	Résidus goudronneux et matières flottantes telles que bois, plastiques, bouteilles, récipients en verre, en plastique, en caoutchouc et en toute autre matière. Débris ou éclats	Absence		Bimensuelle (1)
14	Ammoniaque (NH ₄) mg/l			(3)
15	Azote Kjeldahl (N) mg/l			(3)
Autres substances considérées comme indices de pollution :				
16	Pesticides (parathion ; HCH, dieldrine) mg/l			(2)
17	Métaux lourds tels que : Arsenic, Cadmium ; Chrome VI, Plomb I, Mercure			(2)
18	Cyanures mg/l			(2)
19	Nitrates (NO ₃) et Phosphates (PO ₄) mg/l			(3)
<p>(0) Dépassement des limites prévues en cas de conditions géographiques ou météorologiques exceptionnelles. (1) Lorsqu'un échantillonnage effectué au cours des années précédentes a donné des résultats sensiblement plus favorables que ceux prévus dans ce tableau et lorsqu'aucune condition susceptible d'avoir diminué la qualité des eaux n'est intervenue, la fréquence d'échantillonnage peut être réduite d'un facteur 2 par les autorités compétentes. (2) Teneur à vérifier par les autorités compétentes lorsqu'une enquête effectuée dans la zone de baignade révèle la présence possible ou une détérioration de la qualité des eaux. (3) Ces paramètres doivent être vérifiés par les autorités compétentes lorsqu'il y a une tendance à l'eutrophisation des eaux.</p>				

Tableau 2 : Paramètres d'analyses des eaux de baignade déterminés en 2006 par la directive (2006/7/CE) (EC, 2006)

Paramètres		Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante	Fréquence d'échantillonnage minimale
1	Entérocoques intestinaux (NPP/100 ml)	250(*)	500(*)	500(**)	Bimensuelle
2	<i>Escherichia coli</i> (NPP/100 ml)	100(*)	200(*)	185(**)	Bimensuelle
(*) Évaluation au 95e percentile. (**) Évaluation au 90e percentile.					

1.1.2.2 Les bactéries utilisées comme indicateurs de contamination fécale

La flore bactérienne des organismes à sang chaud est constituée de bactéries commensales, saprophytes et parasites ; celles-ci peuvent être potentiellement pathogènes ou porteurs de facteurs de virulence (Vernozy-rozand and Montet, 2005). Certaines de ces bactéries, en particulier celles provenant de la flore intestinale, sont utilisées comme des indicateurs de contamination fécale dans des domaines alimentaires, médicaux, marins, etc (Bertrand et al., 2011). Ces germes fécaux ont pour habitats primaires le tube digestif de l'Homme et/ou des animaux. Ils se disséminent dans d'autres environnements grâce aux matières fécales.

D'après Scott et al., (2004), un bon indicateur de contamination fécale se définit comme suit :

- ✓ Non pathogène mais présent en même temps que les pathogènes
- ✓ Sa seule source dans les eaux naturelles est la contamination fécale ; absent en l'absence de la contamination fécale
- ✓ Cinétique de survie similaire à celle des agents pathogènes
- ✓ Ne se multiplie pas dans les eaux naturelles
- ✓ Inactivé par les traitements de manière similaire que les pathogènes
- ✓ Méthodes de détection peu onéreuses, rapides et faciles à mettre en œuvre.

1.1.2.2.1 *Escherichia coli* comme indicateur de contamination fécale

Les *Escherichia coli* sont des bactéries Gram négatifs aéro-anaérobies facultatifs appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et sont très abondants dans le tractus intestinal des animaux à sang chaud (Gordon et al., 2008). La température optimale de croissance de ces bactéries est de 37,5°C mais elles sont thermotolérantes à 44,5°C et sont capables de se reproduire à des pH compris entre 7 et 9 (Farhan Mohammad Khan, 2019). Pendant de nombreuses années, le tube digestif des animaux à sang chaud était considéré comme l'habitat exclusif des *E. coli*. Leur concentration dans les matières fécales est d'environ 10^7 UFC/g de matières fécales (Mitsuoka and Hayakawa, 1973). Ainsi, ces bactéries sont considérées comme l'un des meilleurs indicateurs de contamination fécale et leur survie dans les écosystèmes aquatiques est très variable et peut atteindre 14 jours (Berthe et al., 2013). Cependant, Berthe et al., (2013) ont démontré que les isolats avec une faible capacité de survie sont isolés plus fréquemment dans des eaux récemment contaminées. Ainsi, la présence d'*E. coli* dans les milieux aquatiques indique une contamination récente par des matières fécales. De même la présence de cette espèce bactérienne renseigne sur une cooccurrence possible de microorganismes pathogènes tels que d'autres bactéries, des virus et des protozoaires d'origine intestinale (Harwood et al., 2005; Liang et al., 2013). Néanmoins, des récentes études ont identifié des souches de *E. coli* dans divers autres milieux comme dans l'eau de mer, le sédiment et même dans certains sols (Byappanahalli et al., 2012; Farhan Mohammad Khan, 2019; Ness and Hood, 1982; Rochelle-Newall et al., 2015) qui constituent des habitats secondaires de celles-ci (Berthe et al., 2013).

Ces bactéries possèdent une enzyme appelée la β -glucuronidase capable d'hydrolyser le 4-méthylumbelliféryl β -D-glucuronide (MUG) en libérant un fluorogène qui est détecté à l'aide d'une lampe UV de 365 nm (Hernandez et al., 1991). Cette propriété définie par (Feng and Hartman, 1982) est utilisée depuis lors pour quantifier l'abondance de ces bactéries pour l'analyse de la qualité microbiologique des eaux de baignade par exemple. Il est bien connu qu'il existe un certain nombre de phylogroupes distincts d'*E. coli* et que les souches des différents phylogroupes peuvent diverger selon leurs niches écologiques, leur cycle de vie et leur capacité à provoquer des maladies (Gordon et al., 2008). Ainsi, plusieurs études ont caractérisé la structure génétique d'*E. coli* pour identifier les phylogroupes et les différentes souches de cette espèce bactérienne (Clermont et al., 2000; Garabetian et al., 2014; Gordon et al., 2008; Ochman and Selander, 1984; Whittam et al., 1983). A partir de ces études, différentes classifications de cette espèce bactérienne ont été proposées afin de caractériser l'origine des

différentes souches. Un typage par analyse de polymorphisme génétique a permis de déterminer quatre groupes phylogénétiques principaux (A, B1, B2, D) (Clermont et al., 2000; Herzer et al., 1990; Ochman and Selander, 1984; Whittam et al., 1983; Wirth et al., 2006). Ces différents phylogroupes ont des habitats spécifiques et diffèrent par leurs caractéristiques phénotypiques comme leur capacité de croissance selon les facteurs du milieu (disponibilité en sucre, température) et leurs profils de résistance aux antibiotiques (Gordon et al., 2008). Ces propriétés ont permis de caractériser leur origine humaine et ou non humaine (animale), et dans une moindre mesure les souches environnementales c'est-à-dire les souches qui se seraient adaptées à cet environnement (sol, sédiment, écosystèmes aquatiques). Berthe et al., (2013) ; Clermont et al., (2000) ont proposé un schéma basé sur une méthode de PCR en Triplex utilisant trois gènes caractéristiques (*chuA*, *yjaA* et *TspE4C2*) pour déterminer l'origine des *E. coli* à la suite d'une contamination fécale (Figure 1). Ainsi à partir de ce schéma, en Australie, Gordon and Cowling, (2003) ont défini le groupe B1 comme provenant plus fréquemment des vertébrés, le groupe B2 comme étant caractéristique des mammifères et le groupe D comme fréquent chez les vertébrés ectothermiques et endothermiques. Les phylogroupes A et B1 étaient observés dans des échantillons d'eau et de sols alors que les groupes B2 et D étaient moins fréquents dans ces environnements (Gordon and Cowling, 2003; Walk et al., 2007). Parmi les différents groupes, le groupe B2 et le groupe D sont des espèces pathogènes et les groupes A et B1 regroupent des espèces portant des facteurs de virulence favorisant la pathogénicité des souches bactériennes (Berthe et al., 2013; Clermont et al., 2000). Ainsi, à partir de ces propriétés, l'analyse de l'occurrence de 4 gènes principaux permet de caractériser l'origine des souches d'*E. coli*. L'analyse combinée de la présence ou de l'absence des gènes *uidA*, *chuA*, *yjaA* et *TspE4C2* indique des bactéries fécales caractéristiques des différents phylogroupes B2, D, A et B1 (Clermont et al., 2000; Doumith et al., 2012; Turret et al., 2016). Cependant, il existe d'autres souches d'*E. coli* d'origine environnementale qui sont phénotypiquement identiques mais génétiquement différentes et divisées en 5 clades (clade I, II, III, IV, V) (Clermont et al., 2011).

Les souches d'*E. coli* sont majoritairement non pathogènes. Pourtant certaines souches sont responsables d'infections extra-intestinales et de maladies liées aux aliments et à l'eau (Hartl and Dykhuizen, 1984). Pour caractériser l'origine des souches d'*E. coli*, les analyses du pouvoir pathogène et/ou de la résistance aux antibiotiques sont aussi effectuées (Sauget et al., 2016a). L'utilisation d'antibiotiques chez l'homme ou en agriculture (élevage et pisciculture) crée une pression de sélection qui favorise la diffusion de souches résistantes et donc leur persistance dans l'environnement. La recherche de ces molécules et/ou de gènes de résistance à ces

molécules renseignent également sur l'origine de souches de *E. coli* dans l'environnement. Ces dernières années, il a été observé que les *E. coli* produisent des β -lactamases à spectre étendu ou des carbapénèmes qui leur confèrent une résistance à plusieurs antibiotiques composés de β -lactamines et aux carbapénèmes. En fonction de leur pouvoir pathogène, une autre classification des *E. coli* a été proposée. Nataro and Kaper, (1998) ont défini des pathotypes de *E. coli* avec une classification permettant de distinguer huit principaux groupes de souches de *E. coli* : EPEC (entéropathogène), ETEC (entérotoxique), EIEC (entéro-invasive), EHEC (entérohémorragiques), EAEC (entéro-agrégatif) étant responsables d'infections digestives et LPEC (*E. coli* comme pathogènes pulmonaires), MENEC (*E. coli* responsables de méningite néonatale) responsables d'infections extra-intestinales. L'analyse du pouvoir pathogène de cette espèce bactérienne permet également de déterminer l'origine de souches bactériennes.

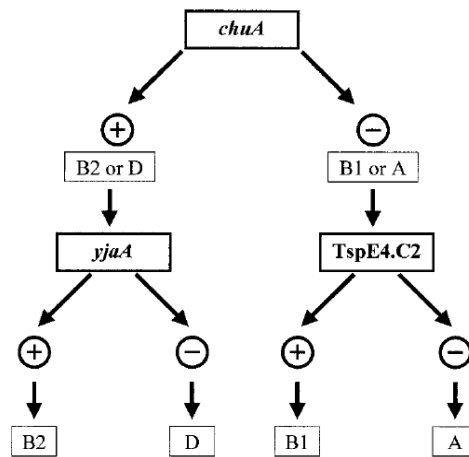


Figure 1 : Schéma de Clermont décrivant l'arbre de décision dichotomique pour déterminer le groupe phylogénétique d'une souche d'*E. coli* en utilisant les résultats de l'amplification par PCR des gènes *chuA* et *yjaA* et *TSPE4.C2*. D'après (Clermont et al., 2000).

1.1.2.2.2 Entérocoques comme indicateur de contamination fécale

Les entérocoques sont des *Firmicutes* appartenant à la famille des *Enterococcaceae*. Ce sont des coques aéro-anaérobies facultatives à Gram positif, groupées en paires ou en courtes chaînettes (Talebi et al., 2015). Ce sont des bactéries non sporulées, non mobiles. Leur température optimale de croissance est de 35°C, mais elles peuvent se multiplier aussi de 10°C à 45°C. La plupart des souches survivent à un chauffage de 30 min à 60°C (Byappanahalli et

al., 2012). Elles croissent en présence de 6,5% de NaCl et à pH 9,6 (Bouguéneq and Horaud, 1989). Comme les *E. coli*, les entérocoques sont très abondants dans le tube digestif des animaux. Chez l'homme, leur concentration peut varier entre 10^5 et 10^8 bactéries/g de poids humide alors que chez les animaux (oiseaux et des mammifères) l'abondance de ces bactéries varie entre 10^4 et 10^6 /g de poids humide (Edberg et al., 2000; Gleeson, 1997; Hancock and Gilmore, 2006).

Ces bactéries sont largement distribuées dans plusieurs habitats extra-entériques comme le sol, les sédiments, le sable de plage, les sédiments d'eau douce, les tapis microbiens (Byappanahalli et al., 2012; Heaney et al., 2015, 2012; Whitman and Nevers, 2003), la végétation aquatique (ex : *Cladophora*) et terrestre et dans les eaux de surface (rivière, ruisseau, fleuve, baie...) (Kacar and Omuzbuken, 2017; Park et al., 2018; Rochelle-Newall et al., 2015; Thi et al., 2016). Ces différents habitats présentent une grande variation des facteurs environnementaux contrairement au tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud, où les paramètres physico-chimiques sont relativement constants, notamment la température (Byappanahalli et al., 2012). Les entérocoques présentent ainsi une grande capacité de survie et sont capables de s'adapter, se multiplier et de persister dans divers environnements (Byappanahalli et al., 2012; Weiskerger et al., 2019). Ces bactéries sont donc considérées comme des indicateurs de pollution ancienne mais leur utilisation comme indicateur de contamination fécale a été remise en question. En effet, les facteurs environnementaux du milieu comme la concentration en nutriments et la température peuvent permettre à ces bactéries fécales de se multiplier et de devenir une population mineure mais persistante dans le milieu (Bonato et al., 2005). Ces bactéries sont capables de développer également deux états physiologiques : un état de dormance et un état VNC (viable mais non cultivable) (Signoretto et al., 2004). En effet, contrairement aux bactéries à Gram négatif (*E. coli*), les entérocoques sont des bactéries à Gram positif et possèdent une paroi épaisse et uniforme constituée de peptidoglycanes qui les protège face aux différents stress environnementaux, comme des lésions cellulaires, des phénomènes de dessiccation, etc. De nombreuses études ont comparé la présence et la persistance des entérocoques dans divers environnements pour caractériser leurs origines (Byappanahalli et al., 2012; Ishii et al., 2006; Whitman et al., 2006). Les habitats et les facteurs de régulation des entérocoques dans les environnements extra-entériques sont synthétisés dans le tableau 3.

Dans les écosystèmes aquatiques en général, différentes espèces d'*Enterococcus* ont été récupérées dans la colonne d'eau mais également dans le sable de plage, d'eau douce, et dans le sédiment des zones supra-tidales ou supra-littorales (*i.e.*, zone la plus haute du littoral, soumise uniquement aux embruns, grandes marées et tempêtes), intertidales (*i.e.*, zone de

balancement des marées) et sub-tidales (*i.e.*, zone toujours immergée) (Lipp et al., 2001; Matthew et al., 2011; Thoe et al., 2014). Elles sont par exemple présentes en forte concentration dans les écosystèmes intertidaux, à faible pente et protégés par des îles ou des zones de marais, etc. (Bonilla et al., 2006; Kucuksezgin et al., 2020). Ces bactéries sont généralement responsables des contaminations fécales dans les écosystèmes marins. Les entérocoques peuvent en effet se fixer sur les particules de sédiment à l'aide de leurs exo-polysaccharides appelé « *Enterococcal surface protein (Esp)* » (Byappanahalli et al., 2012; Toledo-arana et al., 2001). Cette faculté leur assure une protection contre les prédateurs et favorise leur sédimentation et même leur multiplication grâce à la formation de biofilms (Toledo-arana et al., 2001). Ainsi, des études portant sur les sédiments marins et d'eau douce ont révélé que les concentrations d'entérocoques peuvent être supérieures de plusieurs ordres de grandeur (log 10) à celles de l'eau douce et de l'eau marine (Weiskerger et al., 2019). Ces résultats suggèrent que les sédiments peuvent agir comme un réservoir important d'entérocoques, résultant de la sédimentation des bactéries présentes dans la colonne d'eau et de leur persistance dans cet environnement. D'autres études ont également montré que les entérocoques sont capables de persister plus longtemps dans les sédiments d'eau douce (Ishii et al., 2006) que dans les milieux marins.

Le genre *Enterococcus* est constitué d'environ une trentaine d'espèces bactériennes (Gilmore et al., 2014). Cependant, toutes les espèces d'entérocoques ne sont pas d'origine fécale. Les deux principales espèces d'entérocoques d'origine fécale sont *E. faecium* et *E. faecalis* (Kilpper-balz, 1984). Ces deux espèces bactériennes sont opportunistes, fréquemment responsables d'infections nosocomiales, d'infections urinaires, de pyélonéphrites, de bactériémies et d'endocardites. D'autres espèces comme *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. avium* et *E. durans* sont aussi des espèces intestinales retrouvées chez l'homme, chez les volailles, les poissons, les crustacés, mais également dans les eaux de surface (Collins and Farrow, 1984). Par exemple, il a été montré que *E. gallinarum* et *E. hirae* étaient liés à la pollution fécale issue des activités d'élevage porcin (Manero et al., 2002). D'autres espèces sont très abondantes dans les environnements naturels. Il s'agit de *E. mundtii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfurous* qui sont les espèces d'entérocoques les plus abondants dans les réservoirs environnementaux (Byappanahalli et al., 2012). Ces espèces sont associées aux plantes (Thoe et al., 2014), aux tapis d'algues dans les lacs par exemple. Whitman and Nevers, (2003) ont montré que les algues sont une source importante d'entérocoques mais également d'*E. coli* avec des densités dépassant souvent 100 000 UFC/g de matières sèches. Il a été suggéré que *E. casseliflavus* est

l'espèce d'entérocoque la plus courante dans les eaux de ruissellement urbaines (Ferguson et al., 1996; Moore et al., 2008).

Cependant, les méthodes normées de quantification des entérocoques (International Organisation for Standardisation, 1999) utilisées pour l'analyse de la qualité des écosystèmes contaminés ne permettent pas de distinguer la microflore naturelle (environnementale) de la microflore transitoire (d'origine fécale). En plus des principales espèces d'entérocoques (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* et *E. hirae*), ces méthodes permettent de détecter occasionnellement d'autres espèces d'*Enterococcus* (*E. mundtii*) et certaines espèces du genre *Streptococcus* (notamment *S. bovis* et *S. equinus*). Ainsi, les méthodes normées de quantification des entérocoques dans les eaux de baignade ne sont pas spécifiques aux espèces d'origine fécale mais permettent aussi de détecter d'autres espèces d'entérocoques provenant d'autres habitats notamment de l'environnement.

Tableau 3 : Habitats et facteurs de régulation des entérocoques. Occurrence, persistance, croissance et génétique des populations d'entérocoques dans les habitats extra-intestiniels (d'après la review de Byappanahalli et al., (2012), références dans l'article)

Habitat pour les entérocoques	Occurrence	Persistance/survie	Croissance	habitats
Sol	Présent dans les sols tropicaux et tempérés	Persiste plus longtemps que <i>E. coli</i> ; survie plus longue que les autres indicateurs de contamination fécale	Peut se multiplier dans le sol sous certaines conditions	Différentes espèces d' <i>Enterococcus</i> ont été caractérisées dans les sols tropicaux ; des souches métaboliquement diverses d' <i>Enterococcus spp.</i> présentes dans le sol
Sédiment	Présent dans les sédiments d'eau douce et d'eau marine	Survie plus longue dans les sédiments que dans l'eau ; trouvé principalement à la surface, sans tendances saisonnières de distribution ; les événements hydrométéorologiques influencent leur flux entre les sédiments et l'eau ; survie différentielle observée pour les sédiments d'eau douce et d'eau marine	Peut se développer dans les sédiments sous certaines conditions	
Plage de sable	Présent dans les plages d'eau douce et marines ; leur distribution est inégale dans l'espace et le temps	Persiste plus longtemps dans le sable humide de plage et dans les zones côtières	Une multiplication a été observée pour des populations persistantes d'entérocoques dans le sable	Nombreuses espèces d' <i>Enterococcus</i> , dont <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. mundtii</i> et <i>E. hirae</i> présentes dans le sable de plage et les sédiments intertidaux
Végétation	Présent dans la végétation aquatique et terrestre, y compris les algues, la végétation submergée, les plantes à fleurs et les cultures fourragères	Persiste de quelques jours à quelques mois pour la végétation submergée et les algues desséchées	Peut se multiplier et atteindre de fortes densités bactériennes	Différentes espèces d' <i>Enterococcus</i> ont été caractérisées dans la rhizosphère et la phyllosphère ; confirmation de la présence de populations clonales
Eau douce	Présent dans les eaux douces tropicales et tempérées	Survie différentielle des entérocoques par rapport aux autres indicateurs de contamination fécale	Peut croître sporadiquement dans des eaux riches en nutriments et en algues	Souches d'origine environnementale identifiées dans les bassins versants ; divers <i>Enterococcus spp.</i> et souches observées
Eau de mer	Présent dans les eaux marines	Survie plus longue qu' <i>E. coli</i>	Survie prolongée et croissance plus probable dans les sables/sédiments humides et la végétation associée	Diverses souches d'entérocoques observées

Le contrôle sanitaire peut être complété par des analyses supplémentaires comme un contrôle visuel pour détecter la présence de résidus d'hydrocarbure, de verre, de plastique, de caoutchouc etc., mais également des mesures de paramètres physico-chimiques comme le pH, la température, la turbidité, la salinité, l'oxygène dissous, etc. (Tableau 1). La directive européenne sur la qualité des eaux de baignade exige l'élaboration d'un profil de baignade attestant la révision du classement des zones de baignade (2006/7/EC). Ce document doit faire un inventaire de l'état des sources de contamination dans les milieux sensibles pour mettre en place des stratégies de remédiation efficaces et réduire les apports d'origine fécale en amont et en aval du littoral. Pour cela, il est nécessaire de caractériser l'origine des contaminations fécales (EC, 2006).

1.2 Dynamique des contaminations fécales dans les écosystèmes aquatiques

1.2.1 Sources de contamination fécale dans les écosystèmes aquatiques

Comme le terme l'indique, une contamination fécale a pour origine les matières fécales provenant de l'homme ou des animaux. Ces matières fécales sont très riches en bactéries et en virus entériques composants principaux du microbiote intestinal. Ces microorganismes se retrouvent dans les écosystèmes aquatiques en passant par différentes sources situées à proximité de ces environnements (Bertrand et al., 2011; Byappanahalli et al., 2012; Weiskerger et al., 2019). Ainsi, ces microorganismes peuvent être classés selon leurs origines humaines ou animales et en fonction de leurs sources diffuses ou ponctuelles dans les environnements aquatiques (Figure 2).

1.2.1.1.1 Origine humaine et non humaine (animale) de la contamination fécale des écosystèmes aquatiques

Les activités humaines constituent la principale source de contamination fécale dans les écosystèmes aquatiques (Rochelle-Newall et al., 2015). L'urbanisation importante et le développement industriel dans ces environnements littoraux peuvent, à la suite de défauts de raccordement des réseaux d'assainissement, la présence de réseau séparatif traitant les eaux pluviales séparément ou non, des rejets industriels non raccordés ou par les effluents des stations de traitement des eaux usées (STEP) influencer l'apport de contaminants fécaux dans les zones de baignade (Bitton, 2005; Jeanneau et al., 2012; Ogorzaly and Gantzer, 2006). Du

fait de leur situation stratégique pour le développement économique, les écosystèmes littoraux subissent une forte pression anthropique accentuée en période estivale par le tourisme qui peut constituer une source directe de contamination fécale. Les activités de baignade sont considérées comme une source directe de bactéries fécales. En effet, un apport de 100 g de fèces permet la dissémination de 10^{14} cellules de pathogènes dans la colonne d'eau ; et en moyenne un baigneur peut apporter 0.14 g de matière fécale durant une baignade de 15 minutes (Gerba, 2000). Les activités de loisirs comme les campings non raccordés aux STEP, les plaisanciers rejetant les eaux noires « non traitées » des bateaux au niveau ou au large des plages, peuvent contribuer à l'apport de microorganismes fécaux dans ces environnements (Sobsey et al., 2003).

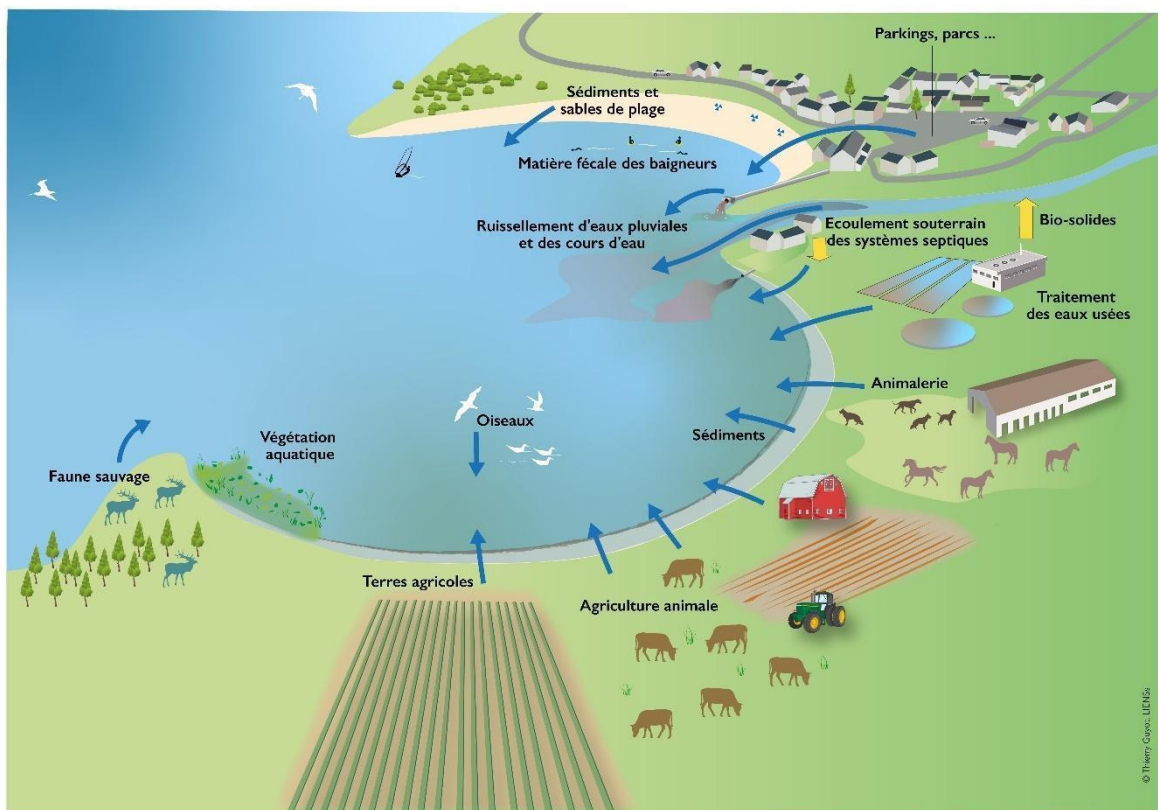


Figure 2 : Les sources des indicateurs de contamination fécale dans les plans d'eau (flèches bleues) Modifié par M. Ndione et T. Guyot, d'après (Byappanahalli et al., 2012)

Plusieurs études ont également mis en évidence une forte corrélation entre la présence d'animaux et les événements de contamination des écosystèmes aquatiques (Boehm et al., 2003; Largier, 2006; Pommepuy et al., 2006; Largier et al., 2006). La présence d'animaux sauvages comme les oiseaux ou d'animaux domestiques notamment les chiens et même les chevaux qui peuvent rejeter des fientes ou des excréments riches en bactéries fécales dans les écosystèmes aquatiques (Dick et al., 2005; Green et al., 2012; Jardé et al., 2018; Nguyen et al., 2018). De nombreuses études ont mis en évidence des liens directs entre la contamination fécale de zones humides et la fréquentation d'oiseaux sur la plage, notamment en hiver (Lu et al., 2008; Benton et al., 1983). Les activités agricoles, notamment l'élevage d'animaux, peuvent également être impliquées dans l'apport de contamination fécale dans ces environnements. Les eaux de ruissellement issues d'épandages de lisier de porcs ou de fumier de bovins, de déjections animales émises lors du pâturage constituent une source directe de contamination fécale (Bradshaw et al., 2016; Morgan et al., 2020) (Figure 2).

1.2.1.2 Les facteurs abiotiques influençant l'accumulation des contaminants fécaux dans les milieux aquatiques

Suivant la nature (bactéries, virus ou molécules chimiques), l'origine (humaine ou non-humaine) et les sources des contaminants fécaux, plusieurs facteurs environnementaux peuvent influencer leur dynamique en favorisant ou non leur développement et leur accumulation dans les milieux aquatiques (Figure 3). Dans les écosystèmes aquatiques, **la température** permet, entre autres, de définir les masses d'eau qui influencent la variabilité des cycles saisonniers. La croissance et la dynamique saisonnière des microorganismes sont aussi contrôlées par la fluctuation des températures. Pour les indicateurs de contamination fécale, il a été démontré que leur température optimale de croissance varie entre 23 et 45°C, que les températures élevées (>50°C) réduisent leur abondance et que les faibles températures peuvent entraîner leur persistance dans l'environnement en favorisant des formes de dormance (Boehm et al., 2018; Bussi et al., 2017; Ishii et al., 2006; Noble et al., 2004; Sokolova et al., 2012). La température peut influencer également la variation d'autres paramètres comme la salinité et la concentration en oxygène dissous qui conditionnent le cycle de vie des organismes marins.

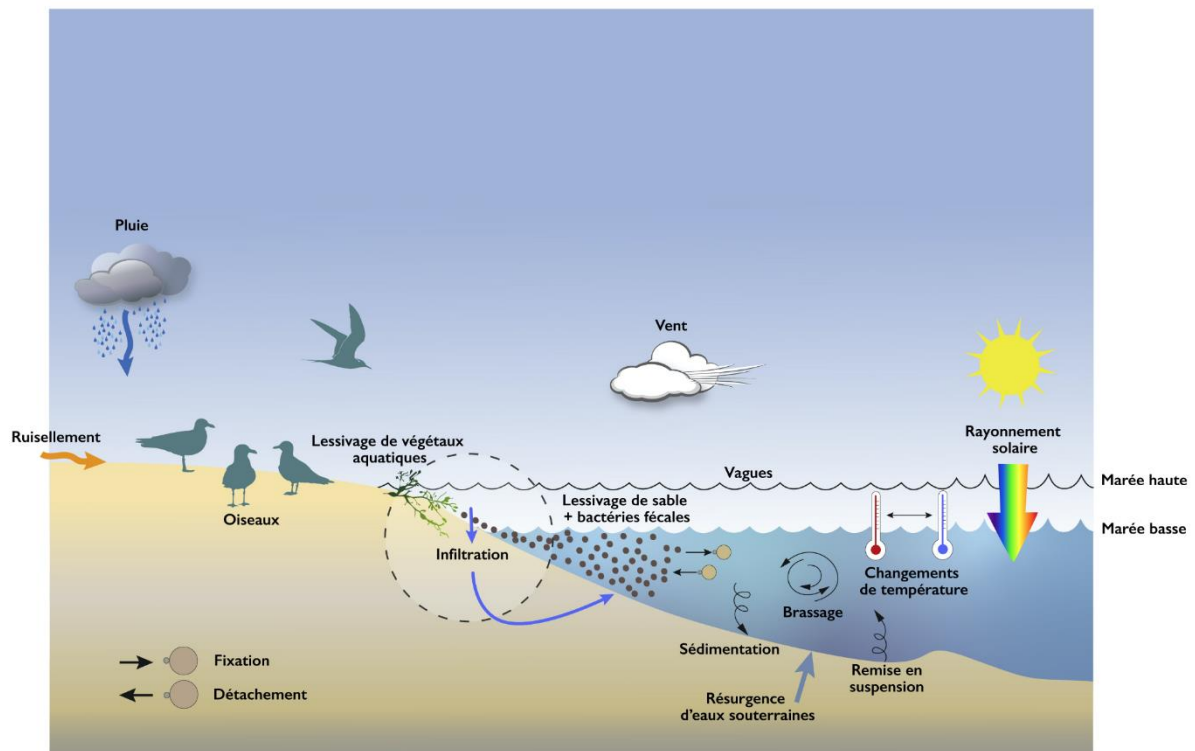


Figure 3 : : Dynamique des germes fécaux dans les plans d'eau et facteurs influençant leur prolifération dans les écosystèmes aquatiques. Modifié par M. Ndione et T. Guyot, d'après Weikerger et al., (2019).

La salinité est un paramètre important qui contrôle la densité de l'eau de mer et permet de comprendre la circulation des masses d'eau et de les différencier. Ce paramètre est considéré comme un facteur limitant la croissance des microorganismes dans divers environnements. En effet, le sel (NaCl) est considéré comme un bactéricide car il exerce une pression osmotique rendant difficile l'homéostasie (Bertrand et al., 2011). Dans l'eau de mer la concentration de la salinité peut atteindre 36 ‰. Ainsi cette propriété fait que l'eau de mer est depuis toujours considérée comme un « milieu épurateur » c'est-à-dire un milieu capable d'inhiber ou d'éliminer la plupart des bactéries allochtones dont des agents pathogènes. Cependant, des études récentes ont décrit des bactéries halotolérantes pathogènes ou non qui sont capables de se multiplier dans les écosystèmes aquatiques (Whitman et al., 2014). De même, les indicateurs de contamination fécale en particulier les entérocoques sont des bactéries capables de se multiplier dans des solutions salines à 65 ‰ (Byappanahalli et al., 2012). La variation de la salinité peut aussi être importante en fonction des apports d'eau douce dans le milieu marin littoral en particulier à proximité d'estuaires ou d'exutoires et suite à des épisodes de fortes pluies ou de pluies durables.

L'oxygène dissous est l'un des principaux facteurs vitaux qui dicte les processus biologiques dans les écosystèmes aquatiques. Sa concentration est par exemple utilisée comme un indicateur de la capacité d'autoépuration des rivières (Knowlton and Jones, 2009).

Le pH est actuellement utilisé comme un indicateur du réchauffement climatique dans les milieux aquatiques. Ce paramètre renseigne sur l'acidité de ces environnements. Son effet sur la dynamique des bactéries fécales dans ces écosystèmes est encore mal connu (Thi et al., 2016). Cependant, la plupart des bactéries et des virus ont un métabolisme stable à un pH neutre à légèrement alcalin comme dans les eaux de surface dont le pH est compris entre 5 et 9.

Les éléments nutritifs concernent principalement les éléments azotés, le phosphate et le silicate. Dans les écosystèmes aquatiques, les nutriments constituent un facteur limitant de la croissance des microorganismes. Leurs apports dans les eaux de baignade peuvent être favorisés par la nature des sédiments, le contact sable de plage-eau, mais ils peuvent également provenir des galets de plage, des algues fixées, de la végétation aquatique, du phytoplancton et même des marais avoisinants situés généralement dans le bassin versants de ces environnements (Byappanahalli et al., 2006; Chun et al., 2015; Whitman et al., 2006). Les bactéries utilisent pour leur développement les nutriments adsorbés aux particules sédimentaires (Gerba and McLeod, 1976). Ces éléments sont également caractérisés pour la surveillance de la qualité de ces écosystèmes. Par exemple, les nutriments azotés (nitrate, nitrite, ammonium) sont analysés en tant qu'indicateur de contamination agricole et sont suivis dans les eaux de surface comme indice de viabilité des écosystèmes. Les fortes concentrations en azote (principalement en nitrates) provoquent la prolifération d'algues entraînant un déséquilibre et donc une eutrophisation du milieu.

Les rayonnements solaires causent des dommages au niveau des acides nucléiques (Laureano-rosario et al., 2017) (Maraccini et al., 2016). C'est le paramètre principal d'abattement des bactéries fécales dans les stations de traitements d'eaux résiduaires comme les stations de lagunages. Les rayonnements solaires sont considérés comme délétères pour les bactéries fécales, notamment les *E. coli* (Jang et al., 2017; Whitman and Nevers, 2003). Cependant la turbidité du milieu et donc la charge en matières en suspension (éléments solides ou volatiles non dissous dans l'eau) constitue des facteurs de protection des microorganismes contre le rayonnement solaire (Monteith et al., 2007; Weyhenmeyer and Müller, 2016; Williamson et al., 2017). La plupart des microorganismes peuvent se fixer sur la surface de ces particules. C'est le cas des deux indicateurs de contamination fécale *E. coli* et entérocoques qui, grâce à leur EPS (substances polymères extracellulaires), peuvent se fixer sur les particules fines de sédiment (Byappanahalli et al., 2012; Toledo-arana et al., 2001).

Les marées et le coefficient des marées, la hauteur d'eau ainsi que **le vent et les courants marins** sont tous des paramètres océanographiques qui peuvent impacter les concentrations en bactéries fécales dans les environnements marins (Figure 3). En effet, lorsque le sable de plage est concentré en bactéries fécales, leur lessivage sous l'effet des facteurs océanographiques cités précédemment entraîne celles-ci dans l'eau de mer. Par exemple, Cheung et al., (1991) ont montré que les niveaux de marées étaient corrélés positivement avec l'abondance des *E. coli* sur les plages à Hong Kong situées à proximité de sources de pollution importantes (d'eaux usées ou rivières polluées). La houle et les courants permettent le brassage des sédiments subtidaux où les bactéries fécales peuvent sédimenter (Feng et al., 2016). De même, en fonction de sa direction, le vent peut influencer sur les courants marins qui dirigent les masses d'eaux provenant d'une source de contamination fécale vers les zones de baignade (Wu et al., 2017).

La pluviométrie est l'un des principaux facteurs environnementaux favorisant l'augmentation des bactéries fécales dans les eaux de baignade (Ackerman and Weisberg, 2003; Boehm et al., 2003; Lipp et al., 2001; Powers et al., 2020; Weiskerger et al., 2019). Elle peut impacter l'apport des contaminants fécaux de deux manières principales. D'abord, le ruissellement des eaux pluviales favorise le lessivage des sols situés dans le bassin versant en se chargeant de matières minérales et organiques dont les bactéries fécales, avant de se déverser dans les eaux (Powers et al., 2020; Silva et al., 2014; Weiskerger et al., 2019). Une augmentation de la concentration des bactéries fécales est systématiquement observée après des précipitations abondantes (6 mm/h) (Ackerman and Weisberg, 2003). Ces mêmes auteurs ont montré que cette contamination peut persister dans le milieu aquatique jusqu'à 5 jours avec une baisse observée 3 jours après la pluie. Ensuite, lors de forts événements de pluie, les stations d'épuration des eaux usées et les stations de lagunage des eaux de pluie, chargées en matières minérales et organiques peuvent être by-passées et se déverser directement dans les milieux aquatiques sans traitement préalable (Staley et al., 2018). Il en est de même pour les eaux des marais qui peuvent s'épandre lors de fortes pluies (tempêtes ou orages) (Ackerman and Weisberg, 2003).

1.2.1.3 Facteurs biotiques influençant la dynamique de contamination

Il a été suggéré que certains facteurs biotiques peuvent influencer la dynamique des contaminants fécaux dans les zones de baignade. Il s'agit principalement des interactions entre les microorganismes. Un de facteurs notables est la (1) lyse virale. Dans l'environnement marin, les virus peuvent en effet être des facteurs de régulation non seulement quantitatif mais également qualitatif des populations de bactéries : ce phénomène est appelé "Kill the winner"

(Bertrand et al., 2011; Thingstad, 2000). (2) La prédation peut également constituer un facteur non négligeable de la régulation des microorganismes fécaux dans les milieux aquatiques (Whitman et al., 2014). Cette interaction est observée dans le sable de plage et le sédiment où la microfaune naturelle (protozoaires et les nématodes) constitue un ensemble de prédateurs pour les bactéries fécales (Bertrand et al., 2011; Janelidze et al., 2011; Whitman et al., 2014). Enfin les bactéries fécales peuvent être en (3) compétition avec les bactéries autochtones du milieu pour les nutriments disponibles en particulier dans le sédiment (Bertrand et al., 2011).

1.2.2 Adaptation des bactéries fécales dans les environnements aquatiques

En fonction des conditions environnementales des écosystèmes, les bactéries indicatrices de contamination fécale peuvent s'accumuler et proliférer dans ces milieux. Ces environnements constituent ainsi leurs habitats secondaires (Berthe et al., 2013). Elles peuvent se retrouver de nouveau chez leur hôte primaire suite à une contamination de l'habitat secondaire vers l'homme ou les animaux.

Depuis longtemps le sédiment a été décrit comme un environnement favorable à la croissance de bactéries fécales. En effet, comme décrit précédemment, du fait de la disponibilité de matière organique soluble et de nutriments, les sédiments constituent un environnement hospitalier pour la survie des bactéries et une zone de protection contre les prédateurs tels que les protozoaires mais aussi une barrière de protection contre l'exposition aux rayons UV du soleil (Decamp, O., and Warren, 2000; Jamieson et al., 2005). Les faibles débits ou l'absence de courants dans certains écosystèmes aquatiques peuvent entraîner la sédimentation des microorganismes. Ce phénomène est régulièrement observé dans les écosystèmes aquatiques avec peu de courants ou en l'absence de renouvellement des eaux de surface (Weiskerger et al., 2019). Une des principales conséquences de la sédimentation des bactéries fécales est leur naturalisation c'est-à-dire l'adaptation de ces microorganismes fécaux dans des milieux extra-intestinaux. La naturalisation des microorganismes fécaux dans le milieu aquatique est un phénomène fréquent dans les écosystèmes tropicaux (Ishii et al., 2006; Rochelle-Newall et al., 2015). Les microorganismes sont ainsi caractérisés par leur capacité à survivre et à se multiplier hors de leur hôte et à s'adapter à des conditions environnementales autres que leurs conditions naturelles de croissance. Ce phénomène a notamment été mis en évidence chez *E. coli* dans les sols (sol d'alpage) (Farhan Mohammad Khan, 2019) conduisant même les auteurs à remettre en doute l'utilisation de cette espèce bactérienne comme indicateur de contamination d'origine fécale (Byappanahalli et al., 2006; Ishii et al., 2006; Whitman et al., 2006). Le sable, les sédiments, les tapis microbiens (biofilm) sont également des habitats secondaires favorables à

la naturalisation bactérienne. Ces substrats peuvent alors représenter un puits ou une source de bactéries d'origine fécale par leur remise en suspension sous l'influence des masses d'eau, des courants, des marées, etc. (Abdelzaher et al., 2010; Matthew et al., 2011; Whiley et al., 2018).

1.2.3 Utilisation des traceurs de sources microbiennes pour caractériser une contamination fécale

Depuis quelques décennies, une approche pour déterminer l'origine d'une contamination fécale consiste à rechercher des cibles présentes spécifiquement chez l'Homme ou chez les animaux. Ces cibles sont des marqueurs biologiques ou chimiques appelés traceurs de sources microbiologiques ou TSM ou encore « Microbial Source Tracking » (Glassmeyer et al., 2005; USEPA, 2009). Ces méthodes de traçage de l'origine des contaminants fécaux ont été développées dans plusieurs pays et sont considérées comme des indicateurs de contamination fécale. Plusieurs types de marqueurs ont été développés par l'utilisation de méthodes moléculaires pour déterminer l'origine des contaminations fécales dans les écosystèmes aquatiques (Green et al., 2012; Layton et al., 2006; Mieszkin et al., 2009; Reischer et al., 2014).

1.2.3.1 Les différents types de traceurs de sources microbiennes

1.2.3.1.1 Les bactéries intestinales comme traceurs de sources microbiologiques

Certaines bactéries fécales ne se développent que chez des hôtes spécifiques et présentent des empreintes génétiques caractéristiques de leur origine. Parmi ces bactéries on distingue les *Bacteroidales*, bactéries très répandues dans le tube digestif des animaux, elles sont hôtes-spécifiques (Blais et al., 2015; Gourmelon and Durand, 2013; Layton et al., 2006). Il existe différents génogroupes qui peuvent être spécifiques à l'homme ou à d'autres animaux comme les bovins, les ovins, les caprins. Ces espèces bactériennes présentent chacune des séquences spécifiques d'ADN notamment des séquences du gène 16S ARNr qui leur sont propres (Figure 4). L'analyse de ces séquences génétiques permet ainsi de les différencier en fonction de leurs hôtes caractéristiques : humains (amorces Hum1Bac), ruminants (amorces Rum2Bac) (Mieszkin et al., 2009) ou porcins (amorces Pig2Bac) par exemple (Mieszkin et al., 2010). Ces séquences sont amplifiées par des amorces spécifiques et elles sont utilisées pour caractériser l'origine des contaminants fécaux dans les écosystèmes aquatiques. D'autres espèces bactériennes comme *Clostridium perfringens* et *Bifidobacter adolescentis* associées à l'homme (Ogorzaly and Gantzer, 2006; Shen et al., 2013), *Catellibacoccus marimammalium* et *Helicobacter spp.* associées aux goélands et aux oiseaux de bord de mer (Lu et al., 2008),

Lactobacteria amylovorus associée aux porcs (Gourmelon et al., 2010b) et *Faecalibacterium spp.* associée à la volaille (Shen et al., 2013) sont également recherchées pour déterminer l'origine d'une contamination fécale dans les eaux de surface.

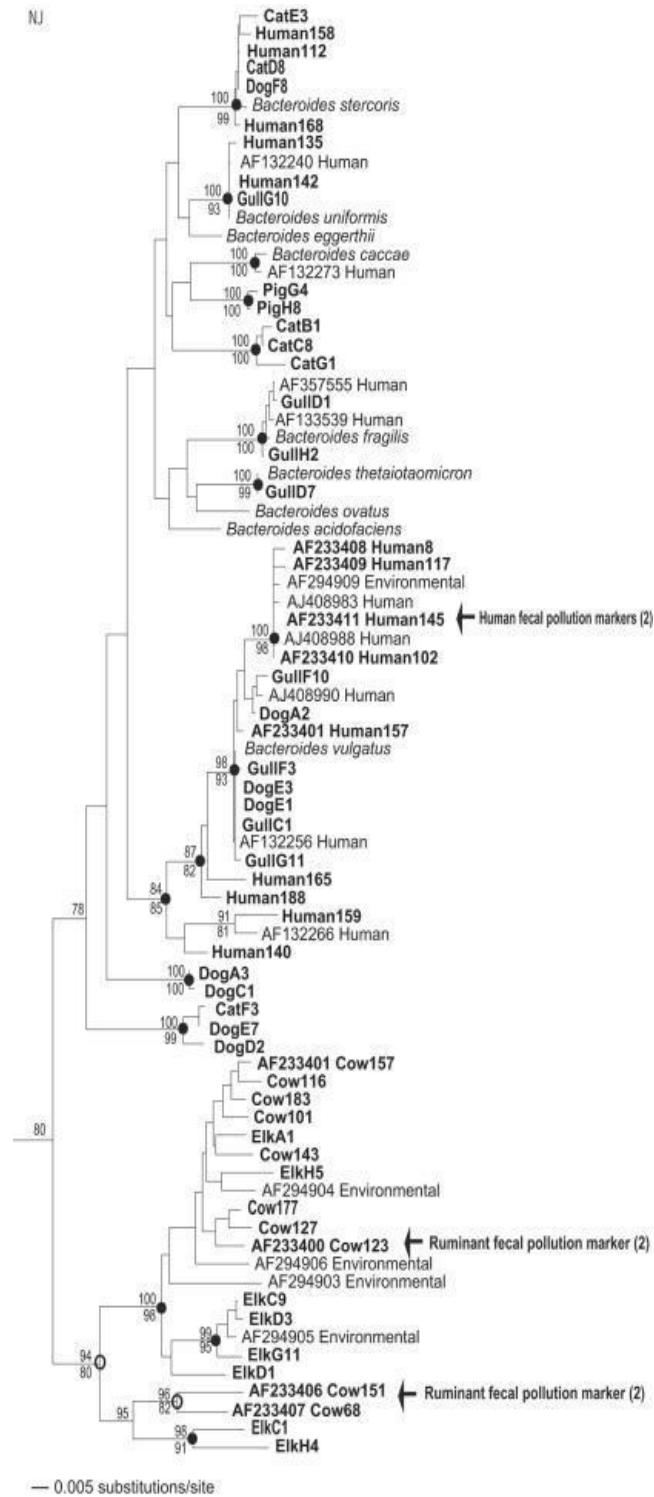


Figure 4 : Relations phylogénétiques des séquences partielles du gène de l'ARNr 16S des Bacteroidales (526 positions) avec des isolats bactériens cultivés du genre Bacteroides (d'après Dick et al., 2005)

1.2.3.1.2 Les virus entériques et phages comme traceurs de contamination fécale

Dans les matières fécales, les virus entériques peuvent atteindre une concentration de 10^5 à 10^{12} particules virales par gramme de fèces (Gerba, 2000). Ainsi plusieurs groupes de virus pathogènes pour l'homme comme les entérovirus, les rotavirus, les norovirus, les polyomavirus, et les adénovirus (d'origine humaine et animale) sont souvent recherchés comme indicateur de contamination fécale (Gerba, 2000; Hartard, 2017; Maunula et al., 2013; Pina et al., 1998; Wong et al., 2012). Par exemple, les norovirus et les adénovirus sont les principaux indicateurs de la qualité microbiologique des fruits de mer comme les huîtres (Maunula et al., 2013; Wong et al., 2012). D'autres indicateurs viraux entériques, tels que les bactériophages ARN-F spécifiques à l'hôte, décrits pour la première fois par (Havelaar and Pot-Hogbeem, 1988) sont caractéristiques de la qualité microbiologique des eaux de baignade. Différents types de bactériophages ont été caractérisés par Ogorzaly and Gantzer, (2006) : les génogroupes GI et GIII sont d'origine humaine et les génogroupes GII et GIV sont d'origine animale. Ce sont les marqueurs TSM les plus utilisés pour caractériser l'origine des contaminants fécaux dans les milieux aquatiques (Cole et al., 2003; Dore et al., 2000; Gómez-doñaate et al., 2011; Mauffret et al., 2012). Le crAssphage est un autre bactériophage associé à une origine humaine et utilisé également pour la caractérisation d'une contamination fécale d'origine humaine (Dutilh et al., 2014; Stachler et al., 2018; Stachler and Bibby, 2014). Plus récemment, le virus végétal PMMoV (Pepper Mild Mottle Virus) infectant les espèces de plantes du genre *Capsicum* (piment et poivre) et se retrouvant dans des produits transformés dérivées de ces plantes a été décrit comme le virus à ARN le plus abondant dans les matières fécales d'origine humaine (environ 10^5 à 10^{10} copies/g de matières fécales). Ce virus est considéré ainsi comme un excellent indicateur de contamination fécale d'origine humaine (Haramoto et al., 2018; Zhang et al., 2006). D'autres indicateurs viraux sont également recherchés. Il s'agit des coliphages somatiques spécifiques à *E. coli* (IAWPRC, 1991; Kott et al., 1974; Mookerjee et al., 2014) ou les phages spécifiques de *Bacteroides fragilis* (IAWPRC, 1991; Tartera and Jofre, J., 1987).

1.2.3.1.3 *Les parasites ou protozoaires comme traceurs de contamination fécale*

Plusieurs protozoaires peuvent se retrouver dans les eaux de surface notamment dans les pays tropicaux où des épidémies d'origine hydrique sont très fréquentes. Les principaux parasites indicateurs d'une contamination fécale et que l'on retrouve dans les eaux de baignade sont *Cryptosporidium parvum* et *C. hominis* provenant de certains ruminants ou *Giardia lamblia* provenant des chiens (Ogorzaly and Gantzer, 2006). Ces organismes sont analysés le plus souvent pour déterminer la qualité des eaux de piscines. Ces organismes peuvent infecter l'homme puis se retrouver dans les écosystèmes aquatiques et donc représenter une contamination d'origine humaine. Il est estimé que la concentration des parasites protozoaires présents dans les fèces de personne infectées peut atteindre 10^5 à 10^7 cellules par gramme de fèces (Gerba, 2000).

1.2.3.1.4 *Des molécules chimiques comme traceurs de contamination fécale*

Plusieurs molécules chimiques sont utilisées pour déterminer l'origine d'une contamination fécale dans divers environnements dont les écosystèmes aquatiques. Ces molécules sont des composés de synthèse ou naturelles, ingérées ou produites par les animaux et les hommes puis excrétées dans les fèces. La présence de ces produits dans l'environnement indique systématiquement une contamination fécale car ils ne se multiplient pas dans l'environnement (Tableau 4). Ces molécules peuvent être spécifiques à leur hôte comme les stéroïdes qui sont produits par les animaux et l'Homme sous différents composés propres à chaque origine permettant ainsi d'estimer la contribution de chaque origine de contamination en cas de pollution mixte. Elles peuvent être aussi des molécules indicatrices soit d'une contamination d'origine animale (comme les stimulateurs de croissance utilisés en agriculture), soit d'une origine humaine comme c'est le cas de la caféine qui est spécifique à l'Homme.

Tableau 4 : Les différentes molécules chimiques pouvant être considérées comme des indicateurs de contamination fécale.

Types	Molécules	Origine
Stéroïdes	Stanols, coprostérol, cholestérol (Derrien, 2011; Jardé et al., 2018)	Humaine et animale
Caféine	Café, thé, cacao, cola, chocolat, etc. (Glassmeyer et al., 2005; Gourmelon et al., 2010b)	Humaine
Composés chimiques naturels ou de synthèse, produits pharmaceutiques	Paracétamol, antibiotiques, contraceptifs oraux (Jeanneau et al., 2012)	Humaine et animale
	Hormones ou stimulateurs de croissance, additifs alimentaires (Bitton, 2005)	Humaine et animale
Composés biologiques	Acides biliaires (Glassmeyer et al., 2005)	Humaine et animale
Tabac	Cotinine (métabolite du tabac) et éthyl citrate (additif du tabac) (Glassmeyer et al., 2005)	Humaine
Édulcorants artificiels	Aspartame, sucralose (Scheurer et al., 2009)	Humaine

1.2.3.2 Critères d'utilisation des différents types de TSM

L'inventaire des traceurs de sources microbiologiques présenté dans la partie (1.2.3) a montré qu'il existe une grande variété de marqueurs caractéristiques de l'origine d'une contamination fécale et se développant dans des écosystèmes aquatiques de zones géographiques différentes. L'utilisation de tous ces types de marqueurs génétiques pour déterminer l'origine d'une contamination fécale dans un espace littoral présente des avantages mais également des limites. Les *Bacteroidales* constituent le meilleur marqueur bactérien de traçage de l'origine des contaminations fécales. Elles sont les bactéries les plus abondantes dans les matières fécales et donc dans l'environnement. Ces bactéries ont une forte spécificité d'hôtes et contrairement aux deux indicateurs de contamination recherchés par la méthode normalisée, elles n'ont pas la capacité de se multiplier dans l'environnement ; ce sont des bactéries anaérobies. La plupart des marqueurs viraux présentés en (1.2.3.1.2) ont aussi une faible persistance dans l'environnement. Néanmoins ces marqueurs viraux notamment les phages ARN-F qui sont les cibles virales les plus recherchées permettent d'estimer la contribution d'une origine humaine par rapport à une origine animale mais ne permettent pas de spécifier les différentes sources d'une contamination animale.

Les marqueurs chimiques sont aussi peu persistants dans l'environnement. Ils sont de bons indicateurs d'une contamination fécale. Cependant, ils sont présents à des quantités relativement faibles dans l'environnement ce qui complexifie leur analyse. Ces marqueurs peuvent être aussi territoires-dépendants, c'est-à-dire très variables en fonction du type d'écosystèmes mais également en fonction des facteurs biotiques et abiotiques de l'environnement étudié (Haramoto et al., 2018; Mayer et al., 2018; Yahya et al., 2017). L'utilisation de ces traceurs de source microbiologique dans d'autres écosystèmes nécessite donc une validation, c'est-à-dire une évaluation de leur sensibilité et de leur spécificité dans l'environnement étudié. (1) La spécificité est la capacité à détecter une cible présente dans les matières fécales. Elle correspond au rapport entre le nombre d'échantillons positifs contenant la cible et l'ensemble des échantillons qui devraient contenir la cible (Kildare et al., 2007; Stoeckel and Harwood, 2007). (2) La sensibilité est la capacité à détecter une source non présente dans un échantillon donné. Elle correspond au rapport entre le nombre d'échantillons négatifs par rapport au nombre total d'échantillons qui n'ont pas réellement subi de contamination fécale (Kildare et al., 2007; Stoeckel and Harwood, 2007).

1.3 Méthodes d'analyse de la qualité microbiologique des écosystèmes aquatiques

Une bonne qualité microbiologique des environnements aquatiques est nécessaire pour garantir leur bon état écologique, préserver leur biodiversité et assurer la sécurité sanitaire des usagers notamment lors des activités récréatives. Le suivi de la qualité des eaux de baignade est, par exemple, basé (1) sur des méthodes de culture bactérienne pour quantifier les indicateurs de contamination fécale *E. coli* et entérocoques intestinaux déterminés par la directive européenne. Le développement des techniques de biologie moléculaire et de biochimie permet aujourd'hui de mettre en place des méthodes d'analyses plus fines et plus rapides pour (2) la recherche de traceurs de sources microbiologiques pour déterminer l'origine des pollutions fécales présentes dans les écosystèmes contaminés. (3) L'analyse de la diversité des communautés microbiennes par des approches de génomique environnementale est aussi possible pour étudier l'écologie microbienne de ces environnements. Ces méthodes d'analyses vont être maintenant présentées.

1.3.1 Méthodes de dénombrement des indicateurs de contamination fécale

Il s'agit d'une quantification de l'abondance des deux indicateurs de la directive européenne basés sur la culture bactérienne en milieu sélectif (ex : TBX pour *E. coli*, et Slanetz pour les entérocoques) avec ou sans enrichissement préalable. C'est vers les années 1980 que ces méthodes miniaturisées ont été développées comme alternative aux techniques de quantification en milieu liquide. La méthode de quantification des *E. coli* a été mise en place par Feng and Hartman, (1982). Plus de 95% des souches d'*E. coli* possèdent l'enzyme β -glucuronidase, qui hydrolyse le 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG), substrat non fluorescent, et libère le 4-méthylumbelliférone qui fluoresce sous UV à 366 nm. Pour les entérocoques, Littel et Hartman (1982) ont mis en évidence que le 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUD) était hydrolysé par la presque totalité des streptocoques fécaux (entérocoques et streptocoques) libérant du glucose et le 4-méthylumbelliférone composé fluorescent sous UV à 366 nm également. Ces techniques ainsi que les méthodes de calcul statistiques pour le dénombrement des bactéries intestinales basées sur la loi de Poisson ont été validées par Hernandez et al., (1991) puis normalisées pour intégrer les réglementations d'analyse des eaux de baignade.

Ces techniques normalisées présentent cependant un certain nombre de limites. Elles sont fondées sur des analyses statistiques et donnent une estimation du nombre le plus probable (NPP) de la concentration des bactéries recherchées dans un échantillon. Les limites de cette estimation sont comprises dans un intervalle de confiance de 95%. Ainsi ces méthodes présentent une incertitude relativement élevée. De plus, les propriétés ciblées par les méthodes normées ne sont pas exclusives aux bactéries d'intérêt. Ainsi, des analyses supplémentaires (paragraphe ci-dessous) sont nécessaires pour confirmer l'identification des bactéries quantifiées par la méthode normée.

1.3.2 Méthodes d'identification des germes fécaux

D'autres techniques de microbiologie permettent l'identification plus précise des microorganismes par phénotypage ou par analyse des propriétés biochimiques notamment l'utilisation des galeries API (Appareils et Procédés d'Identification) ou encore par analyse moléculaire comme le MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*). Le principe de cette dernière méthode est développé à la fin de ce chapitre. C'est une technique basée notamment sur l'analyse des profils protéiques qui est largement utilisée ces dernières années pour des analyses en routine dans les laboratoires de

diagnostic microbiologique (Bizzini et al., 2011), de biologie médicale ou vétérinaire (de Koste and Brul, 2016; Khandeparker et al., 2020; Sauget et al., 2016b), d'agroalimentaire. Cette technique d'analyse a été développée par Anhalt and Fenselau, (1975). Plusieurs études ont montré que cette méthode permet une identification précise des bactéries par l'analyse des spectres protéiques à partir de cellules bactériennes ou d'extraits de protéines (Holland et al., 1999). Ainsi, avec cette méthode, des études ont pu caractériser des souches de *E. coli* d'origine aviaire ; des principaux pathotypes d'*E. coli* (EHEC, STEC, EPEC, ETEC, EAEC, UPEC) ; Sauget et al., (2017) ont caractérisé les différents phylogroupes (B2 principalement) de *E. coli*. De même, (Paula et al., 2017) ont identifié les différents profils protéiques permettant de différencier les espèces d'entérocoques isolées des eaux marines récréatives. Cependant ces méthodes renseignent sur la caractérisation d'un isolat, d'une souche bactérienne mais pas sur l'abondance de germes recherchés dans un échantillon comme c'est le cas pour l'analyse des eaux de baignade.

Il existe des méthodes plus précises de quantification de l'abondance totale des microorganismes dans un environnement donné. Il s'agit de méthodes de caractérisation moléculaire basées sur l'analyse d'acides nucléiques marquées (ADN ou ARN) comme la méthode de quantification par FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) ou par cytométrie en flux. Robertson and Button, (1989) ont été les premiers à utiliser la cytométrie en flux pour dénombrer les cellules procaryotes hétérotrophes par coloration au DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) ou au SYBR green dans des échantillons d'eaux marines. D'autres études ont également utilisé cette méthode pour quantifier l'abondance, le taux de mortalité et / ou de survie des microorganismes dans les écosystèmes aquatiques (Duhamel, 2006; Lavergne et al., 2014; Marie et al., 1999).

En plus des limites des méthodes normées de microplaques citées précédemment, les méthodes de culture et d'identification des indicateurs de contamination fécale sont fondées sur des périodes d'incubation relativement longues (entre 24 et 48 heures pour la lecture des microplaques). Cette longue durée entre la collecte des échantillons et l'obtention des résultats implique que les événements de contamination peuvent avoir déjà eu un impact sur la santé des baigneurs au moment où ils sont détectés et que les restrictions momentanées des activités de baignade sont mises en place probablement après les événements de contamination. Ainsi, il existe un enjeu majeur pour développer de méthodes rapides de dénombrement des indicateurs de contamination fécale, d'identification de leurs sources dans les écosystèmes littoraux et, dans la mesure du possible, la caractérisation de leur origine humaine et/ ou animale pour pouvoir mettre en place des stratégies efficaces de remédiation.

1.3.3 Méthodes de caractérisation de l'origine d'une contamination fécale

Depuis le début du 21^e siècle, le développement de la biologie moléculaire a permis de développer des techniques d'identification de nouveaux marqueurs pour caractériser l'origine des contaminations fécales dans les environnements sensibles. Il s'agit des TSM décrits dans le paragraphe précédent (1.2.3). La recherche de ces marqueurs (bactériens et viraux) est effectuée par la méthode de PCR (réactions de polymérisation en chaîne) et par qPCR (réactions de polymérisation en chaîne quantitative). Ces méthodes basées sur l'amplification de l'ADN ont été largement utilisées pour rechercher des cibles génétiques caractéristiques d'une contamination d'origine fécale (Green et al., n.d.; Mieszkin et al., 2009; Ogorzaly and Gantzer, 2006; Seurinck et al., 2005). La première méthode permet une analyse qualitative de l'occurrence de ces marqueurs dans un échantillon donné alors que la deuxième méthode permet une quantification absolue ou relative des marqueurs biologiques dans l'échantillon analysé.

La principale limite de cette méthode est la sensibilité relativement faible et variable des TSM existant, ainsi que la source de l'échantillon (rivière, lacs, piscine...). Ces méthodes permettent de caractériser l'origine humaine et/ ou non humaine des bactéries et des virus fécaux dans un écosystème aquatique. Cependant les conditions environnementales du milieu peuvent également influencer leur accumulation et leur persistance (Solecki et al., 2011), ainsi il est primordial d'étudier le fonctionnement de ces écosystèmes pour expliquer leur résilience face à ce type de pollution.

1.3.4 Analyse de la structure des communautés microbiennes des écosystèmes contaminés

En plus des méthodes de quantification de l'abondance des communautés microbiennes, d'autres techniques de génomique environnementale permettent d'étudier différents milieux dont les écosystèmes aquatiques. Il s'agit des méthodes Omics telles que la métagénomique (étude de la diversité d'un écosystème), la métatranscriptomique (étude de la diversité fonctionnelle d'un écosystème), la métabolomique (étude des métabolites d'un écosystème) et la métaprotéomique (étude des protéines d'un écosystème). Ces méthodes ont été développées pour décrire la diversité totale et active, les fonctions des organismes et leurs interactions avec un environnement complexe. La métabolomique par exemple est utilisée dans l'analyse de la qualité microbiologique des écosystèmes aquatiques pour la quantification de molécules

chimiques identifiées comme des traceurs de source microbiologique (stéroïdes, caféine, paracétamol, etc.) (Derrien, 2011; Gourmelon et al., 2010a). Elle utilise différentes techniques analytiques, notamment la chromatographie en phase liquide et/ ou en phase gazeuse. Son principe repose sur la différence de solubilité des molécules à caractériser vis-à-vis d'une phase mobile (liquide ou gaz) et/ou d'affinité pour la phase stationnaire. La séparation des molécules s'effectue selon leur adsorption à la phase mobile appelée éluant et de leur désorption successive sur la phase stationnaire.

Ensuite, c'est la spectrométrie de masse qui va permettre de qualifier et éventuellement de quantifier les différentes molécules étudiées suivant leur poids moléculaire. En écologie microbienne, pour étudier des écosystèmes complexes, le séquençage à haut débit (*High Throughput Sequencing*) a été développé depuis le début des années 2000 en particulier pour pallier les limites des méthodes de culture. C'est une méthode basée sur l'analyse de la composition des communautés microbiennes, elle est largement utilisée en biologie marine pour décrire la structure microbienne des écosystèmes aquatiques (Salazar and Sunagawa, 2017). Le séquençage à haut débit est basé sur l'analyse du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr 16S) mis en évidence par Carl Woese (1987) comme étant le marqueur universel pour décrire la diversité des communautés de procaryotes. En effet, ce fragment d'ADN est hautement conservé au sein des différentes espèces bactériennes et en particulier au sein de la même espèce. Plusieurs techniques de séquençage ont été développées depuis quelques années (Figure 5). Ces méthodes diffèrent principalement par la longueur de séquences à amplifier. On distingue ainsi des méthodes avec de courts *reads* (<600pb) comme Illumina (HiSeq, MiSeq, Paired-end) ou le pyroséquençage (454-Roche), des méthodes avec de longs *reads* (2 à 20kpb) (454- Roche, PacBio RS - Ion Torrent, GreidION- Nanopore) et des méthodes de cartographie des séquences sur de grands fragments d'ADN (NABsys, Bionanomatrix) (Figure 6).

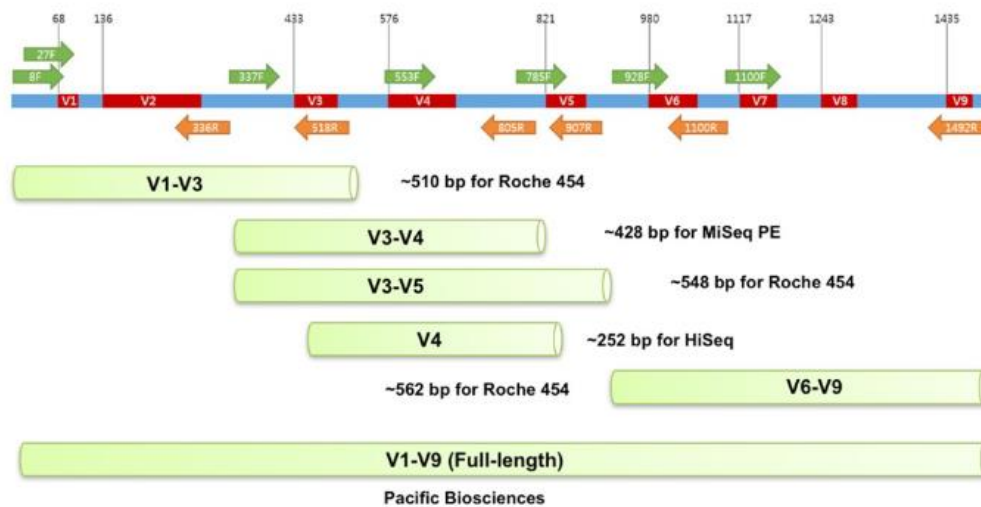


Figure 5 : Longueur des séquences du gène codant pour l'ARN 16S utilisées par les types méthodes de séquençages (D'après Falentin et al., 2019)

Cette méthode permet ainsi d'identifier et de classer les bactéries à partir d'analyse d'unités taxonomiques opérationnelles (*Operational Taxonomic Unit* : OTU) (Moyer et al. 1994). Ces unités permettent de définir un rang taxonomique proche d'une espèce donnée si leur degré de similitudes est d'au moins 97 %. Ces dernières années, une autre unité taxonomique appelé ASV (*Amplicon Sequence Variants*) a été développée pour une classification plus fine par l'analyse de la diversité des lectures au sein d'un même groupe comparée à la diversité attendue uniquement en présence d'erreur de séquençage (Callahan et al., 2017; Falentin et al., 2019). L'assignation taxonomique et la similitude sont analysées sur des bases de données spécialisées de séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S telles que la base RDP (Ribosomal Data Project) (Cole et al., 2003) ou la base de données SILVA SSU 138 (Quast et al., 2013). En microbiologie, ces techniques sont utilisées pour caractériser la diversité et la dynamique fonctionnelle des communautés bactériennes dans les écosystèmes aquatiques comme les lacs, les écosystèmes côtiers comme les sédiments et eau (Li et al., 2021) ou les vasières (Lavergne et al., 2014), des environnements extrêmes (Hugoni et al., 2018) et même dans des environnements contaminés (Wang et al., 2013).

La diversité des espèces est définie comme le nombre d'espèces différentes présentes dans un milieu donné ; elle englobe la richesse (nombre d'espèces présentes) et de diversité (nombre d'espèces pondéré par leur abondance) des organismes (Bertrand et al., 2011). Plusieurs indices permettent de caractériser un écosystème : la diversité alpha avec plusieurs indices (Shannon, Simpson, Chao1, inverse de Simpson) ; la diversité bêta définie par des indices de similarité (Bray Curtis, UNIFRAC) pour déterminer la phylogénie des organismes. L'écologie

fonctionnelle est définie comme l'analyse de la dynamique (richesse, diversité et métabolisme) des organismes, en fonction des paramètres physiques et chimiques d'un écosystème. La méthode de séquençage basée sur l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S effectuée à partir d'échantillon d'ADN décrit la communauté totale des communautés bactériennes comprenant des cellules mortes et viables, en plus des cellules actives, des cellules dormantes et des cellules sporulantes (Li et al., 2021). Une analyse ciblée des communautés actives est possible en utilisant la même méthode de séquençage décrite précédemment à partir des transcrits du gène codant pour l'ARNr 16S. Une comparaison de ces deux méthodes a permis à Li et al., (2021) de caractériser des groupes géographiques de bactéries dans un écosystème côtier. Ces méthodes présentent néanmoins quelques limites dont les principales sont le coût élevé des analyses, la complexité des analyses bio-informatiques qui mettent en évidence un certain nombre de biais et la limite de l'identification à des niveaux taxonomiques généraux. Par exemple, l'affiliation taxonomique des OTUs effectuée suite à des analyses de séquençage permet de caractériser jusqu'à l'échelle de la famille voire du genre mais pas de l'espèce et encore moins de la souche.

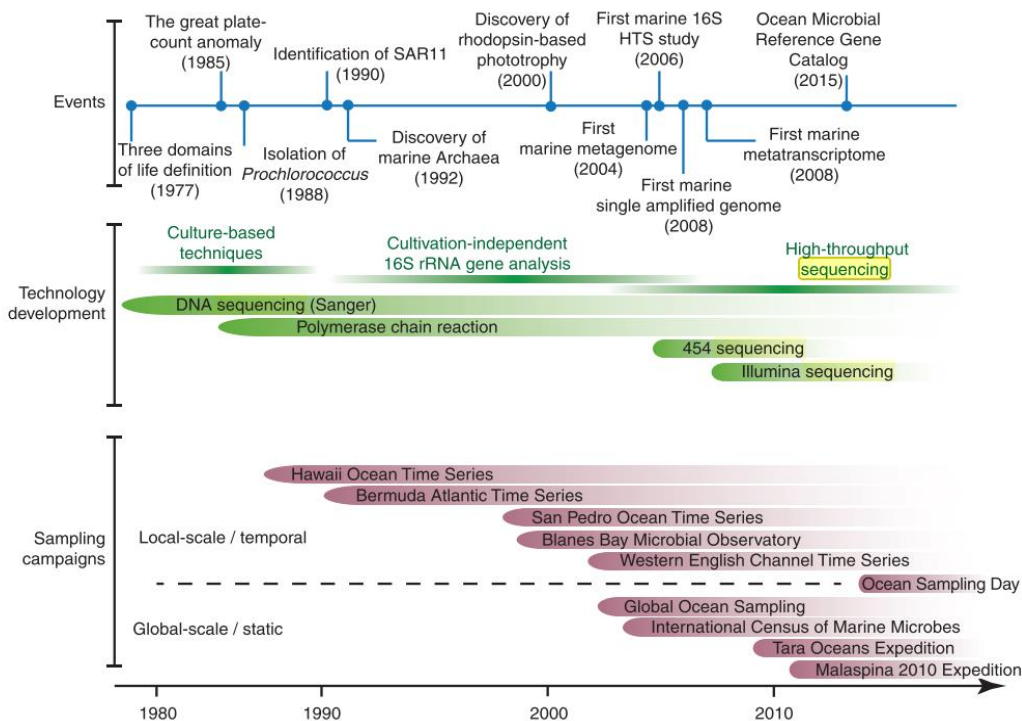


Figure 6 : Principales avancées scientifiques et technologiques dans le domaine de l'écologie microbienne marine (Source Current biology, Salazar and Sunagawa, 2017).

1.3.5 Modèle de caractérisation de l'origine des indicateurs de contamination fécale

Comme décrit précédemment, les indicateurs de contamination fécale sont caractérisés par des espèces (pour les entérocoques) et des phylogroupes (pour les *E. coli*) d'origines différentes. Ainsi pour identifier les espèces bactériennes et caractériser leur origine (humaine ou non humaine), il faut des méthodes moléculaires plus précises et faciles à utiliser pour une identification rapide et une communication efficace contre les événements de contamination. (Bizzini et al., 2011) ont proposé le MALDI-TOF-MS comme alternative pour identifier les agents pathogènes bactériens humains et affiner les résultats obtenus par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Comme décrit précédemment, cette méthode est utilisée comme outil d'identification d'un certain nombre de bactéries dans divers domaines. Le MALDI-TOF MS repose est une technique de séparation de molécules protéiques basée sur le principe de la spectrométrie de masse. Les molécules en l'occurrence les protéines sont ionisées par un faisceau de laser à l'aide d'une matrice. Les ions ainsi libérés mono-chargés positivement migrent à travers un tube à vide suivant leur charge et leur poids moléculaire. La colonne est constituée par un champ électrique d'une force de 20000 V, qui conditionne la traversée des ions dans la chambre électrostatique. Les protéines sont ainsi séparées et caractérisées par leur temps de vol dans la colonne qui est proportionnel à la masse moléculaire et à la charge de l'ions. Les molécules ionisées définissent ainsi plusieurs pics de masse différente qui décrivent un spectre représentant le profil protéique ou l'empreinte protéique, spécifique à une espèce bactérienne donnée. La caractérisation de ces profils est ensuite réalisée grâce à des logiciels par comparaison à la base de données de référence du MALDI-TOF. Cette méthode d'analyse permet une identification de différents isolats de bactéries comme les souches de *E. coli*, les espèces d'entérocoques, de *Campylobacter*, des sérovars de *Salmonella enterica*, de *Staphylococcus aureus*, et de *Pseudomonas aeruginosa* (Kuhns et al., 2012; Santos et al., 2015; Sauget et al., 2016a). Ces dernières années, en plus de l'identification des souches bactériennes, cette méthode est développée comme outils de surveillance de la qualité des eaux notamment pour la recherche de pathogènes dans les eaux de ballast et la caractérisation des espèces bactériennes utilisées comme indicateur de contamination fécale dans les eaux de baignade (Christ et al., 2017; Santos et al., 2015). Une des dernières applications de la méthode MALDI-TOF a été effectuée pour caractériser des espèces *Campylobacter jejuni* isolées à partir de fèces de bovins, d'ovins, de volailles et d'oiseaux de rivage à partir d'un modèle de discrimination protéique (Denis et al., 2019). La construction des modèles discriminants d'indicateurs de contamination fécale actuels permet d'identifier l'origine de ces germes fécaux.

Soucieux de mettre en place des stratégies d'analyses rapides et pertinentes de la qualité des eaux de baignade pour une prise de décision efficace et assurer la sécurité sanitaire, différents travaux ont développé des modèles prédictifs d'analyses du niveau de contamination fécale des zones de baignade. Des modèles de régression linéaire sont construits sur la base d'analyses statiques combinant tous les outils décrits précédemment : indicateur de contamination fécale, traceurs de sources microbiologiques, facteurs biotiques, abiotiques et climatiques des milieux (Ballesté et al., 2020; Brooks et al., 2016). Ces modèles permettent de déterminer l'origine et la dynamique des germes fécaux dans les écosystèmes aquatiques et de prédire efficacement les événements de contamination fécale qui présenteraient un risque sanitaire de santé publique.

1.4 Le cas de la contamination de la baie d'Aytré en Charente-Maritime

1.4.1 Contexte géographique : une grande plage de l'agglomération de La Rochelle

La baie d'Aytré en Charente-Maritime se situe sur la façade atlantique au centre ouest de la France. Cette baie se trouve dans la commune d'Aytré au sud de la zone urbaine de La Rochelle, elle abrite une longue plage qui était utilisée pour la baignade, bien que le manque de fond n'en faisait pas l'endroit idéal pour le bain de mer à marée descendante (Figure 7). La commune d'Aytré fait partie de la Communauté d'Agglomération de La Rochelle, intercommunalité qui compte plus de 170 000 habitants. Cette agglomération possède l'un des plus grands ports de plaisance d'Europe (Port de la Rochelle - Les Minimes : 5 000 places à flot) et une grande station d'épuration (STEP de Port-Neuf, capacité 170 000 équivalents habitants, traitement par boue activée et aération prolongée, rejet après traitement dans la Baie de la Rochelle - CDA La Rochelle, 2021). Cette plage est encadrée par deux promontoires calcaires dessinant une anse. Elle s'est formée naturellement par les phénomènes d'érosion marine et de courants marins (Egis eau, 2011a, 2011b). Cette baie est protégée par deux grandes îles à l'ouest : l'île de Ré au nord et l'île d'Oléron au sud. Ces îles dessinent un pertuis qui protège la baie contre les forts courants et les vagues (Figure 7). La baie d'Aytré présente une plage d'une longueur de 1,8 km. A marée basse, la mer se retire sur 1,5 km découvrant, en raison d'une pente très douce, un estran sablo-vaseux d'une superficie de 2,5 km². La pente de la baie varie de 0.002% et 0.003% pour la partie inférieure de l'estran (entre 2 m sous le niveau moyen et 1 m au-dessus) et 0.05% pour la partie supérieure de la plage (entre 1 m au-dessus du niveau moyen et 3 m au-dessus). Cette baie est donc un écosystème côtier atypique du fait de sa situation géographique et de sa configuration géographique particulière (ASCONIT, 2017).

L'analyse des paramètres océanographiques a montré que lors de la période estivale, les vents dominants proviennent du secteur ouest-sud-ouest à nord-ouest. Les courants sont relativement faibles et varient entre 0,05% et 0,4% aux coefficients moyens de mortes et de vives eaux (45 et 95 respectivement) (ASCONIT, 2017). Cette plage globalement orientée nord-sud, est susceptible d'être impactée par les houles venant du large (Egis eau, 2011a). L'agence régionale de santé (ARS) a identifié les deux principaux sites de prélèvement (Platin Nord et Platin Sud) pour réaliser le contrôle sanitaire des eaux de baignade (Figure 7).



Figure 7 : Localisation géographique de la baie d'Aytré. Carte : M. Ndione et P. Brunello, UMR LIENSs CNRS-La Rochelle Université (2021)

1.4.2 Usages et activités concernant la baie d'Aytré

La commune d'Aytré a été pendant longtemps un pôle industriel important de l'agglomération de la Rochelle ce qu'elle reste en partie avec la présence du site du constructeur ALSTOM qui emploie toujours plus de 1000 personnes autour de la construction ferroviaire (TGV, Tramway). Elle a aussi toujours eu autour de sa plage une dimension récréative avec quelques résidences secondaires (197 sur un parc de logements de 5458 logements en 2018 – INSEE, 2021) et des campings présentant d'importants parcs de mobil-homes (mais 3 des 4 campings de la commune ont été fermés suite à la tempête Xynthia en 2010 faisant passer le nombre d'emplacements en camping de 543 en 2010 à 320 en 2021 – INSEE, 2021 – le camping restant

étant le plus important). De plus, la plage attire à l'échelle de l'agglomération de La Rochelle et sa popularité ne se limite pas aux personnes vivant dans la commune d'Aytré. Cette anse en pente douce, d'où son appellation de plage du Platin, était très prisée pour les activités récréatives comme la baignade, et reste très fréquentée pour les promenades et les activités nautiques comme le kitesurf, le windsurf, etc. (Tableau 5). Au sud de la baie, se trouve un centre équestre (capacité de 60 box - Charentes Tourisme, 2021) dont les chevaux se promènent souvent sur la plage. Comme les chevaux, de nombreux chiens fréquentent la baie malgré un accès interdit à ces derniers du 15 juin au 15 septembre. Cette plage occupe également une place importante dans l'économie locale avec la présence d'une importante activité ostréicole. De nombreux parcs à huîtres installés sont installés sur l'estran marquant la limite de la baie vers le large. Au sud et au nord de la plage sont installées plusieurs entreprises d'ostréiculture : des claires ostréicoles sont dédiées à l'affinage des huîtres, des postes d'alimentation et de vidange des eaux de ces claires sont présents de chaque côté de la baie. La baie d'Aytré est classée en zone B pour la qualité microbiologique des parcs ostréicoles. Ce classement implique que les coquillages cultivés dans la baie peuvent être récoltés mais ne peuvent être mis sur le marché pour la consommation humaine qu'après avoir été purifiés dans des claires. La pêche à pied, à usage récréatif, se pratique toute l'année sur l'estran. Durant les grandes marées, il est possible d'observer jusqu'à 1000 personnes en quête de coquillages (ASCONIT, 2017; SAFEGE, 2010) sur les parties de la baie les plus éloignées du rivage. Les différents équipements et installations pour les usages de la baie ont été recensés par la CdA avant l'interdiction de la baignade (Tableau 5).

Tableau 5 : Principaux usages de la baie d’Aytré (source ASCONIT, 2017)

	Usages	Zones/Installations/Equipements	Types d’usagers	En 2010	En 2016
Coquillages	Cultures marines	-Parc à huîtres au nord et sud du large de l’estran -Grande zone ostréicole dans le marais du Chay (prise d’eau à 300 m de la vanne colonelle + deux autres prises d’eau à la pointe du Chay pour l’alimentation de bassins) -Zone de l’anse de Godechaud -Prise d’eau » des claires « au nord de la baie du Platin pour alimentation de bassins ostréicoles	Professionnels	OUI	OUI
	Pêche récréative	Estran toute l’année	Tous	OUI	OUI
Sports/ Loisirs	Baignade	Zone de baignade de 2100m	Tous	OUI	OUI
	Détente	Installation de baraques de dégustation, boisson, zones nord et sud du Platin	Tous	NON	OUI
	Centre Nautique	Extrémité sud de la plage	Tous	OUI	OUI
	Planche à voile	Sur toute la plage en dehors de la zone de baignade	Tous	OUI	OUI
	Kite surf	Sur toute la plage en dehors de la zone de baignade	Tous	OUI	OUI
	Stand-up paddle	Sur toute la plage en dehors de la zone de baignade	Tous	NON	OUI
	Beach-volley	Terrain zone sud de la plage	Tous	NON	OUI
Commodités	Surveillance	Poste de surveillance	Tous	Non mentionné	OUI
	Hygiène	Douches + toilettes (zone nord et sud)	Tous	Non mentionné	OUI
	Accessibilité	Gare d’Aytré-plage, bus, parking	Tous	Non mentionné	OUI

1.4.3 Contexte sanitaire de la baie d’Aytré

Les premières analyses de la qualité microbiologique des eaux de baignade de la plage d’Aytré ont eu lieu en 1985. C’est la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS) qui a effectué ces premières analyses sur les deux zones de baignade déterminées par l’ARS comme étant les deux sites les plus fréquentés de la plage : le Platin Nord et le Platin Sud (Figure 8).

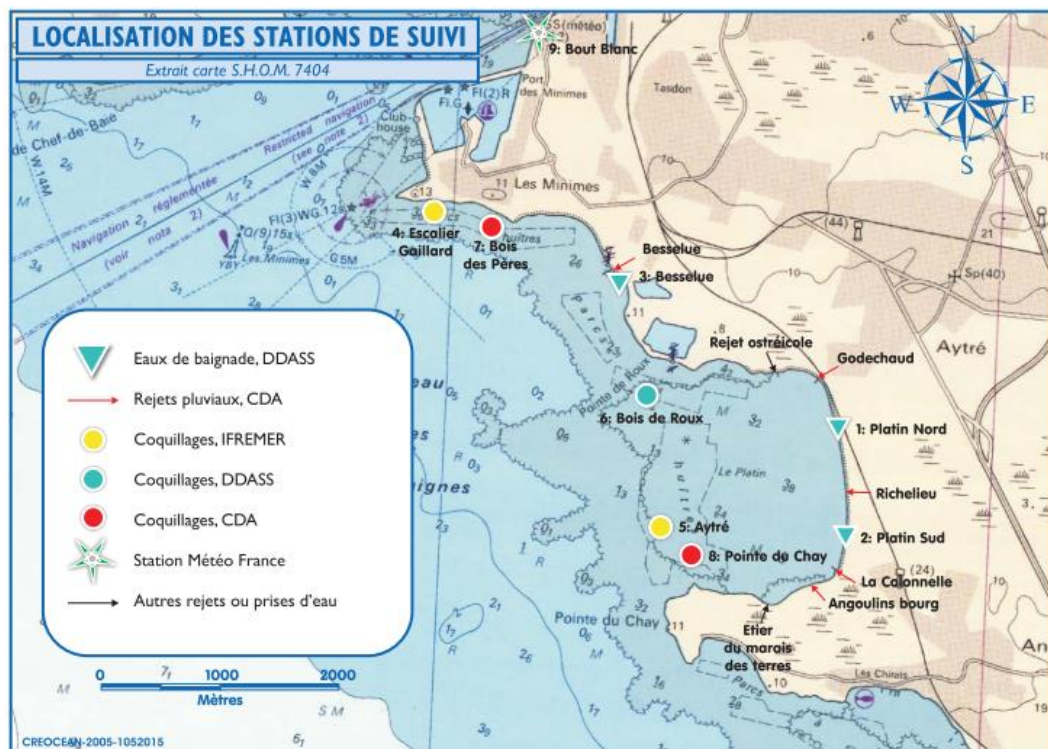


Figure 8 : Sites suivis par des contrôles sanitaires (eaux de baignades et ostréiculture) dans la baie d'Aytré et sources potentielles de la contamination fécale (Source : ASCONIT, 2017)

Jusqu'en 2004, selon la directive 1976/160/CEE, les eaux de baignade d'Aytré étaient classées en "qualité moyenne" (B) ou "momentanément polluées" (C).

A partir de 2005, la communauté d'agglomération de La Rochelle a effectué et financé des travaux et des études pour mettre en place des plans d'actions pour réduire l'apport de contaminants fécaux dans cette plage. Des stations de lagunage ont été construites, il s'agit de la lagune de Chay et la lagune du pont de la Pierre. Les exutoires ostréicoles et pluviaux ont été restaurés. Des écluses ont été mises en place pour réguler l'apport en eau douce provenant du bassin versant dans la baie, notamment en été (Figure 9, C). Les canalisations souterraines et les rejets d'eau des bassins ostréicoles ont également été contrôlés. Une étude de l'impact des facteurs environnementaux et de la dispersion du sédiment réalisée en 2005 n'a montré aucune corrélation de ces facteurs avec les indicateurs de contamination fécale (CREOCEAN, 2005). En 2006, la directive 2006/7/CE a été introduite avec une approche proactive des écosystèmes de baignade. Elle exige l'établissement d'un plan de gestion pour réduire les risques de contamination fécale devant être révisé au moins tous les quatre ans. Ainsi un premier plan de gestion devant évaluer les sources potentielles de contamination par l'élaboration d'un profil de vulnérabilité fut demandé pour toutes les zones de baignade de l'union européenne au plus tard au début de l'année 2011. Pour la plage d'Aytré, les différents acteurs locaux se sont ainsi

investis dans l'étude de l'identification des sources de contamination. Les précédentes études et travaux n'ayant pas permis d'améliorer la qualité microbiologique des eaux de baignade de la plage, d'autres pistes de sources de contamination ont alors été explorées. En 2009, une étude hydrogéologique de la nappe littorale a été réalisée (Figure 9, A et D) pour caractériser les échanges entre la nappe souterraine et les eaux de baignade montrant des échanges de masse d'eau du littoral vers les marais à marée haute (SAFEGE, 2010). En 2010, une analyse est menée pour évaluer une possible contamination par les eaux du canal de Vuhé (situé au sud de la baie et qui est en contact direct avec la plage à travers un exutoire) via une résurgence karstique d'eau douce (Figure 9, B) localisée en pleine baie. Mais cette étude n'a montré aucun lien avec la contamination fécale (Egis eau, 2011b).

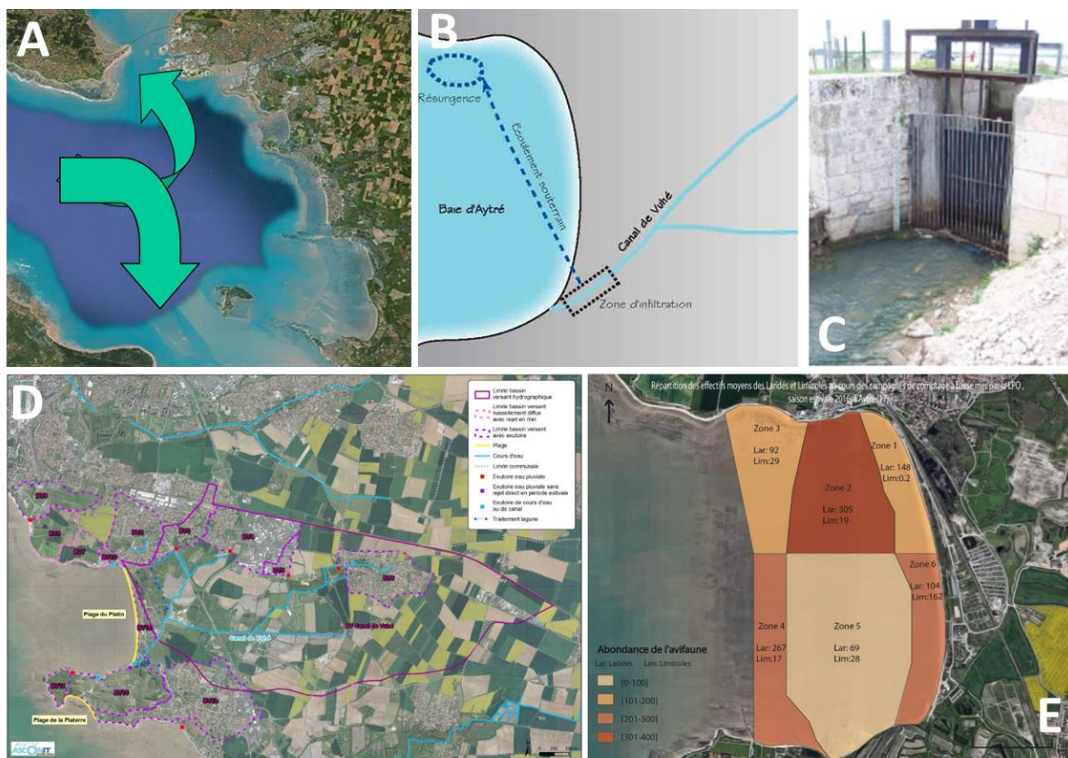


Figure 9 : Principaux travaux effectués dans la baie d'Aytré. A- Etude de la courantologie de la baie d'Aytré, B- Analyse de la résurgence karstique d'eau souterraine dans la baie, C- Réhabilitation des exutoires et construction d'écluse, D- Analyse des infrastructures dans le bassin versant, E- Analyse de la corrélation entre la densité de l'avifaune et le niveau de contamination fécale. Sources : SAFEGE, 2010 ; Egis eau, 2011 ; CREOCEAN, 2005 ; LPO, 2016.

En avril 2011, le premier profil de vulnérabilité de la plage d'Aytré est réalisé avec un recensement des différentes sources potentielles de pollution (Tableau 5). Avec l'application de la directive 2006/7/CE en 2012, l'ARS classe la baie en "mauvaise qualité" pendant plusieurs

années. Ainsi, de 2012 à 2015 les collectivités territoriales impliquées (Mairie d’Aytré, CdA de La Rochelle, Conseil Départemental CD 17) adoptent un protocole dynamique de gestion des eaux de baignade durant la saison estivale. Plusieurs analyses hebdomadaires sont effectuées chaque année entre le 15 juin et le 15 septembre au niveau des exutoires et des infrastructures (zone de résurgence, campings, piézomètres, constructions ostréicoles, etc.) situées dans le bassin versant de la baie. En 2015, avec le développement et l’utilisation croissante des traceurs de source microbiologique, une caractérisation des contaminants fécaux est réalisée par le laboratoire LABOCEA (Tableau 6). Cette analyse à partir d’échantillons d’eau permet de détecter des marqueurs d’origine aviaire dans 9 sur 15 échantillons analysés. En effet, la baie d’Aytré constitue un dortoir pour certaines espèces d’oiseaux marins comme les mouettes (en été), les bernaches et des limicoles en hiver. Cependant, en 2016, une analyse spatiale de la densité de l’avifaune dans la baie (Figure 9, E) n’a pas permis de montrer une relation entre la présence de ces oiseaux et le niveau de contamination fécale (Pham Tan, 2017).

Tableau 6 : Résultats d’analyse d’échantillons d’eau pour rechercher des traceurs de sources microbiologiques pour caractériser des contaminants humains, ruminants, porcins, oiseaux de mer ou équins. Sources : Laboceca, 2015, (Pham Tan, 2016)

Site	Date	<i>E. coli</i> (NPP)	Humain	Ruminant	Porc	Oiseau de mer	Equin
Platin Nord	22/07/2015	179	Non	Non	Non	Oui	Non
Platin Nord	05/08/2015	3671	Non	Non	Non	Oui	Non
Platin Nord	06/08/2015	2249	Non	Non	Non	Oui	Non
Platin Nord	20/08/2015	720	Non	Non	Non	Oui	Non
Platin Nord	26/08/2015	353	Non	Non	Non	Oui	Non
Platin Sud	22/07/2015	872	Non	Non	Non	Oui	Non
Platin Sud	05/08/2015	690	Non	Non	Non	Oui	Non
Platin Sud	06/08/2015	33	Non	Non	Non	Oui	Non
Platin Sud	20/08/2015	969	Non	Non	Non	Oui	Non
Platin Sud	26/08/2015	61	-	-	-	-	-
Platin Colonelle	22/07/2015	251	Non	Non	Non	Oui	Non
Platin Colonelle	05/08/2015	93	-	-	-	-	-
Platin Colonelle	06/08/2015	77	-	-	-	-	-
Platin Colonelle	20/08/2015	160	-	-	-	-	-
Platin Colonelle	26/08/2015	30	-	-	-	-	-

Malgré tous ces travaux et analyses menés jusqu'en 2015, la qualité microbiologique des eaux de baignade ne s'est pas améliorée et l'origine de cette contamination reste alors indéterminée.

1.4.4 Historique des suivis sanitaires des eaux de baignade de la plage d'Aytré

Afin de mieux comprendre la dynamique de cette contamination au cours du temps, nous avons recherché l'ensemble des suivis effectués depuis 1987 que nous présentons ici au regard de la réglementation 2006/7/CE pour redéfinir le profil de vulnérabilité de la plage d'Aytré. Nous avons ainsi suivi sur une période de trente ans les variations des deux indicateurs de contamination fécale *E. coli* et entérocoques.

1.4.4.1 Variation interannuelle de l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale

Cette analyse montre une variabilité annuelle et temporelle de l'abondance des *E. coli* et d'entérocoques pour les sites de baignade, Platin Nord (Figure 10) et Platin Sud (Figure 11) s'inscrivant dans différents temps.

Au Platin Nord, entre 1987 à 1994, les dépassements de seuils réglementaires actuels sont principalement dus à une abondance élevée des deux indicateurs de contamination fécale. De 1995 et 2006, l'abondance des deux indicateurs de contamination a été très ponctuellement en dépassement des seuils réglementaires actuels. A partir de 2007, on observe une augmentation de l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale avec des dépassements ponctuels en *E. coli* et des contaminations fréquentes en entérocoques.

Au Platin Sud, de 1987 à 1993, les dépassements de seuils réglementaires sont principalement dus à une abondance élevée *E. coli*. De 1994 à 2006, la période montre une baisse de l'abondance de *E. coli* avec des épisodes de dépassement des seuils pour les entérocoques plus fréquents. A partir de 2007, l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale est relativement la même avec des dépassements fréquents des seuils réglementaires en entérocoques.

On peut observer que sur ces trente années, les trois temps de la contamination identifiés sont observables de manière relativement concomitante sur les deux sites. Cette analyse pourrait aussi laisser penser que les travaux réalisés au début des années 2000 ont contribué à la réduction du niveau de contamination sur l'abondance des *E. coli*. Cependant cette baisse est observée durant quelques années uniquement. Enfin, les bruits de fond en indicateurs de contamination fécale ont persisté durant la dernière décennie avec des pics de contamination marqués en entérocoques.

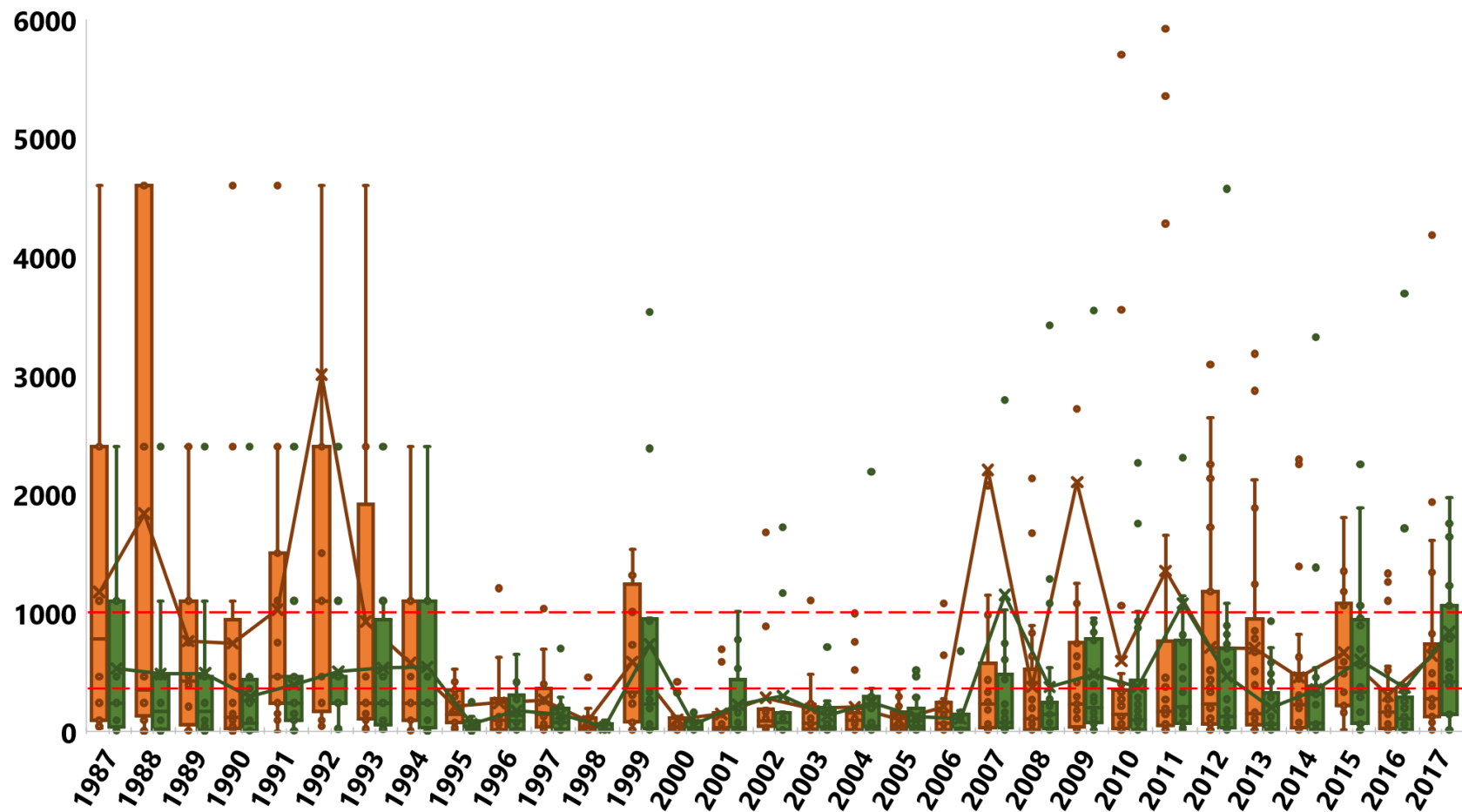


Figure 10 : Variation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques) dans le Platin Nord. Les boxplots en orange et en vert représentent les distributions de l'abondance des deux bactéries *E. coli* et entérocoques respectivement. Les lignes montrent la variation de l'abondance moyenne des deux indicateurs sur chaque année avec le même code couleur que les boxplots. Les lignes horizontales en rouge représentent les seuils réglementaires de *E. coli* (seuil= 1000 NPP/100 ml) et les entérocoques (seuil= 370 NPP/100ml).

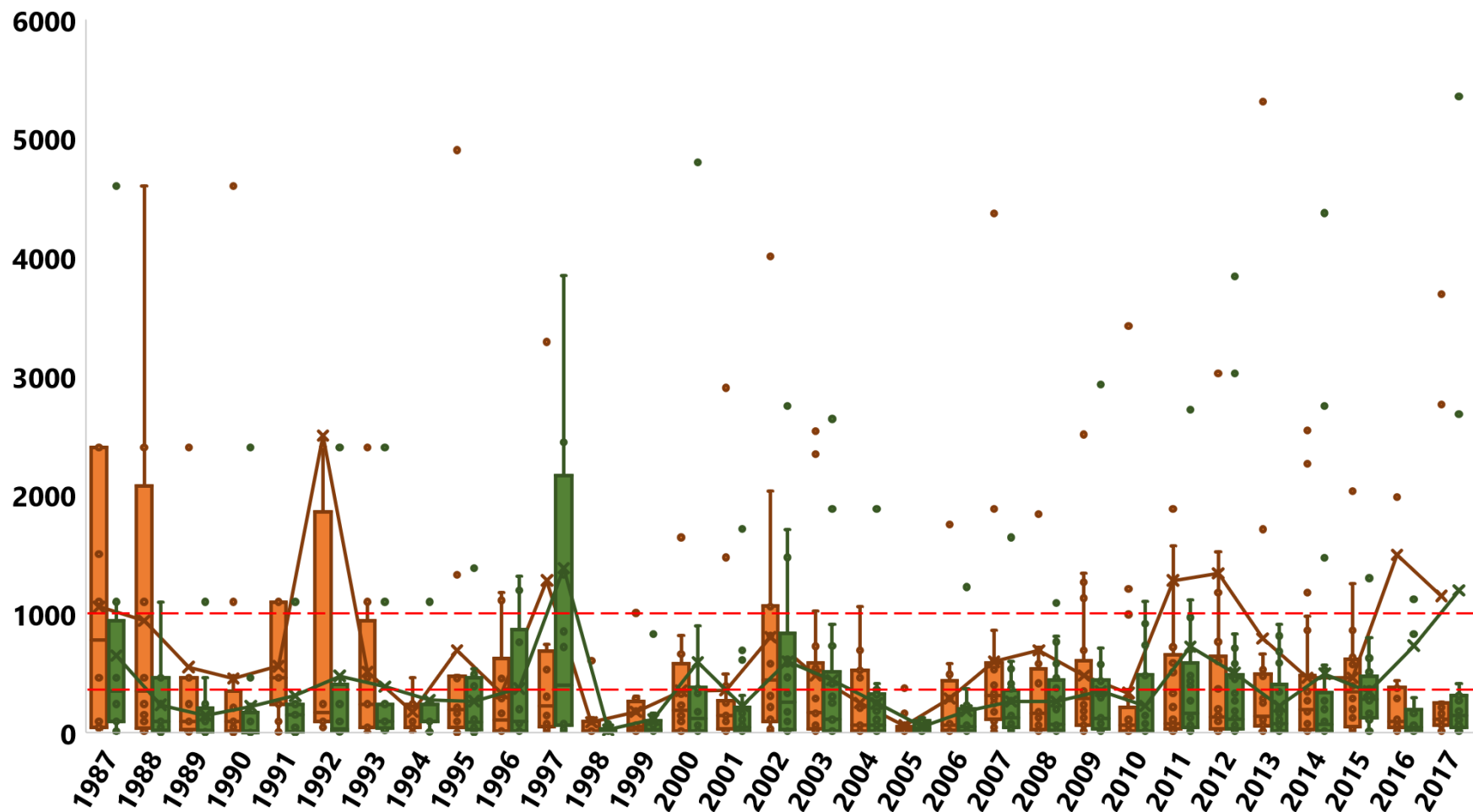


Figure 11 : Variation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques) dans le Platin Sud. Les boxplots en orange et en vert représentent les distributions de l'abondance des deux bactéries *E. coli* et entérocoques respectivement. Les lignes montrent la variation de l'abondance moyenne des deux indicateurs sur chaque année avec le même code couleur que les boxplots. Les lignes horizontales en rouge représentent les seuils réglementaires de *E. coli* (seuil= 1000 NPP/100 ml) et les entérocoques (seuil= 370 NPP/100ml).

1.4.4.2 Fréquence de « dépassements des seuils réglementaires » des indicateurs de contamination fécale

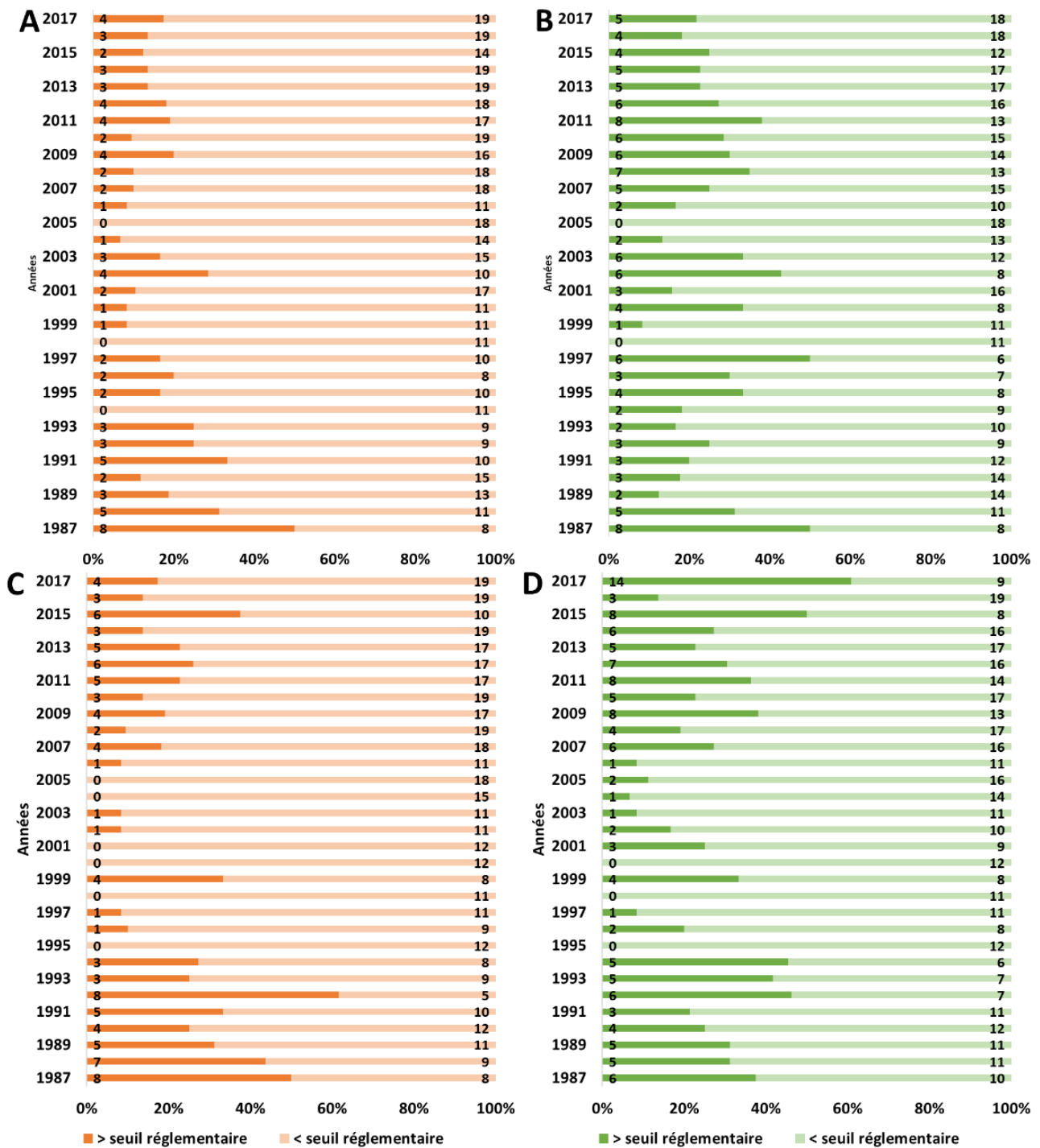


Figure 12 : Historique des pourcentages d'abondance des indicateurs de contamination fécale (*E. coli* en orange et entérocoques en vert). Les barplots représentent la proportion des échantillons en dépassement des seuils réglementaires par rapport aux échantillons « non contaminés ». A) Pourcentage des *E. coli* au Platin Nord, B) Pourcentage des entérocoques au Platin Nord, C) Pourcentage des *E. coli* au Platin Sud, D) Pourcentage des entérocoques au Platin Sud. Les chiffres représentent le nombre d'échantillons analysés pour déterminer les proportions d'abondance.

L'analyse de la fréquence des dépassements des seuils réglementaires (seuils actuels utilisés à des fins de comparaison) des indicateurs de contamination fécale *E. coli* et d'entérocoques depuis 1987 dans les deux sites de baignade a été réalisée pour déterminer la contribution de chaque indicateur sur les évènements de contamination fécale de la baie d'Aytré. Ces résultats montrent que le pourcentage des prélèvements en dépassement des seuils réglementaires varie entre 0 et 70% dans les deux sites de baignade avec une fréquence de dépassement plus élevée pour les entérocoques qui sont généralement responsables des interdictions ponctuelles de la baignade à partir de 2007 notamment (Figure 12). Cette tendance s'observe aussi sur la période entre 1995 et 2006, mais avec des fréquences de dépassement des seuils moins marquées. En revanche, sur la période 1987 - 1994, l'équilibre entre les indicateurs impliqués dans les dépassements est plus important. De manière générale, les dépassements concernant l'indicateur *E. coli* se font à une fréquence légèrement plus forte que ceux concernant les entérocoques.

1.4.5 Hypothèses sur l'origine et les sources de la contamination

La baie d'Aytré est localisée dans un environnement périurbain. Elle est délimitée par une importante zone de marais littoraux anciennement aménagés (marais du Chay, des Terres, et du Pont de Pierre) communiquant avec la baie à travers un système d'exutoires situés tout le long du cordon littoral (Figure 13). Le nord de la baie est bordé par quelques habitations, un parking souvent occupé par des camping-cars, et des exploitations ostréicoles (claires de purification des huîtres). A l'est et en arrière de la baie, se trouve une zone de marais : marais Doux, marais du pont de la Pierre. Au nord de cette zone, commence la zone urbanisée de la commune d'Aytré, mais l'essentiel de l'arrière-plage plus au sud est libre de construction. En effet, suite à la tempête Xynthia en 2010, environ 70 bâtiments endommagés et 150 mobil-homes ont été supprimés de la zone. Dans la partie nord et sud de cet espace se trouvent des parkings utilisés par les automobilistes pour accéder à la plage, ils sont interdits la nuit aux camping-caristes. Le sud de la baie est bordé par des marais réaménagés en bassins ostréicoles, une station de lagunage des eaux pluviales et une zone agricole. A l'ouest de la baie, sur l'estran à environ 1 km de la plage, se trouvent des parcs à huîtres. Un inventaire exhaustif de toutes les sources potentielles de cette contamination fécale est résumé dans le tableau suivant (Tableau 7).

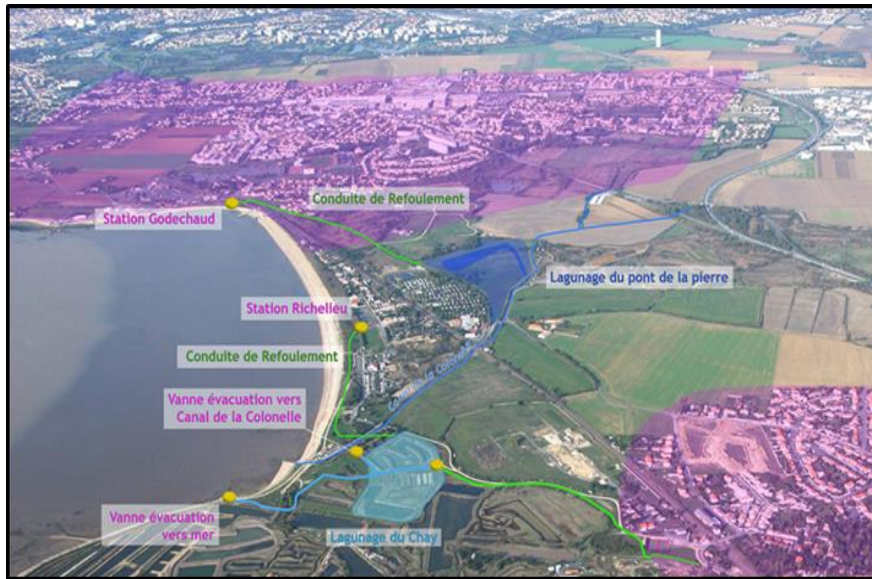


Figure 13 : Présentation du bassin versant de la baie d'Aytré. (En rose les habitations, en bleu sont représentés les stations de lagunage) – la photographie présente la situation de l'urbanisation en arrière de la plage avant la tempête de 2010, l'ensemble des bâtiments en avant de la voie ferrée ayant été déconstruit depuis.

Depuis le début des années 2000, les études effectuées ont mis l'accent sur un certain nombre d'hypothèses pour expliquer l'origine de cette contamination fécale. En 2005, une des premières pistes évoquées est l'origine sédimentaire des bactéries fécales, en effet comme toutes les zones intertidales, la baie d'Aytré est un écosystème riche en sédiment et en matières organiques qui pourraient être favorables à la survie et au développement des bactéries d'origine fécale. De même, situé à proximité d'une zone de marais, un fort apport en matières organiques au niveau des exutoires des claires ostréicoles, ou des exutoires d'eaux pluviales (par exemple l'exutoire du canal de Vuhé), pourrait être envisagé. Cette matière organique peut constituer un apport de nutriments pour les bactéries fécales dans cet écosystème, ce qui permettrait leur persistance et leur prolifération dans ce milieu. En outre, les faibles courants observés dans la baie favorisent la sédimentation, qui serait alors propice au développement et à la protection des bactéries autochtones et allochtones. En 2016, la piste d'une origine aviaire a été retenue à la suite de la détection de traceurs microbiologiques de source aviaire (analyse effectuée par le LABOCEA). A proximité de la baie, se trouve une réserve d'eau douce, (ex-carrière au niveau de la Pointe de Besselue) qui constitue une zone de dortoir pour certaines espèces d'oiseaux qui fréquentent le littoral. Il pourrait exister une communication entre la baie et cette réserve d'eau notamment par une infiltration (d'eau et de bactéries fécales) et une résurgence dans la baie.

Toutes ces hypothèses constituent des pistes intéressantes pour mettre en place une stratégie d'analyse pertinente pour caractériser l'origine de la contamination fécale de cette plage.

Tableau 7 : Inventaire des sources potentielles de pollution de la baie d'Aytré effectué en 2016 par la CdA

Écoulements naturels	Cours d'eau (Canal de Vuhé)	Source potentielle (hors saison)
	Communication du canal ostréicole secteur pointe du Chay directe en mer	Source potentielle
Assainissement	Pôle épuration (Port-neuf et Châtelailon)	Influence peu probable
	Assainissement Collectif (non-conformités constatées + raccordements non contrôlés)	Source potentielle
	Assainissement Non Collectif (non-conformités constatées + systèmes non contrôlés)	Source potentielle
	Réseau d'eaux pluviales (eaux pluviales redirigées vers la lagune du Chay et du pont de pierre pour le secteur Godechaud) hors saison en cas de trop plein de la lagune du pont de la pierre, évacuation des eaux pluviales du secteur Godechaud directement en mer sans traitement	Source potentielle (hors saison)
Sources potentielles de pollution diffuse	Activité agricole (culture végétale, apport engrais)	Source potentielle
	Activité historique (équarrissage, engrais)	Source potentielle
	Activités portuaires	Pas dans la zone d'influence
	Centres équestres et autres loisirs (scolaires)	Source potentielle
Sources ponctuelles et ou accidentelles	Accès des animaux sur le littoral	Source potentielle
	Avifaune (zone dortoir)	Source potentielle
	Baignade en elle-même	Source potentielle
	Conchyliculture	Source potentielle
	Zones de résurgence en mer	Source potentielle
Autres sources	Activité industrielle ICPE ou non avec risque bactériologique	Pas dans la zone d'influence
	Déchetterie	Source potentielle
	Parkings, routes	Source potentielle
	Activité de restauration	Source potentielle
	Déchets des locaux et vacanciers	Source potentielle
	Piscine eau de mer	Pas dans la zone d'influence
	Cycles de marée : lors des marées de vives eaux	Source potentielle
	Pluies intenses (lessivage des sols)	Source potentielle
	Campings sauvages	Source potentielle
	Aires de camping-cars (présence non légale)	Source potentielle
Camping Les Sables	Source potentielle	

1.5 Questionnement et structuration de l'étude

Les investigations menées depuis une trentaine d'années ont mis en évidence différentes hypothèses pour expliquer l'origine de la contamination de la baie d'Aytré. Néanmoins aucun des travaux menés n'a permis d'expliquer de manière satisfaisante et encore moins de solutionner le problème de la contamination observée. C'est pourquoi l'objectif de cette étude est d'aborder la question de manière globale en croisant les différentes approches et en prenant en compte les avancées scientifiques les plus récentes présentées dans ce chapitre introductif.

Cette thèse devra réinterroger l'origine et les dynamiques de la contamination en prenant en compte de nouvelles techniques et une analyse intégrée de multi-indicateurs.

Les principaux objectifs de cette recherche seront ainsi (i) de suivre les dynamiques spatio-temporelles de la contamination fécale dans la baie et en lien avec l'espace géographique dans lequel elle s'inscrit. (ii) La description de la structure et la diversité des communautés microbiennes de cet écosystème intertidal sera aussi réalisée. (iii) La question de la détermination de l'origine humaine ou non humaine (animale voire environnementale) sera posée pour identifier les sources de la contamination et permettre de mieux envisager ses dynamiques. (iv) Notre problématique prendra enfin en compte la question de la réaction et de l'adaptation des populations locales face à cette contamination.

Ce premier chapitre de cette thèse a permis de faire un état de l'art sur la question des contaminations fécales dans les écosystèmes aquatiques et de présenter l'évolution du contexte sanitaire et réglementaire de la question des eaux de baignade. Un point a aussi été réalisé sur les méthodes d'analyse de la qualité microbiologique des écosystèmes aquatiques présentées dans la littérature scientifique, ainsi qu'une présentation du terrain d'étude et de l'historique des analyses effectuées avant le démarrage du programme.

Le second chapitre de ce manuscrit présente les différentes méthodologies mises en place dans le cadre de l'étude de l'échantillonnage aux analyses réalisées. Le troisième chapitre décrit les dynamiques spatio-temporelles de cette contamination fécale. Ensuite, le quatrième chapitre présente la structure et les rôles des communautés de microorganismes dans la baie d'Aytré. Les sources et l'origine humaine ou animale de la contamination fécale sont analysées dans le cinquième chapitre qui sera divisée en deux parties. Ce chapitre présente dans un premier temps

les résultats concernant des suivis comparatifs du niveau de contamination de la baie et d'autres sites caractéristiques de cette problématique, dans un second temps, le suivi de différents marqueurs protéiques, biologiques et chimiques pour comprendre la place de l'homme et de des animaux fréquentant la baie dans la contamination.

Le sixième chapitre permet de comprendre comment l'information sur la contamination et sur l'interdiction de la baignade est reçue par les populations et comment celles-ci adaptent leurs comportements et leurs usages de la baie. Ce manuscrit se termine par une synthèse des résultats et quelques perspectives de notre étude.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1.1 Site d'étude et échantillonnage

1.1.1 Site d'étude

Cette thèse est réalisée à la plage d'Aytré présentée dans le chapitre précédent. Cette baie comporte deux sites de baignade, le Platin Nord (N 46.113017, W -1.133002) et le Platin Sud (N 46.116057, W -1.124722) déterminés par l'ARS pour les suivis sanitaires de la qualité des eaux de baignade de cette plage et qui constituent les principales zones suivies au cours de cette étude (Figure 14B). D'autres sites ont également été suivis en guise de comparaison avec les deux sites de référence. Il s'agit de la baie d'Yves, du port de plaisance, de la plage de Roux (Figure 14A), des exutoires situés le long de la plage (exutoire Nord, exutoire du canal de Vuhé, exutoire sous la passerelle) (Figure 14B).



Figure 14 : Localisation des différents sites de prélèvement. Les points verts représentent les sites des suivis sanitaires déterminés par l'ARS et les points en rouge sont les sites considérés comme de potentielles sources de contamination fécale

1.1.2 Méthode d'échantillonnage d'eau et de sédiment

Notre étude porte sur l'analyse de la qualité microbiologique d'eaux et de sédiments marins dans les différents sites évoqués ci-dessus. Dans les zones de baignade, les échantillons d'eau sont prélevés dans des flacons en polyéthylène stériles à marée haute dans une colonne d'eau

de 1 m de haut et à environ 30 cm de la surface (Figure 15). En plus de l'eau, des échantillonnages de sédiments ont été réalisés à la marée basse précédant la marée haute de l'échantillonnage d'eau. Les sédiments ont été prélevés à l'aide de carottiers en PVC (polychlorure de Vinyle) de 15 cm de diamètre et de 5 cm de hauteur (Figure 16).

Pour chaque type de prélèvement (eau et sédiment), un triplicat d'échantillonnage (R1, R2 et R3) a été effectué à chaque campagne de prélèvement. Les répliqués de chaque échantillon ont été prélevés à environ 5 minutes d'intervalle. Les dates de prélèvement ont été déterminées en fonction du coefficient de marée et de la hauteur d'eau à partir des données disponibles sur le site de marées info (Tableau 8).

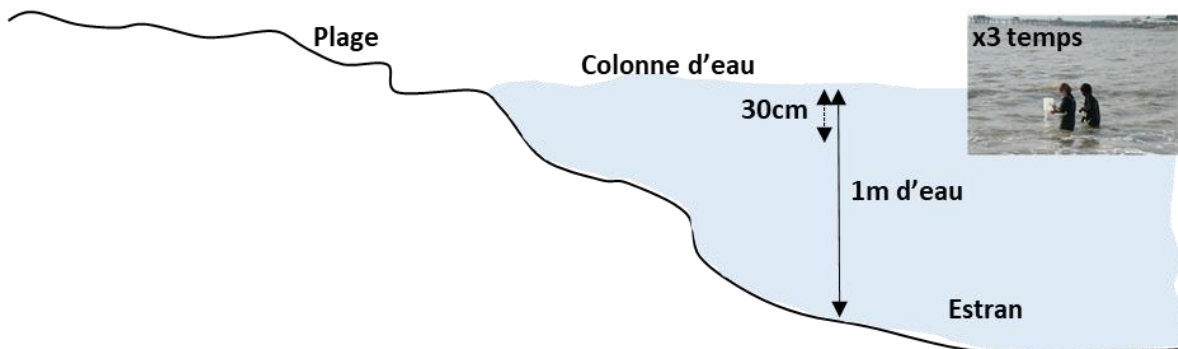


Figure 15 : Prélèvement des échantillons d'eau au niveau des deux sites de baignade de la baie (Platin Nord et Platin Sud). Chaque échantillon d'eau a été prélevé en triplicats (à trois reprises 3 temps = T1, T2, T3) sur chaque site. L'image représente l'échantillonnage d'eau au Platin Nord.

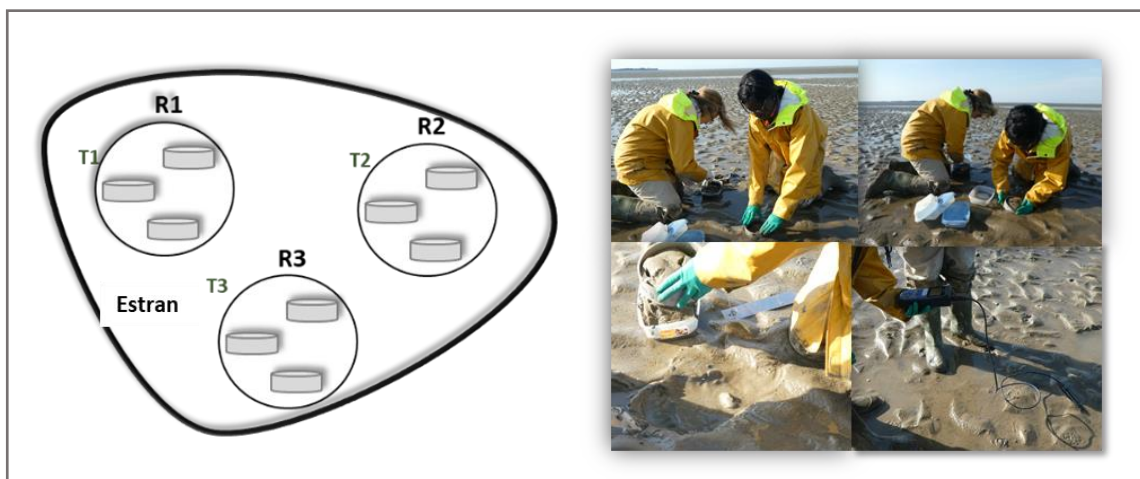


Figure 16 : Prélèvement des échantillonnages de sédiment en triplicat au niveau des deux sites de baignade de la baie (Platin Nord et Platin Sud). A chaque temps (T1, T2, T3) le répliqué correspondant est prélevé. Les images représentent les différentes étapes d'échantillonnage, du prélèvement au conditionnement en terminant par la mesure in situ des paramètres physico-chimiques.

Tableau 8 : Détermination des dates de prélèvement du suivi annuel à partir des données de la station Météo La Rochelle - Pallice. Les dates ont été choisies en fonction de la hauteur d'eau à chaque heure de la journée et du coefficient de marée : exemple du mois de juillet 2019. Les dates surlignées en jaune sont les jours de prélèvement, en orange sont indiqués les horaires de prélèvements de sédiment et en bleu les horaires de prélèvements d'eau. Haut. (m) est la hauteur d'eau et Coef. est le coefficient de marée.

Station La Rochelle - Pallice (France) : Coordonnées : 046° 09' 36.0" N, 001° 12' 42.0" W

Dates	Hauteur d'eau heure par heure														Pleine mer	Heure	Haut. (m)	Coef.	Basse mer	Heure	Haut. (m)	Pleine mer	Heure	Haut. (m)	Coef.	
	06:00	07:00	08:00	09:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00												20:00
Lundi 1 juillet 2019	5,09	4,29	3,28	2,28	1,64	1,78	2,68	3,77	4,64	5,26	5,66	5,73	5,41	4,71	3,75	PM	04:23	5,61	72	BM	10:20	1,59	PM	16:40	5,75	76
Mardi 2 juillet 2019	5,64	5,04	4,09	2,96	1,89	1,34	1,74	2,87	4,07	4,96	5,59	5,92	5,87	5,41	4,57	PM	05:08	5,81	81	BM	11:06	1,34	PM	17:23	5,95	85
Mercredi 3 juillet 2019	5,95	5,66	4,92	3,85	2,62	1,53	1,16	1,84	3,16	4,38	5,26	5,84	6,09	5,93	5,35	PM	05:52	5,96	88	BM	11:51	1,15	PM	18:07	6,09	91
Jeudi 4 juillet 2019	5,93	5,99	5,58	4,75	3,60	2,31	1,27	1,12	2,06	3,47	4,67	5,49	5,99	6,14	5,89	PM	06:38	6,02	93	BM	12:37	1,04	PM	18:53	6,14	94
Vendredi 5 juillet 2019	5,57	5,95	5,91	5,44	4,55	3,36	2,06	1,14	1,24	2,37	3,78	4,89	5,61	6,01	6,09	PM	07:25	5,98	94	BM	13:25	1,04	PM	19:43	6,1	93
Samedi 6 juillet 2019	4,98	5,57	5,84	5,75	5,25	4,36	3,18	1,92	1,16	1,47	2,69	4,03	5,01	5,60	5,91	PM	08:16	5,85	92	BM	14:13	1,13	PM	20:38	5,97	89
Dimanche 7 juillet 2019	4,24	4,99	5,44	5,64	5,55	5,08	4,22	3,07	1,90	1,30	1,76	2,98	4,20	5,02	5,48	PM	09:13	5,65	85	BM	15:05	1,3	PM	21:38	5,77	82
Lundi 8 juillet 2019	3,35	4,32	4,91	5,24	5,41	5,36	4,94	4,14	3,05	1,99	1,52	2,03	3,18	4,26	4,93	PM	10:18	5,43	77	BM	15:59	1,52	PM	22:48	5,55	73
Mardi 9 juillet 2019	2,40	3,49	4,30	4,75	5,03	5,21	5,22	4,88	4,14	3,13	2,16	1,75	2,22	3,26	4,21	PM	11:32	5,25	68	BM	16:58	1,74	PM	---	---	---
Mercredi 10 juillet 2019	1,83	2,55	3,51	4,20	4,59	4,86	5,09	5,16	4,88	4,20	3,25	2,34	1,92	2,32	3,23	PM	00:02	5,36	64	BM	05:33	1,75	PM	12:46	5,17	60
Jeudi 11 juillet 2019	2,09	1,98	2,58	3,44	4,09	4,49	4,80	5,08	5,19	4,94	4,29	3,38	2,48	2,01	2,29	PM	01:14	5,26	58	BM	06:38	1,93	PM	13:52	5,19	56
Vendredi 12 juillet 2019	2,99	2,21	2,01	2,51	3,33	4,02	4,48	4,86	5,17	5,28	5,02	4,36	3,45	2,52	2,00	PM	02:21	5,23	56	BM	07:45	1,99	PM	14:50	5,29	57
Samedi 13 juillet 2019	3,98	3,02	2,20	1,94	2,41	3,27	4,04	4,59	5,03	5,34	5,39	5,06	4,36	3,41	2,46	PM	03:20	5,26	58	BM	08:50	1,93	PM	15:39	5,41	61
Dimanche 14 juillet 2019	4,72	3,90	2,91	2,07	1,82	2,36	3,32	4,19	4,81	5,26	5,52	5,47	5,04	4,25	3,26	PM	04:10	5,33	63	BM	09:49	1,8	PM	16:21	5,54	66
Lundi 15 juillet 2019	5,18	4,59	3,70	2,69	1,87	1,73	2,43	3,51	4,44	5,09	5,51	5,66	5,47	4,90	4,03	PM	04:51	5,41	69	BM	10:39	1,68	PM	16:57	5,66	71
Mardi 16 juillet 2019	5,42	5,05	4,35	3,40	2,38	1,67	1,76	2,67	3,82	4,75	5,38	5,72	5,72	5,36	4,66	PM	05:25	5,47	73	BM	11:24	1,59	PM	17:30	5,76	75
Mercredi 17 juillet 2019	5,52	5,33	4,82	4,03	3,03	2,05	1,55	1,95	3,05	4,21	5,08	5,62	5,83	5,65	5,14	PM	05:55	5,52	76	BM	12:04	1,55	PM	18:02	5,83	77
Jeudi 18 juillet 2019	5,51	5,48	5,13	4,51	3,65	2,64	1,77	1,59	2,32	3,52	4,60	5,36	5,78	5,80	5,46	PM	06:25	5,54	78	BM	12:42	1,55	PM	18:34	5,84	77
Vendredi 19 juillet 2019	5,37	5,52	5,32	4,85	4,15	3,26	2,29	1,64	1,83	2,81	4,00	4,95	5,56	5,80	5,65	PM	06:54	5,52	77	BM	13:18	1,6	PM	19:06	5,8	76
Samedi 20 juillet 2019	5,11	5,43	5,39	5,06	4,51	3,79	2,90	2,04	1,71	2,24	3,34	4,41	5,19	5,62	5,69	PM	07:23	5,46	74	BM	13:54	1,71	PM	19:39	5,71	72
Dimanche 21 juillet 2019	4,75	5,22	5,35	5,16	4,76	4,18	3,46	2,62	1,96	1,96	2,74	3,81	4,72	5,30	5,55	PM	07:53	5,35	70	BM	14:29	1,86	PM	20:13	5,56	67
Lundi 22 juillet 2019	4,29	4,91	5,18	5,16	4,90	4,47	3,91	3,21	2,45	2,04	2,34	3,21	4,16	4,87	5,28	PM	08:24	5,21	64	BM	15:06	2,04	PM	20:49	5,38	61
Mardi 23 juillet 2019	3,76	4,50	4,92	5,04	4,93	4,66	4,26	3,73	3,05	2,42	2,25	2,73	3,58	4,36	4,89	PM	08:58	5,04	57	BM	15:45	2,23	PM	21:31	5,17	54
Mercredi 24 juillet 2019	3,20	4,00	4,55	4,83	4,86	4,75	4,52	4,15	3,63	2,99	2,49	2,49	3,04	3,78	4,40	PM	09:41	4,87	50	BM	16:30	2,42	PM	22:25	4,98	47
Jeudi 25 juillet 2019	2,72	3,41	4,07	4,50	4,69	4,73	4,67	4,49	4,14	3,62	3,01	2,60	2,67	3,18	3,82	PM	10:51	4,73	44	BM	17:21	2,56	PM	23:46	4,85	42
Vendredi 26 juillet 2019	2,50	2,85	3,47	4,03	4,40	4,60	4,70	4,72	4,57	4,21	3,65	3,05	2,65	2,71	3,16	PM	12:37	4,73	41	BM	18:23	2,62	PM	---	---	---
Samedi 27 juillet 2019	2,68	2,51	2,81	3,39	3,95	4,33	4,60	4,81	4,88	4,72	4,31	3,69	3,03	2,58	2,58	PM	01:10	4,86	41	BM	06:51	2,5	PM	13:51	4,89	42
Dimanche 28 juillet 2019	3,23	2,60	2,36	2,64	3,27	3,90	4,37	4,75	5,04	5,13	4,92	4,41	3,68	2,91	2,36	PM	02:18	5,02	45	BM	07:57	2,36	PM	14:49	5,14	50
Lundi 29 juillet 2019	3,99	3,13	2,39	2,08	2,42	3,18	3,94	4,52	5,01	5,35	5,42	5,11	4,46	3,59	2,67	PM	03:16	5,26	55	BM	08:59	2,08	PM	15:41	5,44	61
Mardi 30 juillet 2019	4,81	3,93	2,92	2,06	1,73	2,20	3,16	4,08	4,79	5,35	5,70	5,70	5,26	4,44	3,39	PM	04:09	5,55	68	BM	09:54	1,73	PM	16:30	5,75	74
Mercredi 31 juillet 2019	5,57	4,83	3,78	2,61	1,65	1,39	2,08	3,25	4,32	5,12	5,71	6,03	5,93	5,33	4,34	PM	04:58	5,83	80	BM	10:46	1,36	PM	17:17	6,05	86

1.1.3 Organisation des échantillons d'eau et de sédiment

1.1.3.1 Échantillonnages réguliers d'eau et de sédiment

Un suivi régulier durant une année, de février 2019 à février 2020, a été effectué sur les deux sites de baignade de la baie (le Platin Nord et le Platin Sud). Les échantillons de sédiment à marée basse puis d'eau à marée haute ont été prélevés d'abord sur le site du nord puis sur le site du sud. La plage d'Aytré est une baie relativement plate avec une pente faible (ASCONIT, 2017). Ainsi, pour réaliser les prélèvements dans de bonnes conditions, il fallait une hauteur d'eau de 1,5 m à marée basse pour l'échantillonnage des sédiments et d'au moins 5,5 m pour avoir la hauteur d'eau nécessaire pour les prélèvements d'eau.

Suivant les différentes saisons de l'année, 2 à 8 prélèvements d'eau et 1 à 4 prélèvements de sédiment ont été effectués par mois dans les deux sites. Pour l'eau, un échantillonnage bimensuel a été effectué en hiver, 3 à 4 campagnes d'échantillonnage durant les mois d'automne et de printemps et un échantillonnage bihebdomadaire a été réalisé durant les deux mois d'été (Tableau 9). Pour le sédiment, un échantillonnage mensuel a été réalisé en hiver et en automne et au printemps, un échantillonnage bimensuel durant les mois de juin et octobre et un échantillonnage hebdomadaire durant les deux mois d'été (Tableau 9).

En plus des prélèvements sur les deux zones de baignade de la plage d'Aytré, des échantillonnages d'eau et de sédiment (Tableau 9) ont été effectués en parallèle sur un site de la baie d'Yves (N 46.042783, W -1.059533). Cette baie présente la même configuration spatiale que la baie d'Aytré et la texture de sédiment de cette baie est similaire à celle de la baie d'Aytré (Figure 17 A). Ces prélèvements ont été réalisés afin d'effectuer une analyse comparative de l'effet des topographies particulières sur la dynamique de la contamination fécale dans les deux baies.

Tableau 9 : Fréquence d'échantillonnage d'eau et de sédiment durant le suivi sur une année dans les deux sites de baignade de la baie d'Aytré

Sites d'échantillonnage	Types d'échantillons	Nombre d'échantillons mensuels													Nombre Total
		Fév-19	Mars-19	Avr-19	Mai-19	Jun-19	Jul-19	Août-19	Sept-19	Oct-19	Nov-19	Dec-19	Janv-20	Fév-20	
Platin Nord	Eau	2	2	3	3	4	8	8	4	4	2	2	2	2	46
Platin Nord	Sédiment	1	1	1	1	2	4	4	2	2	1	1	1	1	22
Platin Sud	Eau	2	2	3	3	4	8	8	4	4	2	2	2	2	46
Platin Sud	Sédiment	1	1	1	1	2	4	4	2	2	1	1	1	1	22
Baie d'Yves	Eau	1	1	1	1	1	4	4	1	1	1	1	1	1	19
Baie d'Yves	Sédiment	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	15

1.1.3.2 Echantillonnage “en quadrillage” de la baie

Un échantillonnage d'eau et de sédiment a été réalisé pour analyser la dynamique spatiale et l'homogénéité des concentrations de bactéries fécales (*E. coli* et entérocoques) à l'échelle de la baie en fonction des microreliefs et de la texture du sédiment.

Texture du sédiment sur toute l'étendue de la baie par photographie aérienne

Pour déterminer le plan de quadrillage, une analyse de la teneur en eau de 61 échantillons de sédiments prélevés sur toute l'étendue de la baie a été réalisée pour identifier des zones caractéristiques de la surface sub-tidale de la baie d'Aytré. Ensuite, une analyse de la texture du sédiment a été réalisée par photographies aériennes avec un drone aérien (Phantom 4 pro) suivant le plan de vol déterminé par les cibles représentées sur la Figure 17A. La position des points GPS des cibles a été enregistrée à l'aide de récepteurs GNSS SP80. L'analyse des photographies aériennes a été réalisée par la plateforme “drones” du laboratoire LIENSs pour obtenir une ortho-mosaïque de la structure du sédiment sur toute l'étendue de la baie. Cette étude a permis de caractériser les différents microreliefs du sédiment qui peuvent constituer des milieux propices au développement des microorganismes et donc des bactéries d'origine fécale.

Prélèvements d'eau et de sédiment

A partir de l'ortho-mosaïque du sédiment, 20 points de prélèvement quadrillant la baie ont été déterminés pour analyser la dynamique spatiale des contaminants fécaux. Des échantillonnages de sédiment et d'eau ont été réalisés sur ces 20 points (Figure 17B). Les prélèvements de sédiment ont été effectués suivant le protocole d'échantillonnage décrit en début de ce chapitre (1.1.2, Figure 3). Les prélèvements d'eau à marée haute ont été effectués par le drone marin PAMELi (Plateforme Autonome Multi-capteurs pour l'exploration du Littoral) du laboratoire

LIENSs. Contrairement au suivi annuel décrit précédemment, un unique échantillon d'eau et de sédiment a été prélevé sur chaque point.

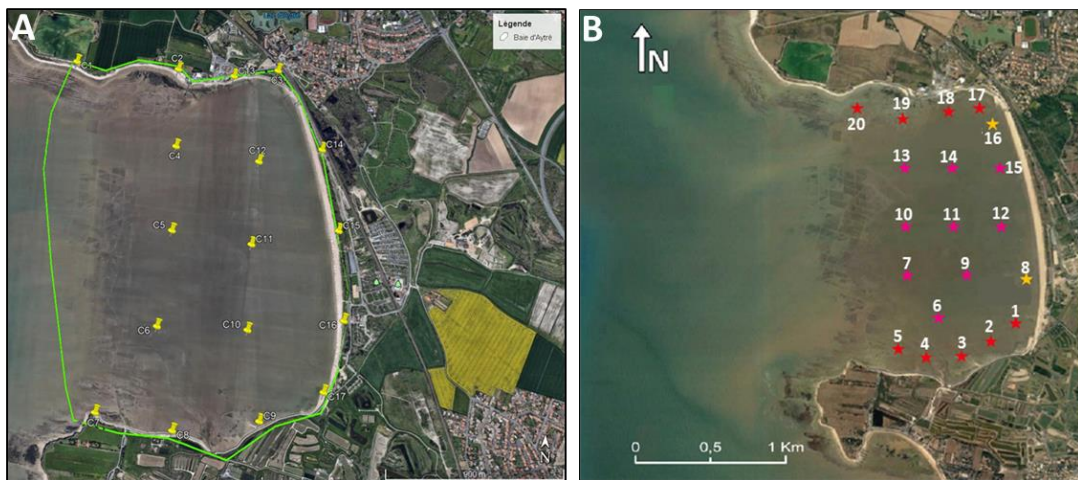


Figure 17 : Détermination des sites du suivi en « quadrillage » A) Positions des cibles (C1 à C17) déterminant le plan des survols de drone aérien pour les photographies aériennes des microreliefs de la baie, B) Répartition des différents points de prélèvement. Les points en jaunes sont les deux sites officiels de baignade et les points en rouge représentent les sites avec du sédiment vaseux et les points en rose rouge représentent les sites avec du sédiment sablo-vaseux.

1.1.3.3 Echantillonnage «en balayage» de la baie

L'une des dernières hypothèses sur l'origine de cette pollution est « l'effet balayage » entraînant l'accumulation des contaminants fécaux (principalement issus des fientes d'oiseaux) dans les zones de baignade sous l'effet de la marée montante. Ainsi, dans cette étude des prélèvements d'eau et de sédiment ont été réalisés sur deux transects, un au nord et l'autre au sud de la baie (Figure 18). Les prélèvements de sédiments ont été effectués depuis la plage vers le large avec un unique échantillon prélevé par point. Arrivés au point le plus au large sur chacun des deux transects, les échantillons d'eau ont été prélevés avec environ 5 cm de hauteur d'eau dans le sens inverse en suivant la marée montante sur chaque point.



Figure 18 : Localisation des deux transects de prélèvement pour le suivi “en balayage”. Les points en jaunes sont les deux sites officiels de baignade et les points en bleu représentent les autres points de prélèvement.

1.1.3.4 Prélèvements ponctuels d’eau autour de la plage d’Aytré

Des prélèvements ponctuels d’eau ont également été réalisés en parallèle aux prélèvements réguliers du suivi annuel sur des sites situés à proximité de la baie d’Aytré et considérés comme de potentielles sources de contamination. Il s’agit d’exutoires ostréicoles (exutoire de la Colonelle et exutoire sous la passerelle sud), des exutoires d’eaux pluviales (canal de Vuhé, écluse nord) et du canal situé près du centre équestre (Figure 14B, Tableau 10). De même des échantillons d’eau ont été prélevés au large de la baie d’Aytré, au-delà des parcs ostréicoles (transect pointe de Roux-Pointe du Chay), au niveau de la plage de Roux et au niveau du port de plaisance des Minimes de La Rochelle (Figure 14A, Tableau 10).

Tableau 10 : Coordonnées géographiques des différents sites où sont effectués les prélèvements ponctuels d'eau. A chaque date un échantillonnage d'eau en triplicat a été effectué

Sites de prélèvements		Coordonnées géographiques		Dates d'échantillonnage
Exutoire du canal de Vuhé		N 46.11175 W -1.124805		29-mai-19
				03-juin-19
				07-juin-19
				18-oct-19
				02-mars-20
Exutoire de marais au nord		N 46.1263611 W -1.133861		16-juil-19
				24-sept-19
				18-oct-20
				02-mars-20
Exutoire ostréicole sous la passerelle sud		N 46.1089167 W -1.132222		29-mai-19
				03-juin-19
				07-juin-19
				24-sept-19
				18-oct-20
				02-mars-20
Plage de Roux		N 46.1331111	W -1.149083	16-juil-19
Centre équestre		N 46.1190556 W -1.116916		12-juin-19
				18-oct-19
Transect hors baie	Pointe de Roux	N 46.1293056	W-1.167194	02-oct-19
	Milieu de baie	N 46.1218611	W -1.165972	
	Pointe du Chay	N 46.109774	W -1.165688	
Port de plaisance		Ponton 39		05-sept-19
		Ponton 55		
		Ponton accueil		

1.1.4 Mesure in situ des paramètres physico-chimiques et météorologiques

Une vingtaine de paramètres biologiques et chimiques ont été mesurés dans tous les échantillons d'eau et de sédiment.

Certains paramètres physico-chimiques et climatiques du milieu ont été mesurés *in situ* durant l'échantillonnage à l'aide de sondes portatives multifaisceaux (Cond 3110, TetraCon 325, WTW, Allemagne). Il s'agit de la température de l'air (°C), la température de l'eau (°C) ou de l'eau interstitielle (pour le sédiment), la salinité (psu), le pH, l'oxygène dissous (mg/l) et la saturation en oxygène (%). Les données climatiques, telles que le coefficient de marée, la

température journalière moyenne, la vitesse du vent, les données pluviométriques, ont été obtenues grâce aux données de la station Météo-France “La Rochelle – Pallice”. D’autres paramètres physico-chimiques ont été quantifiés en laboratoire.

1.2 Analyses en laboratoire

1.2.1 Analyse des paramètres physico-chimiques

Une bouteille en polyéthylène a été rincée à trois reprises avec l’eau de mer avant de prélever 5 litres d’eau pour quantifier les paramètres physico-chimiques du milieu par différentes méthodes normées. Sur la plage, après prélèvement, l’échantillon d’eau a été réparti dans des flacons correspondant à une analyse spécifique avant de les transporter au laboratoire. La concentration en carbone organique total [COT (mg/l)] a été mesurée par la méthode standard (NF EN 1484) (European Committee for Standardization, 1997) à partir de 125 ml d’eau. Un litre d’eau a servi à quantifier les concentrations en matières en suspension [MES (mg/l)] par la méthode standard (NF EN 872) (European Committee for Standardization, 2005) et en matières volatiles en suspension [MVS (mg/l)] par gravimétrie. Les concentrations des sels nutritifs ont été mesurées à partir de 250 ml d’eau par fluorimétrie pour l’ammonium [NH_4 ($\mu\text{mol/l}$)] et par colorimétrie pour le nitrate [NO_3 ($\mu\text{mol/l}$)], le nitrite [NO_2 ($\mu\text{mol/l}$)], le silicate [SiO_2 ($\mu\text{mol/l}$)] et le phosphate [PO_4 ($\mu\text{mol/l}$)] (Méthode SCOR-UNESCO) (Aminot and Kérouel, 2007). Un litre d’eau conservé dans une bouteille ambrée a été filtré pour mesurer la concentration de chlorophylle-*a* ($\mu\text{mol/l}$) et des phéopigments ($\mu\text{g/l}$) par la méthode NF T 90-117 (French Association for Standardization, 1999a).

Pour quantifier les paramètres physico-chimiques dans le sédiment, 1 kg d’échantillon a été utilisé. La concentration en carbone organique total [COT (mg/l)] a été mesurée par spectrométrie suivant la méthode standard NF ISO 14235 (International Organisation for Standardisation, 1988). Dans les sédiments, la concentration des sels nutritifs a été quantifiée à partir de l’eau interstitielle récupérée après centrifugation du sédiment à 3000 rcf pendant 20 minutes à 8°C. Pour quantifier les silicates, 15 ml d’eau interstitielle ont été stockés à 4°C. Les phosphates, les nitrates, les nitrites et l’ammonium, ont été quantifiés avec de l’eau interstitielle filtrée avec un filtre GF/C puis stockée dans des flacons de 15 ml à -20°C. Les concentrations de ces nutriments ont été quantifiées avec un auto-analyseur (Seal Analytical, Nordertedt, Allemagne) muni d’un échantillonneur XY-2 selon la méthode d’Aminot and Kérouel, (2007).

Les concentrations de la chlorophylle-*a* et des phéopigments ($\mu\text{g/l}$) ont été mesurées à partir de 50 mg de sédiment stockés à -20°C . Les concentrations de chlorophylle-*a* ont été quantifiées par fluorimétrie (640 nm, Turner TD 700, Turner Designs, USA) selon la méthode décrite par Lorenzen (1966). Les sédiments ont été lyophilisés puis la chlorophylle-*a* a été extraite la nuit à l'obscurité à 4°C avec de l'acétone à 90% (mélangés par retournement répété) puis centrifugés à 8°C pendant 10 min à 3000 g (Lavergne et al., 2014). La granulométrie a également été mesurée par granulométrie laser (Mastersizer, 2000 ; Malvern Instruments, U.K.) et évaluée à l'aide du programme GRADISTAT tel que décrit par Folk et Ward (1957). Les groupes de texture de sédiments ont été définis par l'abondance relative (%) de d'argile (pour l'argile et le limon de diamètre $< 60 \mu\text{m}$) et de sable (diamètre entre 63 et $2000 \mu\text{m}$) selon l'échelle d'Udden-Wentworth (Blott et Pye, 1986).

1.2.2 Analyse du niveau de contamination fécale

Pour déterminer l'origine de la contamination fécale de la plage, nous avons d'abord analysé le niveau de contamination de l'eau de la baie en quantifiant l'abondance des indicateurs de contamination fécale *E. coli* et entérocoques. L'abondance de ces bactéries a été analysée dans le sédiment également. Ensuite, des traceurs de sources microbiologiques ont été recherchés pour déterminer l'origine de cette contamination.

1.2.2.1 Quantification des indicateurs de contamination fécale

Les indicateurs de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques) ont été quantifiés par la méthode miniaturisée des microplaques. Il s'agit des méthodes normées NF EN ISO 9308-3 (International Organisation for Standardisation, 1999b) et XP X33-019 (French Association for Standardisation, 2004) pour quantifier respectivement les *Escherichia coli* dans les échantillons d'eau et de sédiment et la méthode NF EN ISO 7899-1 (International Organisation for Standardisation, 1999 c) pour les entérocoques dans les échantillons d'eau et de sédiment. Le principe de ces analyses consiste en une mise en culture des échantillons dilués sur la microplaque de 96 puits (64 puits avec une dilution au $1/2$ et 32 puits avec une dilution au $1/20$). Après incubation à 45°C pendant 48h et lecture des microplaques sous UV, la détermination du nombre le plus probable (NPP) des indicateurs est obtenue au moyen de la table NPP selon le principe décrit dans le chapitre 1 (III.2.).

1.2.2.2 Caractérisation des indicateurs de contamination fécale

- ***Isolement des souches bactériennes des indicateurs***

L'analyse de l'abondance des indicateurs normés par la méthode des microplaques n'étant pas spécifique aux souches d'origine fécale (chapitre 1, 1.1.2), un profil de population a été effectué pour valider l'origine de ces indicateurs quantifiés par la méthode normée. Les profils de population permettent de déterminer la proportion des bactéries environnementales versus fécales (humaine et/ou animale) dans les échantillons d'eau et de sédiment à partir d'un sous échantillonnage d'isolats bactériens représentatif de la diversité bactérienne d'un échantillon. Dans cette étude, soixante colonies de souches d'*E. coli* et d'entérocoques ont été isolées et repiquées à partir des microplaques utilisées pour quantifier l'abondance de ces bactéries dans les échantillons d'eau et de sédiment (cf partie III.5.2.4). Les isolats ont ensuite été identifiés par MALDI-TOF. Les analyses effectuées sur les souches de *E. coli* n'ont pas permis de caractériser les origines des différentes souches. Ces résultats ne seront pas présentés dans ce Manuscrit. L'identification des espèces d'entérocoques par MALDI-TOF a permis d'analyser la diversité de ces espèces bactériennes et d'analyser la proportion des différentes espèces caractéristiques de leur origine.

1.2.2.3 Recherche de traceurs de sources microbiologiques

Dans cette étude nous avons analysé 2 types de traceurs de sources microbiologiques et nous avons développé des modèles d'analyse basé sur les marqueurs protéiques qui pourront être utilisés comme outils de caractérisation d'indicateurs de contamination fécale.

1.2.2.4 Marqueurs génétiques

Plusieurs cibles de traceurs de sources microbiologiques ont été recherchés dans les échantillons d'eau en dépassement des seuils réglementaires suivant différentes méthodes de qPCR. Le Tableau 11 ci-dessous résume les différents marqueurs testés dans cette étude et les méthodes de quantification utilisées.

Tableau 11 : Liste des marqueurs des traceurs de sources microbiologiques analysés

Origine	Cibles	Séquences	Méthodes	Références
Humain	Lachno 3	CAACGCGAAGAACCTTACCAAA	qPCR	(Feng et al., 2018)
		CCCAGAGTGCCACCTTAAAT		
		(FAM) CTCTGACCGGTCTTTAATCGGA (MGB)		
Animal	Phage ARNF GI	TCAGTGGTCCATACCTTAGATGC	qPCR	(Ogorzaly and Gantzer, 2006)
		ACCCCGTTAGCGAAGTTGCT		
		FAM-CTCGTCGACAATGG-MGBNFQ		
Chien	BacCan	GGAGCGCAGACGGGTTTT	qPCR	(Kildare et al., 2007)
		R1 : CAATCGGAGTTCTTCGTGATATCTA		
		R2 : AATCGGAGTTCCTCGTGATATCTA		
		FAM-TGGTGTAGCGGTGAAA-MGB		
Cheval	HoF597F Bac708R	CCAGCCGTAAA ATAGTCGG	PCR	(Dick et al., 2005)
		CAATCGGAGTTCTTCGTG		
Aviaire	Helicobacter (GFD)	TCGGCTGAGCATCTAGGG	qPCR	(Green et al., 2012)
		GCGTCTCTTTGTACATCCCA		
Humain	Bactéroïdes (Hum1Bac)	ATCATGAGTTCACATGTCCG	qPCR	(Mieszkin et al., 2009; Seurinck et al., 2005)
		TACCCCGCCTACTATCTAATG		
Humain	Phage ARNF GII (hum3)	TGCAAACCTAACTCGGAATGG	qRT-PCR (Taqman)	(Ogorzaly and Gantzer, 2006)
		AGGAGAGAACGCAGGCCTCTA		
		(FAM)TCCCTCTATTCCTC (MGBNFQ)		
Porcin	Pig2bac	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT	qPCR (Taqman)	(Mieszkin et al., 2009; Reischer et al., 2014; Seurinck et al., 2005)
		ACCTCATACGGTATTAATCCGC		
		(VIC)TCCACGGGATAGCC(NFQ-MGB)		
Ruminant	Rum2bag	ACAGCCCGCGATTGATACTGGTAA	qPCR (Taqman)	Mieszkin et al., 2009; Reischer et al., 2014; Seurinck et al., 2005)
		CAATCGGAGTTCTTCGTGAT		
		(FAM) ATGAGGTGGATGGAATTCGTGGTGT (BHQ-1)		

○ *Analyse de la spécificité et de la sensibilité des marqueurs génétiques*

Pour analyser la spécificité et la sensibilité des marqueurs recherchés, des extractions d'ADN ont été effectuées à partir de fèces d'oiseaux, de chiens, de chevaux ou d'humains (Tableau 12). Tous les marqueurs de l'étude ont été testés sur tous les extraits d'ADN d'origine connue.

Tableau 12 : Fèces récoltées pour l'analyse de la spécificité et de la sensibilité des marqueurs génétiques

Origine	Sites de récolte	Nombre de fèces	Espèces
Aviaire	Moëze Oléron	1	Bécasseau variable
	Moëze Oléron	1	Courlis cendré
	Moëze Oléron	1	Courlis corlieu
	Moëze Oléron	1	Bécasseau maubèche
	Moëze Oléron	1	Barge rousse
	Moëze Oléron	1	Chevalier gambette
	Moëze Oléron	2	Bernache
	Noirmoutier	4	Mouette mélanocéphale
	La Rochelle	1	Poule
Canine	Aytré	4	-
	Yves	2	-
	La Rochelle	4	-
Equine	La Rochelle	8	-
	Yves	2	-
Humaine	La Rochelle	10	-

○ *Extraction d'ADN et d'ARN à partir des échantillons d'eau*

Des co-extractions d'ADN et d'ARN ont été effectuées avec le Kit NucliSENS magnétique extraction de BioMérieux. Deux litres d'échantillon d'eau ont été filtrés par filtration au travers d'une cassette selon le protocole Vivaflow 50/50R/200 décrit par Sartorius.

1.2.2.4.1 Marqueurs chimiques

Des marqueurs chimiques comme la caféine et le paracétamol ont été quantifiés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (Voir protocole en Annexe 2)

1.2.2.4.2 Marqueurs protéiques

Les marqueurs protéiques ont été identifiés par la méthode de MALDI-TOF sur les deux indicateurs de contamination fécale *E. coli* et entérocoques. Cette analyse consiste à discriminer les différentes souches d'*E. coli* et d'entérocoques d'origine humaine de celles d'origine non humaine (animale).

Collecte des souches d'*E. coli* et d'Entérocoques (*E. faecium* et *E. faecalis*)

○ **Constitution d'une banque de souches bactériennes d'origine connue**

Des fèces de chiens, de chevaux, d'oiseaux et d'humains ont été collectés (Tableau 13). Des isolements des souches de *E. coli* et d'entérocoques ont été effectués respectivement sur des milieux TBX (Tryptone Bile X-glucuronide) et BEA (Bile Esculine Azide). Par la suite, les isolats ont été repiqués dans 2 ml de bouillon BMH (Bouillon Mueller-Hinton) puis conservés à -80°C. En parallèle, l'identification des isolats a été confirmée par MALDI-TOF selon le protocole suivant :

Une partie des colonies isolées sur boîte a été déposée sur un spot de la cible MALDI-TOF. Ensuite, le dépôt a été recouvert de 1 µl de matrice (HCCA, portionné), et l'identification a été réalisée avec un appareil Microflex de Bruker et le logiciel MBT Compass Explorer. L'identification est effectuée par comparaison avec la base de données Bruker Taxonomy qui est constituée d'environ 9 000 spectres de références de protéines de bactéries connues.

Tableau 13 : Collecte des souches de bactéries d'origine connue pour la création de modèles d'algorithme génétique MALDI-TOF

Origine	Espèces	Nombre d'échantillons	Sites	Nombre d'isolats		
				<i>E. coli</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Aviaire	Bécasseau variable	3	Moëze Oléron	-	3	10
	Courlis cendré	4	Moëze Oléron	-	-	5
	Courlis corlieu	4	Moëze Oléron	-	3	3
	Bécasseau maubèche	5	Moëze Oléron	-	3	3
	Barge Rousse	2	Moëze Oléron	-	3	3
	Chevalier gambette	4	Moëze Oléron	-	3	3
	Bernache	5	Aytré	-	3	4
	Mouette mélanocéphale	6	Noirmoutier	-	1	4
	Poule	2	La Rochelle	-	5	3
	Goéland	2	La Rochelle	-	-	9
Canine	-	3	Aytré	-	-	5
	-	1	Yves	-	-	5
	-	3	La Rochelle	-	6	5
Equine	-	5	La Rochelle	20	-	-
Humaine	STEP	3	La Rochelle	-	24	4
	Hôpital		Niort	-	1	18

○ **Banque de souches bactériennes à partir des échantillons**

Des souches d'*E. coli* et d'entérocoques ont été obtenues à partir des échantillons d'eau de mer prélevés sur le terrain lors du suivi annuel. Un isolement a été effectué sur les milieux sélectifs des germes indicateurs de contamination fécale. Les solutions contenues dans les cupules fluorescentes lors de la lecture des microplaques (utilisées pour la quantification des indicateurs de contamination fécale) sous UV (indiquant la présence des deux indicateurs recherchés) ont été utilisées pour isoler les souches à analyser. Pour chaque échantillon, 5 isolats de *E. coli* et 5 isolats d'entérocoques ont été repiqués. Le même protocole d'analyse pour le MALDI-TOF utilisé pour les souches d'origine connue a été appliqué pour la construction de cette souchothèque.

○ ***Acquisition des spectres protéiques des indicateurs de contamination fécale***

L'acquisition des spectres est effectuée à partir des isolats des deux souchothèques conservées à -80°C. D'abord les souches ont été repiquées sur milieu gélose au sang et incubées pendant 24h à 37°C. Ensuite l'extraction des protéines est effectuée suivant le protocole décrit dans le chapitre 3.9.5 du manuel d'utilisateur du Biotyper (Version 2.3_Rev1) :

Les colonies isolées ont été resuspendues dans 2 ml de sérum physiologique pour une densité de 5 et de 3 unités McFarland pour les *E. coli* et les entérocoques respectivement.

1) 1 ml de solution obtenue a été transférée dans un tube de 1.5 ml et centrifugée pendant 2 minutes à 2000 rcf.

2) Le surnageant a été éliminé et le culot bactérien a été resuspendu dans 900 µl d'éthanol pur

3) Le mélange a été centrifugé pendant 2 minutes à 13 000 rpm et le surnageant a été éliminé

4) Le culot a été séché parfaitement pour éliminer tous les résidus d'éthanol

5) Ensuite le culot a été re-suspendu vigoureusement avec 30µl d'acide formique à 70%. Puis un volume équivalent d'acétonitrile a été ajouté au mélange pour provoquer la lyse des cellules bactériennes.

6) Le mélange a été centrifugé pendant 2 minutes à 13 000 rpm pour éliminer les débris cellulaires.

6) 1 µl du surnageant (extrait de protéines) a été déposé sur la cible MALDI-TOF en fonction du plan de cible présenté sur la Figure 19. De même des contrôles internes constitués de solution de BTS (*Bacterial Test Standard*) ont été déposés avec chaque échantillon pour vérifier la calibration de l'acquisition des spectres. Pour chaque échantillon, 24 spectres ont été obtenus. En effet chaque extrait de protéine a été déposé 8 fois comme représenté sur le plan et ensuite des spectres ont été enregistrés suite à 3 lectures successives.

7) le screening des spectres a été réalisé avec les logiciels Flex Control et MBT Compass Explorer.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4
B	S1	BTS	S1	S2	BTS	S2	S3	BTS	S3	S4	BTS	S4
C	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4
D	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	S8	S8	S8
E	S5	BTS	S5	S6	BTS	S6	S7	BTS	S7	S8	BTS	S8
F	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	S8	S8	S8
G	S9	S9	S9	S9				BTS	S10	S10	S10	S10
H	S9	S9	S9	S9	BTS				S10	S10	S10	S10

Figure 19 : Plan d'analyse des cibles MALDI-TOF pour l'acquisition de spectres protéiques des souches bactériennes. S (souches), BTS (Bacterial Test Standard). Les chiffres et les lettres représentent les différentes positions sur la cible.

○ **Analyses des spectres protéiques des indicateurs de contamination fécale**

L'analyse des spectres, la création des modèles et la caractérisation des souches ont été réalisées avec les logiciels suivants :

- (1) Le logiciel MBT Compass Explorer permet d'identifier et de classer les souches bactériennes grâce à une comparaison qualitative et quantitative avec des spectres de référence de la base de données Brucker Taxonomy.
- (2) Le logiciel ClinProTools 3.0 (BRUKER DALTONIK GmbH, 2017) crée des modèles d'analyse avec les spectres des souches d'origine connue (humaine ou animale) sur la base d'analyse statistique comme le modèle Anova ou de calcul d'algorithme comme Genetic algorithm 2. Ces modèles permettent de créer deux cohortes qui distinguent les souches d'origine humaine à celles d'origine animale. En outre, ce logiciel effectue la discrimination des spectres des souches obtenues à partir des échantillons d'eau par un screening avec le modèle d'analyse. Ainsi on obtient une caractérisation des souches humaines et animales par analyse qualitative et quantitative des spectres par rapport aux modèles développés (Brégeon et al., 2014).

1.2.3 Structure des communautés de microorganismes

Une étude de la structure des communautés de microorganismes a été réalisée par cytométrie et par metabarcoding pour caractériser l'abondance (bactéries et virus) et la diversité (bactéries) des communautés de microorganismes à partir des échantillons prélevés en triplicat dans les deux sites de baignade durant le suivi annuel (eau et sédiment).

1.2.3.1 Abondance totale des communautés bactériennes et virales

D'abord une quantification absolue des communautés de bactéries et de virus dans tous les échantillons d'eau et de sédiment a été réalisée.

Tableau 14 : Nombre d'échantillons analysés par cytométrie en flux

Sites	Type d'analyse	Nombre d'échantillons	
		Eau	Sédiment
Baie d'Aytré	Suivi annuel	276	132
Baie d'Aytré	Suivi "en quadrillage"	20	20
Baie d'Aytré	Suivi "en balayage"	16	16
Baie d'Yves	Suivi annuel	57	45
Prélèvement ponctuels	-	108	-

1.2.3.1.1 Quantification des bactéries dans les échantillons d'eau

Sur le terrain, automatiquement après l'échantillonnage, 1,5 ml d'échantillon d'eau ont été ajoutés dans des cryotubes de 2 ml contenant 15 µl du mélange glutaraldéhyde 25 % et poloxamer 10 % (2% concentration finale). Les cryotubes ont été laissés à température ambiante pendant 15 minutes, puis plongés dans de l'azote liquide et ensuite conservés à -80°C jusqu'à l'analyse en cytométrie. Au total 477 échantillons d'eau (Tableau 14) ont été analysés pour quantifier l'abondance des procaryotes avec un cytomètre en flux FACS CantoII selon le protocole développé par (Marie et al., 1999).

1.2.3.1.2 Quantification des virus dans les échantillons d'eau

Le même volume d'échantillon d'eau (1,5 ml) a été ajoutés dans des cryotubes de 2 ml contenant 30 µl de glutaraldéhyde 25 % (2 % concentration finale) puis les échantillons ont été conditionnés de la même façon que pour les procaryotes. Ensuite, les 477 échantillons d'eau (Tableau 14) ont été analysés selon le protocole cité précédemment.

1.2.3.1.3 Quantification des bactéries dans les échantillons de sédiment

Pour le sédiment, 2 ml d'échantillon ont été ajoutés dans des cryotubes de 4,5 ml contenant 2 ml de formaldéhyde 4 % (2 % de concentration finale) puis conditionnés comme les autres échantillons. Les analyses ont été réalisées sur un total de 213 échantillons de sédiment (Tableau 14) suivant la méthode développée par Lavergne et al. (2014).

1.2.4 Diversité des communautés bactériennes

Afin d'étudier et de décrire la structure de l'écosystème bactérien de la baie d'Aytré, une analyse de la diversité des communautés de bactéries totales et actives a été effectuée à partir d'ADN et d'ARN extraits des échantillons d'eau et de sédiment du suivi annuel. Les échantillons ont été choisis suivant ces critères (Tableau 15) :

- Échantillons prélevés dans les deux sites à la même date.
- Échantillons en dépassement des seuils réglementaires et échantillons non contaminés (équilibre).
- Échantillons en dépassement des seuils réglementaires sur un seul des deux sites.
- Échantillons d'eau et de sédiment prélevés à la même date
- Au moins un échantillon d'eau et de sédiment par saison

Tableau 15 : Choix des échantillons pour analyser la diversité des communautés bactériennes en fonction de l'abondance des indicateurs de contamination fécale. Dans la colonne eau, « < Seuil » signifie sans dépassement des seuils réglementaires et « > Seuil » indique les échantillons pour lesquels au moins un des indicateurs de contamination fécale était supérieur aux seuils réglementaires. Les dates où les échantillons de sédiment ont été prélevés sont indiquées dans la colonne Sed (sédiment) par le signe +. En rouge sont représentés les échantillons pour lesquels au moins 2 des 3 réplicats étaient en dépassement des seuils réglementaires. En vert et en noir sont représentés les échantillons dont l'abondance des indicateurs de contamination fécale sont inférieures aux seuils réglementaires. PLN : Platin Nord, PLS : Platin Sud.

Hiver 2019-2020 (7 campagnes)				Printemps 2019 (9 campagnes)				Été 2019 (20 campagnes)				Automne 2019 (9 campagnes)			
Dates	Sites	Sed	Eau	Dates	Sites	Sed	Eau	Dates	Sites	Sed	Eau	Dates	Sites	Sed	Eau
07-févr	PLN		< Seuil	08-avr	PLN		< Seuil	24-juin	PLN		< Seuil	26-sept	PLN	+	> Seuil
	PLS		< Seuil		PLS		< Seuil		PLS		< Seuil		PLS	+	> Seuil
18-févr	PLN	+	< Seuil	16-avr	PLN	+	< Seuil	01-juil	PLN		< Seuil	03-oct	PLN		< Seuil
	PLS	+	> Seuil		PLS	+	< Seuil		PLS		< Seuil		PLS		< Seuil
07-mars	PLN		> Seuil	23-avr	PLN		< Seuil	04-juil	PLN	+	> Seuil	10-oct	PLN	+	> Seuil
	PLS		< Seuil		PLS		< Seuil		PLS	+	< Seuil		PLS	+	< Seuil
18-mars	PLN	+	< Seuil	02-mai	PLN		< Seuil	08-juil	PLN		< Seuil	17-oct	PLN		< Seuil
	PLS	+	< Seuil		PLS		< Seuil		PLS		< Seuil		PLS		< Seuil
09-janv	PLN	+	> Seuil	14-mai	PLN		< Seuil	11-juil	PLN	+	< Seuil	24-oct	PLN	+	> Seuil
	PLS	+	> Seuil		PLS		< Seuil		PLS	+	< Seuil		PLS	+	> Seuil
23-janv	PLN		< Seuil	29-mai	PLN	+	< Seuil	15-juil	PLN		< Seuil	12-nov	PLN	+	> Seuil
	PLS		< Seuil		PLS	+	< Seuil		PLS		< Seuil		PLS	+	> Seuil
10-févr	PLN	+	> Seuil	03-juin	PLN	+	< Seuil	18-juil	PLN	+	< Seuil	25-nov	PLN		> Seuil
	PLS	+	> Seuil		PLS	+	< Seuil		PLS	+	< Seuil		PLS		> Seuil
				12-juin	PLN		< Seuil	22-juil	PLN		< Seuil	10-déc	PLN	+	> Seuil
					PLS		< Seuil		PLS		> Seuil		PLS	+	> Seuil
				17-juin	PLN	+	< Seuil	29-juil	PLN	+	> Seuil	17-déc	PLN		> Seuil
					PLS	+	> Seuil		PLS	+	< Seuil		PLS		> Seuil
				06-août	PLN		< Seuil	09-août	PLN	+	< Seuil	14-août	PLN	+	< Seuil
					PLS		< Seuil		PLS	+	> Seuil		PLS	+	< Seuil
				19-août	PLN	+	< Seuil	23-août	PLN		< Seuil	26-août	PLN		< Seuil
					PLS	+	> Seuil		PLS		> Seuil		PLS		< Seuil
				29-août	PLN	+	< Seuil	02-sept	PLN		< Seuil	12-sept	PLN		< Seuil
					PLS	+	> Seuil		PLS		< Seuil		PLS		< Seuil
				18-sept	PLN		< Seuil		PLN		< Seuil		PLN		< Seuil
					PLS		< Seuil		PLS		< Seuil		PLS		< Seuil

1.2.4.1 Préparation des échantillons

Les échantillons ont d'abord été conditionnés sur le terrain, ensuite l'ADN et l'ARN ont été co-extraits, amplifiés puis séquencés. Les réplicats de chaque échantillon ont été analysés séparément jusqu'à l'étape du séquençage.

Les échantillons d'eau prélevés dans un flacon en polyéthylène stérile ont été fixés dans un volume de RNAlater (protocole de préparation en Annexe 1). Ensuite 300 µl d'échantillon (eau + RNAlater) ont été filtrés à travers une membrane en polycarbonate de porosité 0,2 µm et de 47 mm de diamètre. Les filtres ont ensuite été conservés dans des tubes stériles de 1,5 ml puis stockés à -80°C. Les échantillons de sédiment ont été conservés dans des flacons de 15 ml puis plongés rapidement dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C.

1.2.4.2 Coextractions d'ADN et d'ARN dans les échantillons d'eau

○ Préparation des échantillons

La préparation des échantillons a été faite suivant le protocole élaboré par Hugoni et al., (2018). Les différentes étapes de lyse (thermique et chimique) sont les suivantes :

- 1- Avec des pinces Millipore préalablement nettoyées, sortir le filtre décongelé et le mettre dans un tube de 2 ml
- 2- Ajouter 425 µl de tampon de lyse (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, tris 25 mM à pH 8)
- 3- Homogénéiser
- 4- Faire 3 fois un passage azote liquide / 65°C pour le choc thermique
- 5- Ajouter 25 µl de Lysozyme 40 mg/mL (solution fraîche)
- 6- Incuber à 37°C pendant 45 min
- 7- Ajouter 8 µl de protéinase K 20 mg/ml et 26 µl de SDS 20 %
- 8- Incuber à 55°C pendant 2h
- 9- Récupérer la solution obtenue dans un nouveau tube de 2 ml
- 10- Préparer une solution de Béta-mercaptoéthanol avec du tampon RLT plus du kit QIAGEN (10 µl de Béta-mercaptoéthanol pour 1 ml de RLT)
- 11- Ajouter 500 µl de mix (Béta -mercaptoéthanol + tampon RLT) dans chaque tube
- 12- Le mélange ainsi obtenu contient les acides nucléiques, passer à l'extraction avec le kit AllPrep DNA/RNA

- *Co-extraction d'ADN et d'ARN avec le kit AllPrep DNA/RNA*

L'ADN génomique bactérien total a été extrait à l'aide du kit d'extraction AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) selon les instructions du fournisseur (Annexe 3).

- *Dosage au Nanodrop*

Après extraction, une mesure de la concentration et de la qualité des extraits d'ADN et d'ARN a été effectuée avec le NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. Un microlitre d'extrait d'acide nucléique a été déposé sur le socle de mesure puis les concentrations et les ratios ont été enregistrées avec le logiciel Nucleic acid Nanodrop 2000.

1.2.4.3 Extractions d'ADN et d'ARN dans les échantillons de sédiment

Dans le sédiment, les extractions d'ADN et d'ARN ont été réalisées à partir de 2 g d'échantillon de sédiment avec les kits RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kit et RNeasy® PowerSoil® DNA Elution de QIAGEN selon le protocole recommandé par le fournisseur (Annexe 4). Ensuite, une mesure de la concentration et de la qualité des extraits d'ADN et d'ARN a été effectuée comme décrite dans le paragraphe précédent.

1.2.4.4 RT-PCR sur les extractions d'ARN

- *Traitement DNase*

Un traitement DNase a été effectué sur chacun des échantillons d'ARN avec le Kit Ambion™ DNASE I (RNase-free) selon les étapes suivantes :

- 1- Dans un tube de 2 ml contenant 50 µl d'ARN extrait
- 2- Ajouter 4 µl de tampon 10X et 0,8 µl de DNase Ambion
- 3- Incuber pendant 30 minutes à 37°C
- 4- Ajouter dans chaque tube 4 µl de tampon d'inactivation (Inactivation Reagent)
- 5- Incuber à température ambiante pendant 5 minutes en vortexant les tubes toutes les minutes
- 6- Centrifuger pendant 1 minute et 30 secondes à 10000 g
- 7- Récupérer le surnageant, prélever 3 µl pour le dosage au NanoDrop
- 8- Conserver à -80°C dans des tubes de 1,5 ml.

○ **RT-PCR sur les extraits d'ARN**

Les échantillons d'ARN ont été ensuite rétro-transcrits pour obtenir de l'ADNc avec le Kit SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen) selon le protocole suivant :

- 1- Pour 40 µl d'ARN, ajouter 4 µl de tampon turbo 10X, 0,8 µl de DNase Ambion et 4 µl de tampon d'inactivation dans le tube placé dans de la glace.
- 2- Mélanger délicatement le contenu du tube
- 3- Incuber le tube à 25°C pendant 10 minutes suivi de 60 minutes à 42°C et enfin 5 minutes à 85°C.
- 5- Conserver l'échantillon à -20°C jusqu'à son utilisation.

1.2.4.5 Amplifications et purifications des acides nucléiques

Le gène codant pour l'ARNr 16S a été amplifié dans les échantillons d'ADN et d'ADNc avec par les amorces 357F et 926R spécifiques aux régions V3-V5 (2x300 bp) du gène codant pour l'ARNr 16S (tableau 16). Le mélange réactionnel est synthétisé sur le tableau 17.

Tableau 16 : Description des amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour l'ARNr 16S de la région V3-V57

Nom	Séquences
Adaptateurs	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5]
Adaptateurs	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7']
357F (Schuurman et al., 2004)	5' - CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3'
926R (Walters et al., 2015)	5' - CCG YCA ATT YMT TTR AGT TT- 3'

Tableau 17 : Synthèse des produits utilisés pour les réactions de PCR

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
5X HOT BIOAmp® Blend Master Mix ready to load (Biofidal)	4	1x
Primer Forward (sens)	0.6	10µM
Primer Reverse (anti-sens)	0.6	10µM
H2O	qsp 20	

Les réactions de PCR ont été réalisées avec un thermocycleur SensoQuest selon le programme d'amplification suivant : dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 3 min suivi de 35 cycles répétitifs de 45 secondes à 95°C, 45 secondes à 50°C et 1 minute 30 secondes à 72°C et enfin une dernière étape d'élongation à 72 °C pendant 5 minutes (Hugoni et al., 2018).

Les réactions d'amplification ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose TBE (1%).

La migration a été effectuée à 100 V pendant 45 minutes, suivie d'une révélation sous UV.

Les produits de PCR ont ensuite été purifiés avec des billes magnétiques SPRIselect (Beckman coulter) selon le protocole schématisé ci-après (Figure 20).

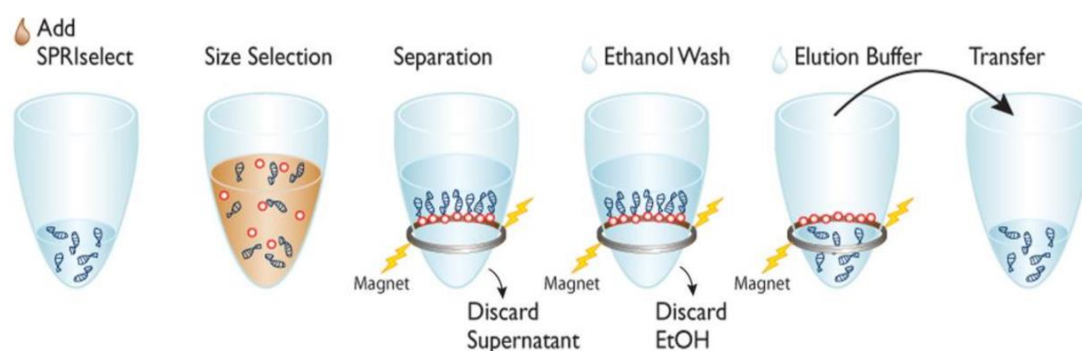


Figure 20 : Principe de purification des produits de PCR par des billes SPRIselect (protocole de Biofidal)

1.2.4.6 Barcoding du gène codant pour l'ARNr 16S

1.2.4.6.1 Séquençage d'ADN et d'ADNc des échantillons d'eau et de sédiment

Après purification, les triplicats de chaque échantillon ont été rassemblés en un seul échantillon. Ensuite, une seconde amplification (indexage, ajout des barcodes) et le séquençage Miseq ont été réalisés par la plateforme de séquençage Biofidal, (Vaulx-en-Velin, France – <http://www.biofidal.com>) par la méthode Miseq en Paired-End 2 x 300 bp dont le principe est le suivant (Figure 21) :

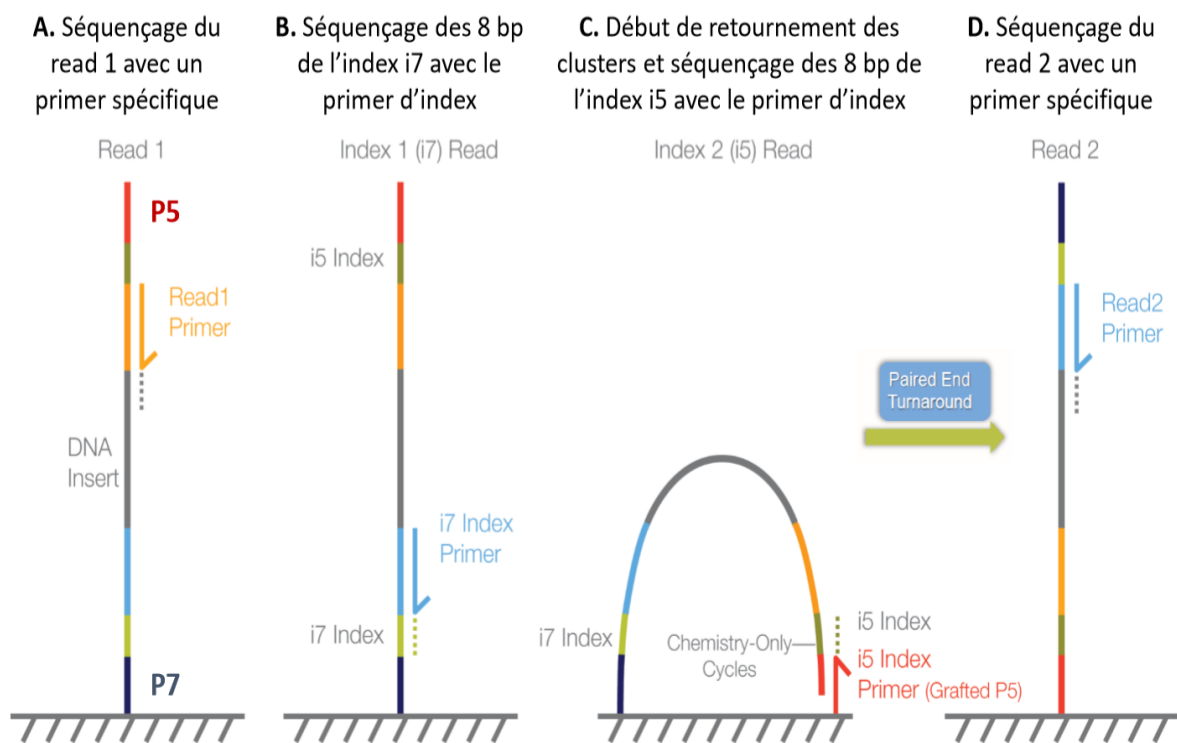


Figure 21 : Principe du séquençage MiSeq paired-end (protocole de Biofidal©)

1.2.4.6.2 Traitement des données du barcoding

- **Qualité des séquençage, définition des OTU et affiliation taxonomique**

Les données de séquençage (d'ARNr 16S) obtenues à partir des échantillons d'ADN et d'ARN sont transmises au format FASTQ. Ensuite des analyses bio-informatiques ont été réalisées avec le pipeline FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) (Escudie et al., 2018) développé par la plateforme Bioinformatique de Genotoul (Toulouse, France) pour nettoyer et effectuer l'assignation taxonomique des séquences. Les différentes étapes de l'analyse sont automatisées sur ce pipeline. D'abord un démultiplexage a été réalisé à partir des formats FASTQ des

séquences analysées. Ensuite, une analyse de la qualité des séquences a été effectuée avec l'outil FastQC (version 0.10.0, disponible sur le portail Galaxy, (Andrew, 2010; Yilmaz et al., 2014)) qui permet de générer un ensemble d'informations sur la qualité des données de séquençage. A partir de cette analyse, les séquences d'ARNr 16S ont été fusionnées en paires avec un maximum de 10% de mésappariements en utilisant FLASH (Magoc and Salzberg, 2011). Au total 3 102 253 séquences ont été obtenues à partir des ADN et des ADNc obtenus des 63 échantillons d'eau et des 28 échantillons de sédiment analysés. Ainsi, un *Preprocess* a été réalisé pour éliminer les singletons 2104272 séquences. Ensuite, 1 019 389 séquences ont été regroupées par clustering avec l'outil SWARM (Mahé et al., 2014) avant de supprimer les chimères à l'aide de VSEARCH (Rognes et al., 2016). Par la suite, 1 617 164 séquences ont été filtrées pour supprimer les séquences dont l'abondance était inférieure à 0.00005% (Bokulich et al., 2013). Pour finir, 584 874 séquences ont été obtenues pour effectuer l'assignation taxonomique des séquences sur la base de données SILVA version 138 (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014).

○ *Regroupement des OTU*

Ensuite les séquences des gènes 16S ont été regroupées sur la base d'un seuil d'identité de similarité de 97 % d'identité de comparaison entre les séquences. Ce regroupement (ou cluster) est appelé OTU (Operational Taxonomic Unit) et représente une unité taxonomique. Le cluster représente l'estimation la plus proche de l'espèce bactérienne biologique. Au total, 647 OTU ont été obtenus. Pour faciliter l'assignation taxonomique, nous avons adapté un pipeline pour identifier les unités taxonomiques opérationnelles (OTU) au niveau des espèces et pour construire une matrice de distance qui nous a permis de comparer l'abondance relative des OTU entre les types d'échantillons. L'affiliation taxonomique a été effectuée avec RDP Classifier (Cole et al., 2009; Wang et al., 2007) et Blastn (Camacho et al., 2009) sur la base de données 138 SILVA (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014). Les OTU affiliées aux chloroplastes et aux mitochondries ont été supprimées. Au total, 343 OTUs ont été annotées et utilisées dans les analyses des communautés microbiennes.

○ Richesse et abondance (evenness) bactériennes

La richesse correspond au nombre d'espèces différentes présentes dans la communauté. Nous avons compté le nombre d'OTU différent présents dans les différents types d'échantillons (eau et sédiment) et les différentes fractions (ADN et ADNc). Pour comparer l'abondance relative des OTUs, le nombre de séquences a été normalisé en rapportant les séquences de tous les échantillons au nombre de séquences le plus faible dans un échantillon donné. Ensuite, la richesse spécifique a été analysée par les courbes de raréfaction permettant d'estimer si la profondeur du séquençage a été suffisante pour l'analyse exhaustivement des espèces bactériennes dans tous les échantillons. L'index du Chao1 est l'estimateur de richesse spécifique maximale le plus couramment utilisé et permet d'estimer le nombre d'OTU non observés à partir du nombre d'OTU total et des OTU en faible abondance (singletons – 1 read, et doubletons – 2 reads) (Chao, 1984). L'*evenness* est une autre mesure de la diversité d'une communauté bactérienne qui détermine la régularité de la distribution des OTU au sein d'un échantillon. Ces analyses (la raréfaction, la richesse et la diversité bactérienne) ont été réalisées avec les packages phyloseq, Microbiome, Tydiverse, VEGAN du logiciel R, version 4.1.1. (R Development CoreTeam, 2010 ; McMurdie and Holmes, 2013 ; Verzani, 2015 ; Dixon, 2003).

1.3 Analyses statistiques

Dans cette étude, nous avons considéré qu'un échantillon était contaminé lorsque l'abondance d'au moins un des deux indicateurs fécaux était supérieure aux valeurs seuils de la réglementation européenne (*E. coli* > 1000 NPP/100 ml d'eau et entérocoques intestinaux > 370 NPP/100 ml d'eau). Vu que nous avons réalisé des triplicats d'échantillonnage, une moyenne a été calculée pour l'analyse des résultats de toutes les analyses. Des comparaisons ont été effectuées entre l'abondance des bactéries fécales (i) dans les différents sites pour chaque type d'échantillon (c'est-à-dire l'eau et les sédiments) et (ii) les échantillons d'eau et de sédiment de chaque site. Nous avons effectué des tests de corrélation de Pearson pour analyser la corrélation entre les paramètres biologiques en utilisant le package PerformanceAnalytics (Peterson, 2007) dans R v4.0.2 (R Core Team, 2020). De même, des tests de corrélation de Pearson ont été réalisés pour déterminer le lien entre l'abondance des bactéries fécales et les variables environnementales. Tous les tests réalisés dans cette étude ont été effectués avec un niveau de signification de 0,05. D'autres analyses statistiques ont été réalisées mais seront présentées plus en détail dans les chapitres présentant les résultats correspondants.

CHAPITRE 3 : DYNAMIQUE SPATIO-TEMPORELLE DES CONTAMINANTS FÉCAUX DANS LA BAIE D'AYTRÉ

Les premiers résultats de cette thèse portent sur l'analyse de **la dynamique spatio-temporelle de la contamination fécale de la baie d'Aytré**. Dans un premier sous-chapitre (temps, section), c'est essentiellement la dynamique saisonnière qui est abordée à travers les variations de la contamination et des paramètres physico-chimiques du milieu. Ce sous-chapitre s'appuie sur un article soumis dans *Marine Pollution Bulletin* intitulé "*Temporal variations in fecal indicators bacteria in bathing waters and sediments on a coastal ecosystem (Aytré Bay, Charente-Maritime, France)*". Cet article, soumis le 4 octobre 2021, a été accepté pour publication le 8 novembre 2021 sous réserve de corrections mineures.

Le second sous-chapitre aborde la dynamique spatiale et l'analyse de la répartition de la contamination dans la baie. L'analyse de la texture des sols de l'estran est d'abord abordée à l'échelle de la baie pour éclairer les analyses microbiologiques du sédiment qui suivent dans un second temps. Ces mesures sont ensuite rapprochées des analyses de la contamination fécale de l'eau en différents points de la baie pour identifier d'éventuelles correspondances spatiales. Cette dernière analyse, qui fait appel à l'utilisation d'un drone marin, est présentée sous forme d'un article intitulé "*Spatial distribution of fecal indicators in a semi-enclosed beach by utilizing marine drone*" qui sera soumis prochainement à la revue *Science of the Total Environment*.

1.1 Dynamique temporelle des contaminants fécaux dans les deux sites de baignade

Ce sous-chapitre présente la dynamique temporelle de l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques) dans la baie d'Aytré. L'analyse de la qualité microbiologique des eaux de baignade de cette baie depuis une trentaine d'années (Chapitre 1,VI.4.1) a montré un bruit de fond en bactéries fécales avec des pics de contaminations fréquents durant les périodes estivales.

1.1.1 Hypothèses et objectifs

Si la persistance interannuelle de la contamination semble avérée, la question de sa saisonnalité demande à être validée. Pour comprendre la présence de cette pollution durant l'été, nous avons analysé la qualité microbiologique des eaux de baignade durant une année afin de comparer la dynamique temporelle de l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale durant les différentes saisons. En plus de ce suivi annuel du niveau de contamination des eaux de baignade, une analyse de paramètres physico-chimiques (ammonium, nitrate, nitrite, silicate, phosphate, salinité, pH, oxygène dissous et carbone organique total) et climatiques (précipitations, température de l'eau, température de l'air et coefficient de marée) a été réalisée pour déterminer les effets éventuels de ces facteurs environnementaux sur la variation temporelle et la survie des microorganismes fécaux. En effet, comme tous les écosystèmes, les environnements marins sont influencés par la variation saisonnière de paramètres physico-chimiques et climatiques qui peuvent impacter la survie des microorganismes dans ces environnements comme présenté dans le chapitre 1 (IV.1.2). Ces deux analyses ont ainsi été réalisées pour répondre à la première hypothèse de cette étude concernant l'influence des paramètres physico-chimiques et climatiques sur la variation saisonnière de l'abondance des indicateurs de contamination fécale, afin de tenter d'expliquer les pics de contamination durant les saisons de baignade.

Ensuite, nous avons analysé les variations saisonnières de la qualité microbiologique du sédiment pour déterminer la possible contribution du type de substrat sur les variations du niveau de contamination des eaux dans les deux sites de baignade. Le sédiment constitue l'une

des principales sources diffuses des contaminations fécales des eaux de surface. En effet, les milieux intertidaux sont des environnements sablo-vaseux caractérisés par une forte accumulation de vases du fait de la faible intensité des vagues et des courants. Ces paramètres favorisent le dépôt et/ou l'adsorption des microorganismes fécaux dans les sédiments de certains écosystèmes aquatiques comme les lacs, les rivières. Ils peuvent donc être impliqués dans le niveau de contamination des milieux aquatiques abrités dans des baies. Comme la colonne d'eau, le sédiment est un compartiment microbien très dynamique qui est aussi influencé par les variations saisonnières des facteurs physico-chimiques et météorologiques ; ces derniers sont responsables de l'équilibre écologique des milieux aquatiques. Ainsi, une analyse de l'impact de la variation des paramètres physico-chimiques du sédiment a été réalisée pour comprendre le déterminisme des bactéries fécales dans ce compartiment marin.

Ces suivis ont été effectués aux différentes saisons sur les deux sites de baignade de la baie définies par l'ARS (le Platin Nord et le Platin Sud) pour décrire les différences de contaminations observées dans ces milieux.

1.1.2 Démarche expérimentale

Afin d'aborder la dimension saisonnière de la contamination, un échantillonnage d'eau et de sédiment a donc été réalisé dans les deux sites de baignade de la baie d'Aytré sur différentes dates de février 2019 à février 2020. Contrairement au suivi sanitaire des eaux de baignade (réglementation européenne), les prélèvements ont été effectués en triplicats sur chaque site. Au cours de l'échantillonnage, des paramètres physico-chimiques ont été mesurés et certains facteurs climatiques ont été obtenus à partir de la station de Météo France La Rochelle-Pallice. L'analyse de la qualité microbiologique des échantillons d'eau et de sédiment a été réalisée par la quantification de l'abondance des indicateurs de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques) ainsi que certaines variables environnementales comme la chlorophylle-*a*, les nutriments etc. (Figure 22). Les détails de ces expérimentations sont décrits dans le chapitre 2 (II).

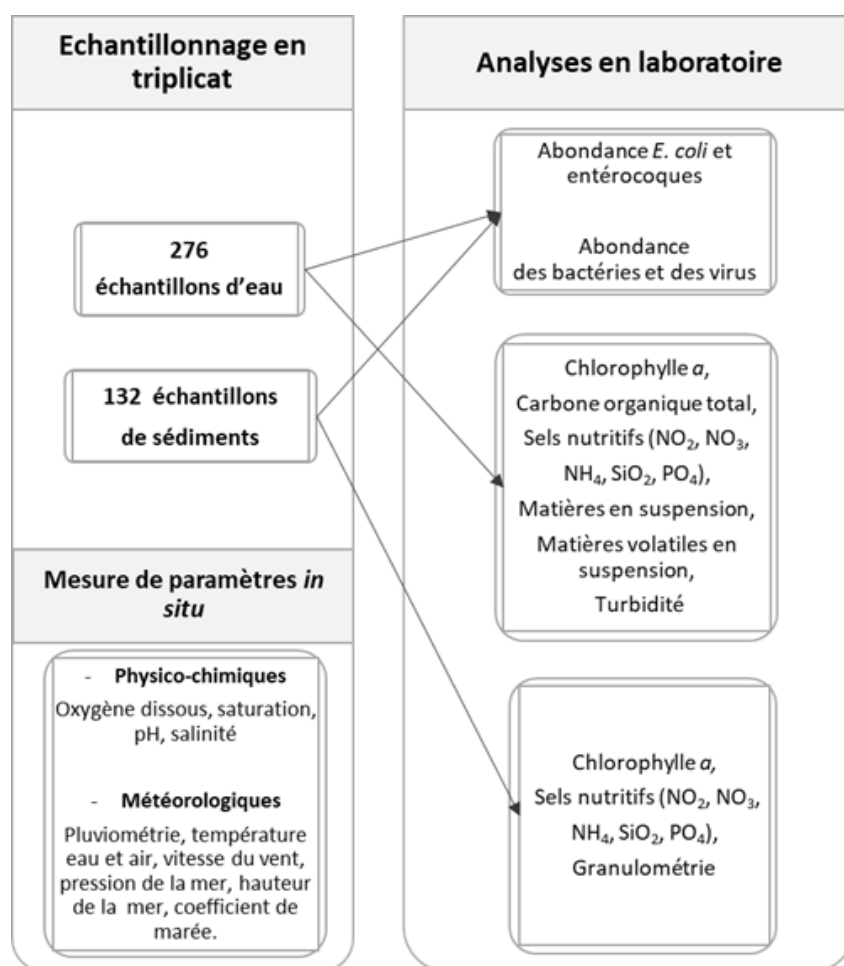


Figure 22 : Schémas de synthèse de l'analyse de la dynamique temporelle de la qualité microbiologique de l'eau et du sédiment de la baie d'Aytré avec les différents paramètres mesurés.

1.1.3 Résultats

Temporal variations in fecal indicators bacteria in bathing waters and sediments on a coastal ecosystem (Aytré Bay, Charente-Maritime, France)

NDIONE Méry¹, ORY Pascaline¹, AGION Tony², TREILLES Michaël³, VACHER Luc¹, SIMON-BOUHET Benoit⁴, LE BÉGUEC Maëlig¹, PINEAU Philippe¹, MONTANIÉ Hélène¹†, AGOGUÉ Hélène¹

¹Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS –La Rochelle Université, La Rochelle, France

²QUALYSE, Laboratoire d'analyses, La Rochelle, France

³QUALYSE, Laboratoire d'analyses, Champdeniers, France

⁴Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (CEBC), UMR 7372 CNRS –La Rochelle Université, Chizé, France

† Deceased

Abstract

Coastal ecosystems are popular environments for economic and recreational activities that may be exposed to fecal contamination. We present a one-year survey of the fecal indicator bacteria dynamics in the bathing water and beach sediment of Aytré Bay (Charente Maritime, France). First, we quantified the *Escherichia coli* and intestinal enterococci abundance, representing fecal indicator contamination, according to Bathing Water Directive (BWD, European Union 2006/7/CE). Then, we measured the total bacterial abundance and the environmental characteristics of the beach, which included chemical (ammonia, nitrate, nitrite, silicate, phosphate, salinity, pH, dissolved oxygen, and total organic carbon) and climatic (rainfall, temperature at water and sediment surface, air temperature and tidal coefficient) parameters. By sampling the water and the sediment at two sites in the beach, we showed that the fecal indicator bacteria (FIB) were occasionally higher than the regulatory threshold during winter, summer and fall. The “poor quality” of the bathing water at the two sampling sites was mainly due to high intestinal enterococci abundance. The FIB abundances were globally correlated between the two sampling sites and between the water and sediment samples in the North Platin site. We found negative significant correlations between FIB and water temperature and salinity, and positive significant correlations between FIB and rainfall, PO₄, NO₃, NO₂ and SiO₂ mainly in the water samples. The relationships between all parameters showed that the main environmental drivers in the water and sediment samples during summer and spring were water temperature and salinity, while in fall and winter; the main environmental drivers were rainfall and dissolved nutrients. These results suggested that FIB occurrence at the two bathing sites of the Aytré Bay had different temporal dynamics according to the seasons.

Key words: Bathing water, Coastal beaches, Microbiological quality, Fecal indicator bacteria, Environmental drivers, Seasonal variation.

1. Introduction

In the current context of climate change, the urbanization of coastal ecosystems and the anthropic pressure near these ecosystems can emphasize the microbiological quality degradation of these environments (Jeanneau et al., 2012; Kucuksegin et al., 2020). Fecal contamination in coastal environments increase risk of infections causing diseases such as ear or eye infections, gastroenteritis, or skin irritations (Bonilla et al., 2006; Heaney et al., 2012; Shuval, 2003; World Health Organization, 2003). Fecal pollution can come from various sources, such as industrial and wastewater treatment plants (WWTPs) discharges not connected to the sewer system, sanitary sewer problems, recreational activities (campgrounds) not connected to WWTPs, stormwater and agricultural runoffs (Gourmelon et al., 2010b, 2010a; Jeanneau et al., 2012; Savichtcheva et al., 2007). Presence of warm-blooded animals through agricultural and recreational activities through domestic animals such as poultry, horse and dog, or frequentation of these environments by wildlife such as birds can also contribute to the aquatic ecosystem's fecal contamination (Alderisio and DeLuca, 1999; Benskin et al., 2009; Mieszkin et al., 2009; Nguyen et al., 2018).

Preserving the ecological balance of these environments and ensuring the health and safety of their users are necessary to promote economic development and tourism (Barbier et al., 2011). European bathing water quality is monitored during summer periods following the Bathing Water Directive (BWD, European Union 2006/7/CE). The guidelines define two fecal indicator bacteria (FIB) as a basis for seawater classification: *Escherichia coli* and intestinal enterococci. Thus, bathing sites are classified in four categories depending on the concentration of these FIB in water, which indicates a public health risk related to swimming activities (EC, 2006).

The monitoring of the microbiological quality of recreational waters is generally carried out through water analysis, since health risks are linked to bathing activities (Cheung et al., 1990; Fleisher et al., 1998). However, many studies have demonstrated that coastal marine environments, which are turbid and rich in suspended particles, could promote the persistence of fecal bacteria in these environments by offering physical and chemical protection from biotic and abiotic stresses (Weiskerger et al., 2019). Indeed, mainly sediments constitute favorable habitats for fecal bacteria growth by protecting them from predators (Harwood et al., 2014; Whitman et al., 2014) and are considered as reservoir of FIB for the overlying waters through

resuspension by swell, wind or runoff (Beverdors and McLellan, 2007; Ishii et al., 2006; O'Mullan et al., 2019; Palmer et al., 2020; Whitman et al., 2006). In addition, FIB can associate with the natural microbial community of these ecosystems through dynamic interactions, becoming part of the endemic microbial community (Byappanahalli et al., 2012; Farhan Mohammad Khan, 2019; Rochelle-Newall et al., 2015). The presence of FIB in seawater and sediment can disrupt the balance of microbial ecological functions through a complex set of activities such as competition for nutrients, predation and viral lysis impacts (Bomo et al., 2004; Feng et al., 2018). In intertidal zones, FIB dynamics are even more complicated by the extensive benthic-pelagic coupling (Nunnally, 2018; O'Mullan et al., 2019; Saint-béat, 2012). Thus, integrating the study of sediment and environmental factors to monitor intertidal bathing seawater is essential to fully understand the dynamics of fecal contaminants.

Ideal fecal indicator bacteria (FIB) should be present when pathogens are present, absent in uncontaminated samples and unable to multiply in the environment (Bitton, 2005). However, in aquatic ecosystems, environmental parameters can directly and indirectly influence FIB concentrations through a variety of mechanisms, including abiotic (salinity, dissolved oxygen, nutrients, marine currents), biotic (interactions with other microorganisms in the environment) and meteorological (precipitation, tidal cycle) parameters (Ackerman and Weisberg, 2003; Boehm et al., 2003; Byappanahalli et al., 2012; Farhan Mohammad Khan, 2019; González-Fernández et al., 2021; Laureano-rosario et al., 2017). Intertidal ecosystems are subject to tidal changes and to seasonal variations (Orvain et al., 2007) that may drive the seasonal dynamics of FIB in these environments. Although, relationships between FIB and environmental conditions are location-specific (Aragonés et al., 2016; Weiskerger et al., 2019). Few studies have analyzed the seasonal dynamics of fecal contaminants by including different physical compartments of these ecosystems as well as the seasonal variations of the abiotic and biotic parameters. To date, the environmental conditions associated with poor microbial water quality and studies are lacking in the intertidal ecosystems.

The aim of this work was to examine the seasonal dynamics of the microbiological quality of a beach located in the bay of Ayré (NE Atlantic Coast, France). The bay is a semi-enclosed beach with two main bathing sites: North Platin and South Platin, where routine analyses of the microbiological bathing water quality are performed. Historical monitoring has shown that the levels of fecal contamination in the two sites can be important, suggesting different sources of pollution (ASCONIT, 2017). In 2012, in accordance with the *Bathing Water Directive BWD*, (European Union 2006/7/CE), the lowering of the thresholds for the regulated

parameters has led to a review of the bathing water profile of Aytré beach whose water is then classified as "poor quality" for several successive years leading to its swimming ban since the summer of 2018. Since then, the pollution has remained and despite the few analyses that were performed, its origin has not yet been determined. Moreover, survey of sediment FIB levels has not been conducted in the bay of Aytré despite the chronic fecal contamination and the associated impact on water quality. Since the bay of Aytré is a very popular zone for various recreational activities, tourism, and shellfish farming, it is essential to understand the dynamic and the distribution of the fecal contamination in the benthic and pelagic compartments to explain and identify the origin of this pollution.

A one-year survey was carried out to characterize the level of the microbiological pollution in the two bathing zones of the bay, focusing on the water column and sediment. This monitoring allowed quantification of FIB abundance over seasons. The measurements of several environmental variables, such as biological (total bacterial abundance, chlorophyll-*a* concentration), physico-chemical (temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, nutrients) and meteorological (rainfall, tidal coefficient) parameters, have been performed for a comprehensive and relevant analysis of the seasonal dynamics of the fecal contamination. The main purposes of this study were (1) to describe the annual dynamic of the FIB groups in both compartments (i.e., water column and sediment); (2) to investigate the spatial FIB distribution and the possible connection of FIB in the water and sediment by kinetics analysis; and (3) to identify the relative contributions of environmental variables as possible drivers of FIB dynamics.

2. Material and methods

2.1. Study area

The study was undertaken on Aytré Bay located along the French Atlantic coast in the municipality of Aytré that has 170,000 inhabitants (Figure 1). This municipality is located in the south of La Rochelle city, which has one of the largest marinas in Europe with approximately 5,000 berths and a large wastewater treatment plant. This beach is a bay sheltered by two large islands: the Ré Island in the NW and the Oléron Island in the SW (Figure 1). These islands draw a strait protecting the bay against strong currents and waves. A vast area of marshland borders the bay to the east with outlets for rainwater, marshland, and oyster farming channels that flow into the bay. In addition, oyster farming activities are carried out around this bay with oyster beds located off the bay, oyster beds and feeding stations located north and south of the beach. Aytré Bay is one of the largest sandy-muddy beaches in this French Atlantic coast with a length of 1.8 km and a foreshore of 2.5 km², which is exposed to the air at low tide up to 1.5 km on a very gentle slope (ASCONIT, 2017). Concerning bathing activities, two main sites located at North Platin and South Platin, have been identified to carry out water quality analysis (Figure 1). The North Platin is very popular for swimming activities while the South Platin is more popular for water sports. Before the bathing prohibition, the beach had an attendance conventionally reaching approximately 500 to 1000 people per day during summer distributed around the two sampling points (L. Vacher, personal communication). Since the permanent closure to bathing, attendance has declined but remains notable, and some people continue to swim despite the ban.

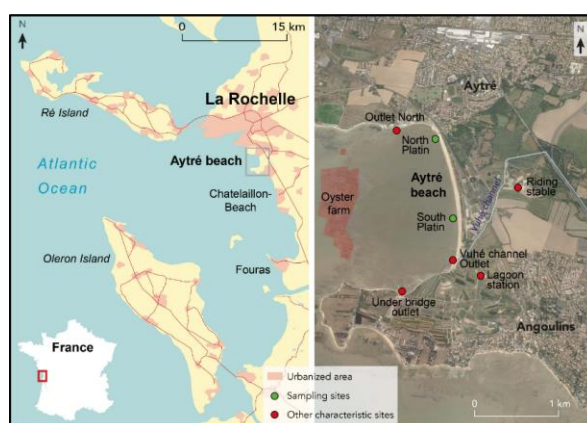


Figure 1: Location of the Bay of Aytré and various sites characteristic of human activities (red dots). The green dots indicate the sampling sites: North Platin and South Platin.

2.2. Sampling

2.2.1. Sampling frequency

Sampling campaigns were carried out on the two bathing sites defined by the ARS: the North Platin (46°07'30"N, 1°07'38"W) and the South Platin (46°06'58"N, 1°07'28"W) from February 2019 to February 2020 (Figure 1). As recommended by the 2006 European directive, sampling was performed 30 centimeters below the surface water at least one meter deep (Parlement européen, 2006). Sampling was carried out as follows: in winter, there were 2 samples per month and from April to November except for July and August, 3 to 4 samples per month were collected with a biweekly sampling scheme (Supplementary Information Table 1). Sediment sampling was added to the annual monitoring of the water column at low tide before water sampling. The first 5 centimeters of the surface sediment was collected with 15-cm diameter cores. Sampling dates and hours were chosen according to tidal coefficients ranging from 45 to 107. Approximately 5.5 L of water and 1.5 kg of sediment were collected in sterile containers. Each sampling was carried out in triplicate, with approximately 5 minutes between replicates.

2.2.2. Abiotic parameters

During water sampling, *in situ* parameters such as temperature (T°C), salinity (psu), pH and oxygen concentration ([dO₂ (mg/l)]) were measured with multiparametric sensors (Cond 3110, TetraCon 325, WTW, Germany). During sediment sampling, the same parameters were measured in the water at the sediment surface with the same multiparametric sensors used for water samples. The Météo France at La Rochelle - La Pallice meteorological station provided hourly climatic data, including the tide coefficient, seawater temperature, air temperature, wind speed, and rainfall data.

2.3. Analyses

2.3.1. Water samples

2.3.1.1. Enumeration of fecal indicator bacteria

E. coli and intestinal enterococci concentrations were obtained by the standard microplate method: NF EN ISO 9308-3 for *E. coli* and NF EN ISO 7899-1 for enterococci (French Association for Standardization, 1999; International Organisation for Standardisation, 1999) with a detection limit of 15 MPN/100 ml of water.

2.3.1.2. Enumeration of total bacterial abundance

The total bacterial abundance was quantified by flow cytometry. Water samples were fixed with glutaraldehyde 0.25% and poloxamer 0.01% solutions. Then samples were frozen in liquid

nitrogen and kept at -80°C until analysis. The analysis was performed with a FACS CantoII flow cytometer according to the method described in Marie et al. (1999).

2.3.1.3. Nutrients and chlorophyll-*a* analyses

The concentrations of total organic carbon [TOC (mg/l)] (European Committee for Standardization, 1997), total suspended solids [TSS (mg/l)] and volatile suspended solids [VSS (mg/l)] were quantified by gravimetry as described by the standard method (International Organisation for Standardisation, 2005). The concentrations of dissolved inorganic nutrients such as ammonia [NH₄ (μmol/l)], nitrate [NO₃ (μmol/l)], nitrite [NO₂ (μmol/l)], silicate [SiO₂ (μmol/l)], and phosphate [PO₄ (μmol/l)] were measured by photometric detection as described by the standard method (International Organisation for Standardisation, 2013). The chlorophyll-*a* concentration (μmol/l) was measured by fluorimetry (640 nm, Turner TD 700, Turner Designs, USA) according to Lorenzen's (1966).

2.3.2. Sediment samples

2.3.2.1. Enumeration of fecal indicator bacteria

Ten grams of wet sediment was diluted in 90 ml of tryptone salt and tween solution (2 %). The suspension was homogenized for 15 min at 300-400 tr/mn with a magnetic stirrer (VARIOMAG Electronicrührer Poly 15, No 90750) to dislodge the bacteria from sediment particles. After 1 minute of settling, the supernatant was collected for quantification of fecal bacteria. *E. coli* quantification was performed as water analysis by standard microplate methods: XP X33-019 (French Association for Standardization, 2004). For enterococci, a serial dilution (Stock solution, 1:10, 1:100) was carried out and then the quantification was performed by standard microplate methods NF EN ISO 7899-1 (International Organisation for Standardisation, 1999).

2.3.2.2. Enumeration of total bacterial abundance

Prokaryotic abundance was evaluated by flow cytometry after sample fixation and cell extraction as described by Lavergne et al. (2014).

2.3.2.3. Nutrients and chlorophyll-*a* analyses

The TOC (mg/l) was measured by spectrometry (International Organisation for Standardisation, 1988), and dry matter content was measured by gravimetry as described by the standard method (International Organisation for Standardisation, 1993). The concentrations of dissolved inorganic nutrients were quantified from the pore water of the sediment recovered after centrifugation at 3000 rcf for 20 minutes at 8°C. For silicate analysis, the pore water was stored at 4°C. For phosphates, nitrates, nitrites, and ammonia analysis, the pore water was filtered with

a GF/C filter and then stored at -20°C . Nutrient concentrations were quantified with an autoanalyzer (Seal Analytical, Norderstedt, Germany) equipped with an XY-2 sampler according to the method described by Aminot and K  rouel (2007). The chlorophyll-*a* concentration ($\mu\text{g/l}$) was quantified by fluorimetry (640 nm, Turner TD 700, Turner Designs, USA) according to Lorenzen (1966). The mean grain size was measured by laser granulometry (Mastersizer, 2000; Malvern Instruments, U.K.) and evaluated using the GRADISTAT program as outlined by Folk and Ward (1957). Sediment textural groups were defined through the relative abundance (% volume) of mud (for clay and silt with diameter $< 60 \mu\text{m}$) and sand (diameter between 63 and 2000 μm) according to the Udden-Wentworth scale (Blott and Pye, 1986).

2.4. Statistical analyses

In our analysis, we considered a sample to be contaminated when the abundance of at least one of the two fecal indicator contaminants was higher than the European standard regulatory threshold values (*E. coli* > 1000 MPP/100 ml water and intestinal enterococci > 370 MPP/100 ml water). To compare the abundance of FIB between (i) the two sites for each sample type (*i.e.*, water and sediment) and (ii) the water and sediment samples in each site, we performed Pearson correlation tests using the *PerformanceAnalytics* package (Peterson, 2007) in R v4.0.2 (R Core Team, 2020). Similarly, Pearson correlation tests were performed to determine the link between FIB abundance and environmental variables. The analysis of the temporal dynamics of FIB over the survey period, was conducted using a kinetic approach with the R package *Slider* (Ferreira et al., 2018). Here, for both the *E. coli* and intestinal enterococci datasets, Pearson correlations were computed along a sliding window of 5 consecutive sampling dates, between either (i) the abundance in two sites, or (ii) the abundance in water and sediment samples. We chose to analyze sliding windows over five consecutive sampling dates to obtain at least a bimonthly dynamic. All tests were performed with a significance level of 0.05. To analyze the relationships between the FIB types and environmental data, principal component analysis (PCA) was performed for water and sediment samples at each sampling site using XLSTATS version 2021.1.

3. Results

3.1. Water samples analyses

3.1.1. *E. coli* and intestinal enterococci abundance in the North Platin and the South Platin sites

At each site, 46 water samples were collected in triplicates. In the North Platin site, the average abundance of *E. coli* in water samples over the year ranged from 0.0 to $1.91 \pm 0.92 \times 10^3$ MPN/100 ml (Figure 2A). The abundance of *E. coli* was above the regulatory threshold (1000 MPN/100 ml of water) for three samples, *i.e.*, one sample per season except in spring. The average abundance of intestinal enterococci over the year ranged from 0.0 to $1.26 \pm 0.41 \times 10^4$ MPN/100 ml (Figure 2C). The abundance of intestinal enterococci was above the regulatory threshold (370 MPN/100 ml of water) for 11 samples out of 46, *i.e.*, 4 in summer, 4 in autumn and 3 in winter. The two FIB types did not exceed the regulatory threshold during spring. In the South Platin site, the average abundance of *E. coli* over the year varied from 0.0 to $1.36 \pm 0.18 \times 10^4$ MPN/100 ml (Figure 2B). In South Platin, the *E. coli* abundance was above the regulatory threshold for 3 different days compared to the North Platin, *i.e.*, one sample per season except in spring. The average abundance of intestinal enterococci over the year ranged from 0.0 to $1.63 \pm 0.25 \times 10^4$ MPN/100 ml (Figure 2D). Intestinal enterococci abundance was above the regulatory threshold for 14 days, *i.e.*, 1 in spring, 5 in summer, 5 in autumn and 3 in winter. On average, for both sites, the total bacterial abundance ranged from $2.19 \pm 0.03 \times 10^5$ to $3.73 \pm 0.30 \times 10^6$ cells/ml (Supplementary Information Figure 1).

The global correlation of *E. coli* abundance performed with the Pearson test revealed a significant positive correlation between the North and South Platin sites ($p < 0.001$). The same correlations were noted for intestinal enterococci abundance ($p < 0.001$) at the two sites. In addition to this correlation, the temporal dynamics of FIB abundance were analyzed along a sliding window of 5 consecutive sampling dates during the survey period at the two sites. This correlation (*i.e.*, North and South Platin sites) showed positive correlations with *E. coli* abundances in late winter, spring and autumn. During summer and early winter, *E. coli* abundances followed different trends between the North and the South Platin sites (Figure 3A). In the two sampling sites, the intestinal enterococci abundances were highly correlated in the winter and autumn periods between the two sampling sites, in contrast to the spring and summer periods where opposite trends were observed (Figure 3B).

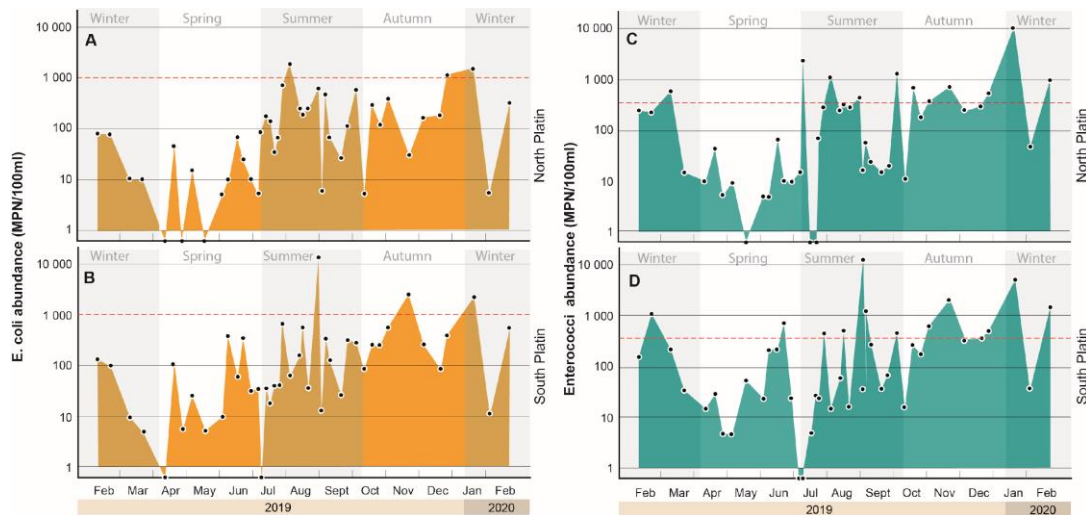


Figure 2: Annual variation in FIB abundances at the two sampling sites. A: *E. coli* abundance in water samples in North Platin. B: *E. coli* abundance in water samples in South Platin. C: Intestinal enterococci abundance in water samples in the North Platin. D: Intestinal enterococci abundance in water samples in South Platin. The black dots represent the average of the triplicate samples for each date, and the red dashed line indicate the European directive threshold for *E. coli* < 1000 MPN/100 ml and intestinal enterococci < 370 MPN/100 ml (MPN: most probable number).

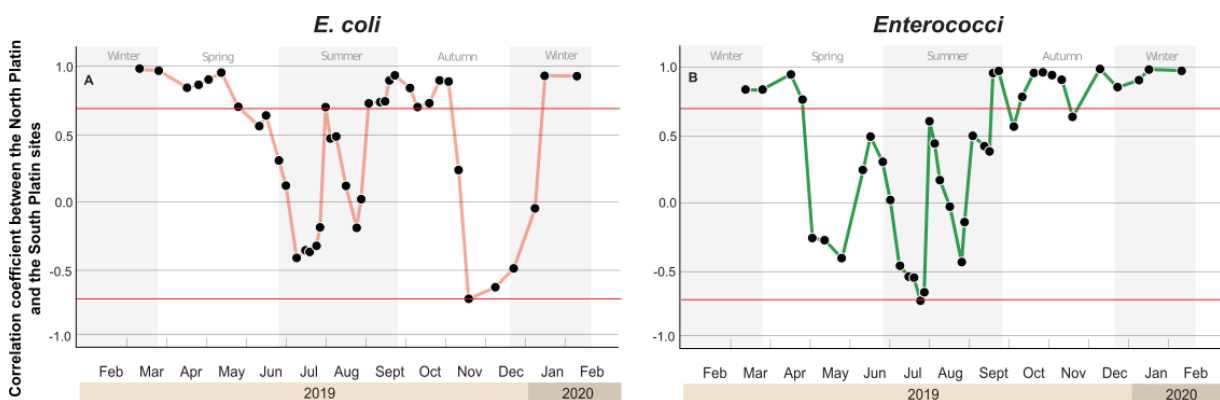


Figure 3 : Correlation coefficients (Pearson) of water samples for the abundance of FIB between the North and South Platin sites, over a sliding window of 5 consecutive sampling dates. A: Correlation coefficients for *E. coli* between the two sites. B: Correlation coefficients for intestinal enterococci between the two sites. The two red horizontal lines indicate thresholds for strong positive (> 0.7) and negative (< -0.7) correlations.

3.1.2. Correlations between FIB abundance and environmental parameters

The seasonal variation of the physico-chemical parameters of the environment is represented in the Supplementary Information (Figure 1 and Table 2). *E. coli* abundance in the North Platin was positively correlated with the NO_3 ($p < 0.05$), SiO_2 , and NH_4 ($p < 0.01$) concentrations and negatively correlated with salinity ($p < 0.05$). At this site, the abundance of intestinal enterococci was weakly correlated with VSS ($p < 0.05$). There was a weak positive correlation

between the 12-hours accumulated rainfall before sampling and the *E. coli* abundance ($p < 0.05$) (Pearson correlation test, Table 1).

In the South Platin site, there was a high positive correlation between the FIB abundance and PO_4 , NO_3 , NO_2 , and SiO_2 concentrations ($p < 0.01$, $p < 0.001$). Water temperature was negatively correlated with both FIB types ($p < 0.01$). Salinity was negatively correlated with intestinal enterococci abundance ($p < 0.001$) and was positively correlated with *E. coli* abundance ($p < 0.05$). In the North Platin, total bacterial abundance was negatively correlated with the *E. coli* ($p < 0.05$) and intestinal enterococci ($p < 0.05$) abundances. As in the North Platin, intestinal enterococci in the South Platin were weakly correlated with VSS ($p < 0.05$). There was a strong positive correlation between FIB abundance and 12-hours and 24-hours accumulated rainfall before sampling ($p < 0.001$, $p < 0.05$, respectively). Total bacterial abundance in the South Platin site was negatively correlated with both FIB abundance: *E. coli* ($p < 0.05$) and intestinal enterococci ($p < 0.01$) (Pearson correlation test, Supplementary Information Table 1).

Table 1: Pearson correlations in water between a set of environmental variables and the logarithm of the abundance of *E. coli* and intestinal enterococci, in the North and South Platin sites. Environmental variables: water temperature (Water temp), air temperature (Air temp), salinity, dissolved oxygen concentration (dO₂), pH, phosphorous concentration (PO₄), nitrite concentration (NO₂), nitrate concentration (NO₃), ammonium concentration (NH₄), silicate concentration (SiO₂), total organic carbon (TOC), total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS), 12-hours cumulated rainfall (12-hours rainfall) and 24-hours cumulated rainfall (24-hours rainfall), total bacteria abundance (Total bacteria), and chlorophyll-a concentration (Chloro a). Asterisks indicate a correlation significantly different from 0 (*: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001).

Variables	North Platin		South Platin	
	<i>E. coli</i>	Intestinal Enterococci	<i>E. coli</i>	Intestinal Enterococci
Water temp	-0.02	0.01	-0.26**	-0.28**
Air temp	0.05	0.14	0.09	-0.24
Salinity	-0.21 *	0.01	0.22*	-0.31***
dO₂	0.05	0.08	0.10	0.01
pH	0.00	0.00	-0.19*	0.09
PO₄	0.00	0.09	0.26**	0.32***
NO₂	0.17	0.15	0.31***	0.29***
NO₃	0.27 **	0.09	0.28**	0.45***
NH₄	0.19 *	0.11	0.07	0.73
SiO₂	0.28 **	0.13	0.41***	0.47***
TOC	0.15	0.08	0.0	0.12
TSS	0.05	0.14	0.12	0.17
VSS	0.09	0.20*	0.12	0.18*
12-hours rainfall	0.17*	-0.00	0.36***	0.34***
24-hours rainfall	-0.02	0.00	0.21*	0.18*
Total bacteria	-0.19*	-0.24**	-0.24*	-0.29**

3.2. Sediment samples analyses

3.2.1. *E. coli* and intestinal enterococci abundance in the North Platin and South Platin sites

For sediment, 22 samples were collected in triplicates at each site. In the North Platin site, the average abundance of *E. coli* over the year varied from 0.0 to $0.76 \pm 1 \times 10^3$ MPN/10 g sediment (Figure 4A). The average abundance of intestinal enterococci varied from $4.77 \pm 1.62 \times 10^1$ to $7.95 \pm 4.51 \times 10^2$ MPN/10 g of sediment (Figure 4C). In the South Platin site, the average abundance of *E. coli* varied from $7.67 \pm 4.04 \times 10^1$ to $1.23 \pm 0.46 \times 10^2$ MPN/10 g sediment (Figure 4B). The mean abundance of intestinal enterococci varied from $3.93 \pm 1.01 \times 10^1$ to $0.81 \pm 1.02 \times 10^3$ MPN/10 g sediment (Figure 4D). At both sites, the abundance of intestinal enterococci was higher than the abundance of *E. coli*. The average abundance of total bacteria ranged from $1.44 \pm 0.1 \times 10^9$ to $1.85 \pm 0.5 \times 10^{10}$ cells/g at both sites (Supplementary Information Figure 2).

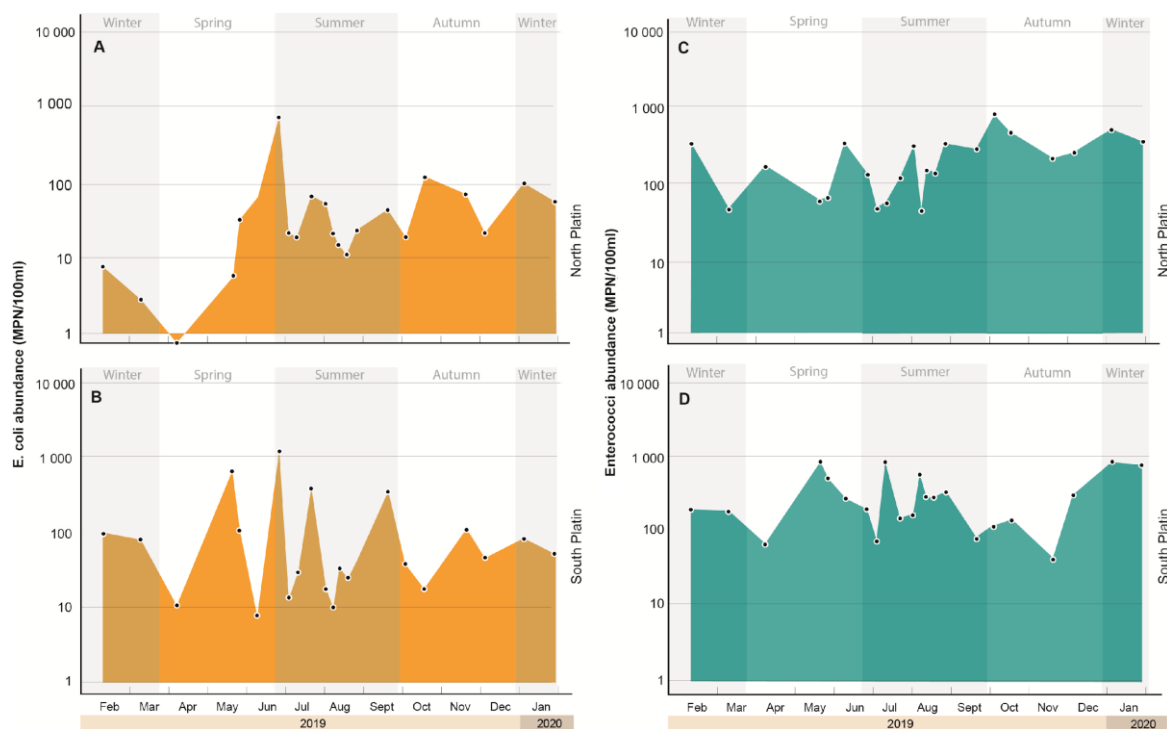


Figure 4: Annual variation in FIB abundances in the two sampling sites. A: *E. coli* abundance in sediment samples in North Platin. B: *E. coli* abundance in sediment samples in South Platin. C: Intestinal enterococci abundance in sediment samples in North Platin. D: Intestinal enterococci abundance in sediment samples in South Platin. The black dots represent the average of the triplicate samples for each date (MPN: most probable number).

The global correlation of FIB abundance over the year in the North and the South Platin sites performed by Pearson's test showed no significant correlation between the *E. coli* abundances ($p > 0.05$) at the two sampling sites. The intestinal enterococci abundances were also uncorrelated between the two sites ($p > 0.05$). Moreover, the temporal dynamics of FIB abundance between the North and South Platin sites performed along a sliding window of 5 consecutive sampling dates showed that the *E. coli* abundances between the two sampling sites were generally uncorrelated except in mid-summer (Figure 5A). The intestinal enterococci abundances were also uncorrelated between the two sampling sites and followed opposite trends in winter, spring, summer and autumn (Figure 5B).

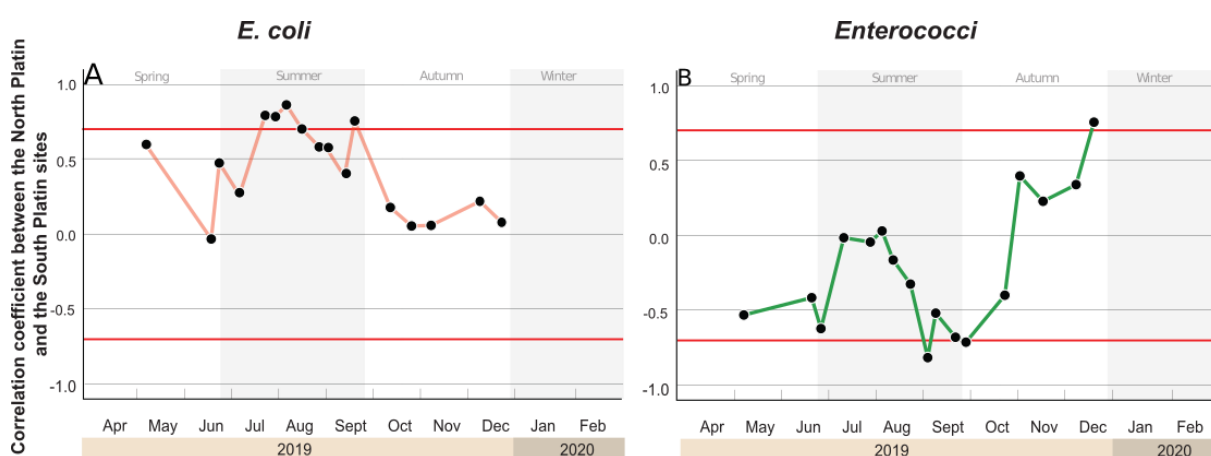


Figure 5: Correlation coefficients (Pearson) of sediment samples for the abundance of FIB between the North and South Platin sites, over a sliding window of 5 consecutive sampling dates. A: Correlation coefficients for *E. coli* between the two sites. B: Correlation coefficients for intestinal enterococci between the two sites. The two red horizontal lines indicate thresholds for strong positive (> 0.7) and negative (< -0.7) correlations.

3.2.2. Correlations between FIB abundance and environmental parameters

The seasonal variation of the physico-chemical parameters of the environment is represented in Supplementary Information (Figure 2 and Table 3). In the North Platin site, the *E. coli* abundance was negatively correlated with water temperature at the sediment surface ($p < 0.01$) and with pH ($p < 0.05$). The intestinal enterococci abundance was positively correlated with NO_2 ($p < 0.05$) and negatively correlated with sediment particle size ($p < 0.05$). In the South Platin site, the *E. coli* abundance was negatively correlated with surface sediment temperature, as in the North Platin site ($p < 0.01$) (Pearson correlation test, Table 2).

3.3. Relationship between FIB abundance in water and sediment samples at each site

In the North Platin site, the relationship between both FIB (*E. coli* and intestinal enterococci) abundances in water and sediment samples were correlated positively (Figure 6A). In the North

Platin site, the relationship between both FIB (*E. coli* and intestinal enterococci) abundances in water and sediment samples were not correlated. In water, FIB abundances ranged from 0.0 to 1×10^4 MPN/100 ml, while their concentrations in sediment were less than 1×10^3 MPN/10 g (Figure 6B). The Pearson correlation between water and sediment samples was only significant and positive for the North Platin site for both *E. coli* ($p < 0.05$) and intestinal enterococci ($p < 0.01$).

Table 2 : Pearson correlations in sediment between a set of environmental variables and the logarithm of the abundance of *E. coli* and intestinal enterococci, in the North and South Platin sites. Environmental variables: water temperature at the sediment surface (WS temp), air temperature (Air temp), salinity, pH, phosphorous concentration (PO₄), nitrite concentration (NO₂), nitrate concentration (NO₃), ammonium concentration (NH₄), silicate concentration (SiO₂), total organic carbon (TOC), 12-hours cumulated rainfall (12-hours rainfall) and 24-hours cumulated rainfall (24-hours rainfall), total bacteria abundance (Total Bacteria), chlorophyll-a concentration (Chloro a) and particles size. Asterisks indicate a correlation significantly different from 0 (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Variables	North Platin		South Platin	
	<i>E. coli</i>	Intestinal enterococci	<i>E. coli</i>	Intestinal enterococci
WS temp	-0.34**	-0.19	-0.33**	0.10
Air temp	0.28*	-0.24	-0.02	-0.00
Salinity	-0.17	-0.15	0.01	0.23
pH	-0.32*	-0.14	-0.07	-0.00
PO₄	0.17	-0.17	0.02	-0.14
NO₂	0.01	0.25*	-0.03	0.20
NO₃	0.01	0.09	0.03	0.09
NH₄	0.01	0.06	0.16	-0.09
SiO₂	0.14	-0.14	0.16	0.00
TOC	0.05	0.10	0.00	0.17
12-hours rainfall	-0.03	-0.10	0.10	-0.22
24-hours rainfall	-0.06	0.02	0.14	-0.22
Total bacteria	0.13	-0.15	0.23	-0.14
Chloro a	0.07	0.01	-0.10	0.21
Particles size	-0.09	-0.33*	0.15	0.02

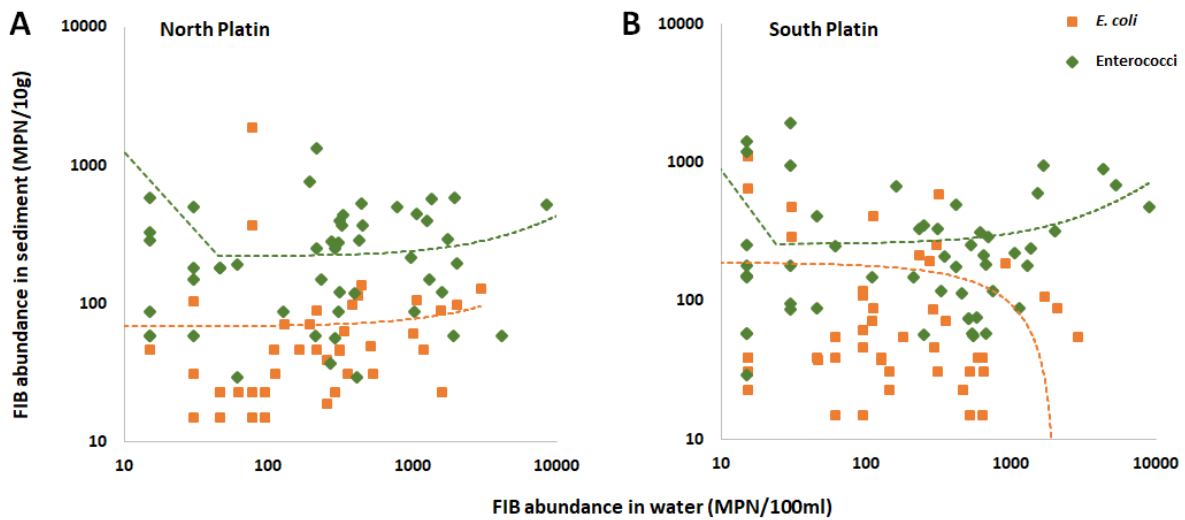


Figure 6: Relationships between FIB: *E. coli* (in orange) and enterococci (in green) concentrations in water and sediment samples. A: Relationships between FIB in North Platin: *E. coli* ($r = 0.48$) and enterococci ($r = 0.55$). B: Relationships between FIB in South Platin: *E. coli* ($r = -0.32$) and enterococci ($r = 0.10$). The orange and green dashed lines represent the correlation trend curves for *E. coli* and Enterococci respectively between sediment and water.

3.3. Relationships between FIB abundance and environmental factors

To summarize the relationship between FIB abundance and environmental parameters, PCA was applied with 18 biotic and abiotic variables for water samples (Figure 7). The PCA revealed clear clustering along mainly the primary (Axis 1) and secondary (Axis 2) axes, explaining a total of 50.1% and 47.85% of the variance observed in the North and South Platin sites, respectively. The PCA loading plots showed the relationship between biotic and abiotic parameters in the North Platin (Figure 7A) and in the South Platin (Figure 7B) sites. At both sites, FIB were positively associated with dissolved nutrients and accumulated rainfall data and negatively associated with salinity, water and air temperature.

For sediment samples, PCA was performed with 14 biotic and abiotic variables (Figure 7). The PCA revealed clear clustering along mainly the primary (Axis 1) and secondary (Axis 2) axes, explaining a total of 57.67% and 52.55% of the variance in the North and South Platin sites, respectively. The relationship between biotic and abiotic parameters in the North Platin (Figure 7C) and in the South Platin (Figure 7D) showed that the two FIB were positively associated with NO_2 , NO_3 , and accumulated rainfall and negatively associated with salinity, NH_4 , SiO_2 , water temperature at the sediment surface and air temperature.

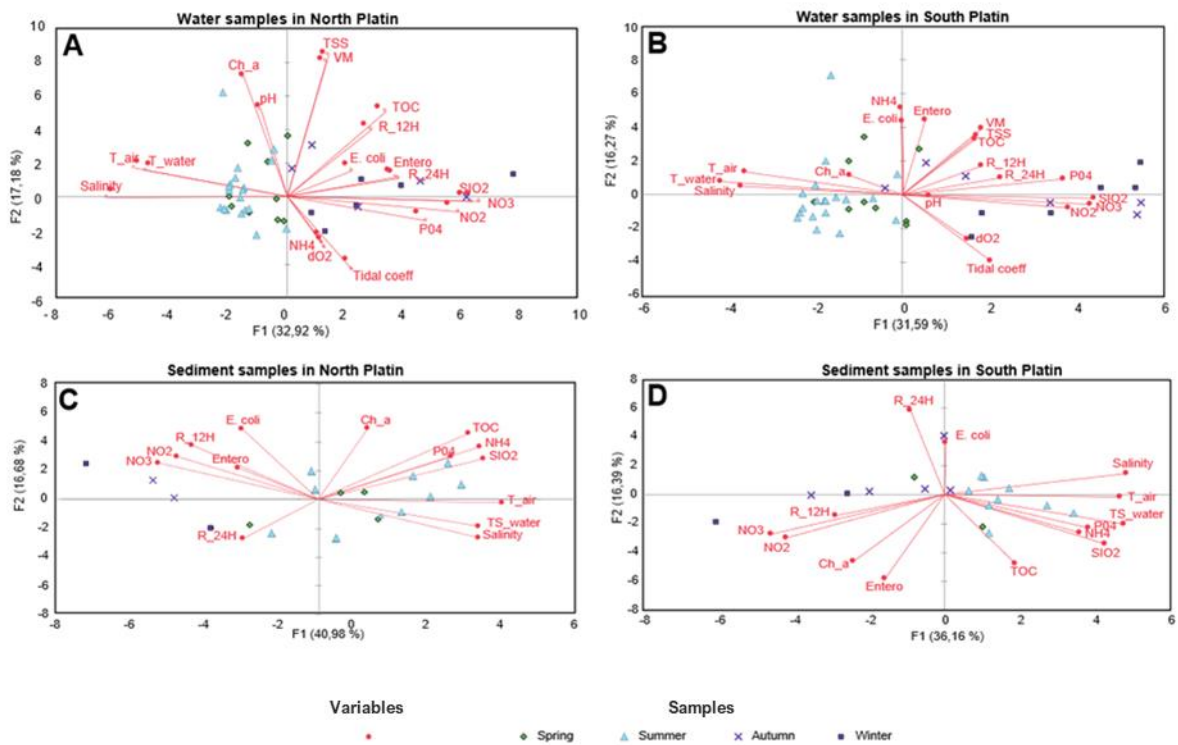


Figure 7 : Principal component analysis (PCA) of the microbial, physico-chemical and climatic data for water samples in North Platin (A) and South Platin (B), and for sediment samples in North Platin (C) and South Platin (D). The environmental parameters are indicated in red. The samples from spring are lozenges, samples from summer are triangles, samples from autumn are crosses, and samples from winter are squares. *E. coli* (*Escherichia coli*), Entero (intestinal enterococci), water temperature (T_water), water temperature at the sediment surface (TS_water), air temperature (T_air), salinity, dissolved oxygen concentration (dO₂), pH, phosphorous concentration (PO₄), nitrite concentration (NO₂), nitrate concentration (NO₃), ammonium concentration (NH₄), silicate concentration (SiO₂), total organic carbon (TOC), total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VM), 12-hours cumulated rainfall (R_12H), 24-hours cumulated rainfall (R_24H), chlorophyll-a concentration (Ch_a), tidal coefficient (tidal coeff).

In the sediment samples, the same associations as those in the water samples were globally observed, with high positives correlations between F1B, accumulated rainfall, NO₂, and NO₃ and negative correlations with salinity, temperature, PO₄, NH₄, and SiO₂.

The analysis of sample score plots showed a clear pattern: summer and spring samples were clustered according to water, air temperature and salinity for water samples. Winter and autumn samples were clustered according to the accumulated rainfall, PO₄, SiO₂, NO₂, NO₃, and TOC parameters (Figs 7A and 7B). For sediment, summer samples were clustered with the water temperature at the sediment surface, air temperature, salinity, PO₄, NH₄, SiO₂, and TOC parameters, while autumn and winter samples were clustered with accumulated rainfall, NO₂,

and NO₃ (Figs 7C and 7D). The main environmental drivers in the water and sediment samples seemed to be water temperature and salinity during summer and spring, while they seemed to be the 12-hours and 24-hours accumulated rainfall data and dissolved nutrients in autumn and winter, respectively.

4. Discussion

4.1. Different patterns of FIB dynamics between water and sediment at the two sites

In this study, we monitored the level of fecal contamination of Aytré Bay for a one-year period, as the beach has been closed to swimming since summer 2018 due to recurrent fecal contamination. FIB levels in water in the two sampling sites were generally low ($<10^4/100$ ml) and similar to concentrations observed in prior studies in surface water, coastal streams or in catchment (Mauffret et al., 2012; Moreno et al., 2019; Savichtcheva et al., 2007; Viau et al., 2011). The determination of the microbiological quality of the two bathing sites showed that over the 45 sampling dates, the European regulatory thresholds were exceeded for 11 and 15 days for intestinal enterococci in the north and south parts of the bay, respectively, and for 3 different days for *E. coli* in each site. This fecal contamination can come from different sources as described in many studies. Fecal contamination in aquatic ecosystems mainly came from human activities (Jardé et al., 2018; Pommepuy et al., 2005) such as sewage discharges, failure to connect sewage systems and/or the presence of sewage outfalls (Mallin et al., 2007; Young et al., 2013). The presence of WWTPs and marinas near beaches could also constitute sources of fecal contamination (Kacar and Omuzboken, 2017; Sobsey et al., 2003). In addition, animals neighboring bathing areas can contribute to fecal contamination, through agriculture activities, during walks of dogs or horses, and by the occurrence of wild animals such as birds (Alderisio and DeLuca, 1999; Nguyen et al., 2018; Pommepuy et al., 2006). As described previously, the Aytré Bay is very popular for recreational activities (swimming, walking dogs and horses) and is a resting place for sea birds. These different factors can therefore be significant sources of fecal contamination in this beach. The watershed of the Aytré Bay is made up of a marsh area and a lagoon treatment plant that can impact the temporal dynamic of FIB despite the regulation of their outflows into the bay during the summer periods (ASCONIT, 2017). Additionally, Aytré Bay is an enclosed beach with a gentle slope, protected from strong currents and waves by two islands and surrounded by marshes. These characteristics have been previously described as conducive to bacterial colonization, aggregation and regrowth in the sand, especially under some favorable environmental conditions, such as intermittent tidal-induced wetting and drying (Donahue et al., 2017; Litton et al., 2010; Yamahara et al., 2009).

Sediments play a major role in global biogeochemical cycling (Glud, 2008) and are increasingly considered as a naturalized secondary habitat for FIB and thus a source of waterborne fecal bacteria (Byappanahalli et al., 2012; Whitman et al., 2006). Maximum FIB concentrations in sediment from both sampling sites were generally low ($<10^3/10$ g). However, these concentrations were higher than concentrations observed in previous studies on beach sands (Bonilla et al., 2006; Halliday and Gast, 2012; Whitman et al., 2014; Yamahara et al., 2009) and coastal sediments (Luna et al., 2018; Perkins et al., 2014). In contrast, FIB concentrations in the two sampling sites were lower than the maximum concentrations (10^5 - $10^6/100$ g) found in riverbank, wetland, and estuarine sediments (Desmarais et al., 2002; Evanson and Ambrose, 2006; Hassard et al., 2016). Generally, FIB abundance in sediment was several times higher in lakes, freshwater ecosystems (lake, river) than in the seawater (Ishii et al., 2006; Matthew et al., 2011; Whitman and Nevers, 2003). In aquatic ecosystems, several studies have shown that, in many cases, sediment resuspension can increase FIB concentrations in water with a greater effect than soil leaching (Palmer et al., 2020; Taylor et al., 2011; Whitman et al., 2014). In our study, the comparison between sediment and water performed by correlation analysis for each fecal indicator bacteria showed that FIB abundance appeared to be generally higher in water mainly during periods of contamination (exceeding regulatory thresholds). Even if the abundance of the two FIB between water and sediment were correlated positively, it seems that sediment is not a source of FIB for the water column. Studies showed that beach sand has high FIB counts suggesting that their leaching may have a greater impact than tidal sediment resuspension on recreational water quality (Bonilla et al., 2006; Halliday and Gast, 2012; Hartz et al., 2008; Matthew et al., 2011). For example, Whitman et al., (2006) found that *E. coli* is present in highly abundance in beach sand and at distances of at least 5 m within the shoreline. Others studies have attempted to analyze the growth of these bacteria in marine environments (Hartz et al., 2008; Heaney et al., 2015), mainly in intertidal zone with the extensive benthic-pelagic coupling (Nunnally, 2018; O'Mullan et al., 2019; Saint-Béat, 2012). FIB survival in sediments and sand may depend on the ability of the bacteria to store energy reserves and bind to sediment particles (Pommepuy et al., 2006) or the properties of beach sand to filter and trap microorganisms and organic matter, thus acting as a reservoir for fecal contamination and associated human pathogens (Hijnen et al., 2004). For example, enterococci have the ability to form biofilms through their extracellular polymeric substance (EPS), which could lead to adhesion to sediment particles or seaweed and resistance to environmental stresses (Byappanahalli et al., 2012). In addition, sediment particles were on average finer in the North Platin than in the South Platin. In the North Platin, particle size was negatively correlated with

intestinal enterococci. As described in previous studies it appears that fine particles in the sediment favored the attachment of enterococci (Byappanahalli et al., 2012; Weiskerger et al., 2019). As noted earlier, in the North Platin, enterococci could attach with their EPS to fine sediment particles giving them protection from environmental pressures. Furthermore, in water samples, intestinal enterococci were also the main indicator explaining the dynamics of fecal contamination. Our results are in agreement with the observations made by Signoretto et al. (2004) and Byappanahalli et al. (2012), who demonstrated that for aquatic ecosystems, enterococci were the appropriate indicators to predict the presence of fecal pathogens in marine waters.

The global comparison of FIB abundance showed that the abundance of each FIB (*E. coli* and intestinal enterococci) between the two sampling sites was positively correlated. However, the temporal dynamic analysis of the contamination at the two sites showed that both FIB followed different trends in summer. Moreover, the relationship of the two FIB between sediment and water was only significantly positive at the North Platin site. These results implied that the north and the south of the Aytré Bay are not exposed to the same fecal contamination sources. The main difference between the two sites is the occurrence of a stormwater lagoon and a freshwater discharge channel from the marsh areas in the south of the bay that may influence the fecal bacterial supply at this site (ASCONIT, 2017; CREOCEAN, 2005).

4.2. Significant correlations between FIB abundance and some environmental parameters

Some studies have indicated that environmental factor variations can influence FIB die-off rates through modifications of temperature, pH, nutrients, and dissolved oxygen concentration (Ackerman and Weisberg, 2003; Boehm et al., 2009; González-Fernández et al., 2021; Mau and Pope, 1999; Thi et al., 2016). *E. coli* can respond to signals from the environment, such as chemicals, pH, temperature, and osmolarity (Sumampouw and Risjani, 2014). Intestinal enterococci are a group of bacteria that optimally grow at temperatures between 10°C and 45°C with a salinity of 65 psu and a pH of 9.6 (Byappanahalli et al., 2012). As typical for most microorganisms, a higher *E. coli* concentration can be expected when the temperature is warmer (Palmer et al., 2020). However, our results did not show the same trend. Indeed, water temperature was negatively correlated with both FIB abundances in the South Platin site. In sediment samples, the temperature at the sediment surface was negatively correlated with *E. coli* abundance at both sites. Viau et al. (2011) also found a negative relationship between enterococci concentrations and water temperature. Similarly, in the study of Ishii et al. (2006), lower temperatures in spring limited the accumulation, survivability, and growth of *E. coli* in the nearshore beach sand environment, and higher concentrations of *E. coli* occurred later in

the year as temperatures reached the seasonal maximums. Salinity concentration also seemed to regulate FIB abundance in Aytré Bay. The same negative associations were observed between salinity and both FIB abundances in the global parameter relationship analysis. This parameter (ranging from 10.3 psu to 39.4 psu) negatively influenced FIB abundance only in water samples (*E. coli* in the North Platin site and intestinal enterococci in the South Platin site). Many studies have reported a negative relationship between salinity and the detection or survival of *E. coli* and enterococci. Atwill et al. (2007) and Mauffret et al. (2013) observed a trend of decreasing *E. coli* count with increasing salinity concentration. Carr et al. (2010) and Viau et al. (2011) found similar results for enterococci concentrations in tidally influenced Hawaiian streams (salinity range from 0.6 to 37.3 psu) and in coastal Mississippi waters (salinity range from 0.0 to 26.4 psu). In our study, salinity seemed to inhibit the growth and proliferation of FIB in Aytré Bay. Rainfall is a major environmental factor that can have an effect on fecal matter diffusion from soils to water through soil leaching and fecal degradation (Villemur et al., 2014). In the water samples, both FIB abundances were positively correlated with the 12-hours and 24-hours accumulated rainfall in the South Platin site, while in the North Platin site, only *E. coli* was positively correlated with the 12-hours accumulated rainfall. Our results corroborate many studies that found strong correlations between *E. coli* and enterococci with rainfall (Aragónés et al., 2016; González-Fernández et al., 2021; Jardé et al., 2018; Leight et al., 2018). In addition, Ackerman and Weisberg (2003) described an increase in ocean fecal bacterial concentrations associated with almost all storms larger than 6 mm. In addition, these authors showed that bacterial concentrations remained elevated for 5 days following rainfall events, although they generally returned to levels below water quality standards within 3 days. In this study, rainfall was on average lower compared to the previously cited study, but a strong positive correlation was observed between FIB abundance and rainfall at both bathing sites. These observations suggested that rainfall contributed to fecal beach contamination in the sampling sites mainly in South Platin, where there is a rainwater lagoon plant and the Vuhé outfall bringing fresh marsh water (ASCONIT, 2017) by washing lands and provoking inputs of allochthonous bacteria and nutrients into the bay. Dissolved nutrients were positively correlated with both FIB abundances in the South Platin site, while in the North Platin site, only *E. coli* was positively correlated with NO_3 , SiO_2 and NH_4 , mainly during winter. The highest nutrient concentrations were also quantified during the winter, as generally expected. Other studies showed the same trend. Khandeparker et al. (2020) showed that the abundances of *E. coli* and *Enterococcus faecalis* were significantly correlated with PO_4 , NO_3 , NH_4 , and SiO_2 . These positive correlations can be explained by the parallel effect of rainfall on increasing

nutrient concentrations and thus fecal bacteria. The FIB abundances were negatively correlated with total bacterial abundance only in the water samples at the two sampling sites. As *E. coli* and intestinal enterococci are used as indicators of pathogen presence, Leight et al. (2018) have highlighted complex positive and negative relationships between total bacteria and autochthonous or allochthonous pathogens. Our results revealed that in water, the FIB seemed to follow different trends compared to the total bacterial count. These results confirmed that the quantified FIB types constituted the fecal contamination and came from a punctual source.

Other low significant correlations were observed between the FIB and other environmental factors. As FIB are mostly organic, VSS are an indicator of organic-solid concentrations measured in samples of activated sludge to determine bacterial amounts (Guangyin and Zhao, 2017). At both sites, the abundance of intestinal enterococci correlated positively with VSS. This correlation shows that VSS could be a proxy for FIB presence even in natural ecosystems. The acidity of an environment is considered to control the rate of microorganism die-off (Reddy et al., 1981). In conclusion, these single correlations detected between FIB abundance and environmental parameters at the two sampling sites suggested that the FIB types have different dynamics at the two sampling sites. However, the interactions of physico-chemical parameters may explain the seasonal variations in FIB abundance (Ackerman and Weisberg, 2003).

4.3. Environmental parameters as FIB drivers for seasonal samples

Few studies have analyzed the seasonal variation of FIB and environmental parameters relationship during the different seasons of the year. Indeed, FIB can be brought and explained differently by environmental parameters based on season (Ferguson et al., 1996; Lipp et al., 2001; Weiskerger et al., 2019). The analysis of water and sediment sample distributions according to abiotic parameters suggested that FIB abundance was explained by temperature and salinity in spring in summer and by accumulated rainfall (12-hours and 24-hours) and dissolved nutrients (mainly PO₄ and SiO₂) during winter. Our findings supported González-fernández et al. (2021), who explained that rainfall, water temperature and salinity were the best predictors of microorganism concentrations in the ocean. Our results suggested that FIB occurrence in the two bathing sites had different temporal dynamics, and two scenarios may be proposed. (1) During fall and winter, by terrestrial runoff, rainfall increases FIB abundance and nutrient concentration. These results were in congruence with Sidhu et al.'s (2013) study conducted during the winter months, when the highest level of fecal contamination was observed as a consequence of stormwater runoff in the Onkaparinga River. Lipp et al. (2001) and Kacar and Omuzbiken (2017) also showed that higher indicator bacteria ratios were

determined during periods of intense rainfall and low temperature corresponding to the winter parameters in our study. (2) During the summer, the high temperatures increased the salinity concentration of the marine environment and were very close to the conditions found in the human digestive tract. These parameters would allow halotolerant and thermophilic intestinal bacteria to find favorable growth conditions, which would lead to their multiplication and therefore high concentrations of FIB in the marine environment.

Conclusion

- The “poor quality” classification of the bathing water of the bay of Aytré was mainly due to high intestinal enterococci abundance.
- The abundance of *E. coli* and intestinal enterococci between water and sediment samples were correlated positively in the North Platin.
- During summer and spring, the main environmental drivers of the FIB dynamics were water temperature and salinity, while in fall and winter, the environmental drivers were rainfall and dissolved nutrients.
- From our results, it appeared that the fecal contamination observed at the two sites did not have the same temporal dynamics mainly in summer and therefore hypothetically came from different sources.
- The temporal monitoring performed in this study showed that the regulatory thresholds of the European bathing water directive were rarely exceeded at the two sites. However, future studies are required to determine the spatial variation in fecal contamination across the whole bay of Aytré.
- When relocated to a new environment, fecal bacteria seem to compete with resident bacteria, probably for essential nutrients. Future studies at the molecular level, such as metabarcoding and MST (microbial source tracking), are necessary to clearly identify the source of contamination and the functional role of fecal bacteria in the whole microbial ecosystem.

Acknowledgments:

This work was financed by Mairie d’Aytré, Région Nouvelle Aquitaine, Communauté d’Agglomération de la Rochelle, Département de la Charente Maritime. We thank Nicolas Lachaussée, Valérie Huet, Jérôme Jourde and the Qalyse team: Samia Kaladji, Eric Chadapeau, Charlotte Guinard, Yann Dupas, and Julien Thomas Maurice for their considerable help during the sampling campaigns. We are grateful to Martine Bréret and Laureen Beugeard for their help with establishment and analysis. We acknowledge Olivier de Viron, Pascal Brunello for data analysis. We thank Michaël Guédon and Benoit Gassilloud for their expertise. We are grateful for the different analytical facilities in the LIENSs laboratory: the Cytometry, the Microbiological and the ‘Logistic, field’ facilities.

Contributions:

M. NDIONE: Methodology, Formal and Statistical analysis, Writing – original draft

P. PINEAU: Formal analysis

B. SIMON-BOUHET, P. ORY: Statistical analysis, Writing – Review

M. LE BEGUEC: Review

L.VACHER, T. AGION, M. TREILLES, H. MONTANIÉ: Conceptualization, Methodology, Supervision

H. AGOGUÉ: Conceptualization, Methodology, Writing, Review, Supervision.

References

- Ackerman, D., Weisberg, S.B., 2003. Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches. *J. Water Health* 01, 85–89. <https://doi.org/10.2166/wh.2003.0010>
- Alderisio, K. a., DeLuca, N., 1999. Seasonal Enumeration of Fecal Coliform Bacteria from the Feces of Ring-Billed Gulls (*Larus delawarensis*) and Canada Geese (*Branta canadensis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5628–5630. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5628-5630.1999>
- Aminot, A., Kérouel, R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu, Ifremer. ed. Méthodes d’analyse en milieu marin.
- Aragonés, L., López, I., Palaz on, A., López- ubeda, R., García, C., 2016. Evaluation of the quality of coastal bathing waters in Spain through fecal bacteria *Escherichia coli* and *Enterococcus*. *Sci. Total Environ.* 566, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.106>
- ASCONIT, 2017. Plage du platine (Aytré) - Révision 2016 du profil de baignade (TYPE 3). La Rochelle.
- Atwill, R., Lewis, D., Pereira, M., Huerta, M., Bond, R., Ogata, S., 2007. Characterizing Freshwater Inflows and Sediment Reservoirs of Fecal Coliforms and *E. coli* at Five Estuaries in Northern California. Davis.
- Barbier, E.B., Hacker, S.D., Kennedy, C., Koch, E.W., Stier, A.C., Silliman, R., B., 2011. The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecol. Soc. Am.* 81, 169–193. <https://doi.org/10.1890/10-1510.1>
- Benskin, C.M.W.H., Wilson, K., Jones, K., Hartley, I.R., 2009. Bacterial pathogens in wild birds : A review of the frequency and effects of infection. *Biol. Rev.* 84, 349–373. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00076.x>
- Beversdorf, L.J., McClellan, S.L., 2007. The potential for beach sand to serve as a reservoir for *Escherichia coli* and the physical influences on cell die-off. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1372–1381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03177.x>
- Bitton, G., 2005. Wastewater microbiology, third edit. Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, Canada.
- Blott, S.J., Pye, K., 1986. Gradistats : a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Dev. Water Sci.* 26, 1237–1248. [https://doi.org/10.1016/S0167-5648\(08\)70015-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5648(08)70015-7)
- Boehm, A.B., Ashbolt, N.J., Jr, J.M.C., Dunbar, L.E., Fleming, L.E., Gold, M.A., Hansel, J.A., Hunter, P.R., Ichida, A.M., Mcgee, C.D., Soller, J.A., Weisberg, S.B., 2009. A sea change ahead for recreational water quality criteria. *J. Water Health* 7, 9–20. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.122>
- Boehm, A.B., Fuhrman, J.A., Mr se, R.D., Grant, S.B., 2003. Tiered approach for identification of a human fecal pollution source at a recreational beach : Case study at Avalon Bay, Catalina Island, California. *Environ. Sci. Technol.* 37, 673–680. <https://doi.org/10.1021/es025934x>
- Bomo, A.-M., Stevik, T.K., Hovi, I., Hanssen, J.F., 2004. Bacterial Removal and Protozoan Grazing in Biological Sand Filters. *J. Environ. Manage.* 33, 1041–1047. <https://doi.org/doi.org/10.2134/jeq2004.1041>
- Bonilla, T.D., Nowosielski, K., Esiobu, N., McCorquodale, D.S., Rogerson, A., 2006. Species assemblages of *Enterococcus* indicate potential sources of fecal bacteria at a south Florida recreational beach. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 800–815. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.03.004>
- Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J., 2012. Enterococci in the Environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 685–706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>
- Carr, M.R., Wang, S.Y., Mclean, T.I., Flood, C.J., Ellender, R.D., 2010. Salmonella rarely detected in

- Mississippi coastal waters and sediment. *J. Appl. Microbiol.* 109, 2191–2199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04851.x>
- Cheung, W.H.S., Chang, K.C.K., Hung, R.P.S., Kleevens, J.W.L., 1990. Health effects of beach water pollution in Hong Kong. *Epidemiol. Infect.* 105, 139–162. <https://doi.org/10.1017/S0950268800047737>
- CREOCEAN, 2005. Etude des causes de la contamination bactériologique des eaux de baignade de la plage du Platin sur la commune d’Aytré - Rapport de Phase 2 Modélisation de la dilution de rejets de dragage et d’exutoires pluviaux Rapp. La Rochelle.
- Desmarais, T., Solo-Gabriele, H., Palmer, C., 2002. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1165–72. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1165-1172.2002>
- Donahue, A., Feng, Z., Solo-gabriele, H.M., Kelly, E., Reniers, A., 2017. Significance of beach geomorphology on fecal indicator bacteria levels. *Mar. Pollut. Bull.* 121, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.05.024>
- EC, 2006. EU Bathing Water Directive 2006/7/EC.
- European Committee for Standardization, 1997. European Committee for Standardization EN 1484 - Water analysis - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC). Paris.
- Evanson, R.F., Ambrose, M., 2006. Sources and Growth Dynamics of Fecal Indicator Bacteria in a Coastal Wetland System and Potential Impacts to Adjacent Waters. *Water Res.* 40, 475–486.
- Farhan Mohammad Khan, P.R.G., 2019. Escherichia coli (E. coli) as an indicator of fecal contamination in water : A review Farhan 1–11. <https://doi.org/10.20944/preprints201910.0081.v1>
- Feng, S., Bootsma, M., McLellan, S.L., 2018. Human-associated Lachnospiraceae genetic markers improve detection of fecal pollution sources in urban waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 1–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.00309-18>
- Ferguson, C.M., Coote, B.G., Ashbolt, N.J., Stevenson, I.M., 1996. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Res.* 30, 2045–2054. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00079-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00079-6)
- Ferreira, P., Dionísio, A., Freitas, E., 2018. A sliding windows approach to analyse the evolution of bank shares in the European Union. *Physica A* 490, 1355–1367. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2017.08.095>
- Fleisher, J.M., Kay, D., Wyer, D., Godfree, A.F., 1998. Estimates of the severity of illnesses associated with bathing in marine recreational waters contaminated with domestic sewage. *Int. J. Epidemiol.* 27, 722–726. <https://doi.org/10.1093/ije/27.4.722>
- Folk, R.L., Ward, W.C., 1957. Brazos river bar : A study in the significance of grain size parameters. *J. Sediment. Petrol.* 27, 3–26. <https://doi.org/10.1306/74D70646-2B21-11D7-8648000102C1865D>
- French Association for Standardization, 2004. 2004 French Association for Standardization XP X33-019 - Sludge Characterization - Positive E. coli Beta glucuronidase Enumeration - Miniaturized Liquid Method (Rating : X33-019). Geneva, Switzerland.
- French Association for Standardization, 1999. 1999 French Association for Standardization NF EN ISO 9308-3 - Water Quality. Detection and Enumeration of Escherichia coli and Coliform Bacteria in Surface and Waste Water. Miniaturized Method (Most Probable Number) by Inoculation in Liquid Medium. Geneva, Switzerland.
- Glud, R.N., 2008. Oxygen dynamics of marine sediments. *Mar. Biol. Res.* 4, 243–289. <https://doi.org/10.1080/17451000801888726>

- González-Fernández, A., Symonds, E.M., Gallard-gongora, J.F., Mull, B., Lukasik, J.O., Rivera, P., Badilla, A., Peraud, J., Brown, M.L., Mora, D., Breitbart, M., Cairns, M.R., Harwood, V.J., 2021. Relationships among microbial indicators of fecal pollution, microbial source tracking markers, and pathogens in Costa Rican coastal waters. *Water Res.* 188, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116507>
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Le Mennec, C., Mieszkin, S., Ponthoreau, C., Gendronneau, M., 2010a. Application of library-independent microbial source tracking methods for identifying the sources of faecal contamination in coastal areas. *Water Sci. Technol.* 61, 1401–1409. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.033>
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Mieszkin, S., Marti, R., Wéry, N., Jardé, E., Derrien, M., Jadas-Hécart, A., Communal, P.Y., Jaffrezic, A., Pourcher, A.M., 2010b. 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.* 1, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.061>
- Guangyin, Z., Zhao, Y., 2017. Enhanced Sewage Sludge Dewaterability by Chemical Conditioning, in: Guangyin, Z., Zhao, Y. (Eds.), *Pollution Control and Resource Recovery for Sewage Sludge*. Butterworth-Heinemann, pp. 13–99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811639-5.00002-4>
- Halliday, E., Gast, R.J., 2012. Coastal water quality and bather health 45, 370–379. <https://doi.org/10.1021/es102747s.Bacteria>
- Hartz, A., Cuvelier, M., Nowosielski, K., Bonilla, T.D., Green, M., Esiobu, N., Mccorquodale, D.S., Rogerson, A., 2008. Survival Potential of *Escherichia coli* and Enterococci in Subtropical Beach Sand: Implications for Water Quality Managers. *J. Environ. Qual.* 889–905. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0312>
- Harwood, V.J., Staley, C., Badgley, B.D., Borges, K., Korajkic, A., 2014. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters : relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol. Rev* 38, 1–40. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12031>
- Hassard, F., Gwyther, C., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., Brett, H., Jones, D., McDonald, J., Malham, S., 2016. Abundance and distribution of enteric bacteria and viruses in coastal and estuarine sediments. *Front. Microbiol.* 7, 1692. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01692>
- Heaney, C.D., Exum, N.G., Dufour, A.P., Brenner, K.P., Haugland, R.A., Chern, E., Schwab, K.J., Love, D.C., Serre, M.L., Noble, R., Wade, T.J., Public, E., Division, H., Health, N., States, U., Protection, E., States, U., Protection, E., Hill, C., 2015. Water quality, weather and environmental factors associated with fecal indicator organism density in beach sand at two recreational marine beaches. *Sci Total Environ.* 1, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.113>
- Heaney, C.D., Sams, E., Dufour, A.P., Brenner, K.P., Haugland, R.A., Chern, E., Wing, S., Marshall, S., Love, D.C., Serre, M., Noble, R., Wade, T.J., 2012. Fecal Indicators in Sand, Sand Contact, and Risk of Enteric Illness Among Beachgoers. *Epidemiology* 23, 95–106. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31823b504c>
- Hijnen, W.A.M., Schijven, J.F., Bonné, P., Visser, A., Medema, G. j., 2004. Elimination of viruses, bacteria and protozoan oocysts by slow sand filtration. *Water Sci Technol* 50, 147–154. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0044>
- International Organisation for Standardisation, 2013. 2013 International Organisation for Standardisation ISO 15923-1- Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1 : Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detecti. Geneva, Switzerland.

- International Organisation for Standardisation, 2005. 2005 European Committee for Standardization EN 872 - Water quality - Determination of suspended solids - Method by filtration through glass fibre filters. Paris.
- International Organisation for Standardisation, 1999. 1999 International Organisation for Standardisation NF EN ISO 7899-1 - Water Quality. Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci in Surface and Waste Water. Miniaturized Method (Most Probable Number) by Inoculation in Liquid Medium. Geneva, Switzerland.
- International Organisation for Standardisation, 1993. 1993 International Organisation for Standardisation ISO 11465 - Soil quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method. Geneva, Switzerland.
- International Organisation for Standardisation, 1988. 1988 International Organisation for Standardisation ISO 14235 - Soil quality - Determination of organic carbon by sulphochromic oxidation. Geneva, Switzerland.
- Ishii, S., Ksoll, W.B., Hicks, R.E., Sadowsky, M.J., 2006. Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 612–621. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.612>
- Jardé, E., Jeanneau, L., Harrault, L., Quenot, E., Solecki, O., Petitjean, P., Lozach, S., Chev e, J., Gourmelon, M., 2018. Application of a microbial source tracking based on bacterial and chemical markers in headwater and coastal catchments. *Sci. Total Environ.* 610–611, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.235>
- Jeanneau, L., Solecki, O., W ery, N., Jardé, E., Gourmelon, M., Communal, P.Y., Jadas-Hécart, A., Caprais, M.P., Gruau, G., Pourcher, A.M., 2012. Relative decay of fecal indicator bacteria and human-associated markers: A microcosm study simulating wastewater input into seawater and freshwater. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2375–2382. <https://doi.org/10.1021/es203019y>
- Kacar, A., Omuzbuken, B., 2017. Assessing the seawater quality of a coastal city using fecal indicators and environmental variables (eastern Aegean Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 123, 400–403. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.052>
- Khandeparker, L., Desai, D. V., Sawant, S.S., Krishnamurthy, V., Anil, C., 2020. Spatio-temporal Variations in Bacterial Abundance with an Emphasis on Fecal Indicator Bacteria and *Vibrio* spp. in and around Visakhapatnam Port , East Coast of India. *ASEAN J. Sci. Technol. Dev.* 37, 91–99. <https://doi.org/10.29037/ajstd.619>
- Kucuksezgin, F., Gonul, L.T., Pazi, I., Kacar, A., 2020. Assessment of seasonal and spatial variation of surface water quality : Recognition of environmental variables and fecal indicator bacteria of the coastal zones of Izmir Bay , Eastern Aegean. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 28, 100554. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100554>
- Laureano-rosario, A.E., Symonds, E.M., Rueda-roa, D., Otis, D., Muller-karger, F.E., 2017. Environmental Factors Correlated with Culturable Enterococci Concentrations in Tropical Recreational Waters : A Case Study in Escambron Beach , San Juan , Puerto Rico. *Int. J. Environ. Res. Public Heal. Artic.* 14, 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121602>
- Lavergne, C., Beaugeard, L., Dupuy, C., Courties, C., Agogué, H., 2014. An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 105, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.002>
- Leight, A.K., Crump, B.C., Hood, R.R., 2018. Assessment of Fecal Indicator Bacteria and Potential Pathogen Co-Occurrence at a Shellfish Growing Area. *Front. Microbio* 9, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00384>

- Lipp, E.K., Kurz, R., Vincent, R., Rodriguez-Palacios, C., Farrah, S., Rose, J., 2001. The Effects of Seasonal Variability and Weather on Microbial Fecal Pollution and Enteric Pathogens in a Subtropical Estuary. *Estuaries* 24, 266–276. <https://doi.org/doi:10.2307/1352950>
- Litton, R., Ahn, J., Sercu, B., Holden, P., Sedlak, D., Grant, S., 2010. Evaluation of chemical, molecular, and traditional markers of fecal contamination in an effluent dominated urban stream. *Env. Sci Technol.* 44, 7369–75. <https://doi.org/10.1021/es101092g>
- Lorenzen, C.J., 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep. Res Ocean.* 13, 223–227. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(66\)91102-8](https://doi.org/10.1016/0011-7471(66)91102-8)
- Luna, G.M., Manini, E., Turk, V., Tinta, T., D’Errico, G., Baldrighi, E., Campanelli, A., 2018. status of faecal pollution in ports: A basin-wide investigation in the Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 147, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.050>
- Mallin, M.A., Cahoon, L.B., Toothman, B.R., Parsons, D.C., Mciver, M.R., Ortwine, M.L., Harrington, R.N., 2007. Impacts of a raw sewage spill on water and sediment quality in an urbanized estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.09.003>
- Marie, D., Partensky, F., Vaultot, D., Brussaard, C., 1999. Enumeration of Phytoplankton, Bacteria, and Viruses in Marine Samples. *Curr. Protoc. Cytom.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1111s10>
- Matthew, C.P., Solo-Gabriele, H.M., Piggot, A.M., Klaus, J.S., Yifan, Z., 2011. Relationships Between Sand and Water Quality at Recreational Beaches. *Water Res.* 45, 6763–6769. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.028>
- Mau, D.P., Pope, L.M., 1999. Occurrence of dissolved solids, nutrients, pesticides, and fecal coliform bacteria during low flow in the Marion Lake watershed, central Kansas, 1998, US Department of the Interior, US Geological Survey. Lawrence.
- Mauffret, A., Caprais, M.P., Gourmelon, M., 2012. Relevance of Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophages for efficient fecal contamination tracking at the level of a catchment in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5143–5152. <https://doi.org/10.1128/AEM.00315-12>
- Mauffret, A., Mieszkin, S., Morizur, M., Alfiansah, Y., Lozach, S., Gourmelon, M., 2013. Recent innovation in microbial source tracking using bacterial real-time PCR markers in shellfish. *Mar. Pollut. Bull.* 68, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.12.029>
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7. <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-08>
- Moreno, S.H., Bolívar-anillo, H.J., Soto-varela, Z.E., Aranguren, Y., Pichón, C., Andrés, D., Daza, V., Anfuso, G., 2019. Microbiological water quality and sources of contamination along the coast of the Department of Atlántico (Caribbean Sea of Colombia). Preliminary results. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.054>
- Nguyen, K.H., Senay, C., Young, S., Nayak, B., Lobos, A., Conrad, J., Harwood, V.J., 2018. Determination of wild animal sources of fecal indicator bacteria by microbial source tracking (MST) influences regulatory decisions. *Water Res.* 144, 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.034>
- Nunnally, C.C., 2018. Benthic – Pelagic Coupling : Linkages Between Benthic Ecology and Biogeochemistry and Pelagic Ecosystems and Process. *Encycl. Ocean Sci.* 3rd Ed. 3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11087-5>
- O’Mullan, G.D., Juhl, A.R., Reichert, R., Schneider, E., Martinez, N., 2019. Science of the Total Environment Patterns of sediment-associated fecal indicator bacteria in an urban estuary : Benthic-pelagic coupling and implications for shoreline water quality. *Sci. Total Environ.* 656,

- 1168–1177. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.405>
- Orvain, F., Sauriau, P., Hir, P. Le, Guillou, G., Cann, P., Paillard, M., 2007. Spatio-temporal variations in intertidal mudflat erodability : Marenes-Oléron Bay , western France. *Cont. Shelf Res.* 27, 1153–1173. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2006.05.013>
- Palmer, J.A., Law, J., Soupir, M.L., 2020. Science of the Total Environment Spatial and temporal distribution of E. coli contamination on three inland lake and recreational beach systems in the upper Midwestern United States. *Sci. Total Environ.* 722, 13. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137846>
- Parlement européen, 2006. 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 1–15.
- Perkins, T.L., Clements, K., Baas, J.H., Jago, C.F., Jones, D.L., Malham, S.K., McDonald, J.E., 2014. Sediment composition influences spatial variation in the abundance of human pathogen indicator bacteria within an estuarine environment. *PLoS One* 9, 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112951>
- Peterson, B.G., 2007. *Overview of PerformanceAnalytics' Charts and Tables*. Chicago, IL.
- Pompey, M., Caprais, M.P., Gourmelon, M., Saux, J.C. Le, Guyader, F. Le, 2006. Fecal Contamination in Coastal Areas : An Engineering Approach Fecal contamination in coastal areas : An engineering approach. <https://doi.org/10.1007/0-387-23709-7>
- Pompey, M., Dominique, H., Caprais, M.P., Gourmelon, M., Saux, J.C., Guyader, L.F., 2005. Fecal Contamination in Coastal Areas : An Engineering Approach, in: Belkin S., C.R.R. (Ed.), *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. Boston, MA., pp. 331–332.
- R Core Team, 2020. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reddy, K.R., Khaleel, R., Overcash, M.R., 1981. Behavior and Transport of Microbial Pathogens and Indicator Organisms in Soils Treated with Organic Wastes. *Environ. Qual.* 10, 255–266. <https://doi.org/10.2134/jeq1981.00472425001000030001x>
- Rochelle-Newall, E., Nguyen, T.M.H., Le, T.P.Q., Sengtaheuanghoung, O., Ribolzi, O., 2015. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: Knowledge gaps and future directions. *Front. Microbiol.* 6, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00308>
- Saint-béat, B., 2012. Modélisation du rôle du biofilm dans le fonctionnement du réseau trophique de la vasière de Brouage (Bassin de Marenes-Oléron) : influence sur les flux de carbone et conséquences sur la stabilité. *Sci. Agric. La Rochelle Univ.* 1–316.
- Savichtcheva, O., Okayama, N., Okabe, S., 2007. Relationships between Bacteroides 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Res.* 41, 3615–3628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.028>
- Shuval, H., 2003. Estimating the global burden of thalassogenic diseases : human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. *J. Water Health* 0.1, 53–64. <https://doi.org/10.2166/wh.2003.0007>
- Sidhu, J.P.S., Ahmed, W., Gernjak, W., Aryal, R., McCarthy, D., Palmer, A., Kolotelo, P., Toze, S., 2013. Science of the Total Environment Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers. *Sci. Total Environ.* 490, 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.020>
- Signoretto, C., Burlacchini, G., Lleo, M., Pruzzo, C., Zampini, M., Pane, L., Franzini, G., Canepari, P., 2004. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the Nonculturable State to Plankton Is the Main Mechanism

- Responsible for Persistence of This Bacterium in both Lake and Seawater 70, 6892–6896. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6892>
- Sobsey, M.D., Perdue, R., Overton, M., Fisher, J., 2003. Factors influencing faecal contamination in coastal marinas. *Water Sci. Technol.* 47, 199–204. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0195>
- Sumampouw, O.J., Risjani, Y., 2014. Bacteria as Indicators of Environmental Pollution : Review Bacteria. *Int. J. Ecosyst.* 4, 251–258. <https://doi.org/10.5923/j.ije.20140406.03>
- Pachepsky, Y.A., Shelton, D.R., Taylor, P., 2011. Critical Reviews in Environmental Science and Technology Escherichia Coli and Fecal Coliforms in Freshwater and Estuarine Sediments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 1067–1110. <https://doi.org/10.1080/10643380903392718>
- Thi, H., Nguyen, M., Thi, Q., Le, P., Garnier, J., Janeau, J., 2016. Seasonal variability of faecal indicator bacteria numbers and die-off rates in the Red River basin, North Viet Nam. *Nat. Publ. Gr.* 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep21644>
- Viau, E.J., Goodwin, K.D., Yamahara, K.M., Layton, B.A., Burns, L., Tong, H., Wong, S.H.C., Sassoubre, L.M., Lu, Y., Boehm, A.B., 2011. Bacterial pathogens in Hawaiian coastal streams d Associations with fecal indicators, land cover, and water quality. *Water Res.* 45, 3279–3290. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.033>
- Villemur, R., Imbeau, M., Vuong, M.N., Masson, L., Payment, P., 2014. ScienceDirect An environmental survey of surface waters using mitochondrial DNA from human, bovine and porcine origin as fecal source tracking markers. *Water Res.* 69, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.063>
- Weiskerger, C.J., Brandao, J., Ahmed, W., Aslan, A., Avolio, L., Badgley, B.D., Boehm, A.B., Edge, T.A., Fleisher, J.M., Heaney, C.D., Jordao, L., Kinzelman, J.L., Klaus, J.S., Pierre, J., Kleinheinz, G.T., Robinson, C., Phanikumar, M.S., Piggot, A.M., Pitk, T., Sadowsky, M.J., Staley, C., Staley, Z.R., Symonds, E.M., Vogel, L.J., Yamahara, K.M., Whitman, R.L., Solo-gabriele, H.M., Harwood, V.J., 2019. Impacts of a changing earth on microbial dynamics and human health risks in the continuum between beach water and sand. *Water Res.* 162, 456–470. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.07.006>
- Whitman, R.L., Harwood, V.J., Edge, T.A., Nevers, M.B., Byappanahalli, M., Vijayavel, K., Brandão, J., Sadowsky, M.J., Alm, E.W., Crowe, A., Ferguson, D., Ge, Z., Halliday, E., Kinzelman, J., Kleinheinz, G., Przybyla-Kelly, K., Staley, C., Staley, Z., Solo-Gabriele, H.M., 2014. Microbes in beach sands: Integrating environment, ecology and public health. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 13, 329–368. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9340-8>
- Whitman, R.L., Nevers, M.B., 2003. Foreshore Sand as a Source of Escherichia coli in Nearshore Water of a Lake Michigan Beach. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5555–5562. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5555>
- Whitman, R.L., Nevers, M.B., Byappanahalli, M.N., Al, W., 2006. Examination of the Watershed-Wide Distribution of Escherichia coli along Southern Lake Michigan: an Integrated Approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7301–7310. <https://doi.org/10.1128/AEM.00454-06>
- World Health Organization, 2003. Guidelines for safe recreational water. Geneva, Switzerland.
- Yamahara, K.M., Walters, S.P., Boehm, A.B., 2009. Growth of Enterococci in Unaltered, Unseeded Beach Sands Subjected to Tidal Wetting. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1517–1524. <https://doi.org/10.1128/AEM.02278-08>
- Young, S., Juhl, A., Mullan, G.D.O., 2013. Antibiotic-resistant bacteria in the Hudson River Estuary linked to wet weather sewage contamination. *J. Water Health* 11, 297–310. <https://doi.org/10.2166/wh.2013.131>

Supplementary Information

Table 3 (Supplementary data T1): Water and sediment sampling frequency during the one-year at the two bathing sites of Aytré Bay.

Sampling sites	Samples type	Frequency												Total	
		Feb-19	Mar-19	Apr-19	May-19	Jun-19	Jul-19	Aug-19	Sept-19	Oct-19	Nov-19	Dec-19	Jan-20		Feb-20
North Platin	Water	2	2	3	3	4	8	8	4	4	2	2	2	2	46
North Platin	Sediment	1	1	1	1	2	4	4	2	2	1	1	1	1	22
South Platin	Water	2	2	3	3	4	8	8	4	4	2	2	2	2	46
South Platin	Sediment	1	1	1	1	2	4	4	2	2	1	1	1	1	22

Table 4 (Supplementary data T2): Variation of the environmental variables in the North and South Platin sites. Environmental variables are water temperature (Water temp), air temperature (Air temp), salinity, dissolved oxygen concentration (dO₂), pH, phosphorous concentration (PO₄), nitrite concentration (NO₂), nitrate concentration (NO₃), ammonium concentration (NH₄), silicate concentration (SiO₂), total organic carbon (TOC), total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS) and chlorophyll-a concentration (Chloro a).

<i>Parameters</i>	<i>North Platin</i>		<i>South Platin</i>	
	Min	Max	Min	Max
<i>Water temp</i>	7.5	28.9	6.7	29.3
<i>Air temp</i>	5.3	26.4	5.3	26.4
<i>Salinity</i>	20.5	36.6	17.1	36.7
<i>dO₂</i>	3.9	12.6	5.1	13.2
<i>pH</i>	7.4	32.3	7.3	9.5
<i>PO₄</i>	0.0	1.1	0.0	1.1
<i>NO₂</i>	0.0	2.6	0.0	2.0
<i>NO₃</i>	0.0	219.3	0.0	183.9
<i>NH₄</i>	0.0	4.8	0.0	11.5
<i>SiO₂</i>	0.0	72.7	0.0	64.9
<i>TOC</i>	0.0	2.4	0.0	2.7
<i>TSS</i>	5.5	483.3	5.2	480.0
<i>VSS</i>	0.0	78.3	0.0	89.3
<i>Chloro a</i>	0.0	45.1	0.0	20.6

Table 5 (Supplementary data T3): Variation of the environmental variables in the North and South Platin sites. Environmental variables are water temperature at the sediment surface (WS temp), air temperature (Air temp), salinity, pH, phosphorous concentration (PO₄), nitrite concentration (NO₂), nitrate concentration (NO₃), ammonium concentration (NH₄), silicate concentration (SiO₂), total organic carbon (TOC), chlorophyll-a concentration (Chloro a), Sandy-clay size (Sandy-clay) and sand size (Sand).

<i>Parameters</i>	<i>North Platin</i>		<i>South Platin</i>	
	Min	Max	Min	Max
<i>WS temp</i>	17.8	28.0	4.8	26.5
<i>Air temp</i>	17.7	26.4	8.0	23.5
<i>Salinity</i>	29.2	47.4	10.3	39.4
<i>dO₂</i>	1.8	9.1	5.2	12.5
<i>pH</i>	7.6	8.4	7.8	8.8
<i>PO₄</i>	1.2	8.8	0.8	9.4
<i>NO₂</i>	0.1	0.6	0.1	7.5
<i>NO₃</i>	0.5	7.1	0.2	56.2
<i>NH₄</i>	16.3	252.3	4.9	68.3
<i>SiO₂</i>	17.4	211.4	12.5	172.1
<i>TOC</i>	1.9	13.7	0.7	5.4
<i>Chloro a</i>	2.3	20.9	5.3	21.7
<i>Sandy-clay</i>	0.0	0.8	0.0	0.7
<i>Sand</i>	0.1	1.0	0.0	1.0

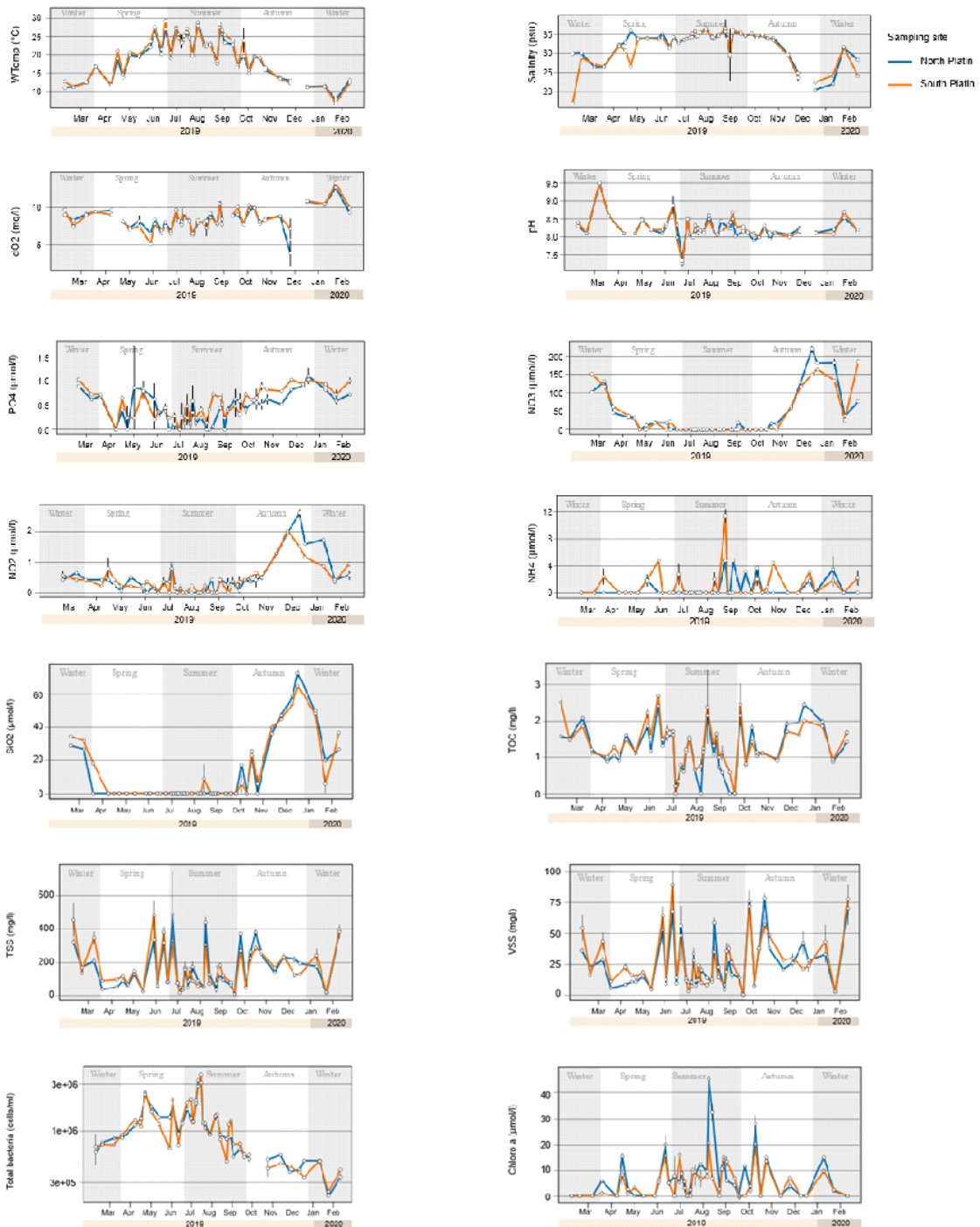


Figure 8 (Supplementary data F1): In situ physico-chemical parameters' variation in water samples in the North (in blue) and South (in orange) Platin sites. Water temperature [WTemp (°C)], salinity, dissolved oxygen concentration [dO2 (mg/l)], pH, phosphorus concentration [PO4 (µmol/l)], nitrite concentration [NO2 (µmol/l)], nitrate concentration [NO3 (µmol/l)], ammonium concentration [NH4 (µmol/l)], silicate concentration [SiO2 (µmol/l)], total organic carbon [TOC (mg/l)], total suspended solids [TSS (mg/l)], volatile suspended solids [VSS (mg/l)], total bacteria abundance [total bacteria (cells/ml)], and chlorophyll-a concentration [Chloro a (µmol/l)]. The white dots represent the average concentration of the triplicate samples for each date. Error bars show standard deviations between triplicates.

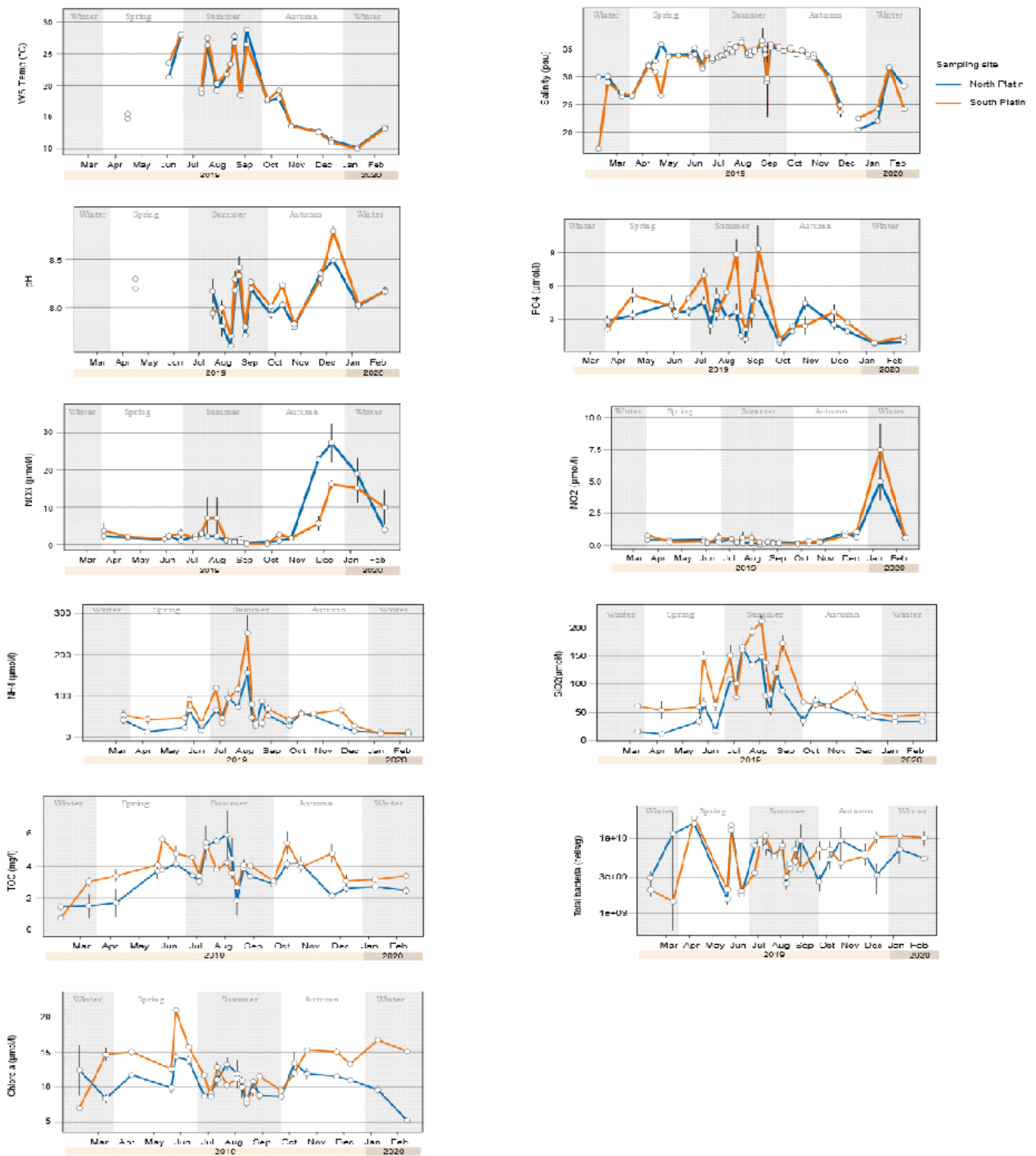


Figure 9 (Supplementary F1): In situ physico-chemical parameters' variation in sediment samples in the North (blue) and South (orange) Platin sites. Water temperature at the sediment surface [WS Temp (°C)], salinity, pH, phosphorus concentration [PO₄ (µmol/l)], nitrite concentration [NO₂ (µmol/l)], nitrate concentration [NO₃ (µmol/l)], ammonium concentration [NH₄ (µmol/l)], silicate concentration [SiO₂ (µmol/l)], total organic carbon [TOC (mg/l)], total bacteria abundance [total bacteria (cells/g)], chlorophyll-a concentration [Chloro a (µmol/l)]. The white dots represent the average concentration of the triplicate samples for each date. Error bars show standard deviations between triplicates.

1.1.4 Conclusions

Cette étude constitue le premier suivi temporel de la qualité microbiologique des eaux de baignade de la baie d'Aytré pour comprendre le déterminisme saisonnier de la contamination fécale persistante dans ce site. L'abondance des indicateurs de contamination fécale dans les deux sites de baignade montre une variation saisonnière avec un faible niveau de contamination fécale durant le printemps et des abondances plus élevées en hiver, en été et en automne. Des dépassements des seuils réglementaires de la directive européenne ont été observés durant ces trois saisons définissant des contaminations principalement dues aux entérocoques. Comme présenté dans l'analyse du suivi historique (chapitre I, VI.4.1), les dépassements des seuils réglementaires durant ce suivi annuel apparaissent également à des dates différentes sur les deux sites de baignade.

La comparaison entre les échantillons d'eau et de sédiment a montré qu'en cas de dépassement des seuils réglementaires de la directive européenne, l'abondance des bactéries fécales mesurée à partir de 100 ml d'eau était supérieure à celle mesurée à partir de 10 g d'échantillon de sédiment prélevé à la même date. Cependant lorsque les abondances en bactéries fécales étaient inférieures aux seuils réglementaires dans l'eau, leurs concentrations pouvaient être plus élevées dans le sédiment que dans l'eau.

L'analyse des corrélations des différents paramètres biologiques et abiotiques a mis en évidence deux principaux scénarios : pendant l'été et le printemps, les principaux facteurs environnementaux corrélés à l'abondance des indicateurs de contamination fécale étaient la température et la salinité de l'eau, tandis qu'en automne et en hiver, les facteurs environnementaux corrélés à l'abondance des indicateurs de contamination étaient les précipitations et les nutriments.

Ce suivi temporel du niveau de contamination de la baie d'Aytré nous a permis de caractériser la dynamique annuelle de cette contamination. La pluviométrie et la température apparaissent comme les deux principaux facteurs pouvant expliquer l'apport de bactéries fécales et la persistance de cette contamination fécale.

En plus de ce suivi temporel sur une année sur les deux sites officiels de baignade, il est essentiel d'étudier la dynamique spatiale de cette contamination fécale sur toute l'étendue de la baie afin de comprendre sa répartition.

1.2 Répartition et dynamique spatiale des contaminants fécaux

L'analyse de la dynamique temporelle de la contamination fécale a mis en évidence une variation saisonnière de l'abondance des indicateurs de contamination fécale sur les deux sites de baignade de la baie d'Aytré. De plus, la comparaison entre les échantillons d'eau et de sédiment sur les deux sites de baignade a montré qu'en cas de dépassement des seuils réglementaires, l'abondance des bactéries fécales dans l'eau était supérieure à la concentration mesurée dans les échantillons de sédiment prélevés à la même date. Cependant, la texture du sédiment n'est pas uniforme dans la baie. La question de l'homogénéité spatiale de la contamination et d'un éventuel lien avec la nature du substrat est donc posée.

1.2.1 Hypothèse et objectifs

Ainsi, pour répondre à l'une des principales hypothèses de cette étude concernant l'apport de bactéries fécales du sédiment vers la colonne d'eau, il est nécessaire de caractériser les différentes textures de ce substrat et d'identifier d'éventuels milieux qui favoriseraient la multiplication des bactéries fécales. Dans ce contexte, après avoir caractérisés la répartition spatiale des différents substrats de l'estran, nous avons réalisé une étude "en quadrillage" de l'abondance des bactéries fécales dans l'eau et le sédiment sur toute l'étendue de la baie pour caractériser spatialement la contamination fécale et évaluer la contribution du sédiment à la contamination des eaux de baignade.

1.2.2 Plan expérimental

Une analyse du niveau de contamination fécale a été réalisée sur 20 points quadrillant la baie en tenant compte des types de substrats. Pour cela une caractérisation des sédiments présents en fonction de la texture a été réalisée afin d'identifier la diversité des terrains présents. A partir de ce travail, le quadrillage a pu être défini en s'adaptant aux spécificités du terrain. Dans un second temps, l'analyse de l'abondance des indicateurs de contamination fécale en fonction des différentes textures du sédiment de la baie a été réalisée en tenant compte de ce quadrillage. Dans un troisième temps, l'analyse de la répartition spatiale des bactéries fécales dans la colonne d'eau sur toute l'étendue de la baie a été effectuée en utilisant le drone marin PAMELi. La quantification de l'abondance des bactéries fécales dans l'eau permet aussi d'identifier les zones de contamination différentielle pour repérer les potentielles sources de celle-ci à proximité des sites suivis. De plus, cette étude de la dynamique spatiale a été effectuée pour vérifier le transfert de contaminants fécaux du sédiment vers la colonne d'eau.

Cette étude a bénéficié de l'opportunité d'utiliser le drone marin PAMELi (en cours de développement dans notre laboratoire) et sa capacité à prélever de façon automatique des échantillons d'eau. Le prélèvement en "quadrillage" de la baie d'Aytré par le drone PAMELi est la première application initiée dans le cadre du laboratoire et constitue en soi une étude pilote. La stratégie mise en place pour répondre à ces objectifs est présentée dans la section I.3 du chapitre 2 présentant les différentes méthodes de cette étude.

1.2.3 Résultats

1.2.3.1 Le sédiment et la distribution spatiale des contaminants fécaux dans la baie

1.2.3.1.1 Une homogénéité relative du sédiment dans la baie

Une caractérisation de la teneur en eau dans le sédiment de la baie combinée à l'analyse des prises de vues aériennes réalisées par un drone a permis d'obtenir une cartographie de la texture de sédiment sur toute l'étendue de la baie (Figure 23). Le nord de la baie est constitué d'une succession de platiers rocheux et de vase molle. Le bord de la baie en contact avec le sable de la plage présente un substrat sablo-vaseux bordé par une zone de vase ; les principaux sites de baignade sont ainsi concernés par des zones de vase molle. Le bord sud de la baie est bordé par d'importantes zones de vase molle et de vase mélangée avec des galets. Le centre de la baie est plus homogène et est constitué de sédiments sableux. La texture du sédiment de la baie n'est donc pas homogène si ce n'est dans la grande partie centrale de l'estran. Cependant les pratiques de baignade des usagers de la baie sont plus concernées par les bords de la baie que par son centre.

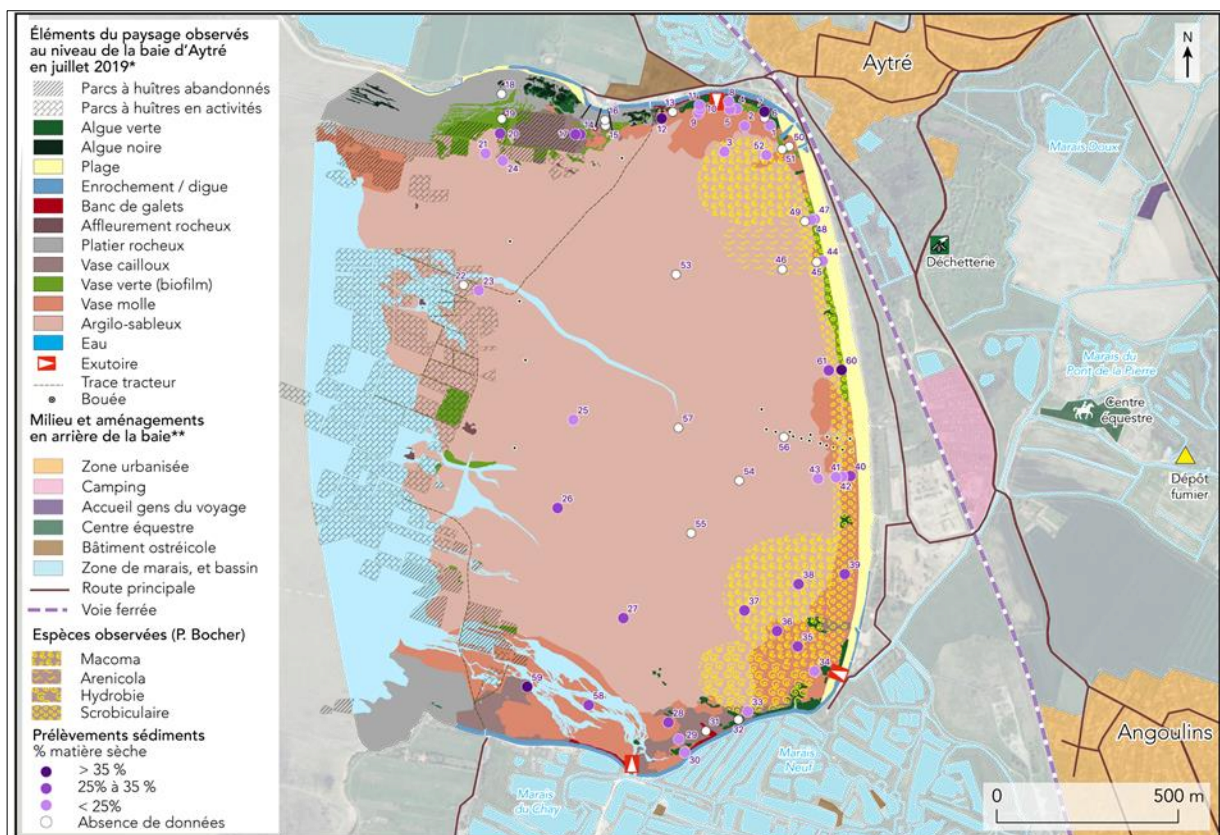


Figure 23 : Cartographie de la texture du sédiment de la baie d'Aytré à partir de mesures de la teneur en eau, de matières sèches et de photographies aériennes. Carte : M. Ndione, P. Brunello, L. Vacher UMR LIENSs CNRS-La Rochelle Université (2020)

1.2.3.1.2 *Mesure en « quadrillage » de la qualité microbiologique du sédiment*

○ *Dynamique spatiale de l'abondance des E. coli et d'entérocoques*

A partir de cette cartographie, nous avons défini 20 sites caractéristiques représentant les différentes textures du sédiment de la baie (Figure 17 chapitre 2). Onze sites comprenant les sites de baignade étaient situés sur les bords de la baie avec un substrat sablo-vaseux et 9 sites étaient situés dans le centre avec un substrat sableux. Deux campagnes d'échantillonnage en « quadrillage » ont été réalisées sur deux dates différentes en mars 2020 puis en septembre 2020. La campagne de mars correspond à une saison de dépassement des seuils réglementaires et la campagne de septembre correspond à une période sans contamination.

La variation spatiale de l'abondance des *E. coli* et des entérocoques dans les sédiments est représentée sur la figure 12. L'abondance des *E. coli* sur les 20 points variait de 0 à 89 NPP / 10 g en mars (Figure 24, A) et de 0 à 46 NPP / 10 g en septembre (Figure 24, C). L'abondance des entérocoques sur les 20 points variait de 0 à 470 NPP / 10 g en mars (Figure 24, B) et de 0 à 1137 NPP / 10 g en septembre (Figure 24, D).

Les abondances en entérocoques étaient en moyenne plus élevées que celles des *E. coli* pour les deux campagnes d'échantillonnage. Une comparaison de la variance de l'abondance des indicateurs de contamination fécales entre les deux campagnes a montré une différence significative pour les entérocoques (Test de fisher, $F=3,76.10^{-5}$) et aucune différence pour les *E. coli* (Test de fisher, $F=0,01$).

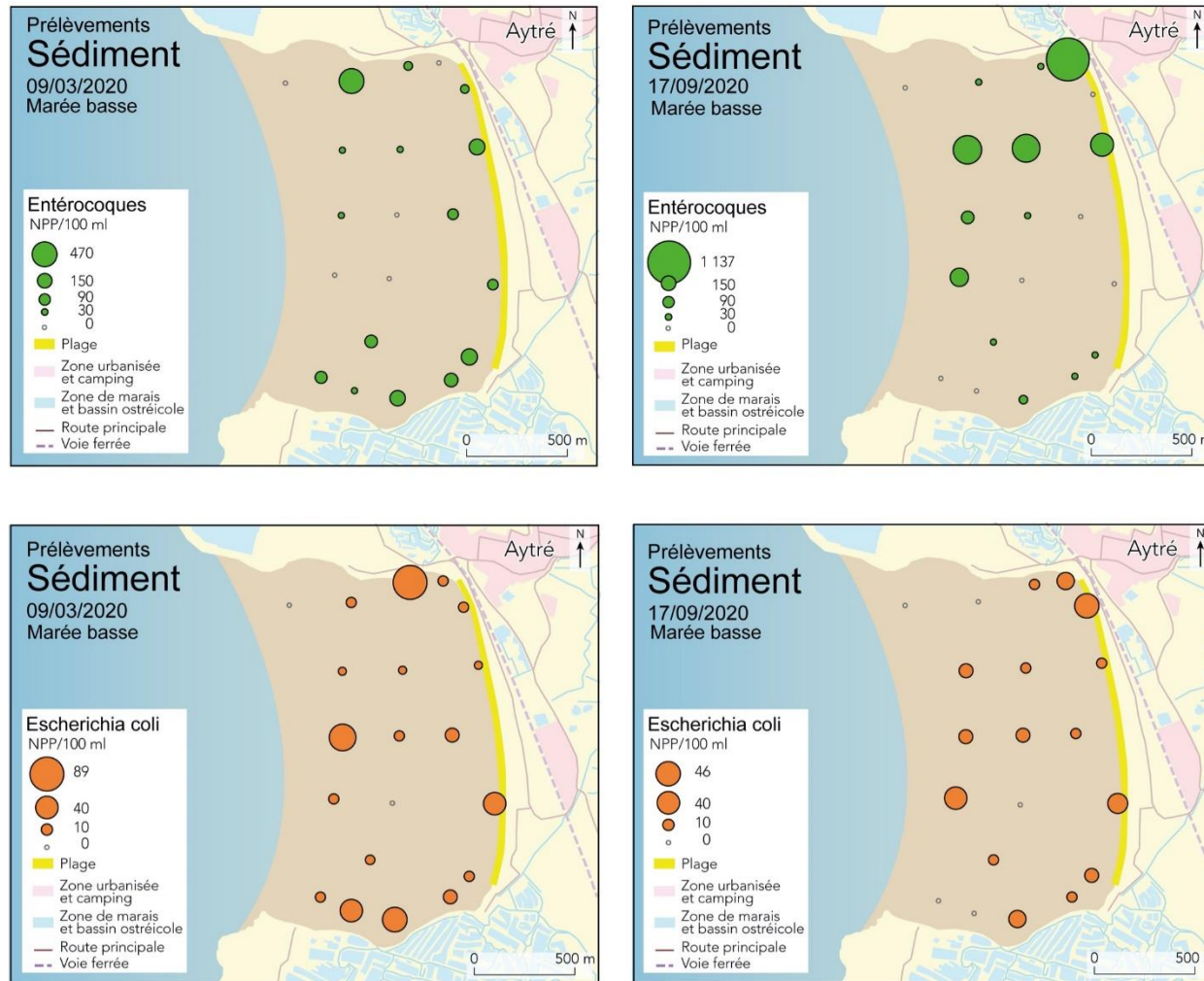


Figure 24 : Variation spatiale de l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment sur 20 sites de la baie d'Aytré. Dynamique spatiale des A) *E. coli* en mars et B) entérocoques en mars, C) *E. coli* en septembre et D) entérocoques en septembre.

1.2.3.1.3 Texture du sédiment dans les différents sites de « quadrillage » pendant les deux campagnes d'échantillonnage

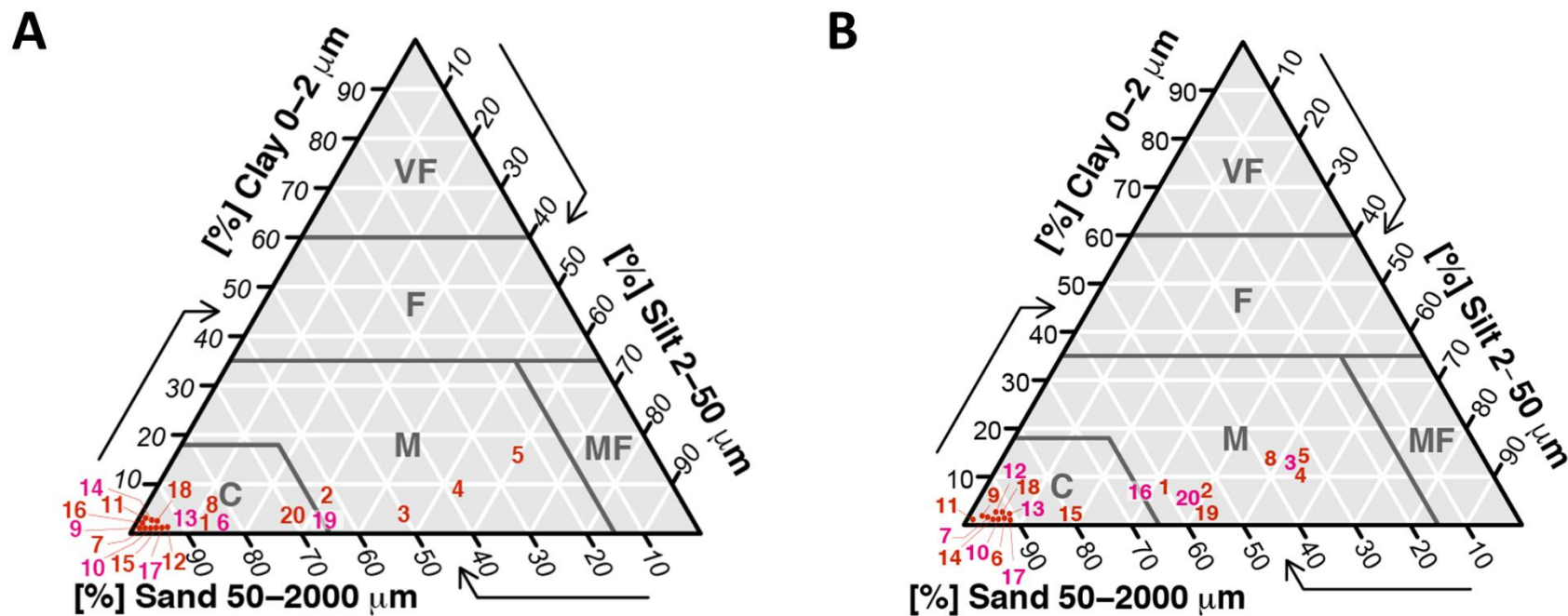


Figure 25 : Diagramme de la texture du sédiment sur les 20 sites de « quadrillage » de la baie d'Aytré. A) campagne d'échantillonnage du mois de mars 2020 et B) campagne d'échantillonnage du mois de septembre 2020. Les différents sites sont représentés par les chiffres en brun. Les pourcentages des différentes fractions de sédiment argile, limon, sable sont représentés sur les côtés des diagrammes. Les différents types de texture sont indiquées par les lettres au niveau des diagrammes de texture : C : Textures grossières (Sableux) ; M : Textures Moyennes (Limoneux) ; F : Textures fines (Argilo-sableux) ; MF : Textures moyennement fines (Limoneux fin) ; VF : Textures très fines (Argileux).

Le diagramme triangulaire de texture du sédiment sur les deux dates de « quadrillage » est représenté sur la figure 25. L'analyse granulométrique sur tous les points du « quadrillage » montre que certains sites sont constitués essentiellement de sables jusqu'à 90%, d'autres sont constitués de 60% de sables et d'environ 10% d'argiles et quelques sites sont constitués de 40% de sables avec 10 à 20% d'argile. Les mêmes textures de sédiment ont été observées sur les différents sites entre les deux campagnes de prélèvements (Mars et Septembre) de « quadrillage ».

Cette analyse de la texture des différents sites rejoint l'analyse de photo-interprétation réalisée pour la carte du sédiment dans la baie. Les sites choisis sont donc représentatifs des différentes structures du substrat présentes dans la baie. Les bords de la baie sont constitués de terrains sablo-vaseux alors que les sites les plus au centre présentent une texture beaucoup plus sableuse [figure 25 A) mars, B) sept].

1.2.3.1.4 Comparaison entre les deux campagnes de « quadrillage »

L'objectif était ici d'interroger les éventuelles permanences dans la caractérisation des substrats et de la contamination à différents moments de l'année. Pour analyser les différences entre les deux campagnes d'échantillonnage (quadrillage 1 réalisé en mars et quadrillage 2 réalisé en septembre), nous avons effectué une comparaison entre les paramètres mesurés d'abord sur l'ensemble des 20 sites, ensuite sur les sites du bord (11 sites sablo-vaseux) puis sur les sites sableux du centre de la baie (9 sites sableux). Cette comparaison est effectuée par corrélation avec le test de Pearson (Tableau 18).

Les différentes fractions de sédiment des deux campagnes étaient fortement corrélées sur les 20 sites et sur l'ensemble des 11 sites vaseux. Cependant les différentes fractions de sédiment entre les deux campagnes n'étaient pas corrélées sur les sites sableux. Aucune corrélation n'a été observée entre les autres paramètres et sur les différents sites.

1.2.3.1.5 Corrélation entre les paramètres biologiques et la texture du sédiment

Les corrélations entre la texture du sédiment et l'abondance des indicateurs de contamination fécale ont ensuite été évaluées dans le cadre de l'approche en « quadrillage » pour les deux dates du suivi (Mars et Septembre). Ainsi, nous avons effectué des corrélations entre l'abondance des *E. coli* et d'entérocoques (Tableau 19, test de Pearson) et les différents substrats sur les deux dates. Aucune corrélation n'a été observée entre les différentes fractions de sédiment et l'abondance des bactéries fécales sur ces deux dates.

Tableau 18 : Corrélations des paramètres biologiques et physico-chimiques entre les deux campagnes (test de Pearson) (quadrillage 1 : (09/03/2020), quadrillage 2 : (17/09/2020)) : sur l'ensemble des 20 sites, entre les sites 11 vaseux (situés aux bords de la baie), entre les 9 sites sableux (situés au centre de la baie)

	Quadrillage 1 vs Quadrillage 2											
	Limons	Argiles	Sables	<i>E. coli</i>	Entérocoques	Température	Salinité	pH	O ₂ dissous	Saturation en O ₂ dissous	Chloro-a	Bactéries totales
20 sites	0,85***	0,75***	0,84***	0,02	-0,27	0,33	-0,22	0,00	-0,22	-0,24	0,34	0,24
11 sites vaseux	0,81***	0,64***	0,79***	0,00	-0,28	0,52	-0,37	0,24	-0,35	-0,19	0,27	0,38
9 sites sableux	0,30	-0,37	0,23	0,06	-0,05	-0,59	-0,17	-0,40	0,22	-0,18	0,14	0,08

Tableau 19 : Corrélation entre l'abondance des indicateurs de contamination fécale et les différentes fractions de sédiment (test de Pearson) (Quadrillage 1 : 09/03/2020, Quadrillage 2 : 17/09/2020)

	Indicateurs de contamination fécale	Limons	Argiles	Sables
Quadrillage 1	Entérocoque	0,32	0,10	-0,29
	<i>E. coli</i>	-,08	0,03	-0,07
Quadrillage 2	Entérocoque	-0,36	-0,37	0,37
	<i>E. coli</i>	-0,10	-0,10	0,06

1.2.3.1.6 Corrélation entre l'abondance des bactéries fécales dans les sédiments et les facteurs environnementaux

L'analyse des corrélations entre les indicateurs de contamination fécale et les paramètres physico-chimiques a montré une corrélation significative positive entre l'abondance des entérocoques et le pourcentage de saturation en oxygène dissous (%) ainsi qu'une corrélation négative significative entre l'abondance des *E. coli* et la salinité pour la campagne de mars (Tableau 20, test de Pearson).

Aucune corrélation n'a été observée durant la campagne de septembre entre l'abondance des indicateurs de contamination fécale et le pH, la température, la salinité, l'O₂ dissous et sa saturation et la chlorophylle-*a*.

Tableau 20 : Corrélation entre l'abondance des indicateurs de contamination fécale et les facteurs environnementaux sur deux dates (quadrillage 1 : 09/03/2020, quadrillage 2 : 17/09/2020)

Date	Indicateurs de contamination fécale	pH	Température	Salinité	O ₂ dissous	Saturation en O ₂ dissous	Chloro-a
Quadrillage 1	Entérocoque	0,06	-0,05	-0,13	0,34	0,53*	0,22
	<i>E. coli</i>	-0,15	0,43	-0,15*	-0,08	-0,15	-0,05
Quadrillage 2	Entérocoque	-0,20	-0,27	0,22	-0,42	-0,40	-0,44
	<i>E. coli</i>	-0,22	-0,16	0,17	-0,37	-0,23	-0,37

1.2.4 Publication B

Spatial distribution of fecal indicators in a semi-enclosed bay by utilizing marine drone

Méry Ndione¹, Luc Vacher¹, Pascal Brunello¹, Thibault Coulombier¹, Denis Dausse¹, Nicolas Lachaussée¹, Philippe Pineau¹, Tony Agion², Michaël Treilles³, Hélène Montanié†, Valérie Ballu¹, Hélène Agogue¹

¹Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS –La Rochelle Université, La Rochelle, France

²QUALYSE, Laboratoire d'analyses, La Rochelle, France

³QUALYSE, Laboratoire d'analyses, Champdeniers, France

Introduction

Drones or unnamed aerial vehicles (UAVs), autonomous underwater vehicles (AUVs) and autonomous surface vehicles (ASVs) have experienced a remarkable growth and become more readily available for marine research in the last decade (Anderson and Gaston, 2013; Crutsinger et al., 2016; Song et al., 2017; Viau et al., 2011). Drones are considered as new, versatile, adaptable, and flexible technologies useful for collecting high-resolution data for monitoring and assessing natural environments (Chapman, 2014; Fráter et al., 2015; Wich and Koh, 2018). Their use in marine research has been critical in bridging the gap between field observations, traditional aerial and space-based remote sensing. Finer mapping of aquatic ecosystems is possible as well as monitoring of marine organisms, their habitats, and acquiring accurate and standard data in real time (Flynn and Chapra, 2014; Klemas, 2015; Pajares, 2015; Watts et al., 2012). Moreover, the development of drones has increased safety and accessibility to otherwise dangerous or inaccessible freshwater or coastal ecosystems (Manfreda et al., 2018; Rhee et al., 2018; Terada et al., 2018; Watts et al., 2012) and the ability to collect data under less optimal weather conditions compared to satellite imagery (Van der Wal et al., 2013). In recent years, UAVs, AUVs, ASVs have been used for water quality monitoring to facilitate access to complex ecosystems, optimize and standardize water sampling and/or measurements of environmental parameters (Koparan et al., 2018a, 2018b; Lally et al., 2019). For example,

Koparan et al (2018) developed an autonomous water sampling mechanism mounted on a multirotor UAV for monitoring water quality.

Recently, La Rochelle University (France) develops the PAMELi (*Plateforme Autonome Multicapteurs pour l'Exploration du Littoral* – Autonomous Multisensor Platform for Coastal Exploration) project for repeated, co-located and simultaneous observations in different disciplines of coastal areas (Chupin et al., 2020). It is intended to acquire scientific data to facilitate the acquisition of spatio-temporal data to promote the emergence of new research (Chupin et al., 2020; Sakic et al., 2021). This autonomous platform is an USV (unnamed surface vehicles) continuously monitors air-draft using the Cyclopée system, a combination of a geodetic GNSS (Global Navigation Satellite Systems) antenna and an acoustic altimeter. In addition to its maneuverability, the interest of the PAMELi system is its ability to be a multi-sensor platform, able to combine water height measurements with many other environmental parameters (temperature, salinity, bathymetry, etc.). Chupin et al., (2020) analyzed this drone's capacity of Navigation Satellite Systems (GNSS) to measure the height at a centimetric level towed by boat and a combination of GNSS antenna and acoustic altimeter mounted. Sakic et al., (2021) proposed to use PAMELi as an alternative to research vessels to measure surface positioning with underwater acoustic positioning. As the PAMELi was built for multidisciplinary scientific purposes, a water sampling mechanism was also developed in order to collect water samples for *ex situ* analysis and measure the environmental parameters at the same time in an autonomous manner.

The monitoring of the microbiological quality of recreational waters is generally carried out through water analysis, since health risks are linked to bathing activities (Cheung et al., 1990; Fleisher et al., 1998). European bathing water quality guidelines define two fecal-indicator bacteria as a basis for seawater classification: *Escherichia coli* and intestinal enterococci (BWD, European Union 2006/7/CE). Thus, bathing sites are classified in four categories depending on the concentration of fecal-indicator bacteria (FIB) in water, which indicates a public health risk related to swimming activities (EC, 2006). Conventionally, bathing waters quality is monitored from the shore during summer periods by sampling on the beach one or two official sites defined by local regulatory and sanitary security agencies.

Fecal-indicator bacteria concentration can differ substantially because of their high spatial and temporal variability (Boehm et al., 2009; USEPA, 2009). Concentrations in different areas of the beach may be affected by the location relative to the bacterial source, stormwater and agricultural runoffs, presence of warm-blooded animals, and type of use (Gourmelon et al.,

2010b; Savichtcheva et al., 2007). Therefore, a single sample of waters reveals little about the true water quality of a beach. Ideally, as far as budget and time are possible, multiple samples should be taken to gain a snapshot into the patchy structure of coastal marine waters and associated human health risk.

We take advantage of the opportunity to use the PAMELi and its water sampling device to study the FIB variability of an entire bay (i.e, Aytré bay) devoted mainly to various recreational activities such as bathing, windsurfing et kitesurfing. The Aytré bay, located in Charente Maritime (France), is a large urban beach where swimming has been prohibited since summer 2018 due to recurrent fecal contamination. Thus, this beach is classified as poor quality with high levels of FIB. A one-year survey was already carried out to analyze the temporal dynamics of the fecal contamination in Aytré Bay at the two bathing sites of this beach (Ndione et al., 2022). In addition to this temporal study, it is necessary to describe the spatial dynamic of fecal contaminants in this beach. As drones have rapidly become a leading methodological tool in aquatic ecosystems, we proposed to analyze the capacity of the marine drone PAMELi to carry out multiple water sampling for the analysis of beach water quality and measurements of associated environmental parameters at the same time. This study is the first case using PAMELi for water quality analysis in coastal ecosystem. The objective of this work was to evaluate the performance of the PAMELi drone in collecting water samples and also presents preliminary study of the spatial variability in FIB concentrations of the Aytré bay.

Materials and methods

Study zone

The bay of Aytré is located on the Atlantic coast in the west of France (Figure 1). It is a semi-enclosed sandy-muddy bay protected by the islands of Ré and Oléron. A vast area of wetland borders the bay to the east. Aytré Bay is a large, low-slope turbid beach with a length of 1.8 km and 2.5 km² of foreshore. It is one of the largest bathing beaches in this region and has two main sites, North Platin and South Platin, where microbiological quality monitoring of bathing water is performed (Sites 8 and 16, Figure 2).



Figure 1: Location of the study site

Twenty water sampling sites were established across the bay of Aytré (GPS coordinates of each site: Supplementary Table S1). Thirteen of the sampling points were located near to the shore of the bay, and the other 7 were located in the bay interior (Figure 2). The Météo France at La Rochelle - La Pallice meteorological station provided hourly climatic data, including the tide coefficient, seawater temperature, air temperature, wind speed, and rainfall data.

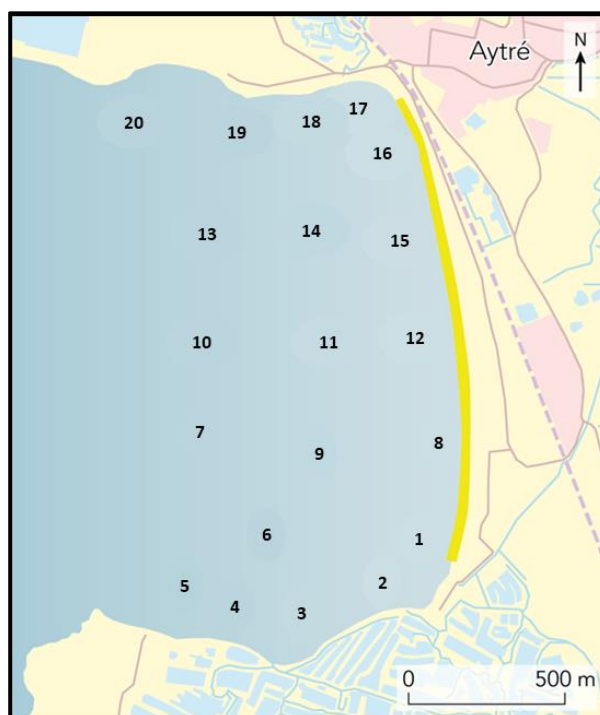


Figure 2: Locations of the sampling sites at the Aytré Bay

Water sampling and *in situ* measurements by the PAMELi drone

The PAMELi drone (pameli.recherche.univ-lr.fr) is an electric catamaran of 3.02 x 1.55 m; it weighs 334 kg and has a speed of 10 nds max (Fig. 3A). The PAMELi drone carries two cameras intended for piloting which communication with the navigation PC is ensured by Wi-Fi 4G or UHF. The marine drone is equipped with a meteorological station, a geodetic GNSS system, a navigation system and a Mini-Cyclopée (Chupin et al., 2020; Sakic et al., 2021). The main features of PAMELi used in this study are the multi-parameters probes and the water sampling system (Fig 3). The multi-parameter probes (YSI EXO2s) made *in situ* measurements of some physico-chemical and climatic parameters of the environment such as temperature (°C), salinity, pH (pH units and mV), oxydo reduction potential (ORP, mV), specific conductance (mS/cm), dissolved oxygen (% air saturation and mg/L), conductivity (mS/cm), turbidity (Nephelometric Turbidity Units, NTU), fluorescent dissolved organic matter (fDOM, in quinine sulfate equivalent, QSE), total suspended solids (TSS, mg/L), chlorophyll (Relative Fluorescent Units, RFU). Throughout its journey, the drone also carried out continuous measurements of the physico-chemical parameters mentioned above by the multi-parameters probes and also in conjunction with water sampling.

During a drone journey, the PAMELi water sampler system can take up to 5 sub-surface seawater samples (depth of 0-30 cm). After each sampling, the pump was purged for one minute and the pump hoses were rinsed with distilled water. Around two liters of water samples were collected into sterile bag. Sampling was conducted on March 9 and September 17, 2020. The sampling days were chosen according to the tidal coefficient allowing the PAMELi drone to approach and sample the sites close to the shore of the bay as the required minimum water depth is around 1 m. Tidal coefficient were 105 (high tide time: 16:50 PM) and 104 (high tide time: 17:41 PM) for the March 9 and September 17, 2020, respectively.

The water samples were stored and transported to the laboratory at 4°C in the dark for immediate processing and analysis. During the March campaign, due to technical problems, the PAMELi performed the water sampling of only 6 sites out of the 20 scheduled sites (Table S1: Sampling sites 8, 10, 11, 12, 13 and 14), the others 14 sites were sampled by hand from a Zodiac boat. However, the PAMELi drone carried out continuous measurements in the bay during this campaign. For the September campaign, the 20 sites were successfully sampled by the PAMELi in less than 2 hours (Table S1, Sampling sites from 1 to 20). In addition, 10 others water samples were taken on the way from the Minimes marina located at the South of La Rochelle city to Aytré bay (Figure 2, Table S1 Sampling sites from 21 to 30).

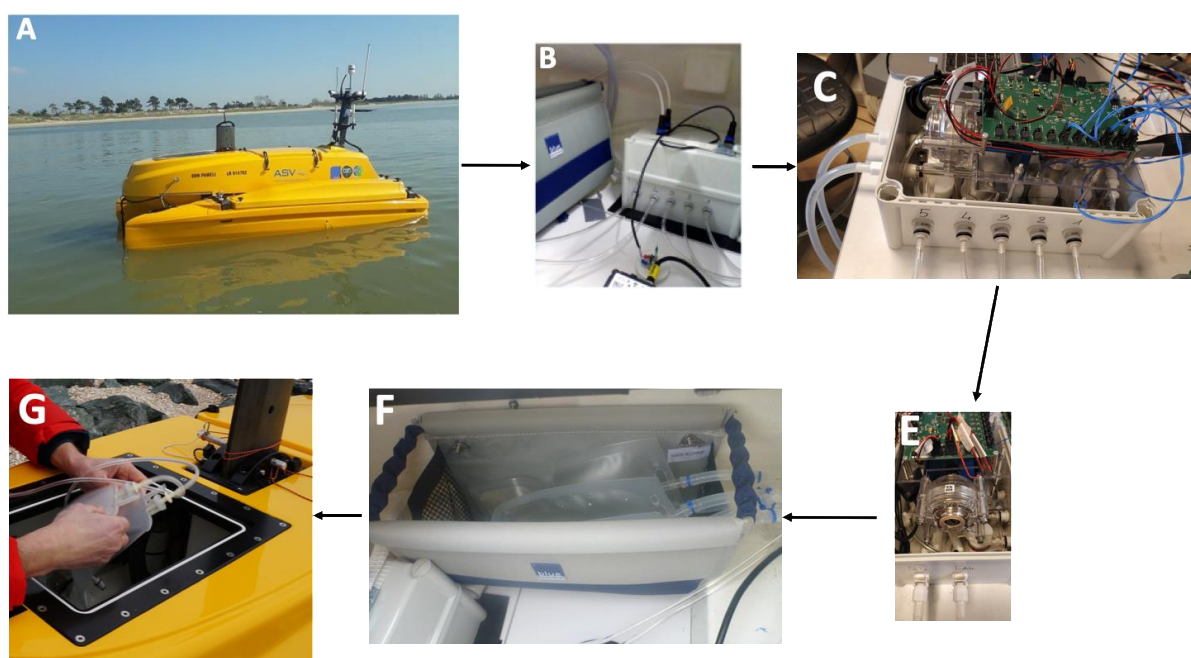


Figure 3. The autonomous surface vehicle (ASV) used in this study. A: The PAMELi drone. B: the water sampling system seen from outside, C: the water sampling system seen from inside, E: Pump, F: Chamber with the 5 sterile bags, G: Retrieval of the samples above the drone.

***Ex situ* analysis of water quality parameters**

The collected water was used to analyze the FIB concentrations and the total bacterial abundance of the bathing water in Aytré Bay. First FIB concentrations were quantified by standard microplate method : NF EN ISO 9308-3 for *E. coli* and NF EN ISO 7899-1 for Enterococci (French Association for Standardization, 1999; International Organisation for Standardisation, 1999). The concentrations of dissolved inorganic nutrients such as ammonia [NH₄ (μmol/l)], nitrate [NO₃ (μmol/l)], nitrite [NO₂ (μmol/l)], silicate [SiO₂ (μmol/l)], and phosphate [PO₄ (μmol/l)] were measured by photometric detection as described by the standard method (International Organisation for Standardisation, 2013). For suspended particulate matter (SPM) analysis, 300 ml of water was filtered through 47 mm pre-combusted and pre-weighted GF-F filters. Then filters were dried at 45°C for 2h and SPM was determined by weight.

Statistical analysis

To determine the link between FIB abundance and environmental variables, Pearson correlation tests were performed using the PerformanceAnalytics package (Peterson, 2007) in R v4.0.2 (R Core Team, 2020).

Results

Environmental parameters

The sampling carried out in situ in the bay during the March and September campaigns by the PAMELI drone was supplemented, in September, by carried out continuous measurements during throughout its journey from the Minimes marina (Figure 4: March campaign, Figure 5: September campaign).

The average water temperature on March campaign and September campaign was 11,3°C and 22,6°C, respectively (Table S1). During the September campaign, the water temperature inside the bay (23,2°C) was higher than the outside of the bay (21,4°C). During the March campaign, the salinity was much lower in the bay (26,1) than in September (34,3). This low salinity observed in March was mainly due to heavy rainfalls (cumulative rainfalls for the 5 past days: 30 mm). These heavy rainfalls may account also for the increase in the turbidity observed in March (60,0 NTU) compared to September (2,2 NTU). Concerning the *ex situ* environmental parameters, we also observed highest measured values for nutrients (ammonium, nitrate, nitrite, phosphorous and silicate) in March than in September (Table S2). We observed also a highest concentration of suspended particulate matter in March than in September (Table S2).

E. coli and intestinal enterococci abundances

During March and September campaigns, the abundance of *E. coli* and intestinal enterococci in water samples over the 20 sites ranged from 0.0 to 251 MPN/100 ml and from 0 to 15 MPN/100 ml respectively (Figure 5, Table S3).

During March campaign, the abundance of intestinal enterococci ranged from 304 to 1090 MPN/100 ml (Figure 6, Table S3). The abundance of intestinal enterococci was above the regulatory threshold (370 MPN/100 ml of water) for 17 samples out of 20 (Table S3). The high concentration of intestinal enterococci observed in the whole bay could be attribute to the heavy rainfalls that occurred before the campaign. Concerning *E. coli* abundance, all the sites were below the regulatory threshold (1000 MPN/100 ml of water) and the highest concentration were observed for sites 2,8 and 16 close to the shore (Figure 5, Table S3). The average abundance of intestinal enterococci over the 20 sites of the bay was 603±200 MPN/100 ml while the average abundance of *E. coli* was 47±54 MPN/100 ml. The spatial variability of *E. coli* abundance is highest than for intestinal enterococci.

During the September survey, the abundance of *E. coli* and intestinal enterococci was very low (i.e, below detection limit) (Table S3). The absence of *E. coli* and intestinal enterococci was also observed in September for the 10 additional water samples taken on the way from the Minimes marina to Aytré bay (data not shown).

Relationships between FIB abundance and environmental parameters.

Due to the absence of fecal contamination during September campaign, we cannot correlate the environmental data to FIB abundances.

During March campaign, only 6 sites (sites 8, 10, 11, 12, 13 and 14) out of 20 were sampled and *in situ* measured by the PAMELi. *E. coli* abundance was correlated significantly with the temperature and dissolved oxygen concentration (Pearson test, $p < 0.05$) measured by the PAMELi drone (Figure S1). There was no significant correlation observed with intestinal enterococci abundance and *in situ* measured parameters (Figure S1). As the others 14 sites were sampled by hand from a Zodiac boat, the relationships between FIB abundance and *ex situ* environmental parameters can be analyzed for the whole sites (i.e, 20 sites) (Figure 7). There was no significant correlation observed with *E. coli* abundance and *ex situ* measured parameters (Figure 7). Intestinal enterococci abundance was correlated significantly with nitrate, nitrite and phosphate concentration (Pearson test, $p < 0.05$) (Figure 7).

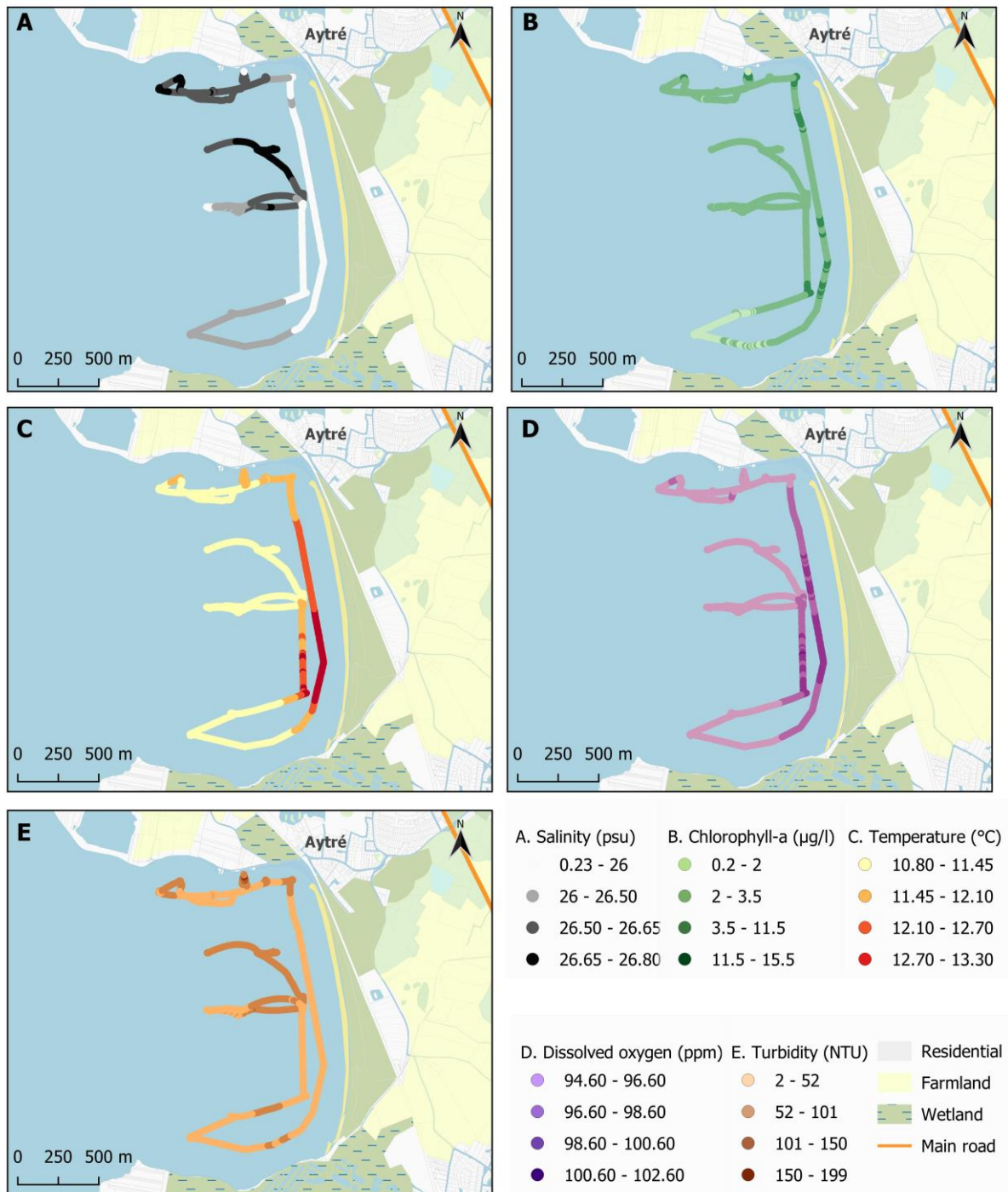


Figure 4. In situ continuous measurement of environmental parameters by the PAMELi drone during the March campaign. A: Salinity concentration variation, B: Chlorophyll-a concentration variation, C: Temperature variation, D: Dissolved oxygen concentration variation, E: Turbidity variation

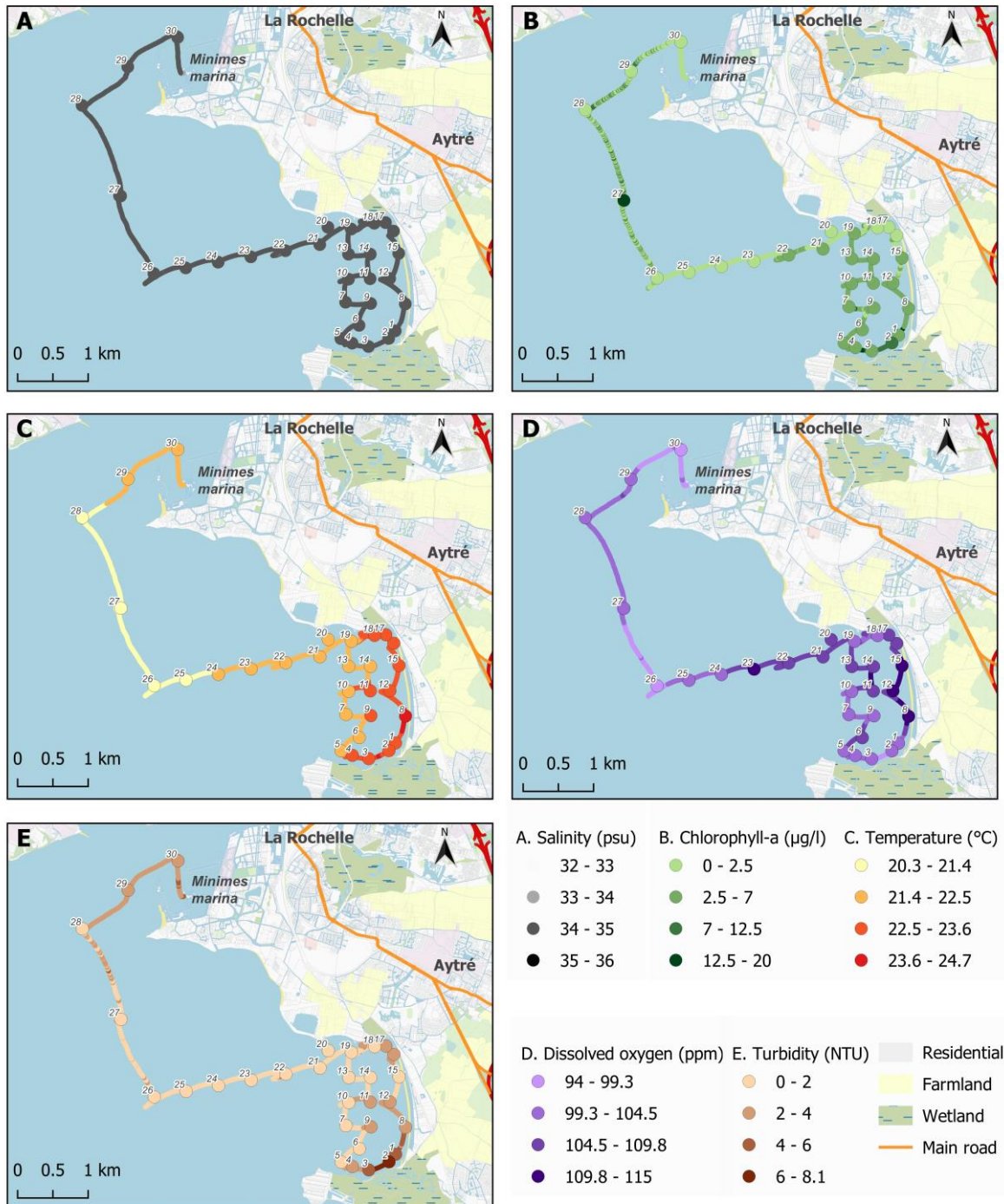


Figure 5. In situ continuous measurement of environmental parameters by the PAMELi drone during the September campaign. The points represent the 20 water sampling sites in the bay (1 to 20) and the 10 supplementary ones (21 to 30) outside the bay. A: Salinity concentration variation, B: Chlorophyll-a concentration variation, C: Temperature variation, D: Dissolved oxygen concentration variation, E: Turbidity variation

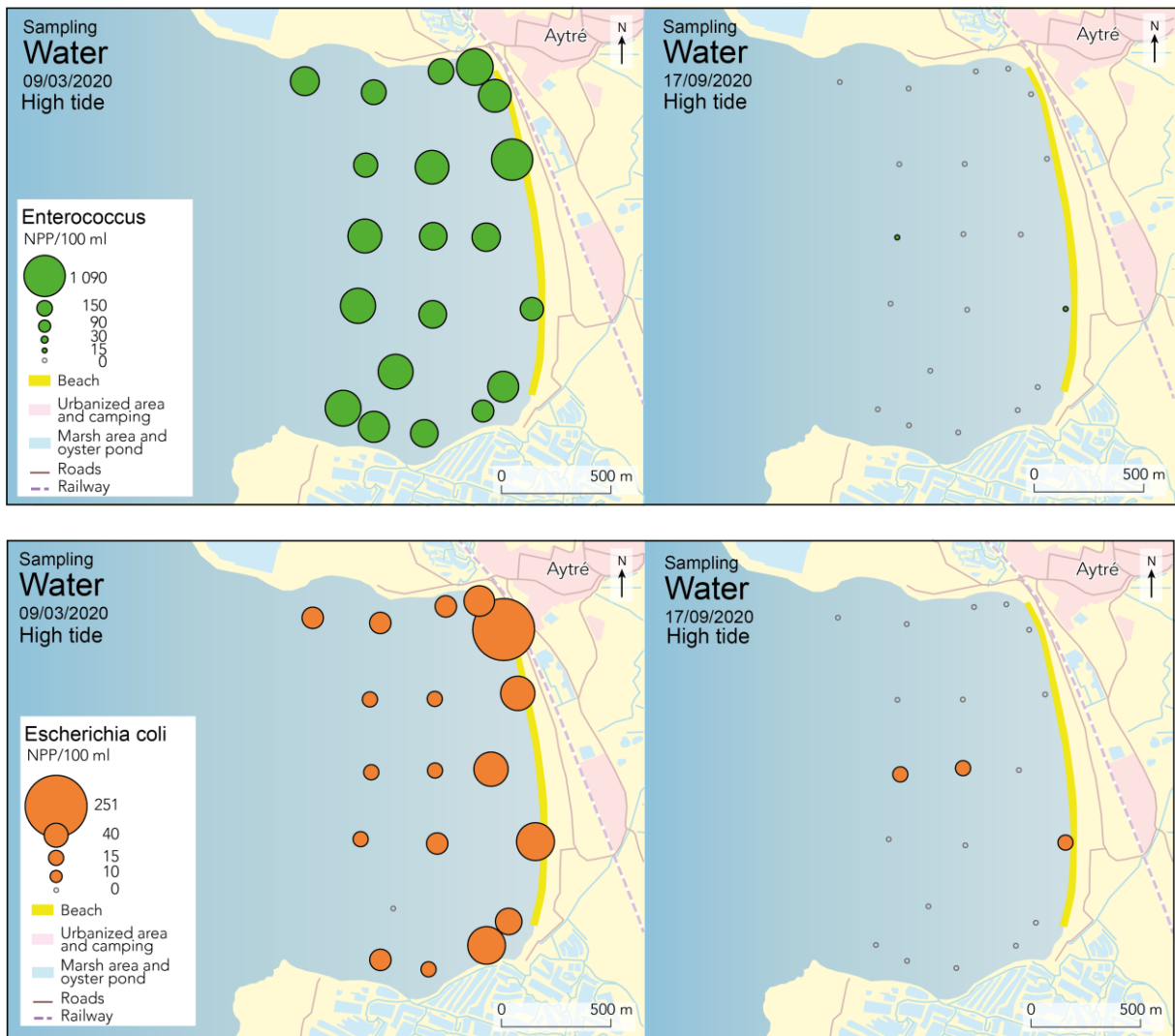


Figure 6. Abundance of enterococci (in green) and *E. coli* (in orange) in the twenty sampling sites during the two campaigns (March at the left and September at the right)

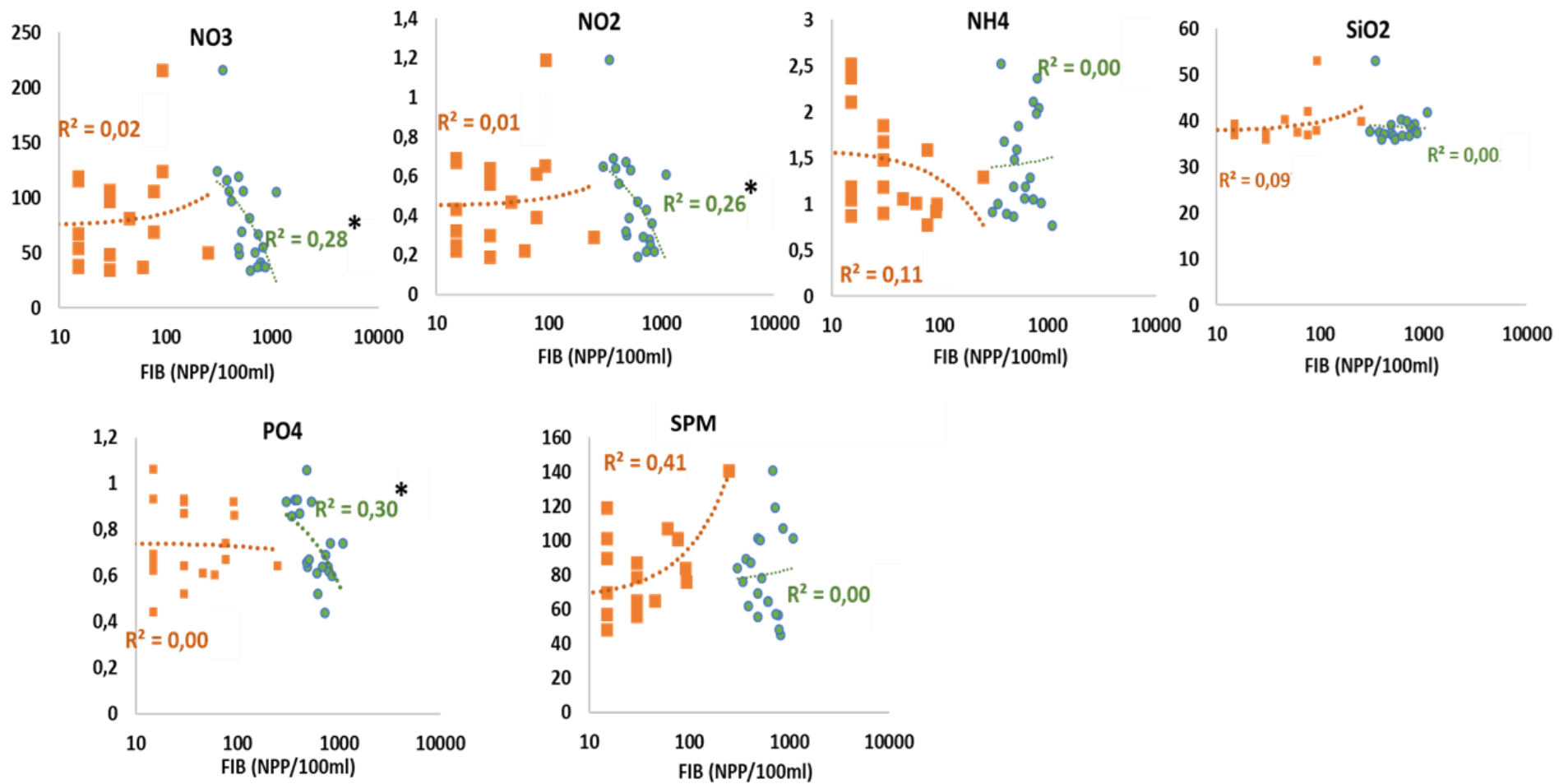


Figure 7. Variation of ex situ environmental parameters and FIB concentrations for March campaign and correlation of each in situ parameter with FIB (20 sampled sites). *E. coli* (orange) and enterococci (green) in water samples, asterisks indicate a correlation significantly different from 0 (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$). NO₃ : nitrate concentration ($\mu\text{mol/l}$), NO₂ : nitrite concentration ($\mu\text{mol/l}$), NH₄ : ammonium concentration ($\mu\text{mol/l}$), SiO₂: silicate concentration ($\mu\text{mol/l}$), PO₄ : phosphorous concentration ($\mu\text{mol/l}$), SPM: suspended particulate matter (mg/l).

Discussion

As observed *in situ* with the sensors of the PAMELi drone, we confirmed with the *ex situ* measured parameters that the highest values recorded for FIB concentration measured during the March campaign are due to rainfalls. It well known that high concentration of FIB in recreational water could be attribute to rainfall (Ackerman and Weisberg, 2003; Boehm et al., 2003; Lipp et al., 2001; Powers et al., 2020; Weiskerger et al., 2019). First, during rainfall, enteric microorganisms may be transported rapidly from watershed to coastal areas (Carney et al., 2019; Silva et al., 2014; Weiskerger et al., 2019). Secondly, the overflow of waste water and lagoon treatment plants may cause excess loading of nutrients and microbes in coastal waters (Staley et al., 2018). Ackerman and Weisberg, (2003) observed systematic increase of fecal bacteria after heavy rainfalls (6 mm/h) and that fecal contamination remained elevated for up to 5 days following a storm. Thus, the high values of intestinal enterococci observed on the whole bay and the persistent presence of *E. coli* near the discharges of rain water (site 2) and marshes (site 8 and 16) can be attributed to the cumulative rainfalls (30 mm) that occurred for the 5 past days before the water sampling. The excess loading of nutrients induced by the rainfall is also observed during our study as in March, the nutrients concentrations are higher than in September and are correlated to the intestinal enterococcus. The absence of FIB in September on the whole bay, corroborate the high temporal variability of fecal contamination recorded previously. Indeed, this feature was already mentioned for the two bathing sites of Aytré bay defined by the Regional Health Agency (i.e, sites 8 and 16) where a one-year survey was conducted (Ndione et al, 2022).

We tested the water sampling system effectiveness during the two campaigns. For march campaign, the PAMELi drone performed the water sampling of only 6 sites out of the 20 scheduled sites where as for the September campaign, the 20 sites were successfully sampled by the PAMELi. The PAMELi drone can perform 5 consecutive water sampling allowing the sampling of the 20 sites in less than 2 hours. PAMELi drone can greatly reduce the effort and the time to collect samples. In addition, reducing the collection time is critical since many water properties fluctuate within hours.

The large capacity of water sampling (i.e, 2L) of the PAMELi drone allows *ex situ* analysis of various abiotic and biotic parameters that need important volume of water (such as nutrients or FIB analysis). These parameters are central if we want to simultaneously investigate several

potential causes of contamination in a large coastal zone. In addition, the possibility of the PAMELi to scan and sample a large patchy area enable to get a clearer picture of potential sources of fecal contamination and therefore its associated human health risk. Thus, and more generally, the PAMELi drone permits to obtain more samples within a single zone in order to develop a high-resolution map, for instance after a rainstorm to identify the source of the influx of chemical or biological contaminants. The methodology employed in this study was useful to investigate the spatial dynamic of the fecal contamination of Ayté bay.

Conclusion

In this pilot study, we have successfully developed a water system sampler on a USV that can obtain water samples from a large coastal zone. The system can collect five 2 L samplers per trip, we are actually working on a system that can collect twelve 2 L samplers per trip. At the same time, the PAMELi drone carried out continuous environmental measurements thanks to the presence of a multi-parameter probes. Efficient and effective monitoring of coastal waters and its physico-chemical parameters is a challenge over the coming decades. This work demonstrates the potential of USV-based monitoring of aquatic ecosystems: the PAMELi drone can autonomously and simultaneously retrieve physical, chemical and biological data.

Acknowledgments

This work was financed by Mairie d'Aytré, Région Nouvelle Aquitaine, Communauté d'Agglomération de la Rochelle, Département de la Charente Maritime. We thank Maëlig Le Beguec, Claire Emery and Mathieu Paoletti, for their help during the sampling campaigns. We acknowledge Olivier de Viron and Cécile Vincent.

Supplementary information

Table S1: *In situ* environmental parameters measured by the PAMELi drone for each sampling sites during the two campaigns (March and September). Temp: temperature (°C), Sal: salinity, pH (pH units), Chloro a: chlorophyll a (RFU), dO2: dissolved oxygen (% air saturation), Turb: turbidity (NTU), fDOM : fluorescent dissolved organic matter (QSE).

Collection date	Sampling sites	Longitude	Latitude	Collection time	Temp	Sal	pH	Chloro a	dO2	Turb	fDOM
03/09/2020	8	-1,13	46,12	16:22	12.62	24.55	8.39	0.78	98.90	33.99	6.34
03/09/2020	10	-1,14	46,12	15:57	10.83	26.00	8.29	0.53	95.70	38.13	5.77
03/09/2020	11	-1,13	46,12	15:47	10.93	26.63	8.29	0.68	95.30	65.51	4.46
03/09/2020	12	-1,13	46,12	15:42	11.28	26.44	8.29	0.70	96.80	60.67	4.66
03/09/2020	13	-1,14	46,12	15:01	10.91	26.51	8.28	0.61	94.70	70.65	4.39
03/09/2020	14	-1,13	46,12	15:08	10.96	26.73	8.29	0.87	95.30	90.84	4.12
09/17/2020	1	-1,13	46,11	16:32	23.73	34.42	8.40	1.18	101.51	5.84	2.19
09/17/2020	2	-1,13	46,11	16:44	24.04	34.56	8.37	1.76	99.36	7.02	2.48
09/17/2020	3	-1,13	46,11	16:51	23.52	34.44	8.39	1.33	99.63	4.19	2.19
09/17/2020	4	-1,13	46,11	16:56	23.07	34.33	8.38	0.76	102.82	2.09	1.94
09/17/2020	5	-1,14	46,11	17:08	22.88	34.28	8.37	1.58	103.49	1.45	1.87
09/17/2020	6	-1,13	46,11	17:13	22.66	34.25	8.37	0.73	105.98	1.45	1.77
09/17/2020	7	-1,14	46,12	17:25	22.48	34.23	8.35	0.67	103.52	1.35	1.78
09/17/2020	8	-1,12	46,12	16:20	24.72	34.65	8.42	1.27	109.89	3.65	2.76
09/17/2020	9	-1,13	46,12	17:20	23.04	34.29	8.37	1.06	102.27	2.96	1.91
09/17/2020	10	-1,14	46,12	17:31	22.95	34.27	8.38	0.85	104.49	1.57	1.9
09/17/2020	11	-1,13	46,12	17:44	23.27	34.33	8.43	1.27	108.43	2.76	2.12
09/17/2020	12	-1,13	46,12	16:02	23.50	34.35	8.43	1.19	110.87	3.45	2.19
09/17/2020	13	-1,14	46,12	17:55	22.68	34.21	8.37	0.75	108.24	0.92	1.87
09/17/2020	14	-1,13	46,12	17:50	22.85	34.23	8.36	0.86	104.76	1.53	1.91
09/17/2020	15	-1,13	46,12	15:52	23.61	34.28	8.39	0.69	113.48	1.89	1.91
09/17/2020	16	-1,13	46,13	15:43	23.88	34.38	8.37	0.59	108.03	3.27	2.07
09/17/2020	17	-1,13	46,13	15:38	23.72	34.26	8.34	0.52	105.86	2.37	2.1
09/17/2020	18	-1,13	46,13	15:30	23.46	34.25	8.33	0.51	102.71	1.83	2.08
09/17/2020	19	-1,14	46,13	18:02	22.94	34.23	8.34	0.88	103.11	1.40	2.01
09/17/2020	20	-1,14	46,13	18:13	22.24	34.18	8.34	0.42	105.50	1.66	1.82
09/17/2020	21	-1,14	46,12	15:07	22.05	34.17	8.35	0.80	107.85	1.72	1.76
09/17/2020	22	-1,15	46,12	14:45	21.76	34.15	8.36	0.91	108.54	1.63	1.68
09/17/2020	23	-1,15	46,12	14:18	21.99	34.18	8.36	0.51	110.59	0.68	1.73
09/17/2020	24	-1,16	46,12	14:03	21.56	34.17	8.33	0.29	104.49	0.50	1.64
09/17/2020	25	-1,17	46,12	13:51	20.77	34.13	8.32	0.40	100.68	0.60	1.53
09/17/2020	26	-1,17	46,12	13:27	20.29	34.12	8.31	0.57	98.09	1.62	1.49
09/17/2020	27	-1,18	46,13	13:07	20.65	34.13	8.33	3.50	99.71	0.66	1.54
09/17/2020	28	-1,19	46,14	12:51	21.06	34.14	8.34	0.44	102.35	1.67	1.55
09/17/2020	29	-1,18	46,14	12:40	21.92	34.13	8.30	0.39	100.54	2.47	1.88
09/17/2020	30	-1,17	46,15	12:27	22.17	34.11	8.29	0.18	98.27	3.21	2.01

Table S2: *Ex situ* environmental parameters analyzed during the two campaigns (March and September). NH₄: ammonium concentration (μmol/l), NO₃: nitrate concentration (μmol/l), NO₂: nitrite concentration (μmol/l), PO₄: phosphorous concentration (μmol/l), SiO₂: silicate concentration (μmol/l), SPM: suspended particulate matter (mg/l).

Sampling sites	March campaign						September campaign					
	NH ₄	NO ₃	NO ₂	PO ₄	SiO ₂	SPM	NH ₄	NO ₃	NO ₂	PO ₄	SiO ₂	SPM
1	1.06	81.14	0.47	0.61	40.21	65	0.07	0.84	0.05	0.17	8.64	8.8
2	0.92	123.94	0.65	0.92	37.76	84	0.03	0.33	0.05	0.16	8.16	11.5
3	0.87	119.12	0.67	1.06	39.11	69	0.01	0.41	0.03	0.11	9.03	15.1
4	1.19	34.25	0.19	0.52	36.84	65	0.00	0.48	0.05	0.10	11.73	10.9
5	2.04	55.15	0.36	0.74	39.23	45	0.00	1.44	0.07	0.12	12.23	14.5
6	1.98	41.61	0.28	0.64	37.89	57	0.11	0.74	0.00	0.04	14.22	9.2
7	2.37	38.37	0.25	0.62	37.94	48	0.00	2.00	0.10	0.23	8.94	6.0
8	1.00	215.39	1.19	0.86	52.96	76	0.00	2.94	0.05	0.06	14.90	7.7
9	1.48	48.56	0.30	0.64	37.11	56	0.00	0.35	0.03	0.07	11.78	7.9
10	2.11	67.01	0.43	0.69	38.94	57	0.00	0.78	0.05	0.07	11.89	6.4
11	1.19	54.43	0.32	0.66	37.26	101	0.04	0.78	0.05	0.10	11.19	10.5
12	1.59	69.16	0.39	0.67	36.78	100	0.04	1.19	0.01	0.06	11.54	6.2
13	2.52	115.71	0.69	0.93	37.45	89	0.08	1.90	0.07	0.02	15.32	5.0
14	1.05	36.95	0.22	0.44	36.78	119	0.00	1.06	0.08	0.02	14.74	3.2
15	0.77	105.34	0.61	0.74	41.94	101	0.02	0.32	0.08	0.06	14.75	3.9
16	1.29	50.34	0.29	0.64	39.85	141	0.09	1.52	0.13	0.11	14.07	5.1
17	1.01	36.90	0.22	0.60	37.36	107	0.00	3.15	0.15	0.10	18.48	4.6
18	0.90	96.89	0.56	0.87	37.17	87	0.01	3.74	0.15	0.11	15.08	5.1
19	1.68	106.07	0.64	0.93	35.95	62	0.19	1.57	0.11	0.08	15.34	4.4
20	1.85	106.43	0.63	0.92	35.93	78	0.45	0.96	0.12	0.06	16.31	2.8

Table S3: FIB abundances in each sampling sites during the two campaigns (March and September). Numbers in red indicate that the abundance was above the European directive threshold for intestinal enterococci < 370 MPN/100 ml (MPN: most probable number).

Sampling sites	March campaign		September campaign	
	<i>E. coli</i> (MPN/100ml)	Intestinal Enterococci (MPN/100ml)	<i>E. coli</i> (MPN/100ml)	Intestinal Enterococci (MPN/100ml)
1	46	612	0	0
2	93	304	0	0
3	15	485	0	0
4	30	619	0	0
5	0	824	0	0
6	0	782	0	0
7	15	791	0	0
8	94	344	15	0
9	30	489	0	0
10	15	736	15	15
11	15	485	15	0
12	77	514	0	0
13	15	371	0	0
14	15	728	0	15
15	77	1090	0	0
16	251	690	0	0
17	61	861	0	0
18	30	415	0	0
19	30	393	0	0
20	30	534	0	0

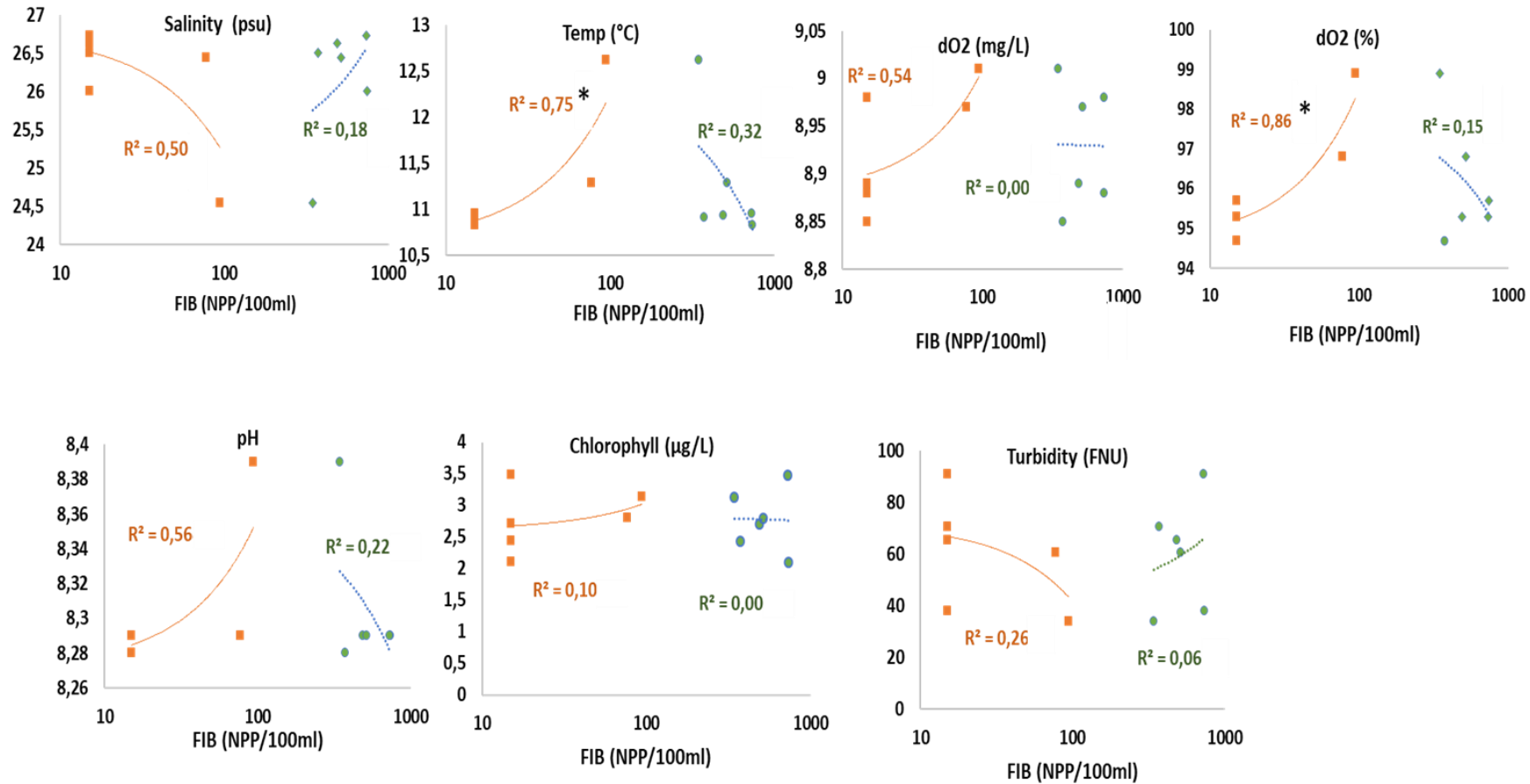


Figure S1. Variation of *in situ* environmental parameters measured by the PAMELi drone and FIB concentrations for March campaign and correlation of each *in situ* parameter with FIB (6 sampled sites). *E. coli* (orange) and enterococci (green) in water samples, asterisks indicate a correlation significantly different from 0 (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$)

1.3 Conclusion

L'étude de la dynamique spatiale de la contamination fécale dans la baie d'Aytré réalisée sur deux périodes de l'année en mars et en septembre a permis d'analyser la répartition spatiale de la contamination fécale dans l'eau et le sédiment sur toute l'étendue de la baie.

L'analyse de la texture du sédiment réalisée pour identifier des différents microreliefs a montré que le sédiment de la baie d'Aytré est constitué principalement de sédiments sableux observés sur le centre de la baie et de sédiments sablo-vaseux sur les bords de la baie. L'abondance des *E. coli* dans le sédiment était relativement faible alors que l'abondance des entérocoques était variable et différente entre les deux campagnes d'échantillonnage et sur les différents sites.

L'analyse en quadrillage du niveau de contamination fécale de la baie d'Aytré a permis de mettre en évidence une homogénéité spatiale de l'abondance des entérocoques alors que les abondances des *E. coli* présentaient de fortes concentrations au niveau du bord et de plus faibles abondances en milieu de baie.

A partir de ces résultats, il semble difficile au vu des observations de considérer qu'une logique de répartition spatiale concernant la contamination existe au sein de la baie. Aucune corrélation vraiment significative ne permet d'étayer les hypothèses concernant l'existence de zones identifiables dans le substrat de la baie possédant des caractéristiques physico-chimiques et granulométriques qui pourraient expliquer une répartition localisée et une récurrence spatio-temporelle de la contamination.

**CHAPITRE 4 : IMPACT DE LA CONTAMINATION
FÉCALE DE LA BAIE D'AYTRE SUR LA STRUCTURE ET
LA DIVERSITÉ DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES.**

1.1 Hypothèses et objectifs

Pour comprendre les effets de la contamination fécale de la baie d'Aytré sur l'équilibre écologique de cette zone de baignade, nous avons réalisé une étude comparative des communautés bactériennes dans l'eau et le sédiment par le séquençage du gène codant pour l'ADNr 16S. De même, pour déterminer l'impact de cette contamination fécale sur le fonctionnement de ce milieu, nous avons analysé les communautés bactériennes actives dans les deux compartiments marins. Ce chapitre est présenté sous format d'article scientifique qui sera soumis prochainement à *ISME communication* et qui présente :

- (1) Une comparaison des communautés bactériennes totales et actives entre le sédiment et l'eau.
- (2) Différentes bactéries indicatrices de contamination fécale proposées comme indicateurs fécaux alternatifs.
- (3) L'impact des facteurs environnementaux sur les communautés bactériennes en lien avec leur utilisation comme bioindicateurs.

1.2 Publication C

Prokaryote seasonal variability in a contaminated recreational aquatic ecosystem.

NDIONE Méry¹, KALENICHENKO Dimitri¹, TREILLES Michaël³, AGION Tony², VACHER Luc¹, MONTANIÉ Hélène^{1†}, AGOGUÉ Hélène¹

¹*Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS–La Rochelle Université, La Rochelle, France*

²*QUALYSE, Laboratoire d'analyses, La Rochelle, France*

³*QUALYSE, Laboratoire d'analyses, Champdeniers, France*

1- Introduction

Fecal contamination markers in aquatic environments are followed to guarantee the quality of the water, which ensure safe usage of this common resource by human society. Surveys revealed that many aquatic environments are contaminated sometimes permanently (Thoe et al., 2018) and sometimes following a seasonal trend (Cui et al., 2013; Lipp et al., 2001). In addition to the economic impact that comes with the limitation of the water access to human activities, the presence of these fecal bacteria can unbalance the ecological status of aquatic environments and thus the structure of native microbial communities. Aquatic ecosystems are primarily composed of two distinct components: the sediments and the water column, each with its own environmental conditions and microbial community structure (Feng et al., 2009; Yang et al., 2016). The prokaryote communities are composed of bacteria and archaea that can be fixed or free in the environment. Several studies have analyzed the presence and persistence of fecal bacteria in aquatic environments including the sediment and water column. Thus, in these two marine components, autochthonous and allochthonous bacterial communities can occur in different physiological states: they can be viable, dormant or dead (Ge et al., 2012; Russell et al., 2012).

In these ecosystems, bacteria play crucial roles in biogeochemical mechanisms of these environments (Telford et al., 2006) such as energy and dissolved organic matter fluxes, carbon and nutrient cycling (Chen et al., 2017; D'Hondt et al., 2004; Karl, 2002; Koh and Khim, 2014).

They form the basis of the food chain in marine ecosystems by breaking down organic matter into inorganic forms that can then be used by autotrophic organisms (Lee et al., 2017; Azam and Malfatti, 2007; Falkowski et al., 2008; Uritskiy et al., 2019). Nevertheless, in the current context of long-term climate change and/or following short-term seasonal variations, some environmental parameters of the environment may disturb the equilibrium of intertidal ecosystems. Studies have confirmed that the composition of microbial communities can be influenced by various environmental variables, including nutrients, salinity, pH, temperature (Fernandez-Leborans et al., 2007; L. Wang et al., 2013; Yu et al., 2015) and biotic factors such as inter-organism cooperation, predation or competition (Gobet et al., 2012; Lavergne et al., 2017; Li et al., 2021). These factors may also influence the dynamics of introduced fecal bacteria in contaminated marine environments (Weiskerger et al., 2019). Like most ecosystems, intertidal environments are resilient and have the ability to clean up pollutants (Ballesté et al., 2020; Blaustein et al., 2013). Knowing the microbial functions associated with this ecosystem is critical to understand its resilience capacities while facing different types of pollution.

However, studies of the seasonal dynamics of bacterial diversity in intertidal ecosystems with high anthropogenic pressure are still lacking (Mestre et al., 2020). Likewise, the resilience of these environments to fecal contamination is still poorly understood.

High-throughput sequencing techniques revealed the microbial composition and allowed the assessment of the determinism and biogeography of marine bacteria in aquatic intertidal ecosystems (Chen et al., 2017; Li et al., 2021; Salazar and Sunagawa, 2017). These methods are widely used to determine microbial diversity in various aquatic ecosystems such as beaches, estuaries, islands, marshes, mudflats or lakes (Hugoni et al., 2018; Lee et al., 2021; Vadde et al., 2019; Zhang et al., 2020). However, this technique has a number of limitations. The total community described by sequencing methods includes, in addition to active cells, dormant or sporulating cells and even dead cells (Makhalanyane et al., 2015). For example, it has been suggested that in sediments in particular, inactive cells may be deposited in the water column (Stoeckel and Harwood, 2007), and that extracellular DNA may be prevalent because it can bind efficiently to sediment particles (Corinaldesi et al., 2005). Thus, in addition to analyze prokaryotic populations, studying the functional structure of microbial communities in these coastal ecosystems is essential to understand their dynamics and define their ecological status through the sequencing of the RNA that better reflects the activated community. High throughput sequencing techniques have also allowed in recent years to describe the

biogeography of marine rare biosphere communities for bacteria (Galand et al., 2016, 2010; Hugoni et al., 2013; Sogin et al., 2006). This phenomenon is that there are a small number of very abundant taxa, whereas a large number of taxa (the "rare biosphere") have lower abundance and extremely high diversity (Bent and Forney, 2008; Fuhrman, 2009); the latter sub-community is still largely unexplored (Pedrós-Alió, 2012; Yu et al., 2015). These methods also make it possible to highlight the existence of biomarkers or characteristic proxy of a disturbance of the aquatic ecosystem such as fecal contamination.

To analyze the impact of fecal contamination on the bacterial communities of a coastal ecosystem, we studied the structure of microbial communities in Aytré Bay. This is a recreational intertidal ecosystem that has been banned for swimming since summer 2018 in accordance with the European directive (2006/7/EC), following recurrent fecal contamination. The analysis of the temporal dynamics of the level of fecal contamination in the two bathing sites of Aytré Bay has been described elsewhere (Ndione et al., 2022). In this study, the annual monitoring has shown the background level of *E. coli* and Enterococci with frequent exceedances of the regulatory thresholds for Enterococci. The objective of this study is to compare the seasonal variability of total and active bacterial diversity in water and sediments in order to (1) describe the bacterial diversity and determine the active communities in this ecosystem, (2) identify some environmental factors influencing the composition of the active bacterial communities, (3) analyze the impact of fecal contamination in the bacterial composition by highlighting potential bioindicators of contamination events.

2- Materials and Methods

2.1. Site description and sampling

The study was undertaken on Aytré Bay located along the French Atlantic coast. Water and sediment were collected at the two Aytré Bay swimming sites the North Platin (46°07'30"N, 1°07'38"W) and the South Platin (46°06'58"N, 1°07'28"W) from February 2019 to February 2020 (Figure 1). As recommended by the 2006 European directive, sampling was performed 30 centimeters below the surface water at least one meter deep (Parlement européen, 2006). Sampling was carried out as follows: in winter, there were 2 samples per month and from April to November except for July and August, 3 to 4 samples per month were collected with a biweekly sampling scheme. Sediment sampling was added to the annual monitoring of the water column at low tide before water sampling. The first 5 centimeters of the surface sediment were collected with 15-cm diameter cores. Sampling dates and hours were chosen according to tidal coefficients ranging from 45 to 107. Approximately 5.5 L of water and 1.5 kg of sediment were collected in sterile containers. Each sampling was carried out in triplicate with approximately 5 minutes between replicates.

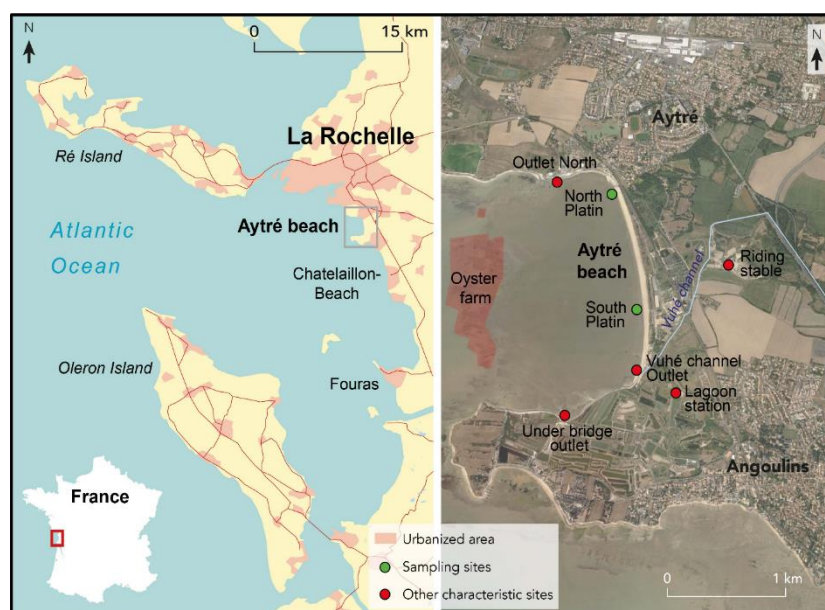


Figure 1: Location of the study site and the sampling sites.

During water sampling, *in situ* parameters such as temperature ($T^{\circ}\text{C}$), salinity (psu), pH and oxygen concentration ($[\text{dO}_2 \text{ (mg/l)}]$) were measured with multiparametric sensors (Cond 3110, TetraCon 325, WTW, Germany). During sediment sampling, the same parameters were measured in the water at the sediment surface with the same multiparametric sensors used for

water samples. The Météo France at La Rochelle - La Pallice meteorological station provided hourly climatic data, including the tide coefficient, seawater temperature, air temperature, wind speed, and rainfall data.

2.2. Water and sediment microbiological quality

In water samples, *E. coli* and intestinal enterococci concentrations were obtained by the standard microplate method: NF EN ISO 9308-3 for *E. coli* and NF EN ISO 7899-1 for Enterococci (French Association for Standardization, 1999; International Organisation for Standardisation, 1999) with a detection limit of 15 MPN/100 ml of water. In sediment samples, *E. coli* and intestinal enterococci concentrations were obtained by the standard microplate method: XP X33-019 for *E. coli* and NF EN ISO 7899-1 for Enterococci (French Association for Standardization, 2004; International Organisation for Standardisation, 1999) with a detection limit of 7 MPN/10 g of sediment.

Results of the level of fecal contamination in water and sediment samples is described in detail elsewhere (Ndione et al., 2022).

2.3. Nutrients and chlorophyll-*a* analyses

In water samples, the concentrations of total organic carbon [TOC (mg/l)] (European Committee for Standardization, 1997), total suspended solids [TSS (mg/l)] and volatile suspended solids [VSS (mg/l)] were quantified by gravimetry as described by the standard method (International Organisation for Standardisation, 2005). The concentrations of dissolved inorganic nutrients such as ammonia [NH_4 ($\mu\text{mol/l}$)], nitrate [NO_3 ($\mu\text{mol/l}$)], nitrite [NO_2 ($\mu\text{mol/l}$)], silicate [SiO_2 ($\mu\text{mol/l}$)], and phosphate [PO_4 ($\mu\text{mol/l}$)] were measured by photometric detection as described by the standard method (International Organisation for Standardisation, 2013). The chlorophyll-*a* concentration ($\mu\text{mol/l}$) was measured by fluorimetry (640 nm, Turner TD 700, Turner Designs, USA) according to (Lorenzen, 1966).

In sediment samples, the TOC (mg/l) was measured by spectrometry (International Organisation for Standardisation, 1988), and dry matter content was measured by gravimetry as described by the standard method (International Organisation for Standardisation, 1993). The concentrations of dissolved inorganic nutrients were quantified from the pore water of the sediment recovered after centrifugation at 3000 rcf for 20 minutes at 8°C. For silicate analysis, the pore water was stored at 4°C. For phosphates, nitrates, nitrites, and ammonia analysis, the

pore water was filtered with a GF/C filter and then stored at -20°C. Nutrient concentrations were quantified with an autoanalyzer (Seal Analytical, Norderstedt, Germany) equipped with an XY-2 sampler according to the method described by (Aminot and Kérouel, 2007). The chlorophyll-*a* concentration ($\mu\text{g/l}$) was quantified by fluorimetry (640 nm, Turner TD 700, Turner Designs, USA) according to (Lorenzen, 1966). The mean grain size was measured by laser granulometry (Mastersizer, 2000; Malvern Instruments, U.K.) and evaluated using the GRADISTAT program as outlined by (Folk and Ward, 1957). Sediment textural groups were defined through the relative abundance (% volume) of mud (for clay and silt with diameter < 60 μm) and sand (diameter between 63 and 2000 μm) according to the Udden-Wentworth scale (Blott and Pye, 1986).

2.4. PCR amplification and sequencing of the prokaryotic 16S rDNA genes

A mixture of 300 ml mixed sample water and RNAlater were filtered through polycarbonate membrane (0.22 μm pore size, 47 mm diameter, GVWP04700; Millipore). The filters were then kept in sterile tubes and stored at -80°C. From these filters, total bacterial genomic DNA was extracted using the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's recommendation. Sediment samples were stored in 15 ml vials and then rapidly immersed in liquid nitrogen before being stored at -80°C. Sample preparation followed the protocol developed by (Hugoni et al., 2018). DNA and RNA extractions of sediment samples were performed from 2 g of sediment sample with QIAGEN RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kit and RNeasy® PowerSoil® DNA Elution respectively following the protocol recommended by the supplier.

After DNA and RNA extraction from water and sediment, a measurement of the concentration and quality of the extracts was performed with the NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. Then, a DNase treatment was performed on the RNA extracts with the Ambion™ Kit before back-transcription to obtain cDNA with the SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). PCR mix consisted in 40 μl of RNA, 4 μl of 10X Turbo Buffer, 0.8 μl of Ambion DNase and 4 μl of inactivation buffer.

The gene coding for 16S rRNA was amplified in the DNA and cDNA samples with primers 357F (Schuurman et al., 2004) and 926R (Walters et al., 2015) specific to the V3-V5 regions (approximately 300bp) 16S rRNA gene. PCR mix consisted in 5X HOT BIOAmp® Blend Master Mix ready to load (Biofidal) and 10 μM of each primer in a final volume of 20 μl .

Amplifications were carried out on SensoQuest thermal cycler according to the following amplification program: denaturation of DNA at 95°C for 3 min followed by 35 repetitive cycles of 45 seconds at 95°C, 45 seconds at 50°C, and 1 minute 30 seconds at 72°C and finally a final elongation step at 72°C for 5 min (Hugoni et al., 2018). Amplification reactions were verified by TBE (1%) agarose gel electrophoresis. Migration was performed at 100 V for 45 minutes.

PCR products were then purified with SPRIselect magnetic beads (Beckman coulter). After purification, the triplicates from each sample were pooled into a single sample. Then, a second amplification (indexing, addition of barcodes) and Miseq sequencing were performed by the Biofidal sequencing platform, (Vaulx-en-Velin, France - <http://www.biofidal.com>) using the Miseq paired-end method.

2.5. Sequence analysis

Sequencing data (of 16S rRNA) obtained from the DNA and RNA samples were received in FASTQ format. Bioinformatics analyses were performed with the FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) pipeline (Escudié et al., 2017) developed by the Genotoul Bioinformatics platform (Toulouse, France) to clean and perform taxonomic assignment of the sequences. First, a demultiplexing was performed from the FASTQ formats of the analyzed sequences. Then a sequence quality analysis was performed with the FastQC tool (version 0.10.0, available on the Galaxy portal, Andrew, 2010) which allows to generate a set of information about the quality of the sequencing data. From this analysis, 16S rRNA sequences were merged into pairs with up to 10% mismatches using FLASH (Magoc and Salzberg, 2011). A total of 3,102,253 sequences were obtained from the DNAs and cDNAs obtained from the 63 water samples and 28 sediment samples analyzed. Thus, a Preprocess was performed to remove singletons 2104,272 sequences. Then, 1,019,389 sequences were clustered using the SWARM tool (Mahé et al., 2014) before removing chimeras using VSEARCH (Rognes et al., 2016). Subsequently, 1,617,164 sequences were filtered to remove sequences with abundance less than 0.00005% (Bokulich et al., 2013). Finally, 584,874 sequences were obtained to perform taxonomic assignment of sequences on the SILVA version 138 database (Quast et al., 2013).

Next, the 16S gene sequences were clustered based on a similarity identity threshold of 97% comparison identity between sequences. This grouping (or cluster) is called an Operational Taxonomic Unit (OTU) and represents a taxonomic unit. The cluster represents the closest estimate of the biological bacterial species. A total of 647 OTUs were obtained. To facilitate

taxonomic assignment, we adapted a pipeline to identify species-level operational taxonomic units (OTUs) and to construct a distance matrix that allowed us to compare the relative abundance of OTUs between sample types. Taxonomic affiliation was performed with RDP Classifier (Cole et al., 2009; Wang et al., 2007) and Blastn (Camacho et al., 2009) on the SILVA v138 database (Quast et al., 2013). OTUs affiliated with chloroplasts and mitochondria were removed. A total of 343 OTUs were annotated and used in the microbial community analyses.

Richness is the number of different species present in the community. We counted the number of different OTUs present in the different sample types (water and sediment) and fractions (DNA and cDNA). To compare the relative abundance of OTUs, the number of sequences was normalized by relating the sequences of all samples to the lowest number of sequences in a given sample. OTUs in water samples were normalized at 1463 sequences for DNA fraction and 2903 sequences for cDNA fraction. In sediment samples, OTUs abundance was normalized at 954 sequences for both DNA and cDNA fractions. Then, the specific richness was analyzed by rarefaction curves allowing to estimate if the sequencing depth was sufficient to exhaustively analyze the bacterial species in all samples. The Chao index¹ is the most commonly used maximum species richness estimator and estimates the number of unobserved OTUs from the number of total OTUs and OTUs in low abundance (singletons - 1 read, and doubletons - 2 reads) (Chao, 1984). Evenness is another measure of the diversity of a bacterial community that determines the regularity of the distribution of OTUs within a sample. These analyses (bacterial rarefaction, richness, and diversity) were performed with the phyloseq, Microbiome, Tydiverse, VEGAN packages of R software, version 4.1.1. (Dixon, 2003; McMurdie and Holmes, 2013; R Core Team, 2020; Verzani, 2014).

2.6. Data analysis

We analyzed the distribution and abundance of sequences (abundant, and specific). A one-way ANOSIM test (Warton et al., 2012) was performed to compare similarity of the diversity of bacterial communities between (1) the two bathing sites, (2) between the two-sample nature (water and sediment) and (3) between the different sample fractions (DNA and cDNA). The same analysis was performed to compare different fractions of water sample at the two contamination levels.

The difference in bacterial communities' composition between samples from different sites, the sample nature and between fractions was analyzed by NMDS ordination (Buttigieg and

Ramette, 2014). A PERMANOVA analysis was performed to determine the contribution of the different bacterial communities on the dissimilarity of the bacterial composition at different analysis levels (Table 1).

Table 1: samples types and different analysis levels

Sites	Sample nature	Fractions	Contamination levels
North Platin	Water	DNA	Above threshold (AT)
			Below threshold (BT)
		cDNA	Above threshold (AT)
			Below threshold (BT)
	Sediment	DNA	-
		cDNA	-
South Platin	Water	DNA	Above threshold (AT)
			Below threshold (BT)
		cDNA	Above threshold (AT)
			Below threshold (BT)
	Sediment	DNA	-
		cDNA	-

3- Results

3.1. Structure of bacterial communities in water and sediment

A total of 342 OTUs were obtained from the analysis of DNA and cDNA sequences of 63 water and 28 sediment samples. The Chao1 index showed higher abundances in DNA than in cDNA fractions. The diversity of bacterial communities in water analyzed by Shannon diversity showed the identical diversity in DNA and cDNA (Figure 2B). According to European regulatory threshold in AT (above threshold) and BT (below threshold) water samples, the Chao1 index showed identical diversity for both sample fractions while Shannon diversity showed greater diversity in DNA fractions for both contamination levels (Figure 2A).

The Chao1 index for bacterial communities in sediment showed the same abundances in both DNA and cDNA fractions. However, the Shannon index showed that bacterial communities in sediment are more diverse in DNA than in cDNA fractions (Figure 2B).

Abundance and diversity indices were calculated to compare bacterial communities' structure between water and sediment and between the different cDNA and DNA fractions in the two sample types. The Chao1 index for bacterial communities was higher in water than in sediment for both DNA and cDNA fractions. The Shannon index showed that bacterial communities in sediment are more diverse in sediment than those in water (Figure 2B).

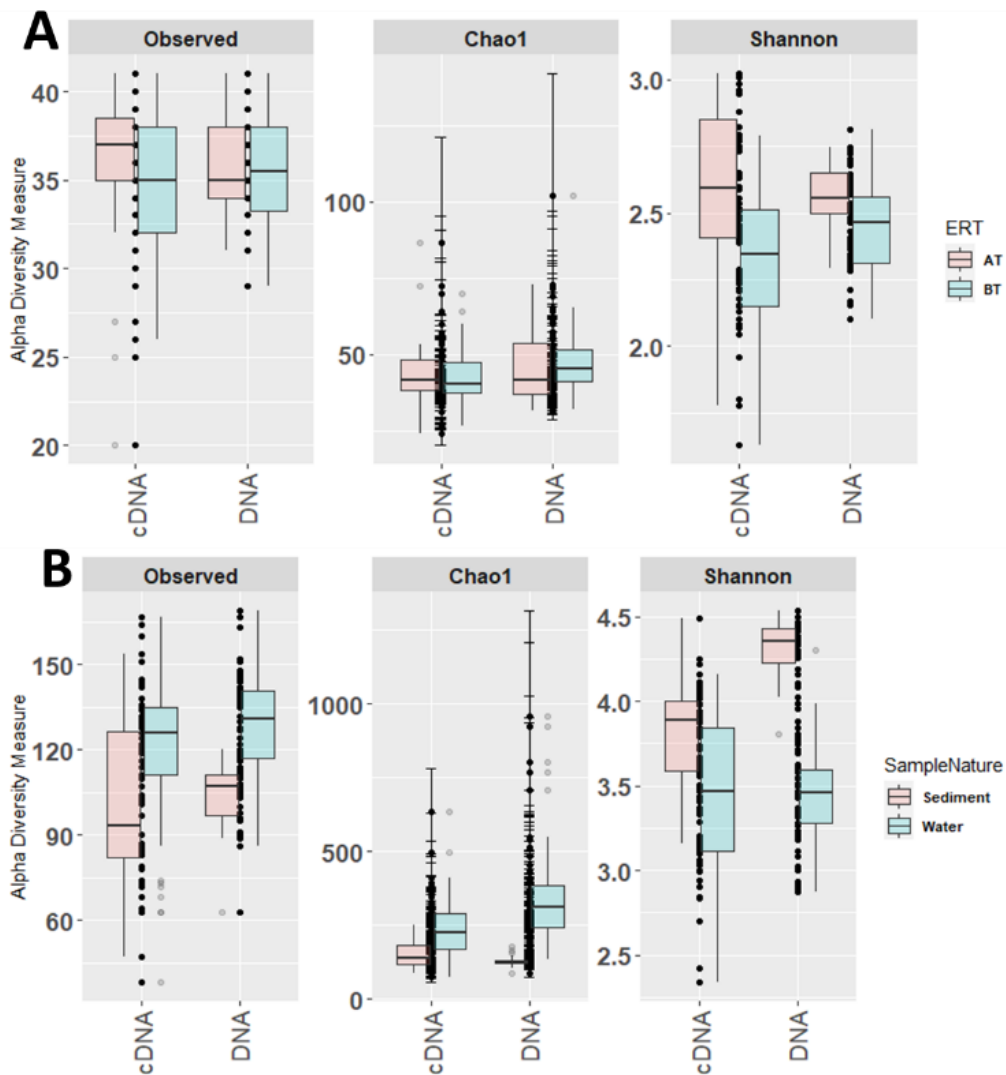


Figure 2: diversity of bacterial communities A) between water samples above european threshold and below european threshold for DNA and cDNA fractions. B) between sediment and water samples for DNA and cDNA fractions. ERT (european regulatory threshold).

3.2. Bacterial Composition in water and sediment

We included in the analysis the 50 most abundant bacterial sequences whose taxonomic affiliations have been determined in total samples (water, sediment and DNA, cDNA). The relative abundance at Phylum level in water and sediment samples according to DNA and cDNA fractions is shown in Figure 3. *Proteobacteria* was the main abundant phylum accounted for 75% (Figure 3A, 3C). The abundance of *Bacteroidota* reached 25% in both sample fractions. The abundance of *Actinobacteriota* reached 10% mainly in the DNA fraction.

Cyanobacteria, *Fusobacteriota* and *Nitrospirota* abundances were variable and mostly abundant in the RNA.

In sediment samples, *Proteobacteria* was the main abundant phylum accounted for 50% (Figure 3B, 3D). The abundance of *Bacteroidota* reached 30% in DNA fractions while *Cyanobacteria* abundance reached 25% in RNA.

The comparison between water and sediment at Phylum level showed that *Proteobacteria* represent the most abundant phylum in both sample natures (sediment and water) (Figure 3A, 3C, 3D). *Actinobacteriota* are unique sequences in water samples mainly within the DNA fraction.

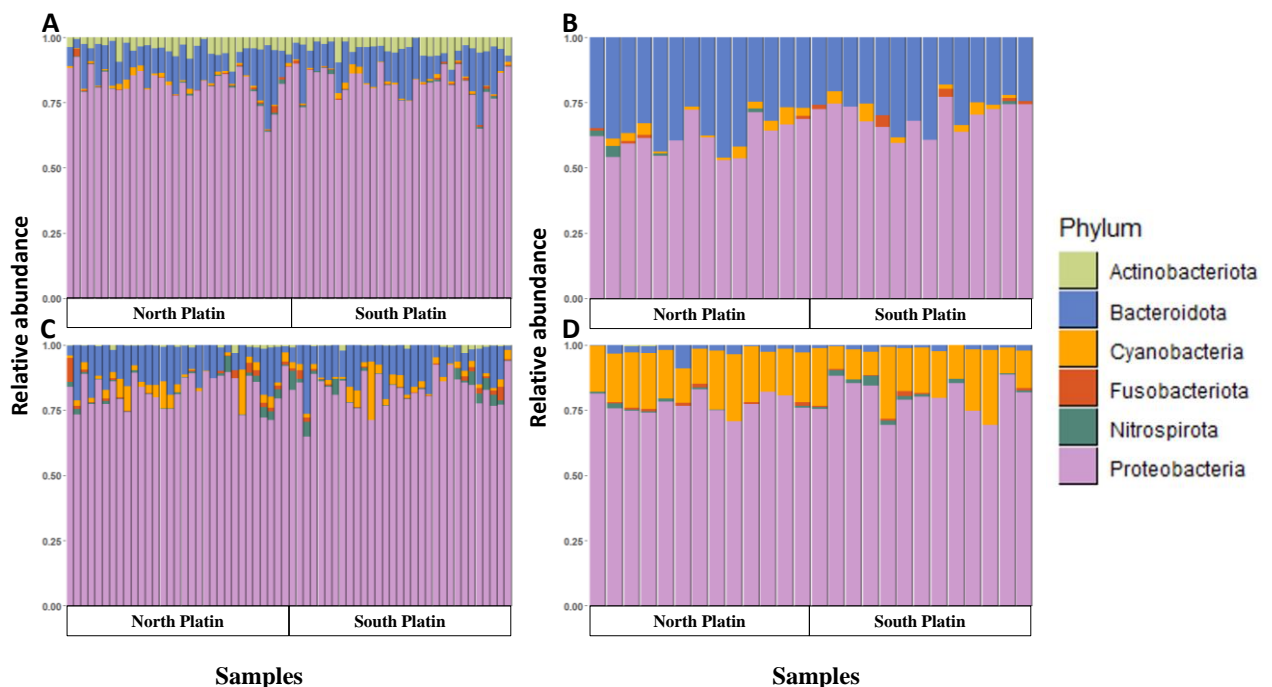


Figure 3: Relative abundances of taxa at the Phylum level for each water and sediment samples. A) community composition with DNA fraction in water samples. B) community composition with DNA fraction in sediment samples. C) community composition with RNA fraction in water samples. D) community composition with RNA fraction in sediment samples.

Analysis of bacterial community diversity at the Family level in water and sediment samples is shown in Figure 4. In water, *Rhodobacteraceae* was the dominant Family with about 65% in cDNA samples and less than 50% in DNA samples. The *Clade-1* Family abundance accounted for 50% in some DNA samples and reached 25% in cDNA samples. The abundance of *SAR116*, *Flavobacteriaceae* and *Nitrospiraceae* reached about 10% in a few DNA and cDNA samples.

Actinomarinaceae was more abundant in DNA while *Chromatiaceae* was more abundant in RNA.

In the sediment, *Chromatiaceae* was dominant Family representing up to 50% in some DNA fractions while their abundances in RNA fractions were at least 75%. *Flavobacteria* were more abundant in the DNA samples with an abundance of about 25% while their abundances were very low in the RNA samples. The same trends were observed for the *Rhodobacteriaceae* families between the two sample fractions.

The comparison of water and sediment showed that bacterial community diversity was different between water and sediment samples. *Clade-1*, *Actinomarinaceae*, *SAR116* and *Spirosomaceae* families constitute the unique sequences in the water samples and are more abundant in the DNA than in the RNA fractions. *Chromatiaceae* and *Flavobacteriaceae* were more abundant in sediment.

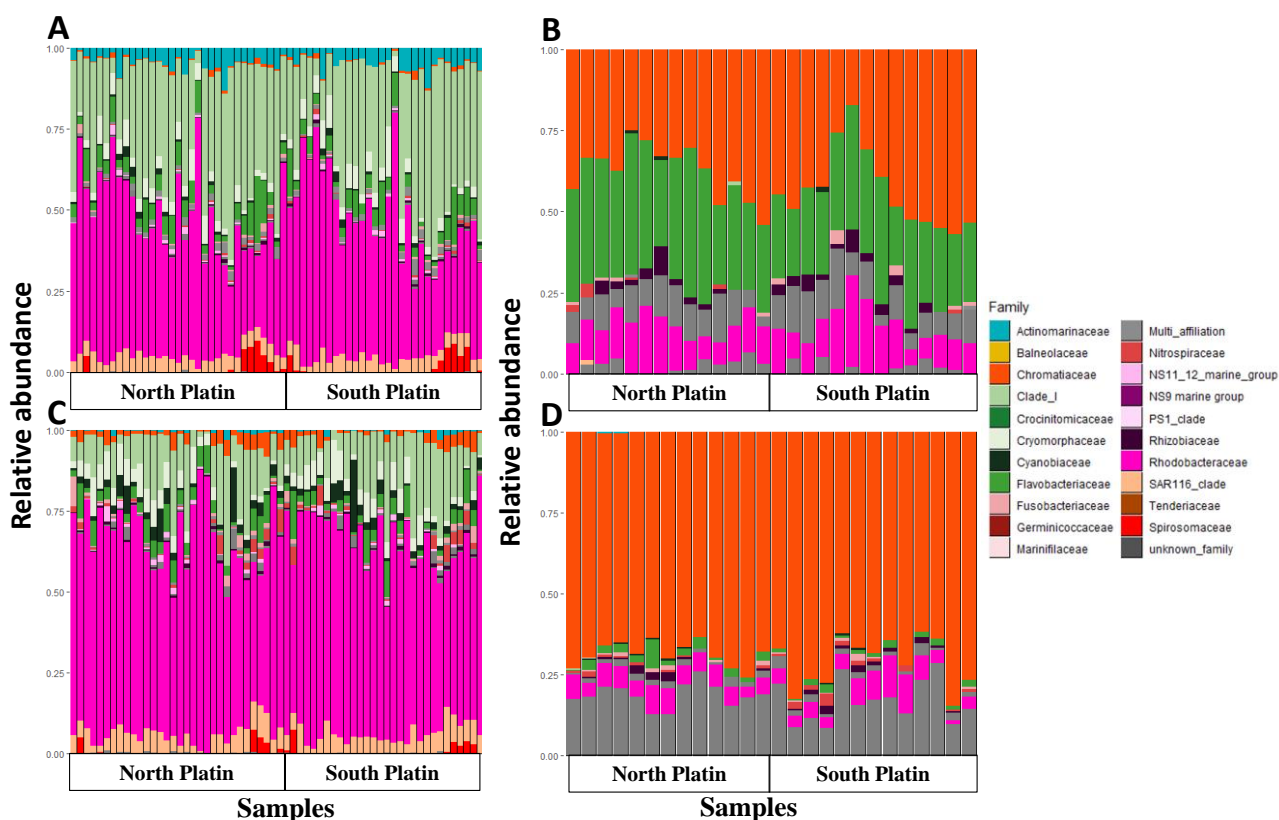


Figure 4: Relative abundances of taxa at the family level for each water and sediment samples. A) community composition with DNA fraction in water samples. B) community composition with DNA fraction in sediment samples. C) community composition with RNA fraction in water samples. D) community composition with RNA fraction in sediment samples.

3.3. Difference in total community structure in different analysis levels

A one-way Analysis of Similarity test (ANOSIM) showed that the community structure was similar between the two sampling sites with a Global R of -0.01 ($p = 0.82$). However, the community structure was different between water and sediment samples with a Global R of 0.99 ($p \leq 0.001$).

In water samples, the community structure was different between RNA and DNA fraction with a Global R of 0.27 ($p \leq 0.001$). No difference between DNA samples according to contamination level (AT and BT) with a Global R of 0.06 ($p = 0.021$) and there was significant difference according to season with a Global R of 0.42 ($p \leq 0.001$). No difference between RNA samples according to contamination level (AT and BT) with a Global R of 0.04 ($p = 0.049$) and there was significant difference according to season with a Global R of 0.30 ($p \leq 0.001$).

In sediment samples, total community structure was different between RNA and DNA fraction samples with a Global R of 0.98 ($p \leq 0.001$). According to season, in DNA and RNA samples, total community structure was different respectively with a Global R of 0.26 ($p \leq 0.001$) and Global R of 0.30 ($p \leq 0.001$).

Temperate coastal microbial communities are characterized by a strong seasonal cycle that is often reflected in the composition of the microbial community (Fuhrman et al., 2015). Here, we highlighted a similar trend that structure the water and sediment dataset according to changes in environmental parameters that can be explained by the seasons. The potential (DNA) and active (RNA) microbial communities followed this trend. In water samples, the bacterial communities' diversity, which was revealed by the calculation of the Shannon index and the ANOSIM analysis, were similar across season between the potential and active communities. These results suggest that in water potential and active bacterial diversity are overall similar and follow the same seasonal trend. The relative bacterial abundance at phylum level showed that *Proteobacteria* was the most abundant bacterial phylum. However, at Family level, different relative abundance was observed between potential and active community composition. *Rhodobacteraceae* largely dominated the potentially active bacterial assemblage while Clade_1 family was more abundant in potential microbial communities. *Chromatiaceae*

and *Nitrospiraceae*, were more abundant in active microbial communities while *Actinomarinaceae* were more abundant in potential microbial communities. The comparison of bacterial composition between the potential and active microbial communities showed that *Nitrospiraceae*, *Chromatiaceae*, and *Cyanobiaceae* family were more abundant in active microbial communities than in potential ones.

In sediment, the ANOSIM analysis showed that the potential and active bacterial communities were different. There are more hidden taxa and therefore functions in the sediment than in the water, which explains the highest diversity observed in the DNA sequencing compared to active microbial communities sequencing. Therefore, the sediment can be seen as a pool of microorganisms that can be triggered and potentially transferred to the water compartment by environmental changes, the plot compositions at family level showed a switch between *Flavobacteriaceae* and *Chromatiaceae* in potential and active microbial communities respectively. The PERMANOVA analysis showed that according seasons, bacterial composition in DNA fraction was identical. The same observation was done for active microbial communities.

3.4. Environmental variables influence total community composition

ANOSIM analyses demonstrate that bacterial communities' compositions were different in water and sediment. Also, the composition of the bacterial communities from DNA and RNA fractions were different between the two samples. Thus, to explain these differences we analyzed the effects of environmental variables on bacterial community structure. A NMDS was performed between the environmental parameters and the distribution of bacterial communities according to the seasons (supplementary figure1). ANOSIM analyses showed a difference between AT and BT samples for both fractions of water according to seasons.

The distribution of the different DNA and RNA samples showed a similar distribution between the different fractions according to seasons. The distribution of the different communities draws an annual cycle according to the composition of the bacterial community structure. Among the physico-chemical parameters analyzed for the water samples, we observed correlations characteristic of the seasonal variation of the different physico-chemical parameters. Temperature and salinity, TOC concentration and low rainfall height (R_6H and R_12H) are correlated to summer and fall samples, high rainfall height (R_24H) and nutrient concentrations are correlated to spring and winter samples. To confirm whether physico-chemical and

meteorological factors affect the level of fecal contamination in this ecosystem, a correlation between the two FIB and the DNA and RNA bacterial composition was performed. Positive correlation between FIB and bacterial communities was observed with autumn samples.

In the sediment, analysis of the distribution of bacterial communities by NMDS showed a significant difference between the DNA and RNA fractions. To identify the environmental factors that influenced this divergence, some physico-chemical parameters were plotted on sample distribution according to seasons and sample fractions. Correlations were observed between cDNA fractions and low rainfall height (R_12H) and NH₄. These data show that bacterial activity in the sediment was correlated with rainfall height and NH₄. Temperature and NO₃ are correlated to DNA fractions. These differences are confirmed by the permutational ANOVA test (F= 3.16, p≤0.001) with a significant difference between community composition of each fraction according to seasons. Analysis of bacterial composition according to FIB abundance in the sediment showed correlations between cDNA fraction and *E. coli* abundance while enterococci seemed to be more correlated with the abundance of DNA fractions. These results indicate that *E. coli* are active in the sediment. However, the permutational ANOVA test (F= 0.71, P=0.83) did not show a significant difference between community composition of each fraction according to seasons.

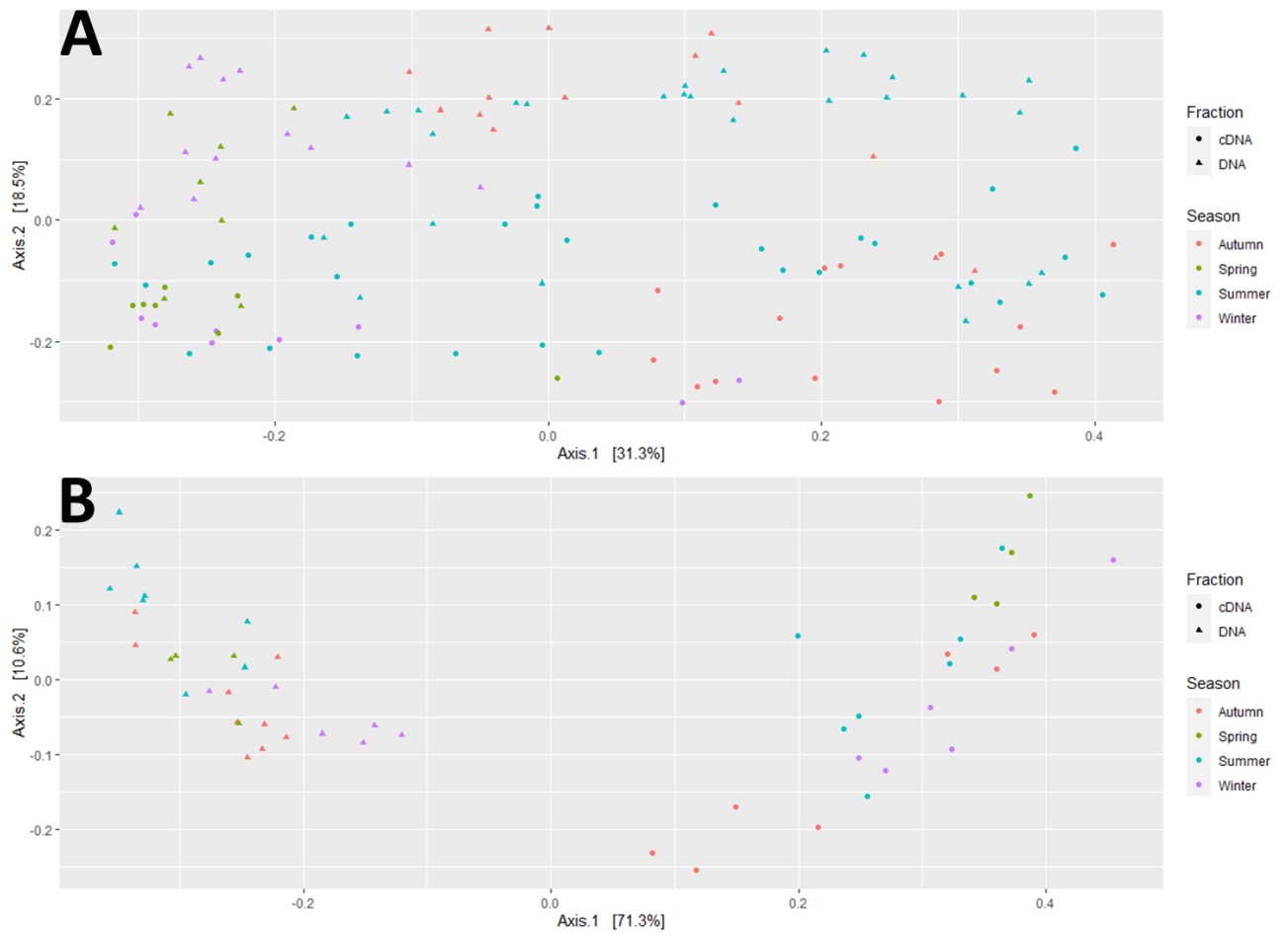


Figure 5: NMDS plot of total bacterial community composition in A) water samples and B) sediment samples. Bacterial communities from samples collected. Points are colored according to seasons while shapes show cDNA et DNA fractions.

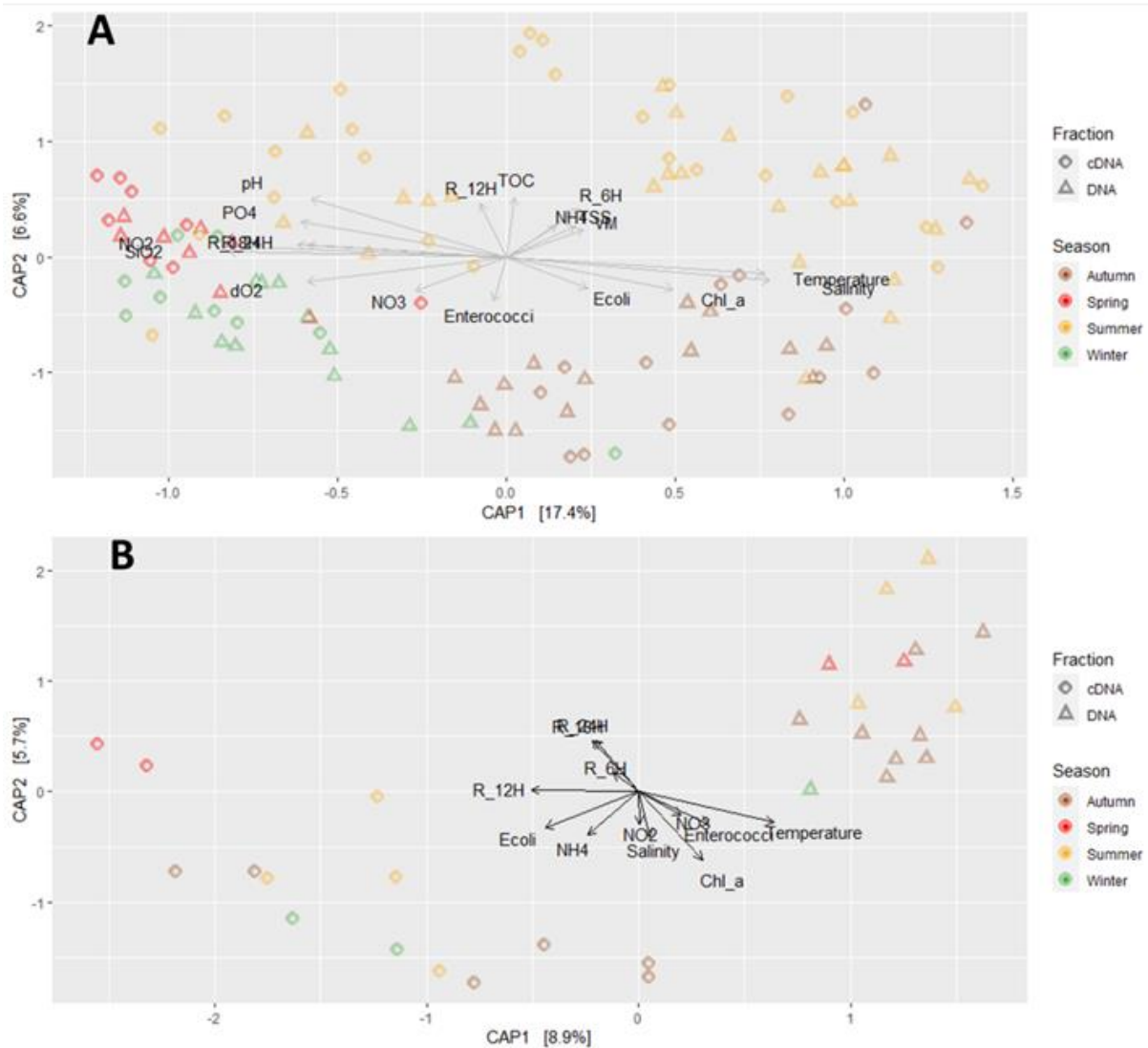


Figure 6: CAP plot of total bacterial community composition in A) water samples and B) sediment samples. Points are colored according to seasons while shapes show cDNA et DNA fractions. *E. coli* (*Escherichia coli*), *Enterococci*, water temperature ($^{\circ}\text{C}$), water temperature at the sediment surface ($^{\circ}\text{C}$), salinity (psu), dissolved oxygen concentration (dO2), pH, phosphorous concentration (PO4), nitrite concentration (NO2), nitrate concentration (NO3), ammonium concentration (NH4), silicate concentration (SiO2), total organic carbon (TOC), total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VM), 12-hours cumulated rainfall (R_12H), 24-hours cumulated rainfall (R_24H), chlorophyll-a concentration (Chl_a)

The comparison between bacterial communities in water and sediment showed a different bacterial composition at both phylum and family levels between sediment and water in Aytré Bay. In addition, the ANOSIM analysis showed a significant difference between the bacterial communities of the water and the sediment of the bay. This difference of bacterial communities between these two marine compartments is very often observed in aquatic environments (Cui et al., 2013; Halliday et al., 2014). Indeed, this difference is explained by the variation in nutrient abundance in sediment and in water of these marine ecosystems. The variation of bacterial communities in water is influenced by seasonal variation in environmental factors. These results show that water is a very dynamic environment whose microbial richness is independent of the sediment.

Different diversity between water and sediment in community composition and diversity was observed. Actinomarinaceae and SAR116 were unique taxa observed in water samples. The bacterial communities were less impacted by seasonal variation of environmental parameters indicating that the bacterial communities are very stable in the sediment.

To understand the seasonal dynamics observed in the composition of bacterial communities, it is essential to describe the different taxa that determine these bacterial communities. In water, Rhodobacteraceae represented the dominant family needs phytoplankton-derived organic matter will determine the dynamics of heterotrophs. SAR116 Clade are widespread in marine environments and are also known to target small organic molecules (Huggett, J. et al., 2012). In the sediment, Chromatiaceae are the dominant family belonging to the Gammaproteobacteria, they are phototrophic purple sulfur bacteria. while Flavobacteriaceae are usually associated with phytoplankton-derived organic matter (Teeling et al., 2016). They utilize complex algal-derived substrates and show a typical increase in abundance after phytoplankton blooms (Teeling et al., 2016).

This high diversity of bacterial communities as well as function provided by these bacterial communities will help to describe the functioning of this ecosystem in the second part of this paper, which is currently under analysis.

1.3 Conclusion

This study aimed to describe the seasonal variation of the composition and diversity of bacterial communities in the water and sediment of Aytré Bay. This first part presents the different fluctuations of the diversity and the relative abundance of the various taxa in the sediment and the water according to the physicochemical and meteorological parameters of the environment.

The main differences were observed in the abundance and composition of certain bacterial taxa in water and sediment. *Rhodobacteraceae* was the most abundant family in the water while in the sediment *Chromatiaceae* was more abundant. Some bacterial families were specific to the water column like SAR116 and *Actinomarinaceae*.

Some bacterial groups were of interest during this description. These include *Spirosomaceae*, *Chromatiaceae* in water samples exceeding the regulatory threshold, particularly in active communities. Thus, more precise analyses are being carried out to understand the determinism of these taxa in order to explain the dynamics of the contamination of Aytré Bay. An analysis of the possible links between the abundance of the indicators of fecal contamination and the bacterial communities is also in progress to analyze the impact of the presence of these fecal bacteria on the ecological balance of this environment. These analyses will make possible to identify characteristic bacterial taxa of fecal contamination that could be considered as proxy of fecal contamination and used as alternative indicators.

CHAPITRE 5 : SOURCES ET ORIGINES HUMAINE ET/OU NON HUMAINE (ANIMALE) DE LA CONTAMINATION FÉCALE

Après avoir analysé la dynamique spatio-temporelle de l'abondance des indicateurs de contamination fécale ainsi que la variation saisonnière de la diversité des communautés bactériennes au cours d'un événement de contamination fécale, ce chapitre présente dans un premier temps **une comparaison de la configuration spatiale des baies d'Aytré et d'Yves** permettant d'écarter l'hypothèse d'une contamination locale. En effet, si une baie de même configuration similaire, abritée et découvrant à marée basse caractérisée par un large estran sablo-vaseux, présente la même problématique, alors l'explication d'une pollution accidentelle locale pour la contamination de la baie d'Aytré ne pourrait être l'explication unique.

Ensuite, ce chapitre présente dans **une deuxième partie les sources potentielles de cette contamination fécale**.

(1) Une analyse de différents sites à proximité de la baie a été réalisée afin d'écarter certaines sources possibles de la contamination.

(2) Ensuite, l'hypothèse de la contamination aviaire a été testée par le suivi d'un balayage supposé des fientes d'oiseaux par la marée montante.

Enfin, **la dernière partie de ce chapitre présente les différentes origines de cette contamination fécale** par (1) la caractérisation de l'origine des indicateurs de contamination fécale (environnementale ou fécale) puis (2) le développement de modèle de discrimination pour déterminer l'origine humaine et ou non humaine des principales espèces bactériennes indicatrices d'une contamination fécale et enfin (3) la recherche de traceurs de sources microbiologiques pour déterminer l'origine humaine ou non humaine (animale) de cette contamination.

I. Effet du contexte géographique sur la contamination fécale

1.1 Hypothèse et objectifs

Les écosystèmes marins intertidaux situés dans des zones anthropisées sont des milieux exposés à des contaminations fécales. En effet, l'urbanisation de ces environnements littoraux constitue globalement la principale cause de dégradation de la qualité microbiologique de ces écosystèmes de loisirs.

La baie d'Aytré est située dans une commune relativement urbanisée avec plusieurs activités organisées autour de la plage (chapitre 1, section VI). Pour analyser les effets du contexte géographique sur le niveau de contamination de notre zone d'étude, nous avons réalisé une étude comparative avec un écosystème présentant les mêmes propriétés topographiques mais situé dans une zone moins anthropisée. Il s'agit de la baie d'Yves située à environ 20 km au sud de la baie d'Aytré. Ces deux écosystèmes sont des environnements intertidaux abrités dans des baies sablo-vaseuses entourées de marais et protégées par des îles : l'île de Ré au nord et l'île d'Oléron au sud (Encart, Figure 26). Les baies d'Aytré et d'Yves présentent de faibles pentes relativement identiques. La pente de la baie d'Aytré varie entre 0,002% et 0,003% au niveau de la partie inférieure de l'estran et de 0,05% au niveau de la partie supérieure de l'estran. La pente de la baie d'Yves est de 0,001% au niveau de la partie inférieure de l'estran et de 0,11% sur la partie supérieure de l'estran. Cependant, ces deux baies ont des propriétés différentes : la baie d'Yves est plus grande que notre zone d'étude. Au sud de cette baie se trouve la réserve naturelle nationale du marais d'Yves. Classée en 1981, cette réserve connue pour être un important sanctuaire ornithologique occupe une surface de 192 hectares et est gérée par la Ligue pour la Protection des Oiseaux. La baie d'Yves n'est pas une zone de baignade et la qualité microbiologique des eaux n'y est donc pas surveillée pour les activités de baignade (Figure 26).

Ainsi, pour comprendre les effets du contexte géographique (urbanisation, configuration spatiale) de la baie d'Aytré sur la contamination fécale de cet écosystème, nous avons réalisé une étude comparative entre les deux baies. Un suivi durant une année de la qualité microbiologique de l'eau et du sédiment de la baie d'Yves a été réalisé en même temps que le suivi annuel effectué à la baie d'Aytré, cependant les prélèvements ont été moins nombreux que ceux de la baie d'Aytré. Les effets des paramètres physico-chimiques et météorologiques du milieu ont également été analysés pour expliquer la dynamique temporelle de la contamination fécale dans la baie d'Yves.

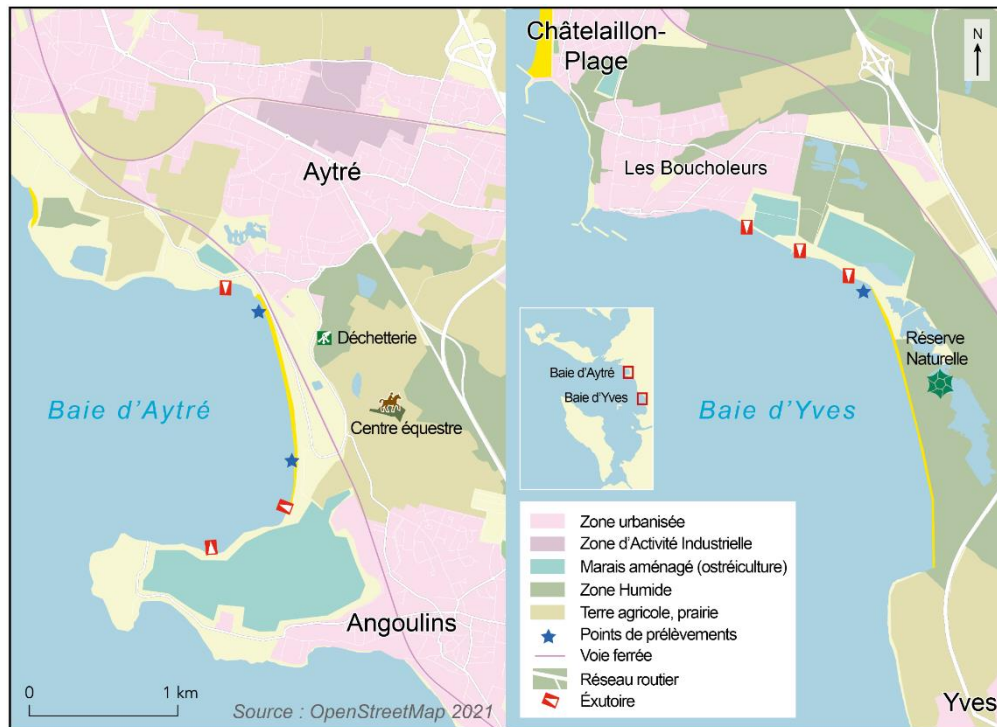


Figure 26 : Présentation de la baie d'Aytré et de la baie d'Yves avec les différentes zones caractéristiques autour des deux écosystèmes littoraux. Les sites de prélèvements sont représentés sur les cartes par les étoiles en bleu. Carte : M. Ndione, P. Brunello, UMR LIENSs CNRS-La Rochelle Université (2021)

1.2 Plan expérimental

Un échantillonnage d'eau et de sédiment a été réalisé dans la baie d'Yves en parallèle aux échantillonnages effectués dans la baie d'Aytré. Au total 20 prélèvements d'eau ont été réalisés dans la baie d'Yves : un échantillonnage mensuel en hiver, au printemps et en automne ; et un échantillonnage hebdomadaire a été réalisé durant les deux mois de l'été (août et juillet) (Tableau 21). Simultanément, un échantillonnage mensuel de sédiment a aussi été effectué. Les échantillons d'eau et de sédiment de la baie d'Aytré prélevés en même temps que les échantillons de la baie d'Yves ont été analysés pour effectuer cette étude comparative.

Des analyses de paramètres microbiologiques et physico-chimiques (Chapitre 3, I.2) ont été effectuées pour déterminer et comparer la qualité microbiologique de l'eau et du sédiment dans les deux baies.

Tableau 21 : : Fréquence des échantillonnages pour l'étude comparative au niveau des deux baies

Sites		Hiver	Printemps	Été	Automne
Baie d'Aytré	Eau	4	3	8	3
	Sédiment	3	3	2	2
Baie d'Yves	Eau	4	3	8	3
	Sédiment	3	3	2	2

1.3 Résultats

1.3.1 Abondance des indicateurs de contamination fécale dans l'eau et le sédiment dans les deux baies

Après avoir montré que la variation saisonnière de l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale était similaire dans les deux sites de baignade de la baie d'Aytré, nous avons comparé la dynamique temporelle des indicateurs de contamination fécale dans la baie d'Aytré et la baie d'Yves durant un cycle annuel (Figure 27). Pour réaliser cette étude comparative entre les deux baies, nous avons combiné les données des deux sites de baignade de la baie d'Aytré. La variation saisonnière de l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans les deux baies est représentée sur la figure 2. Dans la baie d'Aytré, l'abondance des *E. coli* dans les eaux variait en moyenne de 7,5 ($\pm 7,5$) à 1885 ($\pm 928,3$) NPP/100ml d'eau et l'abondance des entérocoques variait en moyenne de 2,5 ($\pm 4,2$) à 9445 ($\pm 3503,3$) NPP/100ml d'eau. Dans la baie d'Yves, l'abondance des *E. coli* dans les eaux variait en moyenne de 0 à 1704 ($\pm 817,1$) NPP/100ml d'eau et l'abondance des entérocoques variait en moyenne de 5 ($\pm 6,7$) à 2336,7 ($\pm 831,1$) NPP/100ml d'eau. L'abondance des *E. coli* était en dépassement des seuils réglementaires sur deux dates dans la baie d'Aytré et sur quatre dates dans la baie d'Yves (en été et en automne) durant ce suivi. L'abondance des entérocoques était en dépassement des seuils réglementaires sur neuf dates dans la baie d'Aytré et sur dix dates dans la baie d'Yves. L'abondance des indicateurs de contamination fécale dans l'eau était plus faible durant le printemps par rapport aux autres saisons de l'année aussi bien dans la baie d'Aytré que dans la baie d'Yves.

Dans le sédiment, l'abondance des *E. coli* variait en moyenne de 5,2 ($\pm 3,1$) à 326,3 ($\pm 368,4$) NPP/10g et l'abondance des entérocoques variait en moyenne de 58,7 ($\pm 38,2$) à 608 ($\pm 657,5$) NPP/10g dans la baie d'Aytré. Dans la baie d'Yves, l'abondance des *E. coli* variait en moyenne de 0 à 218 ($\pm 79,3$) NPP/10g et l'abondance des entérocoques variait en moyenne de 0 à 502,3 ($\pm 336,4$) NPP/10g.

Dans le sédiment, l'abondance des bactéries fécales était peu variable dans la baie d'Aytré alors que dans la baie d'Yves l'abondance des indicateurs de contamination fécale était faible de février à juillet et on observe une nette augmentation à partir du mois d'août.

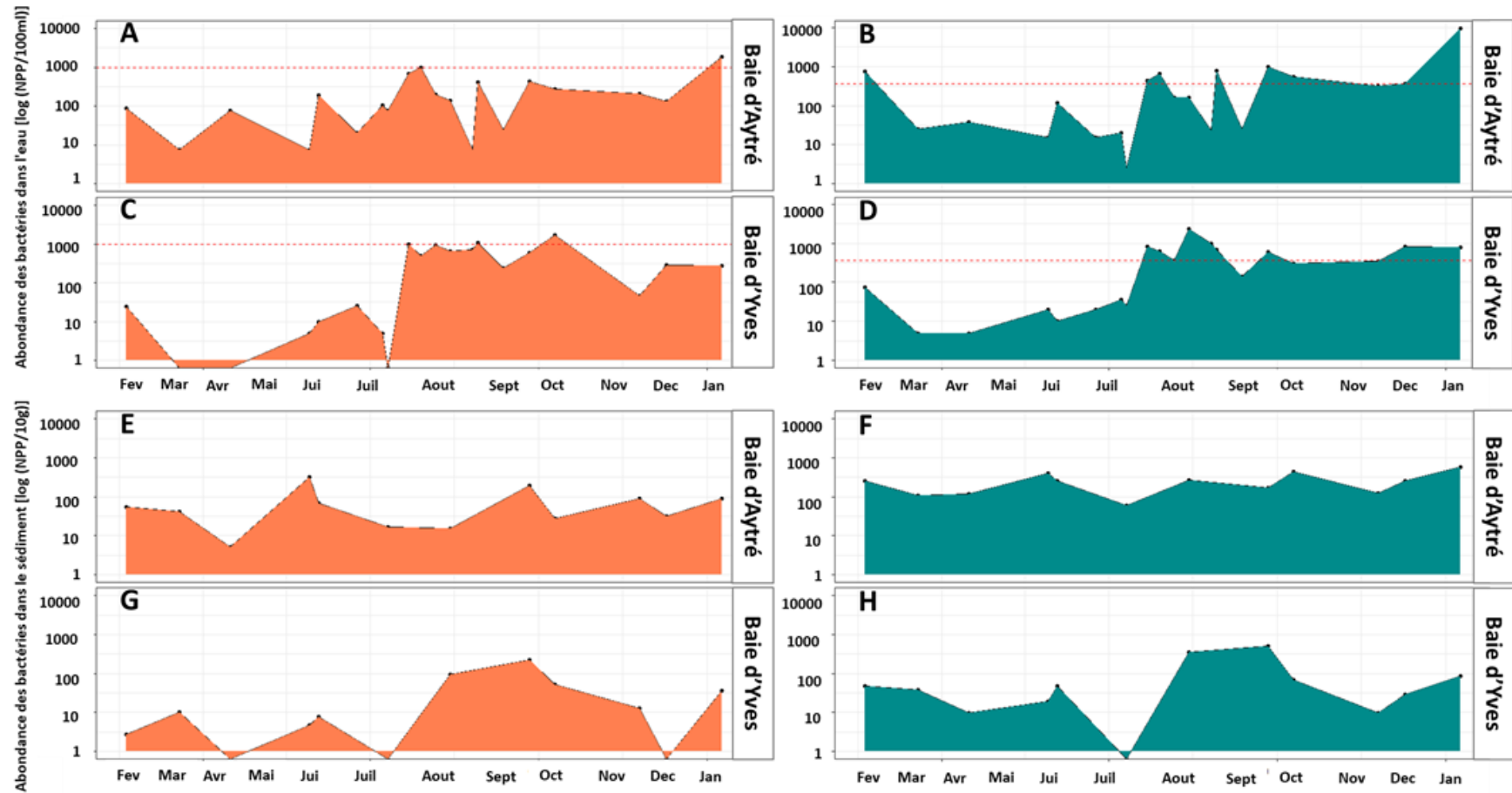


Figure 27 : Variation saisonnière des indicateurs de contamination fécale dans l'eau et le sédiment de la baie d'Aytré et de la baie d'Yves au cours d'un cycle annuel. *E. coli* en orange, entérocoques en vert. Échantillons d'eau (A, B, C, D) ; échantillons de sédiment (E, F, G, H). Les seuils réglementaires des indicateurs de contamination fécale dans les eaux de baignade (1000 NPP/100ml pour *E. coli* et 370 NPP/100ml pour entérocoques) sont représentés par les lignes rouges en pointillés sur les figures A, B, C et D.

La comparaison de l'abondance des indicateurs de contamination fécale entre le sédiment et l'eau a montré des variations d'abondance plus élevées que dans le sédiment. Au printemps, les abondances des deux indicateurs de contamination fécale étaient plus élevées dans 10g de sédiment que dans 100ml d'eau. Cependant, lorsque les indicateurs de contamination fécale étaient en dépassement des seuils réglementaires dans l'eau (durant les autres saisons), leurs abondances étaient plus faibles dans 10g de sédiment que dans 100ml d'eau.

1.3.2 Corrélation entre l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans l'eau et le sédiment dans les deux baies

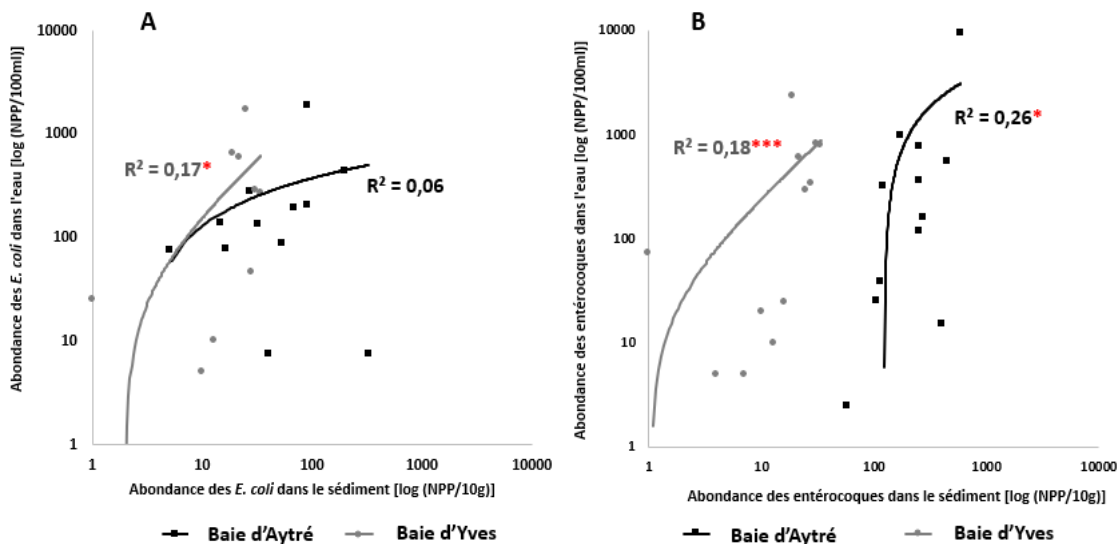


Figure 28 : Corrélation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale entre le sédiment et l'eau dans les deux baies étudiées. A) corrélation de l'abondance des E. coli. B) corrélation de l'abondance des entérocoques. Les données de la baie d'Aytré sont représentées en noir et les données de la baie d'Yves sont représentées en gris. R2 représente les coefficients des courbes de tendance. Les astérisques en rouge représentent le degré de significativités des tests de Pearson (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$) effectués sur les coefficients de corrélation entre les abondances des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment et dans l'eau.

La corrélation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale entre l'eau et le sédiment des deux baies est représentée sur la figure 28. Les abondances des *E. coli* dans l'eau et le sédiment étaient corrélées positivement et significativement pour la baie d'Yves mais aucune corrélation n'a été observée pour la baie d'Aytré (figure 28, A). Par contre, les abondances des entérocoques dans l'eau et le sédiment étaient positivement corrélées dans les deux sites. (Figure 28, B). La variation de l'abondance des *E. coli* était globalement identique dans les deux baies. L'abondance des entérocoques dans le sédiment et dans l'eau était plus élevée en baie d'Aytré qu'en baie d'Yves.

1.3.3 Corrélation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans l'eau avec les paramètres physico-chimiques et météorologiques dans les deux baies

Les corrélations entre l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale et les paramètres physico-chimiques mesurés dans les échantillons d'eau des deux sites sont représentés dans le tableau 22. Cette analyse montre que dans la baie d'Aytré, l'abondance des indicateurs de contamination fécale était corrélée négativement mais de manière significative avec la température de l'eau, la salinité et l'abondance des bactéries totales quantifiées par cytométrie en flux. L'abondance des deux indicateurs est néanmoins corrélée positivement avec les concentrations de nitrate, de silicate et la hauteur de précipitations mesurée à 6h, 12h, 18h et 24h avant l'échantillonnage. L'abondance des *E. coli* est corrélée positivement aux concentrations de chlorophylle-*a* et d'ammonium. Les entérocoques étaient corrélés positivement avec les concentrations en phosphate, les coefficients de marées et la hauteur d'eau de mer.

Dans la baie d'Yves, l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale était positivement corrélée aux concentrations en chlorophylle-*a*. L'abondance des entérocoques était corrélée positivement aux concentrations en carbone organique total.

Tableau 22 : Corrélations des indicateurs de contamination fécale dans l'eau avec les paramètres physico-chimiques et météorologiques du milieu dans les deux baies. Les chiffres en gras correspondent aux coefficients de corrélation et les astérisques représentent le degré de significativité des tests de Pearson (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Paramètres	Baie d'Aytré		Baie d'Yves	
	<i>E. coli</i>	Entérocoques	<i>E. coli</i>	Entérocoques
Température de l'eau	-0,21*	-0,29**	0,12	0,08
Salinité	-0,22*	-0,23*	0,24	0,04
pH	0,10	0,06	0,22	0,30
Oxygène dissous	0,16	0,11	-0,23	0,00
Carbone organique totale	0,09	0,16	-0,03	0,36**
Nitrate	0,24**	0,27**	-0,25	0,05
Nitrite	0,12	0,09	0,01	0,00
Silicate	0,27**	0,31***	-0,11	0,15
Phosphate	0,06	0,19*	0,18	0,22
Ammonium	0,19*	0,03	0,09	0,02
Matières en suspension	0,02	0,10	0,02	0,20
Matières volatiles	0,07	0,16	0,07	0,25
Chlorophylle- <i>a</i>	0,24**	0,14	0,38**	0,44**
Bactéries totales	-0,23*	-0,27*	0,00	-0,06
Virus	-0,11	-0,15	-0,06	-0,04
Pluviométrie 6h	0,69***	0,72***	-0,05	0,13
Pluviométrie 12h	0,5***	0,44***	-0,08	0,07
Pluviométrie 18h	0,44***	0,37***	-0,01	0,03
Pluviométrie 24h	0,30***	0,22*	-0,17	-0,06
Coefficient de marées	0,08	0,19*	-0,01	-0,00
Hauteur d'eau	0,08	0,23*	-0,05	0,07

1.3.4 Corrélation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment avec les paramètres physico-chimiques et météorologiques des deux baies.

Les corrélations entre les deux indicateurs de contamination fécale et les paramètres physico-chimiques mesurés dans les échantillons de sédiment sont représentés sur le tableau 23. L'abondance des indicateurs de contamination fécale était corrélée positivement aux concentrations en nitrite. L'abondance des deux indicateurs de contamination fécale était corrélée négativement et de manière significative avec les concentrations en oxygène dissous et positivement avec les hauteurs de la pluviométrie mesurées 24h avant l'échantillonnage.

Tableau 23 : : Corrélation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment avec les paramètres physico-chimiques et météorologiques des deux baies. Les chiffres en gras correspondent aux coefficients de corrélation et les astérisques représentent le degré de significativités des tests de Pearson (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$)

Paramètres	Baie d'Aytré		Baie d'Yves	
	<i>E. coli</i>	Entérocoques	<i>E. coli</i>	Entérocoques
Température de l'eau	-0,08	-0,14	0,24	0,27
Salinité	0,07	-0,21	0,02	0,08
pH	-0,25	0,29	0,27	-0,25
Oxygène dissous	-0,24	0,19	-0,55**	-0,50*
Nitrate	0,08	0,12	-0,26	0,21
Nitrite	0,00	0,28*	-0,10	0,00
Silicate	0,07	0,16	-0,04	-0,04
Phosphate	0,03	-0,11	-0,31	-0,30
Ammonium	0,04	0,08	-0,18	-0,08
Chlorophylle- <i>a</i>	0,07	0,18	0,32	0,28
Bactéries totales	-0,11	0,08	-0,11	0,08
Pluviométrie 6H	-0,01	-0,07	-0,08	0,15
Pluviométrie 12H	-0,03	-0,10	-0,12	-0,18
Pluviométrie 18H	-0,03	-0,19	0,11	0,11
Pluviométrie 24H	0,13	-0,13	0,6***	0,44**

1.4 Conclusion

Le suivi comparatif de l'abondance des indicateurs de contamination fécale entre la baie d'Aytré et la baie d'Yves effectué pendant une année a montré une dynamique temporelle similaire entre les deux baies.

Le niveau de contamination en *E. coli* et en entérocoques dans ces deux baies est variable au cours du cycle annuel. On observe une abondance faible au printemps contre une abondance élevée en hiver, en été et en automne. L'abondance des *E. coli* était en dépassement des seuils réglementaires sur deux dates à la baie d'Aytré et sur quatre dates à la baie d'Yves durant le suivi annuel alors que l'abondance des entérocoques était en dépassement des seuils réglementaires sur neuf dates à la baie d'Aytré contre dix dates à la baie d'Yves durant le suivi. En outre, la comparaison de la qualité microbiologique de l'eau et du sédiment a montré que lorsque l'abondance des indicateurs de contamination fécale était en dépassement des seuils réglementaires, leur concentration était plus faible dans le sédiment que dans l'eau dans les deux baies. Il semble donc que le sédiment ne semble pas constituer pas une source de contamination fécale dans ces deux baies.

Le suivi annuel réalisé montre que la contamination fécale n'est pas spécifique à la baie d'Aytré. Dans un environnement présentant des similitudes comme c'est le cas dans la baie d'Yves, zone sablo-vaseuse à faible pente et abritée dans une baie protégée par des îles on observe une abondance similaire des indicateurs de contamination fécale. Notre étude montre que le contexte géographique similaire de ces deux baies pourrait contribuer à la contamination fécale.

II. Sources possibles de la contamination fécale de la baie d'Aytré

1.1 Hypothèse et objectifs

Dans le but d'évaluer les sources possibles de la contamination fécale dans la baie d'Aytré comme recommandé par la directive européenne, plusieurs sites ont été identifiés comme susceptibles de constituer des sources de contamination fécale dans notre zone d'étude. En effet, comme présenté dans le chapitre 1 (section VI), la baie d'Aytré est située dans une zone de marais qui est en contact permanent avec les eaux de la baie à travers des exutoires sauf durant les périodes estivales. Pour rappel, durant cette période, les exutoires sont fermés par des écluses qui régulent l'apport d'eaux douces (dont la qualité microbiologique n'est pas contrôlée) de la zone de marais vers la plage. Ainsi, nous avons réalisé des suivis de la qualité microbiologique d'échantillons d'eau prélevés sur différents sites. Il s'agit de sites situés au niveau du bassin versant de la baie comme le canal de marais au nord et le canal situé à proximité du centre équestre, au niveau de différents exutoires (exutoire de marais au nord, exutoire ostréicole au sud, exutoire du canal de Vuhé) se déversant dans la baie.

Une analyse en transect a également été effectuée au niveau du large de la baie (au niveau de la pointe du Chay, en milieu de baie et au niveau de la pointe de Roux) pour étudier l'hypothèse de l'apport de contamination fécale du large vers l'intérieur de la baie.

De même des analyses ponctuelles ont été réalisées au niveau du port de plaisance des Minimes à la Rochelle qui a été identifié comme une source extérieure potentielle de la contamination fécale de la baie d'Aytré.

Cette partie présente également un suivi de l'accumulation par balayage des fientes d'oiseaux par la marée montante.

1.2 Plan expérimental

Pour examiner les sources possibles de contamination fécale de la baie d'Aytré, des prélèvements ponctuels ont été réalisés en temps sec et en temps de pluie sur différents sites à proximité de la baie d'Aytré. Des prélèvements d'eau ont été effectués à marée basse au niveau des exutoires présentés sur la Figure 29.

D'autres prélèvements d'eau ont aussi été réalisés en transect au large de la baie. Pour ces mesures, sur chaque site, un triplicat d'échantillonnage a été réalisé en surface de l'eau et un quatrième échantillon a été prélevé en profondeur (Figure 29).

Deux campagnes d'échantillonnage d'eau ont été réalisées en septembre 2019 et en janvier 2020 au niveau du port de plaisance des Minimes. Les prélèvements ont été effectués au niveau de 3 pontons du port de plaisance permettant d'apprécier différentes situations dans les bassins. Ils ont aussi été effectués d'abord à marée descendante puis à marée montante (Figure 29).

L'analyse de la qualité microbiologique de tous ces échantillons d'eau a été effectuée comme pour le suivi annuel.

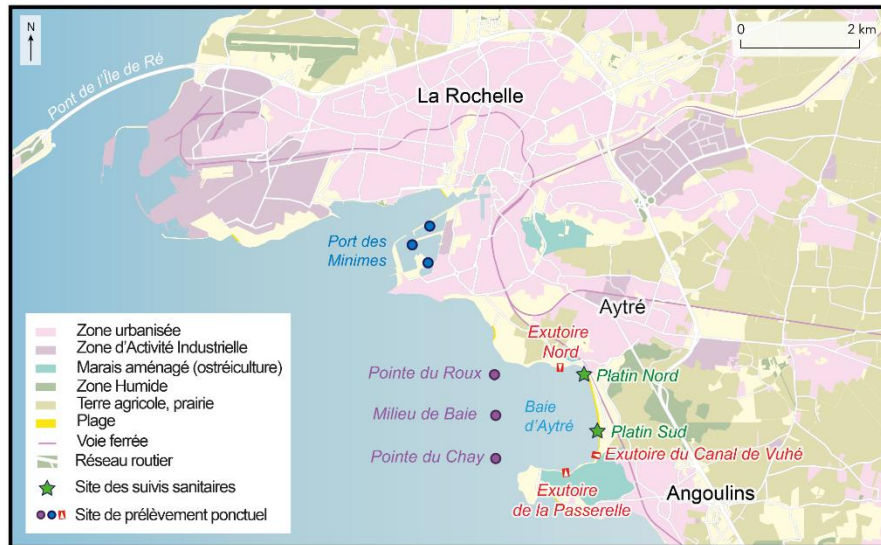


Figure 29 : Localisation des sites suivis pour déterminer les sources possibles de la contamination fécale dans la baie d'Aytré. Les sites en vert correspondent aux deux sites de baignade où sont réalisés les suivis sanitaires. Les sites en rouge correspondent aux exutoires où ont été effectués les différents prélèvements. Les sites en violet correspondent au transect réalisé au large de la baie. Les sites en bleu sont les pontons où ont été effectués les prélèvements dans le port de plaisance des Minimes. Carte : M. Ndione, P. Brunello, UMR LIENSs CNRS-La Rochelle Université (2021).

1.3 Résultats

1.3.1 Dépassements ponctuels des indicateurs de contamination fécale au niveau des exutoires lors des épisodes de pluies

L'analyse de l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans les échantillons prélevés ponctuellement au niveau des exutoires de la baie d'Aytré sont représentés dans le tableau 24. Les analyses effectuées au niveau de l'exutoire du canal de Vuhé, du canal devant le centre équestre, de l'exutoire de marais au nord et de l'exutoire ostréicole au sud ont montré qu'en temps sec il n'y avait pas de dépassement des seuils réglementaires (ligne en jaune dans le tableau 24). Cependant, en temps de pluies, des dépassements des seuils réglementaires en entérocoques notamment, sont notables dans ces quatre sites avec une valeur maximale de 15 513 NPP/100 ml d'eau en septembre. En dépassement des seuils réglementaires, les abondances en *E. coli* dans l'exutoire de marais au nord de la baie ont atteint 11 477 NPP/100 ml d'eau. Cette analyse de la qualité microbiologique des exutoires montre des dépassements des seuils réglementaires dans les différents sites principalement par temps de pluie.

Ces prélèvements ponctuels ont été effectués entre 48h et 72h avant certains prélèvements d'eau du suivi annuel dans les deux sites de baignade de la baie d'Aytré. Ainsi, nous avons réalisé une comparaison de l'abondance des indicateurs de contamination fécale entre les prélèvements ponctuels effectués au niveau des exutoires et le site de baignade correspondant, soit le Platin Nord, soit le Platin Sud.

Une comparaison a été faite entre l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans les échantillons de l'exutoire de marais au nord et les échantillons du Platin Nord (tableau 25). Des dépassements des seuils réglementaires ont été observés dans ces deux sites en septembre et en mars. Les abondances des indicateurs de contamination fécale quantifiée dans les échantillons d'eau de l'exutoire du canal de Vuhé, l'exutoire ostréicole sud et le canal devant le centre équestre ont été comparées aux échantillons de Platin Sud (tableau 25). Les dépassements des seuils réglementaires des indicateurs de contamination fécale observés au niveau des ces trois sources potentielles situés au sud de la baie sont liées aux pics de contamination observés au niveau du Platin Sud. Ce suivi montre que les exutoires et le canal suivis au cours de ces prélèvements ponctuels peuvent constituer de véritables sources de contamination fécale dans la baie d'Aytré.

Tableau 24 : Abondance des indicateurs de contamination fécale quantifiée lors des prélèvements ponctuels dans les différentes sources de contamination de la baie d’Aytré. Les prélèvements effectués en temps sec sont représentés en jaune et les prélèvements effectués en temps de pluie sont représentés en bleu. Les valeurs indiquées en gras en rouge correspondent à des dépassements des seuils réglementaires des indicateurs de contamination fécale.

Exutoire du canal Vuhé	<i>E. coli</i> (NPP/100 ml)	Entérocoques (NPP/100 ml)	Pluviométrie 12h (mm)	Pluviométrie 24h (mm)
29-mai-19	202	121	0	0
03-juin-19	133	41	0	0
07-juin-19	192	139	7,4	8
18-oct-19	406	779	0,6	2
02-mars-20	964	959	11,5	20,4
Canal centre équestre	<i>E. coli</i>	Entérocoques	Pluviométrie 12h	Pluviométrie 24h
12-juin-19	41	25	0	2,8
18-oct-19	674	394	0,6	2
Exutoire de marais Nord	<i>E. coli</i>	Entérocoques	Pluviométrie 12h	Pluviométrie 24h
16-juil-19	359	20	0	0
24-sept-19	11477	15513	32,1	33,1
18-oct-20	105	122	0,6	2
02-mars-20	117	3763	11,5	20,4
Exutoire ostréicole Sud	<i>E. coli</i>	Entérocoques	Pluviométrie 12h	Pluviométrie 24h
29-mai-19	0	0	0	0
03-juin-19	66	36	0	0
07-juin-19	121	72	7,4	8
24-sept-19	10710	6890	32,1	33,1
18-oct-20	10	93	0,6	2
02-mars-20	905	932	11,5	20,4

1.3.2 Abondance des indicateurs de contamination fécale au large de la baie

Le suivi en transect réalisé au large de la baie d’Aytré au niveau de la pointe du Chay, en milieu de baie et au niveau de la pointe du Roux n’a pas montré de dépassements des seuils réglementaires. Ceci indique que la contamination de la baie ne semble pas provenir du large.

1.3.3 Abondance des indicateurs de contamination fécale au niveau du port des Minimes

Les analyses ponctuelles effectuées au niveau du port de plaisance n’ont pas montré de dépassements de seuils réglementaires à marée montante ou à marée descendante durant les périodes de suivi. Ces échantillonnages

ont été réalisés durant des périodes de dépassement des seuils réglementaires dans la baie d’Aytré et en temps de pluie, ainsi le port de plaisance ne semble pas être une source de contamination fécale dans la baie d’Aytré.

Tableau 25 : Abondance des indicateurs de contamination fécale quantifiée dans les échantillons d’eau prélevés dans les différentes sources de contamination de la baie d’Aytré. Les abondances des E. coli sont représentées en orange et les abondances des entérocoques sont représentées en vert. Les dates des prélèvements ponctuels effectués dans les exutoires et les quantifications des indicateurs de contamination fécale dans les deux sites de baignade mesurés entre 48 et 72 h après les analyses ponctuelles sont indiquées. Les valeurs indiquées en gras et en rouge correspondent à des dépassements des seuils réglementaires des indicateurs de contamination fécale.

	<i>E. coli</i> (NPP/100 ml)		Entérocoques (NPP/100 ml)	
	Exutoire de marais Nord	Platin Nord	Exutoire de marais Nord	Platin Nord
16-juil-19	359	62	20	68
24-sept-19	11477	585	15513	1430
18-oct-20	105	408	122	409
02-mars-20	117	251	3763	690
	Exutoire du canal Vuhé	Platin sud	Exutoire du canal Vuhé	Platin sud
29-mai-19	202	15	121	15
03-juin-19	133	10	41	25
07-juin-19	192	52	139	252
18-oct-19	406	554	779	693
02-mars-20	964	94	959	344
	Canal centre équestre	Platin sud	Canal centre équestre	Platin sud
12-juin-19	41	10	25	25
18-oct-19	674	514	394	693
	Exutoire ostréicole Sud	Platin sud	Exutoire ostréicole Sud	Platin sud
29-mai-19	0	5	0	5
03-juin-19	66	10	36	25
07-juin-19	121	52	72	252
24-sept-19	10710	283	6890	536
18-oct-20	10	554	93	693
02-mars-20	905	94	932	344

1.3.4 Hypothèse de l'accumulation/balayage des fientes d'oiseaux dans l'eau par la marée montante.

1.3.4.1 Rappel de l'hypothèse

La baie d'Aytré est un écosystème intertidal dont l'estran se découvre à marée basse jusqu'à 1,5 km. Certaines espèces d'oiseaux notamment des mouettes et des limicoles fréquentent la baie en hiver et en été à marée basse en tant que zone de dortoir ou pour se nourrir. La présence de ces oiseaux dans la baie implique un apport conséquent de fèces dans la baie en particulier sur l'estran. Ainsi, la marée montante pourrait remettre en suspension ces fèces qui hébergent un nombre non négligeable de bactéries fécales (environ 10^8 /g dans les fèces des goélands). Pour répondre à l'hypothèse concernant le balayage et l'accumulation des fèces d'oiseaux à marée montante dans les zones de baignade, une analyse du niveau de contamination de la baie a été réalisée en fonction de la marée montante. Cette analyse a été effectuée une première fois en 2015 par la communauté d'agglomération de la Rochelle qui avait proposé une étude avec la ligue de protection des oiseaux sur la présence des oiseaux dans la baie et donc leur contribution sur cette contamination. La vérification de cette hypothèse sur l'origine de la contamination fécale dans la baie d'Aytré n'avait jusque-là pas pu être menée dans de bonnes conditions aussi son évaluation a été reprise dans le cadre de ce travail.

Cette partie du manuscrit constitue donc une réévaluation de cette hypothèse pour comprendre le rôle des oiseaux, mais aussi les effets de la marée montante sur le niveau de contamination dans les zones de baignade de la baie d'Aytré.

Ainsi, nous avons défini deux transects à partir des deux zones de baignade comme décrit dans la section I.4. du chapitre 2. L'analyse en « balayage » de l'accumulation des contaminants fécaux dans les deux sites de baignade en fonction de la marée montante a été réalisé lors de deux campagnes, le 4 juin et le 16 septembre 2020. Des échantillons d'eau et de sédiment ont été prélevés pour quantifier l'abondance des indicateurs de contamination fécale comme effectué pour le suivi annuel. Les échantillons de sédiments étaient prélevés en fin de marée basse alors que les échantillons d'eau étaient prélevés dans la pellicule d'eau se constituant sur les différents sites de prélèvement au moment de l'arrivée de la marée montante sur les mêmes points.

1.3.4.2 Résultats

L'analyse de la qualité microbiologique de l'eau et du sédiment sur les deux transects (Nord et Sud) définis pour déterminer les effets de la marée montante sur le niveau de contamination fécale dans les deux zones de baignade de la baie d'Aytré est représentée sur la figure 30.

La première campagne d'échantillonnage effectuée en juin a montré de faibles abondances des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment (Figure 30B, D). Le suivi de la qualité microbiologique des échantillons d'eau en fonction de la marée montante n'a pas montré d'accumulation de l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale en juin 2020 (Figure 30A, C). De plus, les abondances des indicateurs de contamination fécale dans l'eau et le sédiment n'étaient pas corrélées.

La deuxième campagne d'échantillonnage effectuée en septembre a montré de faibles abondances des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment (Figure 30F, H). Le suivi de la qualité microbiologique des échantillons d'eau en fonction de la marée montante n'a pas montré d'accumulation de l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale en septembre 2020 (Figure 30E, G). Comme pour juin, les abondances des deux indicateurs de contamination fécale entre l'eau et le sédiment n'étaient pas corrélées.

Il n'est donc pas possible de valider l'hypothèse d'une origine de la contamination fécale par balayage des fientes d'oiseaux par la marée à partir de ces mesures.

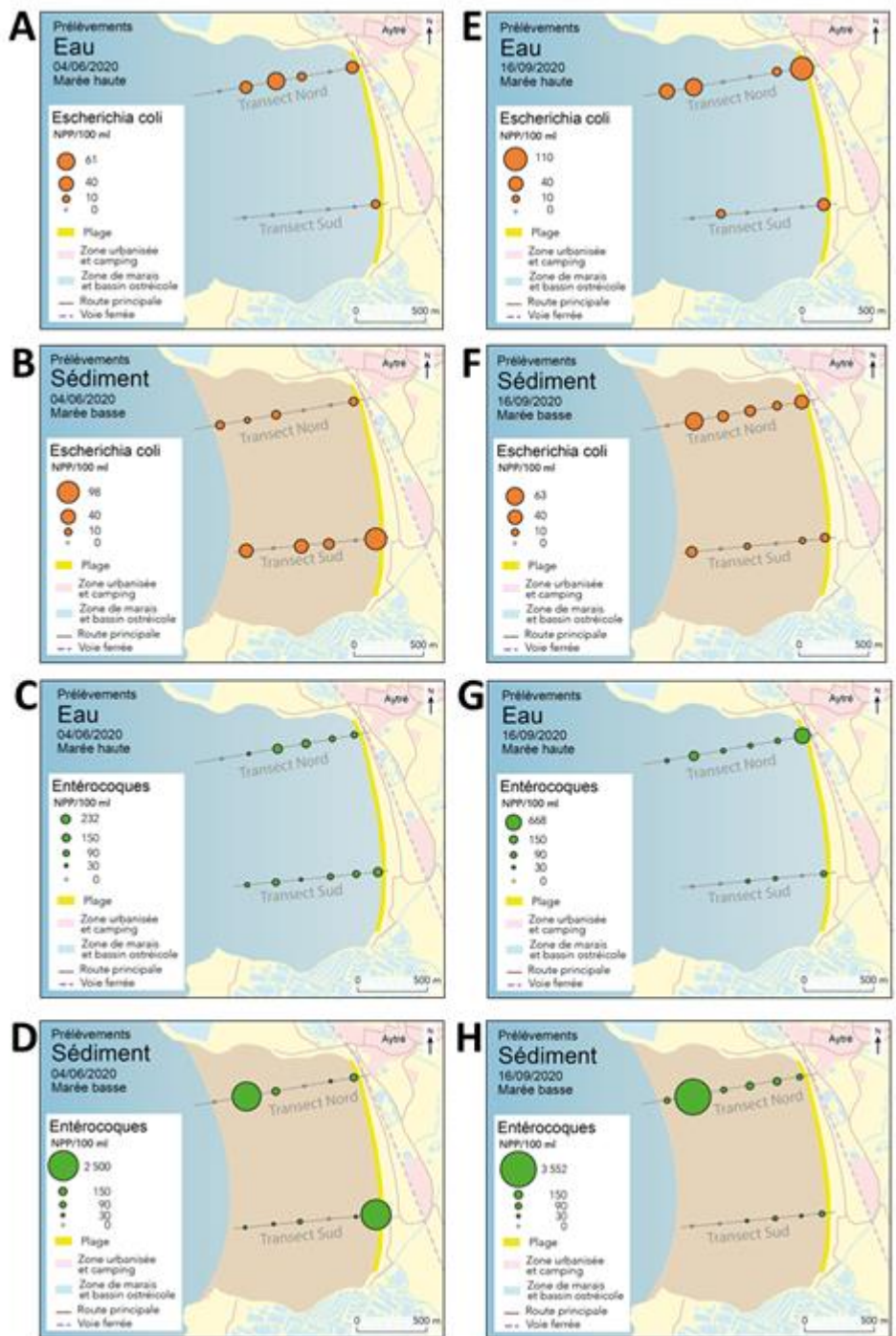


Figure 30 : Abondances des deux indicateurs de contamination fécale dans l'eau et le sédiment durant les deux dates de suivi en "balayage" effectué sur deux transects (transect Nord et transect Sud). A) Abondance des *E. coli* dans l'eau en juin. B) Abondance des *E. coli* dans le sédiment en juin. C) Abondance des Entérocoques dans l'eau en juin. D) Abondance des Entérocoques dans le sédiment en juin. E) Abondance des *E. coli* dans l'eau en septembre. F) Abondance des *E. coli* dans le sédiment en septembre. G) Abondance des Entérocoques dans l'eau en septembre. H) Abondance des Entérocoques dans le sédiment en septembre.

1.4 Conclusion

L'analyse de la qualité microbiologique des prélèvements d'eau réalisés ponctuellement dans différents sites à proximité de la baie d'Aytré a permis d'évaluer certaines sources possibles de contamination fécale. Les exutoires situés au nord et au sud de la baie, semblent constituer de véritables sources de contamination en particulier en période de pluie s'ils sont ouverts. Cependant, la régulation de l'apport d'eau douce de ces exutoires durant la période estivale semble être efficace pour réduire le niveau de contamination fécale de la baie d'Aytré durant les saisons de baignade. Les analyses réalisées ponctuellement au niveau du port de plaisance des Minimes ont montré que la contamination fécale ne semble pas provenir de ce site. De même, les analyses réalisées sur le transect au large de la baie n'ont pas montré de dépassement des seuils réglementaires en *E. coli* et en entérocoques. Ces résultats semblent indiquer que la contamination fécale ne provient pas du large de la baie (zone des pertuis) et n'est donc pas apportée par les courants.

Le suivi en transect de l'effet des marées sur la qualité microbiologique des eaux de baignade dans les deux sites de baignade n'a pas montré d'accumulation des contaminants fécaux dans les zones de baignade ce qui ne renforce pas l'hypothèse d'une origine aviaire de la contamination.

Tous ces suivis indiquent que la contamination fécale observée dans la baie d'Aytré pourrait être, au moins en partie, due à une mauvaise qualité des eaux de ruissellement du bassin versant notamment en temps de pluie. Le lessivage des sols et donc du bassin versant de la baie semble pouvoir influencer la qualité microbiologique des eaux de baignade de la baie d'Aytré si les exutoires ne sont pas efficacement fermés.

III. Origine de la contamination fécale de la baie d’Aytré

1.1 Problématique

Après avoir étudié la dynamique spatio-temporelle de la contamination fécale et identifié certaines sources possibles de cette pollution, il était essentiel de s’interroger sur l’origine humaine et/ou non humaine de cette contamination. Les dépassements des seuils réglementaires sont principalement dus à de fortes abondances d’entérocoques. Cependant, comme nous l’avons présenté dans le chapitre 1 (section 1.1.2.2.2), toutes les espèces d’entérocoques ne sont pas d’origine fécale. Les deux principales espèces d’origine fécale (humaine et animale) sont *E. faecium* et *E. faecalis*. Certaines espèces sont d’origine ubiquiste ; il s’agit de *E. hirae* (animale ou environnementale) et de *E. casseliflavus* (humaine ou environnementale). *E. mundtii* est intéressante, puisqu’elle est l’une des principales espèces d’origine environnementale (de matière végétal) présente dans les écosystèmes aquatiques. De plus, la méthode d’analyse des entérocoques dans les eaux de baignade ne permet pas de distinguer les espèces fécales des espèces ubiquistes et environnementales (International Organisation for Standardisation, 1999). Ainsi, nous avons d’abord caractérisé les différentes espèces d’entérocoques pour identifier les souches bactériennes responsables des dépassements des seuils réglementaires. Pour cela, nous avons déterminé la proportion des différentes espèces en fonction de leurs origines à partir d’une sous-population de souches bactériennes (d’entérocoques) obtenue suite à des isolements à partir de cupules positives de microplaques révélant un dépassement des seuils réglementaires. Dans la même lancée, nous avons caractérisé les origines humaine et/ou animale des principales espèces bactériennes indicatrices d’une contamination fécale : *E. coli* et les deux principaux entérocoques intestinaux *E. faecium* et *E. faecalis* pour estimer la contribution de chacune des deux origines à partir de ces indicateurs. Nous avons ainsi développé une méthode exploratoire basée sur l’analyse de marqueurs protéiques par des modèles d’algorithme génétiques pour discriminer les origines des bactéries indicatrices de contamination fécale.

Ensuite, à partir des échantillons en dépassement des seuils réglementaires, nous avons recherché des marqueurs d’origines spécifiques à l’homme, aux chevaux, aux oiseaux et aux chiens qui représentent les principales origines fécales de cette contamination en fonction des usages de la baie d’Aytré (Chapitre I, 1.4.2). En complément, des marqueurs chimiques ont été recherchés pour valider la contribution de l’origine humaine sur le niveau de cette contamination fécale.

1.2 Plan expérimental

1.2.1 Diversité des espèces d'entérocoques

Pour déterminer la diversité des espèces d'entérocoques, 3 échantillons de chaque site de baignade (Platin Nord et Platin Sud) ont été analysés à différentes campagnes d'échantillonnage (décembre 2019, février et septembre 2020). A partir des microplaques réalisées pour déterminer la qualité microbiologique de ces échantillons, un sous-échantillonnage de 60 isolats d'entérocoques a été effectué pour chaque échantillon comme décrit dans le chapitre 2 (section 1.2.2.3.3). Ensuite, les différents isolats bactériens ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et la proportion de chaque espèce identifiée a été calculée.

1.2.2 Analyse des traceurs de sources microbiologiques

1.2.3 Origine des principales espèces bactériennes indicatrices d'une contamination fécale

À partir des 46 campagnes d'échantillonnage réalisées durant le suivi annuel, 7% des échantillons d'eau du Platin Nord étaient en dépassement des seuils réglementaires pour *E. coli* et 24% pour les entérocoques. Au Platin Sud, 7% des échantillons étaient en dépassement des seuils réglementaires pour *E. coli* et 32% pour les entérocoques. Ces échantillons en dépassement des seuils réglementaires ont été analysés pour, d'une part, caractériser l'origine humaine ou animale des indicateurs de contamination fécale, et d'autre part, rechercher des traceurs de sources microbiologiques.

A partir de ces échantillons, 141 isolats de *E. coli*, 76 isolats de *E. faecium* et 18 isolats de *E. faecalis* ont été obtenus à partir des échantillons des deux sites. Ces isolats ont été analysés à partir de modèles d'algorithmes génétiques développés à partir d'isolats des trois espèces bactériennes obtenues à partir d'échantillons de fèces d'humain, de chien, d'oiseau et de cheval (chapitre 2, section 1.2.2.3.3). Les mêmes analyses ont aussi été réalisées avec les échantillons en dépassement des seuils réglementaires de la baie d'Yves.

1.2.4 Quantification de marqueurs génétiques

Plusieurs marqueurs génétiques ont été analysés au cours de cette étude (tableau 11). Cependant, 4 marqueurs ont été retenus pour déterminer l'origine de la contamination fécale de la baie d'Aytré. Il s'agit de traceurs de sources microbiologiques d'origine spécifique pour l'homme (*HF183*), le cheval (*HoF597F*), les oiseaux (*GDF*). Ces marqueurs ont été quantifiés par PCR quantitative pour déterminer la contribution de chaque origine sur le niveau de contamination fécale. En outre, le marqueur chien (*BacCan*) a été analysé par PCR pour estimer l'occurrence de ce marqueur dans ces échantillons, les résultats par PCR quantitative de ce marqueur n'étant pas exploitables.

La sensibilité et la spécificité des ces quatre marqueurs ont été analysées par qPCR à partir d'échantillons d'ADN extraits de fèces humaines et d'animaux (tableau 12). Tous les marqueurs étaient sensibles à l'origine correspondant. Les marqueurs d'origine humaine et aviaire étaient spécifiques à une origine humaine et à une origine aviaire respectivement.

Cependant, le marqueur cheval a été détecté sur tous les échantillons de fèces récoltés (humaines, aviaires et chien).

1.2.5 Quantification de marqueurs chimiques

Dans cette étude la caféine et le paracétamol ont été les deux marqueurs chimiques quantifiés comme traceurs d'origine humaine (Annexe 2).

1.3 Résultats

1.3.1 Place de l'origine fécale dans les indicateurs de contamination

1.3.1.1 Origine environnementale et origine fécale

La caractérisation des différentes espèces d'entérocoques quantifiées par la méthode normée est représentée sur la figure 31.

Dans les échantillons d'eau du Platin Nord, 5 espèces d'entérocoques ont été isolées à partir de trois microplaques en dépassement des seuils réglementaires des trois campagnes d'échantillonnage. *E. faecium* était l'espèce dominante sur deux (60% en décembre 2019 et 70% en septembre 2020) des trois échantillons analysés. *E. mundtii*, l'espèce environnementale, était présente sur l'ensemble des 3 échantillons à des proportions variant de 10% (en février 2020) à 35% (en décembre 2020). Les espèces ubiquistes *E. casseliflavus* et *E. hirae* étaient présentes à 50% (en septembre) et à 25% (en février 2020) respectivement.

Dans les échantillons d'eau du Platin Sud, 5 espèces d'entérocoques ont également été isolées à partir des microplaques des 3 campagnes d'échantillonnage. *E. faecium* était dominant dans l'échantillon de février 2020 (50%). *E. faecalis* a été isolé dans l'échantillon de février 2020 (20%). Les espèces ubiquistes *E. casseliflavus* et *E. hirae* étaient les autres espèces dominantes avec des proportions de 40% en septembre 2020 et de 30% en février 2020 respectivement. *E. mundtii* était présent dans l'échantillon de septembre 2020 (15%). En décembre 2019, seulement 20 isolats bactériens ont été obtenus et ils ne correspondaient à aucune des six principales espèces d'entérocoques.

Dans le sédiment, au Platin Nord les analyses ont été réalisées à partir de 2 échantillons, aucun isolat n'a pu être isolé à partir de l'échantillon de décembre 2019. Les principales espèces d'entérocoques étaient par ordre d'abondance décroissant *E. faecium*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* et *E. hirae*. Au Platin Sud, les principales espèces d'entérocoques étaient *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* et *E. mundtii*.

La même diversité des espèces d'entérocoques a été observée dans les deux types d'échantillons. Cependant, les proportions des différentes espèces bactériennes dans le sédiment n'étaient pas liées entre les deux types d'échantillons. De plus, la diversité des isolats bactériens obtenus à partir des échantillons d'eau montre que les espèces d'entérocoques d'origine environnementale et ubiquiste étaient responsables en partie ou totalement aux dépassements des seuils réglementaires en entérocoques.

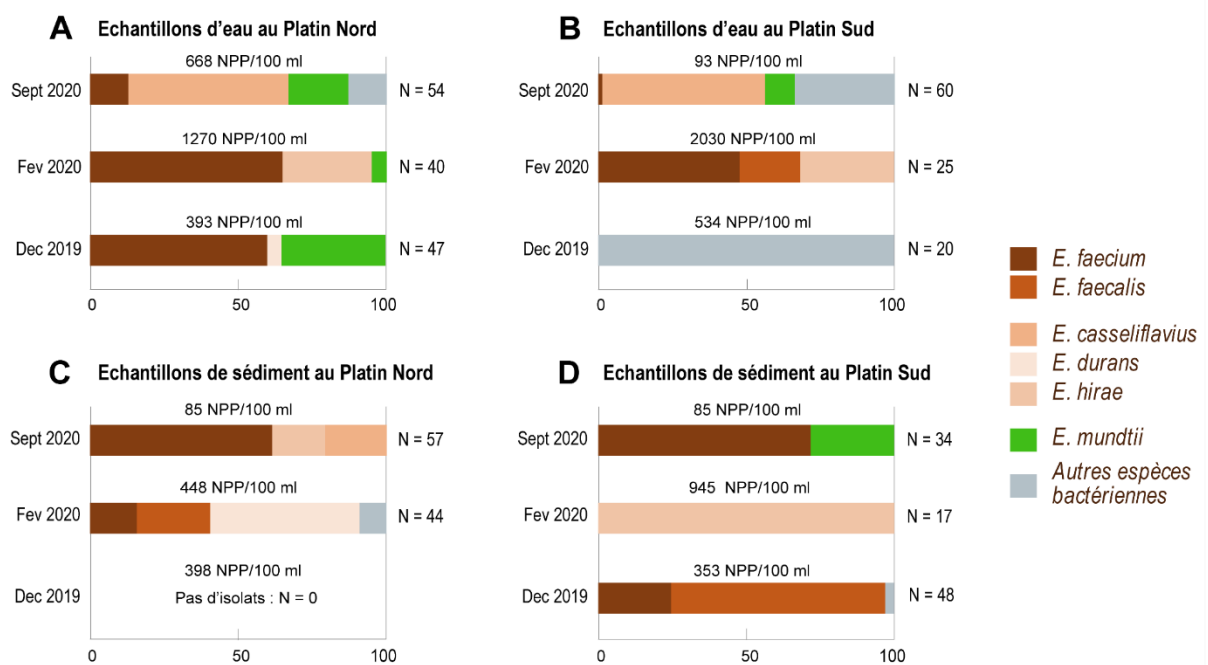


Figure 31 : Proportion (%) des différentes espèces d'entérocoques durant 3 campagnes d'échantillonnage (décembre 2019, février et septembre 2020) d'eau et de sédiment sur les deux sites de baignade de la baie d'Aytré. Les quantifications des entérocoques sont indiquées au-dessus de chaque histogramme et le nombre d'isolats obtenu est indiqué par le nombre N. A) Échantillons d'eau au Platin Nord, B) échantillons d'eau au Platin Sud, C) échantillons de sédiment au Platin Nord et D) échantillons de sédiment au Platin Sud. La légende indique les différentes espèces de bactéries suivant le code couleur.

1.4 Traceurs de sources microbiologiques

1.4.1 Origine humaine et origine non humaine (animale) des indicateurs de contamination fécale

1.4.1.1 Modèles d'algorithmes génétiques

Le modèle d'algorithme génétique développé pour discriminer l'origine des espèces d'*E. coli* a été développé au cours d'une précédente étude réalisée avec des isolats bactériens de différentes origines obtenues à partir d'échantillons prélevés en région Poitou-Charentes. Ce modèle a été obtenu à partir de 200 isolats de *E. coli* (24 d'origine humaine et 108 d'origine animale), le reste des échantillons a été utilisé pour valider le modèle. Ce modèle permet de discriminer la classe humaine à 99,79% et la classe animale à 98,79%. Sachant que les souches de *E. coli* peuvent être sites-dépendants, ce modèle a été validé pour notre étude sur de souches de *E. coli* isolées de fèces de chiens, de chevaux, d'oiseaux et d'humains prélevés à proximité de la commune d'Aytré.

Le modèle d'*E. faecalis* a été développé à partir de 42 isolats (17 d'origine humaine et 25 d'origine animale) et permet de discriminer à 100% les deux classes (humaine et animale). Le modèle d'*E. faecium* a été développé à partir de 28 isolats (19 d'origine humaine et 9 d'origine animale) et permet de discriminer la classe humaine à 99,89% et la classe animale à 99,27%. Ces modèles ont également été validés avec des isolats de fèces de chiens, de chevaux, d'oiseaux et d'humains prélevés à proximité de notre site d'étude.

1.4.2 Détermination de l'origine des indicateurs de contamination fécale

Au total 259 souches de bactéries fécales (*E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*) ont été isolées à partir des cupules positives de microplaques des échantillons en dépassement des seuils réglementaires sur les deux sites de baignade de la baie d'Aytré (Tableau 26). Ces analyses ont également été réalisées dans la baie d'Yves pour comparer les caractéristiques des contaminations fécales observées dans les deux baies. Les modèles d'algorithme génétique ont permis de discriminer les différents isolats en fonction des classes d'origine humaine et d'origine animale. Le nombre d'isolats analysés sur

chaque site est synthétisé dans le tableau 6. Dans la baie d’Aytré, pour l’ensemble des espèces bactériennes, 28% des isolats des deux sites de baignade de la baie d’Aytré ont été classés en origine humaine, 65% en origine animale et 7% des isolats n’ont pas pu être caractérisés.

Au total, 72 isolats d’*E. coli*, d’*E. faecium*, d’*E. faecalis* ont été isolés à partir des échantillons de la baie d’Yves. Neuf pourcent de ces isolats sont d’origine humaine, 80% d’origine animale et 11% n’ont pas pu être caractérisés.

Cette analyse indique qu’en fonction de la caractérisation de l’origine des souches bactériennes indicatrices de contamination fécale, cette pollution est principalement d’origine animale dans les deux baies contaminées. La contamination humaine est de 28% dans la baie d’Aytré et de 9% dans la baie d’Yves, ceci peut être lié au contexte géographique plus anthropisé dans la baie d’Aytré que dans la baie d’Yves.

Tableau 26 : Classification des différents isolats bactériens d’indicateurs de contamination fécale en fonction de leur origine humaine ou animale.

Sites	Espèces bactériennes	Nombre total d’isolats	Classe d’origine humaine	Classe d’origine animale	Origine non déterminée
Platin Nord	<i>E. coli</i>	85	10	70	5
	<i>E. faecium</i>	50	2	44	4
	<i>E. faecalis</i>	4	3	1	-
Platin Sud	<i>E. coli</i>	78	12	64	2
	<i>E. faecium</i>	26	9	13	4
	<i>E. faecalis</i>	14	4	9	1
Yves	<i>E. coli</i>	35	4	31	-
	<i>E. faecium</i>	25	2	19	4
	<i>E. faecalis</i>	12	1	9	2

1.4.3 Traceurs génétiques

La quantification des traceurs de sources microbiologiques mesurée dans les échantillons en dépassement des seuils réglementaires sur les trois sites (Platin Nord, Platin Sud et baie d'Yves) est représentée sur la figure 32 (A, B, et C respectivement). Trois marqueurs génétiques ont été quantifiés par qPCR dans tous les échantillons : HF183 pour une origine humaine, GDF pour une origine aviaire et HoF597F pour une origine équine. Les réplicats des différents échantillons ont été analysés séparément pour la recherche de ces marqueurs génétiques.

Le marqueur cheval est le marqueur le plus abondant dans les échantillons en dépassement des seuils réglementaires. Leur abondance variait de 10^2 à 10^4 copies/ml dans tous les échantillons des trois sites.

Le marqueur aviaire était le deuxième marqueur le plus abondant dans les échantillons en dépassement des seuils réglementaires. Leur abondance variait de 0 à 10^2 copies/ml dans les échantillons des trois sites. Ce marqueur était plus présent dans les échantillons du Platin Sud que dans les échantillons des deux autres sites.

Le marqueur humain était moins abondant dans les échantillons en dépassement des seuils réglementaires. Cet indicateur était présent dans quelques échantillons : 2 au Platin Nord, 6 échantillons au Platin sud et 2 échantillons à la baie d'Yves. Leur abondance variait de 0 à 10^2 copies/ml. Ce marqueur était aussi plus présent dans les échantillons du Platin Sud que dans les échantillons des deux autres sites.

L'analyse par PCR de l'occurrence du marqueur chien réalisée à partir des échantillons en dépassement des seuils réglementaires a montré que ce marqueur est présent dans 40% des échantillons du Platin Nord et 60% des échantillons du Platin Sud et dans 10% des échantillons de la baie d'Yves.

Aucun lien n'a été observé entre l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale et les concentrations des marqueurs chimiques dans les échantillons d'eau.

L'analyse des marqueurs génétiques montrent que le marqueur cheval était le marqueur le plus abondant, il est suivi par le marqueur aviaire. Le marqueur humain était l'indicateur le moins abondant dans les trois sites étudiés. Ces résultats montrent que la contamination fécale observée dans les sites de baignade de la baie d'Aytré était majoritairement d'origine animale avec des concentrations très élevées de l'indicateur d'origine équine. Ces résultats montrent également les mêmes variations de la dynamique de ces trois marqueurs génétiques dans les trois sites. L'analyse des marqueurs génétiques indique donc que cette contamination fécale n'est pas spécifique à la baie d'Aytré.

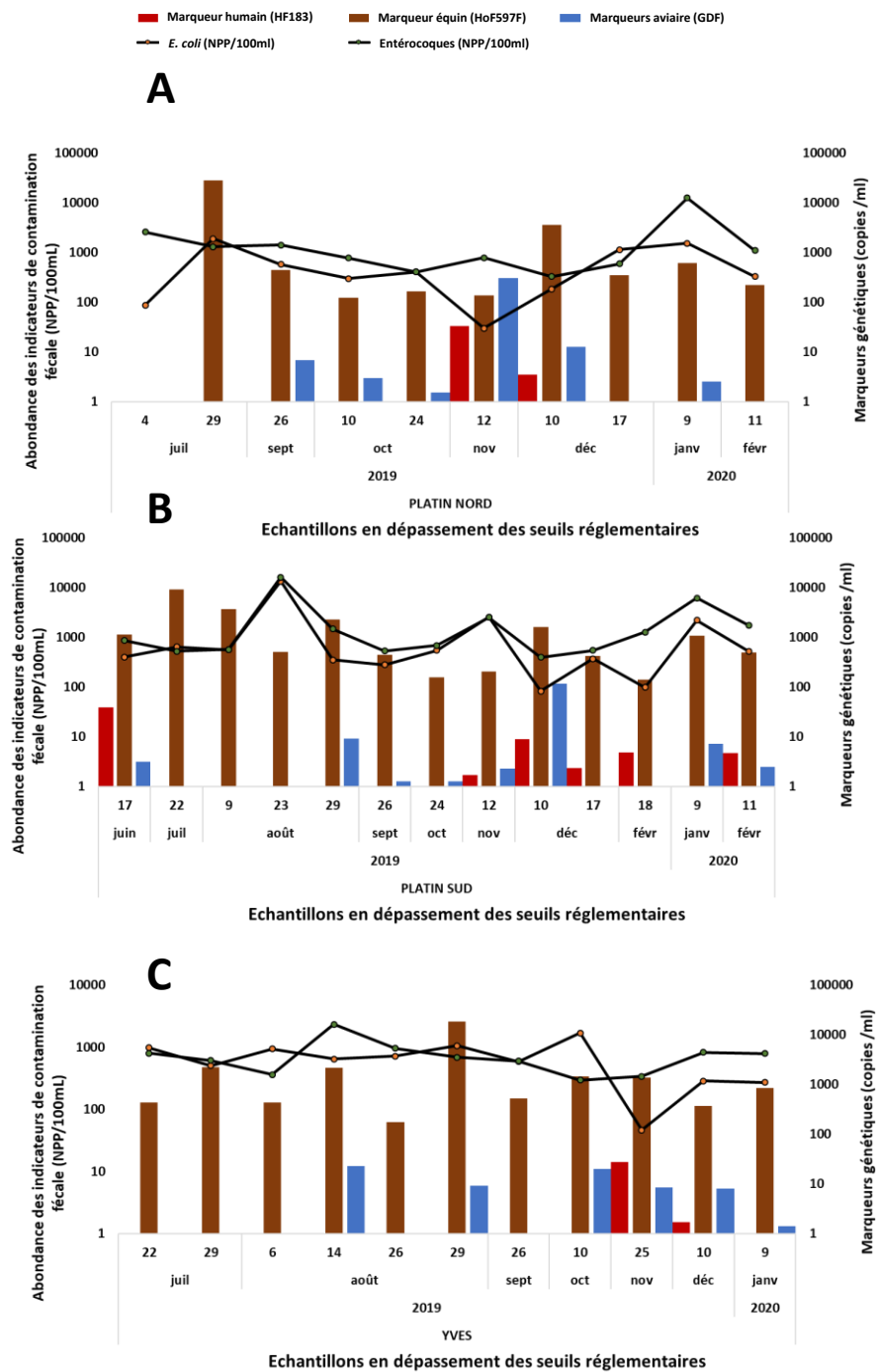


Figure 32 : Abondance des marqueurs humain (HF183), aviaire (GDF), et équin (HoF597F) dans les différents échantillons d'eau en dépassement des seuils réglementaires sur les trois sites d'échantillonnage Platin Nord, Platin Sud et baie d'Yves. Les abondances des deux indicateurs de contamination fécale sont représentées par les courbes. A) Échantillons d'eau au Platin Nord, B) échantillons d'eau au Platin Sud, C) échantillons d'eau de la baie d'Yves.

1.4.4 Traceurs chimiques

La caféine et le paracétamol sont les deux marqueurs chimiques quantifiées pour confirmer l'estimation de la contribution de l'origine humaine sur le niveau de contamination fécale de la baie d'Aytré. Ces deux marqueurs de contamination fécale d'origine humaine ont été détectés sous forme de traces c'est-à-dire en dessous de la limite de détection ($<0,05$) dans la majorité des échantillons en dépassement des seuils réglementaires.

Les échantillons où ces marqueurs ont été quantifiés sont représentés sur la figure 33. La concentration de ces molécules chimiques dans les différents échantillons a également été analysée dans les réplicats des différents échantillons. Dans certains échantillons, les concentrations en caféine variaient de 0 à $0,2\mu\text{g}$ à des dates différentes dans les 3 sites étudiés. Des concentrations non négligeables de caféine ont été détectées dans 5 réplicats de 2 échantillons au Platin Nord et dans un réplikat d'un échantillon au Platin Sud. Dans les échantillons de la baie d'Yves, la caféine a été quantifiée dans 7 réplicats de 4 échantillons. Les concentrations de paracétamol variaient de 0 à $0,13\mu\text{g/ml}$. Ce marqueur a été quantifié dans 3 réplicats d'un échantillon du Platin Nord, 2 réplicats de 2 échantillons du Platin Sud et 2 réplicats de 2 échantillons de la baie d'Yves. Aucun lien n'a été observé entre l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale et les concentrations de ces marqueurs chimiques dans les échantillons d'eau.

Ces marqueurs étaient les moins abondants et leurs concentrations dans les échantillons contaminés était relativement faible. Ces résultats indiquent une faible contribution d'une origine humaine sur le niveau de contamination de la baie d'Aytré. Ces résultats montrent également une variabilité importante entre les réplicats d'un même échantillon.

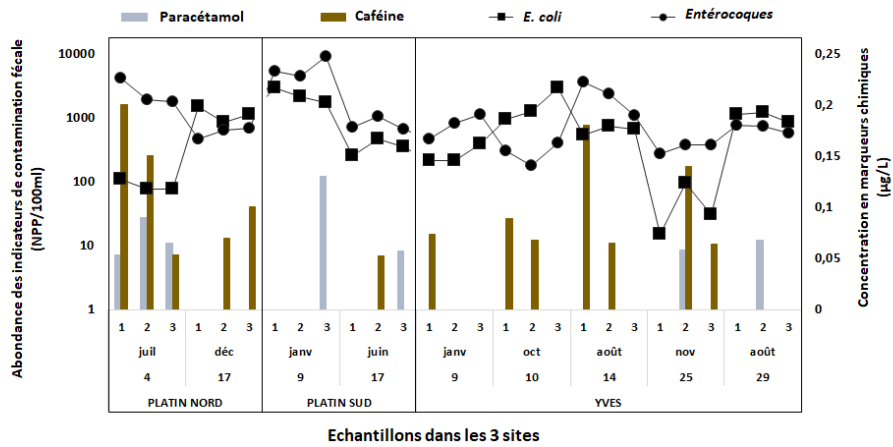


Figure 33 : Abondance des marqueurs chimiques (paracétamol et caféine) dans quelques échantillons d'eau en dépassement des seuils réglementaires de la baie d'Aytré et abondances des indicateurs de contamination fécale dans ces échantillons. Les numéros des échantillons correspondent aux trois réplicats de chaque échantillon.

1.5 Conclusion

La dernière partie de ce chapitre présente les différentes origines de la contamination fécale de la baie d'Aytré et une estimation de la contribution de chaque origine sur le niveau de cette contamination. Les analyses de profil de population ont montré que les dépassements des seuils réglementaires des indicateurs de contamination fécale étaient dû en partie à des bactéries environnementales.

Le développement de modèles discriminants de profils protéiques des bactéries indicatrices d'une contamination pour une caractérisation rapide de l'origine humaine ou non humaine (animale) des indicateurs de contamination fécale a montré que les souches bactériennes étaient principalement d'origine animale.

Les résultats des marqueurs génétiques montrent que la contamination fécale observée dans les sites de baignade de la baie d'Aytré était majoritairement d'origine animale avec des concentrations très élevées de l'indicateur d'origine équine. Les marqueurs génétiques présentent globalement les mêmes variations dans les trois sites. Ce qui indique que cette contamination n'est pas n'est pas spécifique à la baie d'Aytré.

C'est la combinaison de toutes ces analyses qui nous a permis d'identifier les différentes origines de cette contamination fécale et de confirmer l'origine plurifactorielle de la contamination tout en permettant d'estimer la part de chaque origine sur le niveau de contamination de la baie d'Aytré.

1.6 Discussion

Ce chapitre avait pour but d'identifier les différentes sources de la contamination fécale de la baie d'Aytré et de déterminer les différentes origines de cette pollution.

L'étude comparative de la dynamique spatiale de l'abondance des indicateurs de contamination fécale entre la baie d'Aytré et la baie d'Yves montre une variation temporelle similaire entre les deux sites. Ces résultats indiquent que la problématique de la contamination fécale de la baie d'Aytré n'est pas un phénomène local mais est étroitement liée à la situation géographique de la baie et à sa configuration spatiale particulière. En effet, plusieurs études démontrent que les écosystèmes intertidaux à faibles pentes, abrités dans des baies et protégés par des îles ou des zones de marais sont favorables à la multiplication des entérocoques en particulier (Bonilla et al., 2006; Kucuksezgin et al., 2020). Nos résultats corroborent ces observations et montrent que la contamination fécale de la baie d'Aytré est en partie due à la configuration géographique du site.

Une source de contamination fécale majeure identifiée dans cette étude correspond aux exutoires situés au bord de la plage. En effet, ces exutoires apportent une quantité d'eau douce non négligeable dans la baie dont la qualité microbiologique n'est pas toujours excellente. La fermeture de ces exutoires durant la période estivale constitue donc une bonne stratégie pour réduire l'apport de contaminants fécaux dans la baie durant cette saison de baignade. Les analyses réalisées en dehors de la baie (au large et dans le port de plaisance des Minimes) confirment que la contamination n'arrive pas du large et provient de la baie elle-même ou de son bassin versant.

L'analyse de l'origine de la contamination fécale a montré dans un premier temps que les dépassements des seuils réglementaires des bactéries fécales seraient dus en partie à des bactéries d'origine environnementale comme *E. mundtii* qui proviendrait de matières végétales (Byappanahalli et al., 2012; International Organisation for Standardisation, 1999). Dans la baie d'Aytré, cette espèce bactérienne peut être présente naturellement dans la baie ou elle peut provenir probablement de la zone de marais située dans le bassin versant de la baie. Les espèces ubiquistes *E. hirae* et *E. casseliflavus* sont les espèces ubiquistes et donc peuvent indiquer soit une

contamination fécale soit une présence naturelle dans ce milieu ou encore un apport depuis le bassin versant. Ce qui corrobore notre précédente conclusion.

Les modèles d'algorithme génétique développés dans cette étude permettent de déterminer la part de chaque origine sur le niveau de cette contamination fécale à partir de souches bactériennes isolées des échantillons en dépassement des seuils réglementaires. Ces outils pilote mis en place dans cette étude montrent qu'il est possible de discriminer différentes souches bactériennes d'origine fécale en fonction de leur profil protéique. Cependant comme les bactéries étudiées peuvent être "sites-dépendants", il est nécessaire d'implémenter les modèles créés avec des souches d'origine connue prélevées dans différentes zones pour pouvoir valider ces modèles et optimiser leur utilisation.

Les marqueurs génétiques recherchés dans cette étude nous ont permis d'évaluer la contribution de chaque origine sur le niveau de contamination fécale de la baie d'Aytré. Le marqueur cheval était le marqueur le plus abondant dans tous les échantillons indiquant ainsi une contribution des chevaux à la contamination fécale de la baie d'Aytré. Cependant, le marqueur utilisé dans cette étude (**HoF597F**) a montré une faible spécificité pour les échantillons d'origine équine. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser ou de développer d'autres marqueurs plus spécifiques pour les chevaux. Les marqueurs aviaire et humain étaient moins abondants dans les échantillons contaminés. Ces résultats confirment les estimations obtenues avec l'analyse des marqueurs protéiques : la contamination fécale de la baie d'Aytré serait principalement due à une pollution d'origine animale.

CHAPITRE 6 : PERCEPTION DE CETTE CONTAMINATION PAR LA POPULATION LOCALE ET ADAPTATIONS DES PRATIQUES RECREATIVES

La baie d'Aytré occupe une place importante dans l'agglomération de la Rochelle pour les pratiques récréatives. Durant la période estivale en particulier, ses 1,8 km de plage attirent un nombre important de baigneurs dont certains sont des touristes fréquentant le camping proche ou sont en séjour dans une commune de l'agglomération. La plage attire aussi des habitants locaux ou des excursionnistes qui apprécient son paysage et son calme. Depuis 2018, la fermeture "définitive" de la plage aux activités de baignade constitue un frein au développement touristique de cette commune.

Dans cette étude, après avoir analysé la dynamique spatio-temporelle de cette contamination et identifier les sources et origines de la contamination, nous nous sommes proposées d'enquêter auprès des usagers de la plage pour comprendre les impacts de l'interdiction de la baignade sur les pratiques concernant cet espace.

La directive européenne demande l'information du public sur la qualité des eaux de baignade durant les saisons de baignade. Ainsi, nous avons analysé la réception de l'information sur la contamination et sur l'interdiction de la baignade fournie par les collectivités territoriales et par les scientifiques en charge de l'étude. Nous avons aussi analysé la perception plus ou moins négative que les usagers avaient de la contamination en fonction de son origine. L'adaptation des pratiques et les changements dans la perception de la "qualité" des lieux ont aussi été abordés.

Ce chapitre est également présenté sous forme d'un article intitulé "*Réception de l'information et adaptation des pratiques suite à la contamination des eaux de baignade d'une plage péri-urbaine (Aytré) du littoral atlantique français*" qui sera soumis prochainement dans la revue canadienne Vertigo, La revue électronique en sciences de l'environnement.

Réception de l'information et adaptation des pratiques suite à la contamination des eaux de baignade d'une plage péri-urbaine (Aytré) du littoral atlantique français

Le Béguet Maëlig, Petit Emmanuelle, Vacher Luc, Agogué Hélène, Ndione Méry.

Réception de l'information et adaptation des pratiques suite à la contamination des eaux de baignade d'une plage péri-urbaine (Aytré) du littoral atlantique français

Le Béguet Maëlig, Petit Emmanuelle, Vacher Luc, Agogué Hélène, Ndione Méry

1.1 Introduction

Aujourd'hui le littoral atlantique est concerné comme bien des régions du monde par un phénomène de forte littoralisation. Il en résulte une augmentation des populations et un développement des activités entraînant une pression importante sur les milieux littoraux. La croissance de l'attractivité de ces espaces sensibles liée en grande partie à la recherche de leurs aménités naturelles génère cependant de manière pernicieuse des pressions pouvant altérer ces environnements (Dachary-Bernard, Lyser, 2016). Ces contradictions s'accompagnent d'une prise de conscience et d'une vigilance sociétale accrue pour les questions d'altération des milieux en particulier sur les littoraux les plus fréquentés et les plus urbanisés.

Ce contexte de vigilance par rapport aux risques liés à une dégradation de l'environnement proche, qui apparaît dès les années 1970 avec l'émergence de l'écotoxicologie, prend une réelle ampleur au début du 21^e siècle autour de questions comme l'utilisation des pesticides ou l'identification de perturbateurs endocriniens. Aujourd'hui, il explique la bonne acceptation sociétale des cadres réglementaires visant à renforcer la sécurité sanitaire (Tabuteau, 2007), même si la crise du COVID a pu radicaliser certaines positions en matière d'acceptation des contrôles.

A partir d'un évènement : la fermeture « définitive » de la baignade en 2018 d'une plage de l'agglomération de La Rochelle (figure 1) pour dépassement récurrent des normes sanitaires concernant la qualité des eaux de baignade, il s'agira ici d'analyser **la manière dont une population d'usagers reçoit l'information sur la contamination d'un lieu fréquenté pour ses loisirs et comment elle adapte ses pratiques en lien avec cet espace**. Les changements dans la pratique de la plage et dans la perception de cet espace de loisir seront mis en relation avec le mode de réception de l'information sur la contamination de l'environnement et la manière dont l'interdiction de la baignade est prise en compte par les pratiquants.

Pour traiter de cette question nous précisons, dans un premier temps, les spécificités de cette contamination « invisible » d'une nature particulière, puisqu'elle doit parler à la raison alors qu'elle ne parle pas aux sens. Nous aborderons ensuite la question de la réponse de la population fréquentant la baie d'Aytré à ces informations. Pour cela, la méthode utilisée pour comprendre comment la population reçoit ces informations et comment elle adapte ses comportements sera présentée dans un premier temps. Un profil général de la réception de l'information et de l'adaptation des pratiques suivra pour rendre compte de la réelle homogénéité de la réponse de la population. Enfin, pour affiner l'analyse, l'existence de nuances dans la réponse des usagers en fonction des pratiques effectuées dans l'espace de la plage sera interrogée.

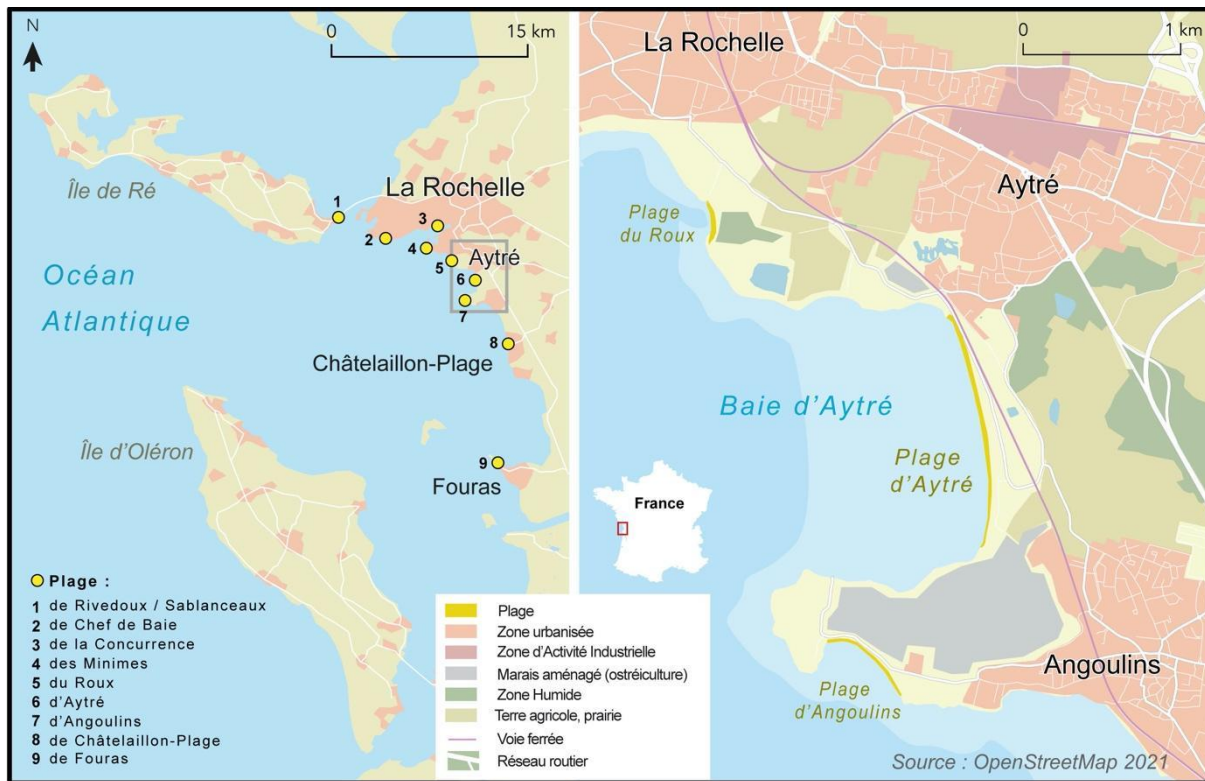


Figure 1- La plage d'Aytré, une plage de l'agglomération de la Rochelle
Source : Carte Pascal Brunello, 2021.

1. Une interdiction de la baignade due à une contamination de l'environnement ?

Pour comprendre comment la population d'utilisateurs reçoit l'information sur la contamination de la plage, il est nécessaire de préciser la nature du problème rencontré. En effet, à Aytré, la contamination n'a rien de spectaculaire puisqu'elle est liée à la présence de bactéries fécales. Son appréhension repose largement sur la confiance que l'utilisateur peut avoir à l'égard du producteur de l'information. De même, l'interdiction de la baignade entraînée par la contamination représente un autre volet dans la réception de l'information qui peut relever de mécanismes d'acceptation différents.

1.1 Une contamination invisible, sans goût et sans odeur

La contamination fécale dont relève notre cas d'étude est liée aux mesures effectuées dans le cadre de la surveillance des eaux de baignades qui font l'objet en France d'un suivi réglementaire pendant la période estivale conformément à la directive européenne (2006/7/CE). Cette directive a été transposée en droit

français aux articles D.1332-14 à D.1332-38-1 du code de la santé publique (CSP) et le suivi des eaux de baignade française est donc assuré sous la responsabilité des Agences Régionale de Santé. Quatre prélèvements d'eau doivent être effectués réglementairement durant la saison balnéaire sur les plages ouvertes à la baignade. Le classement de la qualité des eaux de baignade (et donc l'éventuelle interdiction de la baignade) est effectué avec l'analyse des mesures des deux paramètres microbiologiques réglementés (*Escherichia coli* et entérocoques intestinaux) en fin de saison estivale (DGS, 2021). Le Ministère chargé de la santé précise que « Leur présence dans l'eau indique une contamination d'origine fécale plus ou moins forte en fonction des concentrations relevées. Ces germes microbiens ne constituent pas en eux-mêmes un danger pour les baigneurs aux seuils généralement relevés mais peuvent indiquer, par leur présence, celle simultanée de germes pathogènes. » (DGS, 2021). Il s'agit donc bien d'un indicateur de « qualité » bonne, moyenne ou mauvaise plus qu'une alarme signalant la présence d'agents pathogènes actifs dans l'environnement. Cependant, si la qualité des eaux est signalée comme étant de qualité insuffisante durant cinq années de suite, une interdiction de la baignade sera demandée par l'Agence régionale de santé car les eaux seront définitivement considérées comme « non conformes » (DGS, 2021).

La qualité insuffisante des eaux reste cependant très virtuelle dans la pratique pour les usagers d'autant plus que des altérations plus spectaculaires comme la présence d'algues (toxiques ?) ou la transparence ne sont pas retenues pour classer la qualité de l'eau en fin de saison. On peut ainsi parler d'une contamination invisible et inodore. La mairie d'Aytré et le représentant de l'Agence régionale de santé relevaient d'ailleurs lors d'une réunion publique organisée par la mairie suite à l'interdiction de la baignade (25/06/2018) qu'aucun signalement de problème de santé suite à la baignade dans la baie n'avait jamais été signalé à leurs services.

1.2 Une contamination qui s'inscrit dans le temps

L'interdiction de la baignade en 2018 inscrit dans les esprits, une « pollution » nouvelle dont la cause ne pourrait être liée qu'à une nouvelle donne de la vie locale : extension du port de plaisance de La Rochelle, problème avec les systèmes d'épuration des eaux, etc. Ici, plus qu'une nouvelle pollution, il s'agit pourtant d'un nouveau calibrage des seuils réglementaires de la qualité des eaux qui fait basculer la situation des eaux de baignade de « normale » à « anormale ». D'ailleurs, les élus sont très sensibles au vocabulaire et rejettent le terme de pollution qui impliquerait selon le langage courant une dégradation de l'environnement par l'introduction de substances toxiques ou de déchets suite à l'activité humaine. Ce terme impliquerait donc, pour eux, une dynamique « d'apport » identifiable dans le temps potentiellement lié à un défaut de gestion. Cette dynamique n'étant pas avérée, le terme est rejeté.

Il est vrai que le phénomène « d'apparition » de la contamination semble clairement établi. Le passage de la directive européenne 76/160/CEE à la directive 2006/7/CE définissant une nouvelle méthode de classement des eaux de baignade (Bedri et al., 2016) a simplifié l'approche en ne prenant en compte plus que deux paramètres microbiologiques (5 étaient en vigueur avec la directive de 1975). Il a en revanche « durci » les critères permettant d'appartenir à la qualité des eaux suffisantes. En France un certain nombre de sites de

baignade, dont celui d'Aytré, sont ainsi passés du niveau qualité suffisante à celui d'insuffisante par la seule évolution de la réglementation (Duboudin, 2007). Le temps de la mise en application de la nouvelle réglementation avait d'ailleurs permis aux gestionnaires de voir arriver la fermeture de la baignade sans pour autant trouver les moyens de faire baisser les taux de contaminants dans la baie. En effet, depuis plus de 10 ans que des analyses sont effectués dans la baie, les indicateurs *Escherichia coli* et entérocoques sont toujours présents avec une certaine stabilité les plaçant en dessous des seuils réglementaires avant 2006 puis au-dessus avec l'évolution de la réglementation.

1.3 Appréhender l'invisible implique connaissance et adhésion au discours

Si la contamination des eaux de baignade ne peut être appréhendée par les sens, l'acceptation de son existence implique une connaissance et une adhésion aux discours portant l'information de cette contamination. La réception de l'information sera donc capitale et conditionnée par différents éléments.

Pour cela, il faudra que le discours soit diffusé et que l'information arrive jusqu'aux usagers. La communication par les médias locaux, mais aussi par des affichages publics sera alors incontournable. Cependant les affichages informant aux entrées de plage de l'interdiction de la baignade ont souvent été intentionnellement arrachés et pas toujours rapidement remplacés, ce qui a pu entraîner durant l'été des déficits d'information sur la fermeture de la baignade chez les visiteurs. Pour la presse locale, ce sujet récurrent est régulièrement relayé en fonction des nombreuses hypothèses et de l'approche de la saison estivale qui rappelle le problème de la fermeture de la plage « *Pollution, la plage est interdite à la baignade. Cela pourrait durer deux ou trois ans. Le point sur ce serpent de mer* » (Sud-Ouest, 05/07/2018). La presse relaye l'ensemble des informations au fil de l'eau sans véritable hiérarchisation. Dès 2016, Sud-Ouest évoque par exemple « *le mystère des mouettes ... qui pourrait expliquer la pollution de l'eau* » (12/08/2016). Elle se fait aussi parfois l'écho de l'instrumentalisation du débat dans le contexte politique local. Ainsi « *La pollution de la plage enflamme les débats* » titrait le Journal Sud-Ouest le 15 septembre 2018 quand un conseiller d'opposition soulignait « *la durée terriblement longue* » des recherches pour trouver les causes de la pollution. Le sujet relayé par l'Agence France Presse a même le droit à une couverture nationale en mai 2018 (*Libération, Match, Le Point, Ouest France, France Info, etc.*) comme le montre ce titre vu sur le site internet du magazine Science et Avenir le 25 mai 2018 « *une pollution d'origine inconnue interdit la plage d'Aytré* ».

L'importante participation aux réunions publiques d'information sur l'interdiction de la baignade souligne que globalement les usagers sont inquiets et en recherche d'information. Il est notable aussi que de multiples explications circulent en lien avec des préoccupations plus ou moins savantes et souvent rapportées à des problématiques proches des personnes les exprimant : des évacuations d'eaux usées douteuses chez des voisins ; un envasement suspect noté par un ostréiculteur depuis les travaux du port de plaisance. Comme cela a déjà été observé (Zinn, 2008), les connaissances prises en compte par le public relèvent souvent de l'expérience vécue et mobilisent des informations incomplètes. Le ton des débats relève aussi souvent du mécontentement et d'une méfiance envers les pouvoirs locaux et les discours scientifiques suspectés au mieux d'être hors-sol, au pire de défendre des intérêts obscurs. En matière de contamination de l'environnement, de nombreuses études signalent que le discours des experts et les informations officielles comptent moins que

les signes visibles des pollutions (Bickerstaff & Walker, 2001 ; Day, 2006 ; Evrard & al., 2011, Wakesfield & al., 2001).

Si l'on se réfère aux niveaux de confiance en la science, les médias ou les politiques observés nationalement dans le « Baromètre de la confiance politique » dressé chaque année par Opinionway pour le Centre de recherches politiques de Sciences Po (CEVIPOF), en 2021, un quart des Français n'a pas confiance dans les scientifiques et plus de la moitié des Français n'a pas confiance dans les institutions politiques nationales. Le niveau de confiance le plus faible concerne le gouvernement et l'institution présidentielle (Opinionway, 2021). Mis à part la question sur la confiance dans les scientifiques qui n'était pas posée avant 2021, ces chiffres étaient presque les mêmes avant la crise du COVID. Evrard (2011) rappelle avec Hobson-West (2003) que nous vivons dans un nouvel ordre social, dans lequel le système d'expertise scientifique a perdu le monopole de la vérité.

1.4 Une plage contaminée qui est aussi une plage interdite

Au-delà de la perception de l'existence de la contamination, les usagers sont aussi confrontés à l'interdiction de la baignade entraînée par dépassement des normes sanitaires. Cette fermeture, qui inscrit une rupture dans la pratique des lieux, soulève des problématiques générales comme la question des restrictions d'usages dans des espaces publics, la cohérence de l'articulation de ces interdictions avec les usages autorisés et la réception et les représentations associées à ces interdictions.

Si la fermeture des plages a été popularisée durant la période COVID, elle reste néanmoins un phénomène rare. Durant la saison balnéaire 2009 sur un total de 2005 zones de baignades suivies sur le littoral atlantique européen (Espagne, Portugal, France, Royaume-Uni et Irlande), seuls 23 sites enregistraient des valeurs qui n'étaient pas en conformité avec les normes européennes. En 2018, lors de la fermeture de la baignade sur la plage d'Aytré, sur les 180 points de contrôle littoraux de l'Agence Régionale de Santé (ARS) en Nouvelle-Aquitaine, trois présentent des niveaux de qualité insuffisants, mais la fermeture de plage n'est décrétée que pour les deux sites de la plage d'Aytré (Platin Nord et Platin Sud), pour cause de niveaux insatisfaisants récurrents. Cette interdiction de la baignade a depuis entraîné la disparition de cette plage des sites répertoriés par l'Agence Régionale de Santé Nouvelle-Aquitaine. La plage étant fermée « définitivement », plus aucun suivi sanitaire n'est affiché. Le drapeau rouge, indiquant que la baignade est interdite, est hissé durant toute la saison estivale et le poste de surveillance de la plage a disparu. Comme l'observent Geffroy et Papinot (2005) dans le cas des interdictions de la pêche à pied en Bretagne, des réactions de rejets passant par une décredibilisation de l'interdiction sont alors possibles avec revendication d'une expérience des lieux pour justifier un comportement déviant. Le fait que l'interdiction soit issue d'une transposition au droit national d'une directive européenne ne plaide pas pour une réception simple de l'information, les institutions européennes étant considérées comme à peine plus digne de confiance que le gouvernement du pays (Opinionway, 2021).

De plus la fermeture de la baignade ne correspond pas à la fermeture de la plage qui reste ouverte pour les pratiques de promenade, de bronzage, etc. La cohérence de l'interdiction n'est donc pas forcément évidente, d'autant plus que les sports nautiques (kitesurf, planche à voile), importants dans la baie, ne sont pas interdits. Ces pratiques n'étant pas sensées impliquer un contact aussi étroit que la baignade avec l'élément marin. Une certaine incompréhension voire un sentiment d'incohérence peuvent naître de cette situation. C'est en ce sens qu'il nous paraît pertinent de traiter de la réception de l'information sur la contamination et sur l'interdiction de la baignade dans le contexte d'Aytré. Elle sera abordée dans le sens de la réception sociale dans une optique proche du concept d'acceptation sociale (Almaric, 2015; Semmoud, 2008) et du point de vue de la perception de l'information (Krupka, 2005) relevant de différents filtres sensoriels et culturels (Bailly, 1977, 1984), mais aussi des représentations mentales des usagers (Debarbieux, 1998) concernant ces espaces de loisirs et la nature des contaminations.

2. Comment traiter de la réponse d'une population face à la contamination invisible d'un de ses espaces de loisirs ?

Face à une situation de contamination invisible d'un espace dédié aux loisirs, comment aborder la réponse de la population pour permettre son analyse ? Il s'agit ici de présenter le cadre méthodologique mis en œuvre pour appréhender, suite à l'interdiction décrétée de la pratique de la baignade à Aytré, la façon dont les usagers ont reçu l'information sur la contamination, et leur façon d'adapter ou non leur pratique de cet espace.

2.1 La construction d'une enquête en ligne

Le choix de l'enquête a été fait pour appréhender la réception et la réaction des individus face à la contamination et à l'interdiction de la baignade de la plage d'Aytré. Ce choix de technique de recueil de données vise à collecter un nombre important de réponses, représentant au mieux la diversité des pratiques de loisirs et des réactions des usagers de la baie et des riverains. Il s'agit d'être en mesure de traiter de la dimension de l'adaptation des pratiques avec une grande ampleur.

1.1.1.1 Du questionnaire de terrain à l'enquête en ligne : un « choix » lié au contexte sanitaire

Le mode de passation de ce questionnaire, initialement prévu *in situ* avec des enquêteurs pour capter l'ensemble des usagers fréquentant la plage - locaux, excursionnistes et touristes -, a dû être réorienté en raison de la crise sanitaire liée au coronavirus. Une enquête en ligne, adaptée à l'investigation auprès des

populations locales, a donc été diffusée par internet, à travers la presse locale et les réseaux sociaux afin de rester dans les temporalités des travaux de l'équipe pluridisciplinaire du programme ICOMABIO². Ce mode opératoire a conduit de fait à un resserrement de la population enquêtée : ainsi tous les répondants retenus côtoient ou ont donc côtoyé la plage d'Aytré. Elle fait partie de leur environnement local. Si le choix de ce mode d'enquête permet de s'adresser aussi bien aux usagers ayant arrêté de fréquenter la plage suite à l'interdiction de la baignade qu'à ceux qui continuent ou qui la fréquentent depuis, il a été cependant plus difficile de capter les visiteurs exceptionnels sur le temps d'une journée. De même, ce choix permet d'intégrer un nombre important de répondants pouvant se projeter dans un avant et un après la fermeture de la baignade. Au final, 1053 questionnaires ont été collectés entre le 19 mai et le 20 septembre 2020, dont 992 ont été pris en compte pour cette étude³.

1.1.1.2 Interroger les usagers sur la contamination en partant de l'interdiction de la baignade

La question de l'origine de la contamination de la baie d'Aytré constitue l'objet central du programme ICOMABIO. Pourtant, cette contamination n'a pas été abordée de façon frontale dans le questionnaire intitulé « Aytré : Perceptions et usages d'une plage fermée à la baignade ». Afin de ne pas influencer les répondants peu ou non informés et d'être véritablement en mesure de cerner le niveau de connaissance de ce problème de qualité des eaux, nous avons fait le choix d'engager le questionnaire avec la mesure d'interdiction de la baignade et d'identifier à quoi cette fermeture était associée pour les enquêtés. Ils ont ensuite été invités à se positionner sur la qualité des informations dont ils disposent sur ce problème (fiabilité de l'information et des sources), avant d'exprimer leur niveau de connaissance sur la mesure de la qualité des eaux de baignade et de qualifier leur réaction face à ce problème (inquiétude ou non). Ce n'est qu'après un ensemble de questions sur l'évolution des usages et de leur image de la plage suite à l'interdiction de la baignade, que la question des sources de la contamination est intervenue. Elle est alors abordée à travers le niveau de tolérance face à l'origine (naturelle ou humaine) des deux bactéries responsables de la contamination de cet espace de loisirs. Les informations collectées ont été croisées avec les réponses à une série de questions visant à identifier différents profils d'enquêtés, de façon classique autour du lieu de résidence, de l'âge, du genre, mais aussi en fonction de leur proximité avec le lieu étudié (statut de résident principal ou secondaire, touriste,

² ICOMABIO (*Identification des sources de contamination fécale dans un espace littoral connaissant des pratiques de tourisme et de loisir ; Utilisation combinée de marqueurs biologiques, chimiques : l'exemple de la baie d'Aytré*) est un programme de recherche pluridisciplinaire, impliquant le Laboratoire LIENSs CNRS-La Rochelle Université et le Laboratoire de sécurité sanitaire QUALYSE, qui a vu le jour pour identifier l'origine et les dynamiques de la contamination fécale dans la baie.

³ 61 répondants n'ont en effet jamais fréquenté la plage et/ou n'ont pas connaissance de sa fermeture. Ils n'ont donc pas été pris en compte dans les traitements puisque l'objectif de l'étude est de comprendre la réception de l'information et les changements en matière de pratiques et d'image.

excursionniste ; habitude de fréquentation ; attachement) et de leur rapport aux informations (institutionnelles, scientifiques).

2.2 Une grille d'analyse pour traiter la réponse de la population enquêtée

Afin de rendre compte de la réponse de la population enquêtée face à ce problème, les données recueillies n'ont pas été traitées de façon linéaire au fil du questionnaire, mais selon une grille d'analyse structurant la caractérisation en trois grands points : le premier contextualise la réception et la réaction des répondants ; le deuxième aborde la réception de la contamination et de l'interdiction ; le troisième traite des réactions à travers la transformation de l'image et des pratiques de loisir (figure 2). Posant l'hypothèse qu'il existe un lien entre les modalités de réception et le type de réaction, cette grille de lecture combine donc l'analyse de la réception et l'analyse de l'évolution de l'image et d'adaptation des pratiques. Elle permet de construire un profil général d'analyse de la réponse de l'ensemble de la population enquêtée, mais aussi dans un deuxième temps d'aborder ses possibles variations.

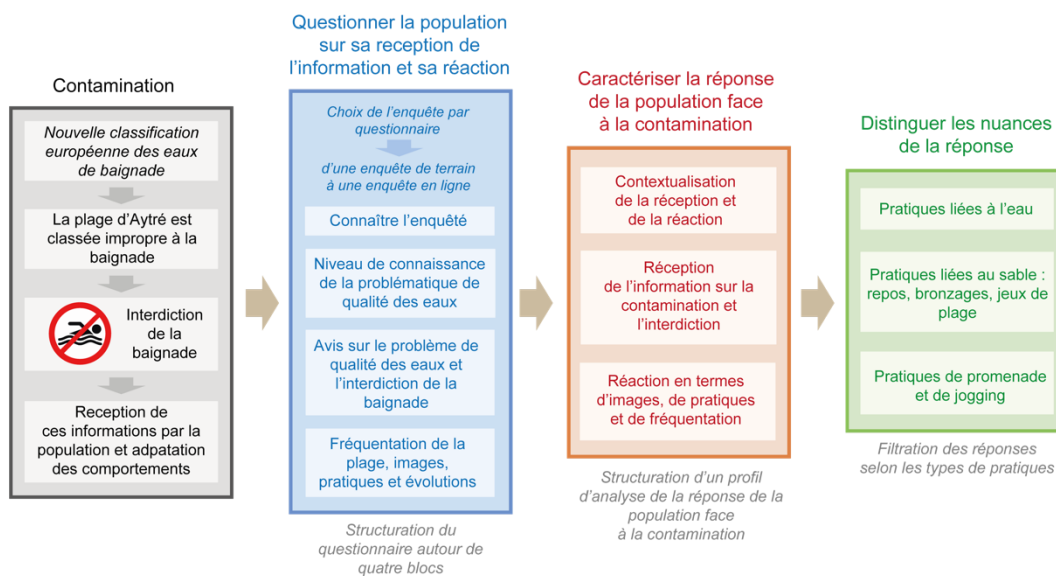


Figure 2 - Collecte et traitement de l'information du programme ICOMABIO
(Le Béguec, Petit, Vacher, Agogué, Ndione, ICOMABIO, 2021)

1.1.1.3 Contextualisation de la réception de l'information par les enquêtés

La réception de l'information sur la contamination et de l'interdiction de la baignade sont contextualisées dans le cadre de cette étude à partir de l'attachement à la plage, le rapport à la nature et le niveau de confiance dans les informations scientifiques et institutionnelles.

L'attachement au lieu (Scannell & Gifford, 2010) qui dépend beaucoup de l'expérience du lieu (Tuan, 1977) est un élément clé de lecture. Nous faisons ici l'hypothèse que les répondants attachés à la baie d'Aytré seront d'autant plus enclins à « cohabiter » avec la contamination, à tolérer sa présence. L'attachement peut être alors défini avec Léa Sébastien (2016, p. 24) « comme un phénomène complexe qui souligne un lien affectif positif entre des individus et des lieux familiers (lieux de vie, de vacances, de mémoire, de famille) (Altman et Low, 1992). L'aspect affectif se manifeste négativement (tristesse, manque) lorsque le lieu est soudainement dégradé ou indisponible (Mesch et Manor, 1998) ».

Le rapport à la nature est exploré avec la grille proposée par Le Corre (2018) à partir des travaux Schulz (2002). Dans ses travaux de psychologie sociale Schulz développe en effet une intéressante échelle d'inclusion de la nature en soi (« Inclusion of Nature in Self») qui permet de se représenter son rapport plus ou moins étroit à l'environnement naturel. Cet indicateur est mobilisé ici pour évaluer la concordance possible entre ce rapport à la nature et la réception de la contamination.

Le rapport aux informations scientifiques et institutionnelles en général est ensuite évalué pour comprendre si cette relation à l'information et à ceux qui la produisent peut être discriminant dans la réception de l'information sur la contamination de la baie d'Aytré. Par exemple, une forte méfiance vis-à-vis de ces informations pourrait être liée à une réception particulièrement négative de la contamination et de l'interdiction.

1.1.1.4 La réception de l'information sur la contamination et l'interdiction de la baignade

A Aytré, la problématique de qualité de l'eau est ancienne, mais l'existence d'une contamination officiellement actée par la réglementation est relativement récente. Nous posons donc l'hypothèse que les répondants qui n'ont jamais ressenti les effets de cette « mauvaise » qualité des eaux, entre autres dans le cadre de leurs pratiques de baignade, doutent plus facilement de l'intérêt de ces informations. Pour évaluer la réception d'information sur la contamination et l'interdiction de la baignade nous mobilisons différents indicateurs :

Le premier marqueur retenu met en avant les doutes qui peuvent exister sur l'information signalant un problème de la qualité des eaux de baignade de la baie. Le deuxième indicateur concerne l'inquiétude suscitée ou non par la mauvaise qualité de l'eau.

Dans un troisième temps, la manière dont les enquêtés considèrent comme plus ou moins acceptable la contamination est évaluée en fonction de différentes origines (environnementale, animale ou humaine) ou mode de diffusion (accidentelle, naturelle). L'objectif est ici de comprendre si la recevabilité de la contamination varie en fonction des hypothèses les plus couramment admises de l'origine et de la dynamique

de la contamination et, d'autre part, si les causes anthropiques sont plus tolérées par certaines catégories d'usagers de la plage comme les baigneurs ou les promeneurs de chiens.

Enfin, la réception de l'interdiction de la baignade est évaluée à partir de l'avis des enquêtés sur le niveau d'intérêt des normes entraînant l'interdiction de la baignade. Ces derniers pensent-ils que les mesures de la qualité des eaux ayant entraîné la fermeture de la baignade sont inutilement sévères ou au contraire adaptées pour garantir la qualité et la sécurité des eaux de baignades ?

1.1.1.5 Réactions et adaptations en lien avec les pratiques et l'image de la plage

Notre grille d'analyse aborde ensuite la **réaction** des enquêtés dans leurs pratiques et dans leurs perceptions de la plage. Quelles réponses apportent-ils dans leurs actes et dans leur manière d'envisager l'espace de la plage d'Aytré à la réception de cette information sur la contamination et sur l'interdiction de la baignade ?

Un premier indicateur évalue l'évolution de l'image de la plage suite à la fermeture à la baignade. Le but étant de vérifier si la contamination mise à jour par cette fermeture a entraîné une dégradation notable de l'image de la plage.

Le deuxième indicateur permet d'interroger l'importance de ceux qui définissent maintenant la plage avant tout comme un lieu pollué ou contaminé. L'idée est ici de connaître les mots utilisés pour « dire » la plage. L'hypothèse est que, selon leurs pratiques, la contamination a une place plus ou moins prépondérante dans les esprits. Les répondants ayant des pratiques au contact de l'eau définiront probablement moins la plage à travers la contamination.

Dans un troisième temps c'est l'évolution des pratiques des enquêtés qui est évaluée avec pour hypothèse qu'un certain nombre de répondants ont arrêté toutes leurs pratiques de la plage en raison de la contamination et de la fermeture à la baignade, y compris celles qui n'ont pas de rapport avec l'eau (promenade, jogging). L'arrêt de toutes pratiques concernerait les pratiquants particulièrement inquiets par la mauvaise qualité de l'eau. Ensuite, il s'agit d'évaluer la part de ceux ayant arrêté une partie seulement de leurs pratiques, notamment celles en contact avec l'eau. L'interdiction de la baignade ayant conduit une partie des personnes fréquentant la plage d'Aytré à privilégier la fréquentation d'autres plages.

L'évolution du classement de la plage d'Aytré dans les préférences des usagers avant et après la fermeture de la baignade est ensuite abordée. Pour cela, la place d'Aytré dans les trois plages (proches) les plus fréquentées est scrutée. Il s'agit là de voir la part des personnes fréquentant habituellement la plage avant l'interdiction de la baignade qui ont reporté leurs pratiques sur d'autres lieux proches (en général d'autres plages de l'agglomération de La Rochelle) après la fermeture de la baignade. Un focus particulier étant effectué sur les répondants ayant cessé leurs pratiques de bain notamment.

Enfin, les deux derniers indicateurs de notre grille d'analyse (voir traduction de la grille à travers le graphique présentant le profil général – figure 4) se réfèrent à la réaction des usagers face des propositions d'organisation de la baignade pour tenir compte de variations spatio-temporelles de la contamination. L'idée est d'évaluer dans quelle mesure les enquêtés seraient prêts à se baigner au regard de la validation de certaines

hypothèses. Ainsi a été testée auprès des enquêtés l'idée d'une ouverture de la plage sur certains périmètres en cas de contamination d'origine environnementale localisée. Cette hypothèse du programme ICOMABIO avance l'idée que tout ou partie de la contamination est liée à des bactéries non pathogènes pour l'homme présentes dans l'environnement, mais ressortant comme les bactéries fécales recherchées aux moments des analyses sanitaires. A aussi été proposée aux enquêtés l'idée d'une ouverture de la baignade sur certains créneaux si l'hypothèse d'une concentration de contaminants liée à la marée était confirmée. Cette deuxième possibilité concerne un phénomène de balayage des fientes de mouettes sur le vaste estran particulièrement plat au moment des marées entraînant des concentrations temporaires de contaminants « naturels » se diluant rapidement à marée haute.



Figure 3 – La plage d'Aytré et son estran vaso-sableux découvrant sur 1,5 km à marée basse
Source : Photo : Luc Vacher 15 juillet 2019

3. Une réelle homogénéité de la réponse de la population

La réception de l'information sur la contamination des eaux et sur l'interdiction de la baignade par les personnes connaissant et/ou fréquentant la plage d'Aytré s'est avérée plutôt homogène. L'analyse des réponses ne révèle pas de grandes oppositions définissant des profils profondément différents. Aussi, l'idée de définir un profil moyen de réception, dont il sera possible d'analyser les légères variations, fait sens dans cette étude.

L'analyse de ce profil général abordera dans un premier temps la sensibilité des usagers aux discours « officiels » et scientifiques et leur relation à la plage et à l'environnement de manière plus générale pour contextualiser la réponse des enquêtés à la situation de contamination. Ensuite, la réception de l'information sur la réalité de la contamination sera abordée avant de s'intéresser à l'acceptation de l'interdiction de la baignade. La manière dont les usagers ont adapté leurs pratiques à la situation et comment l'image de la plage a évolué constituera le dernier volet structurant ce « profil type ».

3.1 Réponse homogène ou population uniforme ?

Une hypothèse initiale de l'étude était que de fortes variations existaient en termes de réception de l'information sur la contamination et de l'interdiction de la baignade, et de réaction de la population à ces mesures en fonction du profil des usagers (type de pratiques, sensibilité environnementale, confiance dans les institutions, etc.). Cette hypothèse n'est que très partiellement vérifiée. En effet s'il existe des nuances dans la réception de l'information, en particulier en fonction du type de pratique (comme nous le verrons dans le paragraphe 4), la réponse globale de la population enquêtée présente une certaine homogénéité de réception et de réaction. Il ne semble pas exister de controverses vraiment fortes entre des groupes d'individus par rapport à la contamination et à l'interdiction. En réalité, cette relative uniformité de la réponse est sans doute révélatrice d'une forme d'homogénéité de la population qui a répondu à l'enquête.

Les répondants sont des personnes qui s'intéressent suffisamment à la plage d'Aytré et se sentent suffisamment concernés par l'usage de cette plage pour répondre à une enquête en ligne⁴. Sans surprise, les répondants sont donc essentiellement des habitants qui résident dans le voisinage direct de la plage qui fait partie de leur offre d'espaces de détente de proximité. Ce sont des résidents principaux pour la grande majorité (91,4 %) dont la moitié vivent dans la commune d'Aytré (55,4 %) et un quart (25,5 %) dans une commune limitrophe (La Rochelle, Périgny, Saint-Rogatien, La Jarne et Angoulins). L'importance des visiteurs (2,1 % de touristes et 3,6 % d'excursionnistes) et même des résidents secondaires (2,8 %) parmi les enquêtés, est très faible au regard de la fréquentation historique de la baie. En 2014, la fréquentation estivale de la plage d'Aytré (Koehren & al. 2015) comporte 60 % de touristes, 10 % d'excursionnistes et 4 % de résidents secondaires. La faible part des visiteurs ayant répondu, en partie liée au mode de diffusion en ligne, est une des limites de cette enquête. Cette faiblesse est cependant à relativiser au regard des questions posées impliquant une connaissance, discrète chez les visiteurs, de la situation avant la fermeture de la baignade. La réponse des habitants est aussi particulièrement intéressante dans le sens où elle concerne des acteurs impliqués dans la problématique locale de la contamination de la baie, dont les choix sur la relocalisation des activités ne sont pas forcément aussi simples pour les visiteurs.

Le mode de passation de l'enquête via une interface web a aussi joué dans la définition du groupe de répondants. Ainsi l'importance des personnes les plus âgées est particulièrement sous-représentée chez nos répondants si on fait référence à la population communale : 15,45 % de plus de 60 ans chez les enquêtés alors qu'ils représentent plus de 31 % dans la population de la commune d'Aytré (INSEE, 2017). Notre groupe de répondants est aussi très féminin (58 % de femmes) ce qui n'est pas forcément étonnant au regard des pratiques de plage. Guyonnard (2017) signale en effet que la plage est un espace très féminin et que cette tendance est classique sur toutes les plages du monde occidental. Elles se sentent donc possiblement plus concernées que les hommes par une enquête concernant cet espace de pratique.

⁴ Les documents de communication invitaient à répondre sur « Votre perception et vos usages de la plage d'Aytré ? »

L'attachement à la baie d'Aytré est un des éléments qui montre l'uniformité de la population : 82,7 % des répondants s'y déclarent attachés (figure 4). Pour l'illustrer, il est aussi possible d'évoquer la proximité à la nature des répondants (67,5 %) ou encore leur confiance dans les informations reçues. La majeure partie des enquêtés a confiance dans les informations qu'elle reçoit en général. Néanmoins, la part d'enquêtés ayant une faible confiance dans le discours scientifique s'élève tout de même à un répondant sur cinq (20,6 %) et près du double (37,9 %) sont méfiants par rapport aux informations issues de sources institutionnelles. Pour la confiance dans les informations fournies par les scientifiques, on aurait pu imaginer que la difficulté des scientifiques à déterminer l'origine de la contamination et la multiplication des explications parfois contradictoires participe, dans le cadre de la baie d'Aytré, à la méfiance vis-à-vis du discours scientifique. Cependant, à l'échelle nationale, la même proportion de « confiants » (78 %) et « méfiants » vis-à-vis des scientifiques ressort (Opinionway, 2021), le contexte local ne semble donc pas influencer. De même, pour les informations institutionnelles, le contexte que l'on retrouve à un niveau national de manque de confiance dans les institutions politiques à tous les échelons, entre 32 % (Municipalité) et 61 % (Gouvernement) (Opinionway, 2021), semble davantage expliquer les fortes valeurs de l'enquête que le contexte local.

Les enquêtés présentent ainsi de nombreuses caractéristiques communes ce qui incite à étudier globalement leur réponse à la situation de contamination. En premier lieu, voyons comment ils reçoivent l'information sur la contamination et la mesure d'interdiction de la baignade qui en découle.

3.2 La réception par les usagers de l'information sur la contamination et l'interdiction

1.1.1.6 Une contamination qui n'est pas systématiquement inquiétante pour les enquêtés

De manière générale, la contamination est une information prise au sérieux. La plus grande partie des répondants ne remettent pas en question l'information sur le problème de qualité des eaux de baignade même si un enquêté sur trois en doute (30,3 %). Certains répondants ne comprennent pas que l'eau soit impropre à la baignade à Aytré alors qu'elle est de bonne qualité sur les plages de La Rochelle situées à quelques kilomètres et nombre d'entre eux soulignent ne ressentir aucun effet négatif malgré des pratiques de bain régulière. D'autres répondants sont aussi surpris qu'une eau impropre à la baignade permette l'exploitation ostréicole (à l'entrée de la baie à environ 1,5 kilomètre de la plage).

Les enquêtés sont davantage partagés sur le caractère anxiogène de cette mauvaise qualité de l'eau avec près de la moitié d'entre eux (45,3 %) qui déclare s'inquiéter de cette mauvaise qualité de l'eau alors que l'autre moitié (54,7%) ne la considère pas comme une véritable menace. Pour ces derniers, cela s'explique probablement par l'ancienneté de la problématique de mauvaise qualité et l'habitude des usagers à vivre avec. A l'inverse, les questions qui restent en suspens au sujet de l'origine de la contamination et le manque de connaissance des enquêtés peuvent faire naître des inquiétudes et des avis divergents.

Part des répondants qui ...

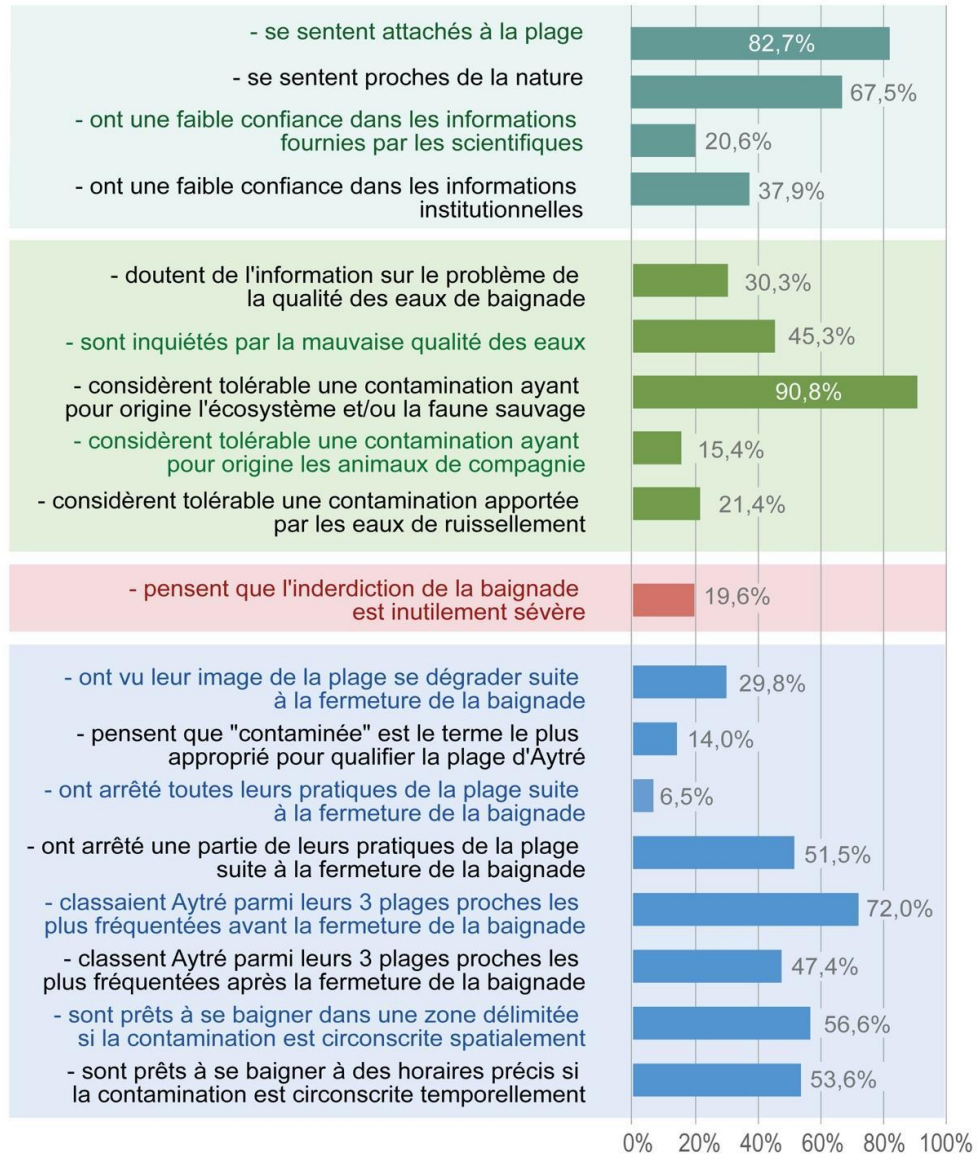


Figure 4 – Réponse de la population enquêtée sur la contamination de la baignade et l'interdiction de la baignade à Aytré en 2020

Source : 1053 questionnaires collectés entre le 19 mai et le 20 septembre 2020 – 992 traités
Le Béguec-Petit-Vacher – ICOMABIO 2020

1.1.1.7 Une contamination d'origine naturelle est tolérable pour les enquêtés

L'origine de la contamination fait partie des questions qui demeurent encore sans réponses certaines et qui font débat. Plusieurs hypothèses sont donc étudiées. Il est intéressant de constater qu'en fonction des scénarios sur l'origine de la contamination la tolérance des répondants est différente. La réception est beaucoup plus positive lorsque que le scénario de l'origine de la contamination naturelle est évoqué. En effet, 90,8 % des répondants considèrent qu'une origine naturelle (faune sauvage, écosystème de la baie) pour cette contamination est tolérable. A l'inverse, une contamination d'origine humaine ou assimilée est bien moins tolérée. Une contamination ayant pour origine les animaux de compagnie du fait des déjections canines par exemple est peu tolérable pour les répondants (15,4 % des enquêtés la considère comme tolérable). Les rejets sauvages d'eaux usées ou les dysfonctionnements de système d'épuration quand ils sont assimilés à une pollution permanente sont aussi très mal acceptés (8,4 % la considère tolérable). Une origine accidentelle, provenant des eaux de ruissellement par exemple, est un peu mieux acceptée par les enquêtés (21,4 %).

1.1.1.8 Une interdiction de la baignade découlant de la contamination rejetée par un répondant sur cinq

Malgré les doutes d'une partie des enquêtés sur l'existence de la contamination et l'absence d'inquiétude pour plus de la moitié d'entre eux, la mesure d'interdiction est globalement acceptée. Néanmoins, une part non négligeable d'entre eux (19,6 %) considère que l'interdiction de la baignade est inutilement sévère. On peut imaginer que les baigneurs qui fréquentent la plage depuis longtemps sans avoir constaté de désagrément en lien avec cette baignade n'adhèrent pas à l'idée d'une nécessaire interdiction.

1.1.2 Évolution de l'image de la plage et adaptation des pratiques

Même si les enquêtés ne conviennent pas tous de l'existence de la contamination et de l'utilité de l'interdiction, des changements en termes de perception de la baie et de comportements sont notables depuis la fermeture à la baignade. L'analyse de la réaction des usagers de la baie à partir de l'évolution de leur image, de leurs pratiques et de leur fréquentation de la plage depuis la fermeture à la baignade permet d'appréhender ces changements.

1.1.2.1 Une dégradation de l'image de la plage et une baisse non uniforme de la fréquentation

La contamination n'étant pas nouvelle mais dans les esprits des usagers depuis la fermeture à la baignade, il était possible de supposer que les enquêtés, proches de la baie, n'ont pas ou peu vu leur image

évoluer suite à la fermeture puisque la problématique est ancienne. Même si l'image positive de la baie d'Aytré s'est globalement maintenue pour la plupart des répondants depuis la fermeture à la baignade, près de trois répondants sur dix (29,8 %) déclarent que la fermeture a (plutôt) dégradé l'image qu'ils ont de la plage (figure 4). Ainsi, le mot « contaminé » est aujourd'hui jugé comme le terme le plus approprié pour décrire la plage pour 14 % des répondants. De même, l'expression de « plage polluée » a été retenue par 13,7 % des enquêtés et « plage interdite » par 9,9 % d'entre eux. C'est donc plus d'un tiers des répondants (37,6 %) qui choisissent un terme péjoratif lié à la contamination pour qualifier la plage. Les termes positifs sont toutefois majoritaires et la plage reste fréquemment définie comme « tranquille » (33,3 %), « grande » (12 %) ou encore « jolie » (8,8 %) rappelant que la proximité au lieu des enquêtés et le lien affectif jouent un rôle important dans le maintien d'une bonne image de la baie malgré la contamination.

Cette fermeture a également impacté les pratiques de loisir⁵ (voir figure 5). Avant la fermeture, les principales activités sur la plage d'Aytré étaient la promenade et le jogging (86,8 %) principalement en dehors de la saison estivale, se baigner (65,3 %) ou seulement se tremper les pieds (75,2 %), le repos souvent associé aux pratiques de bronzage (68,8 %). Les jeux de sable avec les enfants étaient aussi courants (44,3 %) comme les sports nautiques (23,1 %). La pêche à pied, moins pratiquée, était quand même l'activité de 17,1 % des pratiquants. Il faut noter que cette activité ne s'organise pas nécessairement à partir de la plage. Elle peut, lors des grandes marées, concerner les parties les plus éloignées de l'estran auxquelles on accède à partir des côtés de la baie.

⁵ L'agglomération de La Rochelle dépasse les 170 000 habitants en 2018 ; la population de la commune d'Aytré est de 9205 en 2018 (INSEE, 2021). Les enquêtes ECOP (Vacher, 2015) montrent sur de belles journées d'été entre 500 et 1250 personnes présentes sur la plage entre 2008 et 2014 ; la plage des Minimes tout proche compte sur les mêmes temporalités entre 1500 et 2600 plageurs présents sur la plage.

Les pratiques récréatives à Aytré avant et après la fermeture à la baignade
 en % des pratiquants avant et après l'interdiction de la baignade

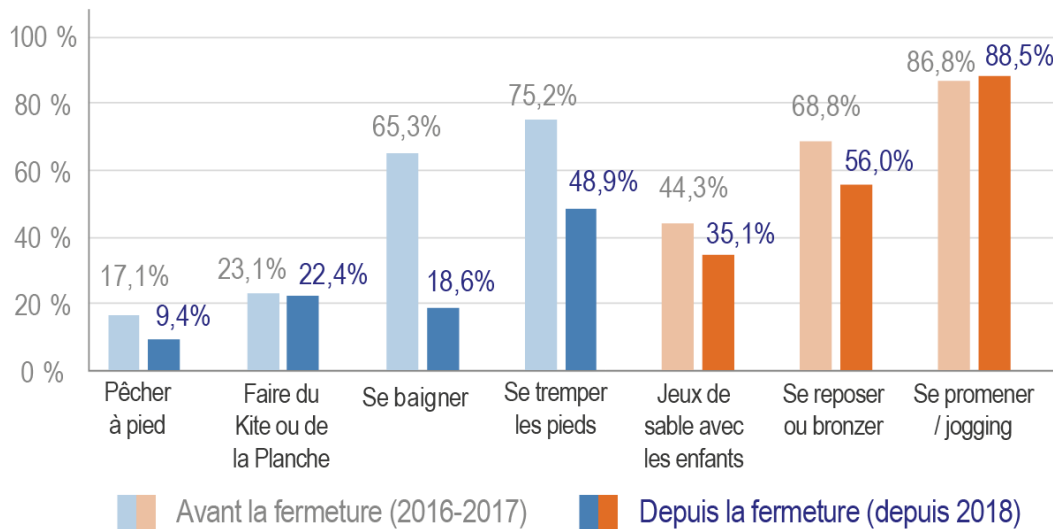


Figure 5 – Les pratiques de loisir sur la plage d’Aytré avant et après la fermeture à la baignade

Source : Enquête ICOMABIO 2020 – 19/05-20/09/2020 - 992 répondants

Sur les 992 répondants 924 avaient des pratiques avant et 925 après, sachant que la différence correspond à un nombre de personnes ayant abandonné toutes pratiques à peu près équivalent au nombre de celles ayant débuté des pratiques à Aytré depuis la fermeture de la baignade.



Figure 6 – Après l’interdiction de la baignade en 2018, la plage d’Aytré reste fréquentée

Source : Photo : Luc Vacher - 11 Août 2018

Après l'interdiction de la baignade en 2018, on remarque que la pratique du bain n'a pas disparu, même si elle a fortement diminué et ne relève plus que d'un peu moins d'une personne sur 5 alors qu'elle concernait 3 sur 5 avant la « fermeture ». On continue cependant à se tremper les pieds de manière plus notable, puisqu'une personne sur deux déclare continuer à mettre les pieds dans l'eau à Aytré.

Cette valeur est proche des chiffres de ceux qui fréquentent la plage en s'allongeant sur le sable pour se reposer et bronzer. On peut imaginer que les deux pratiques sont liées. L'érosion pour ces pratiques de plage sans bain est cependant notable en particulier pour ceux qui se rafraîchissent les pieds dans l'eau (48,9 % contre 75,2 % avant l'interdiction) alors que ceux qui viennent pour le repos ou le bronzage représentent aujourd'hui un peu plus d'un usager sur deux (56 % contre 68,8 % avant l'interdiction). L'érosion du poids de ceux qui fréquentent la plage avec des enfants ne semble pas plus forte (35% après l'interdiction contre 44 % avant). On aurait pu penser que l'inquiétude pour les enfants aurait chassé de manière plus radicale les parents plus inquiets pour leurs enfants que pour eux-mêmes, cela ne semble pas le cas. Cependant avec seulement un tiers des usagers déclarant aujourd'hui les jeux de sables avec enfants, la plage bascule clairement en dessous de ce qui est attendu sur les plages de l'agglomération rochelaise (40 à 50 % de cellules avec enfants) (Guais & al, 2010 ; Koehren & al, 2015).

Enfin le poids des pratiques comme le Kitesurf et la promenade est moins impacté. L'importance de la promenade et du jogging augmentant même très légèrement. On peut imaginer, au-delà des chiffres qui sont ici trop faibles pour véritablement valider l'hypothèse, que la plage moins fréquentée pour des pratiques de bronzage durant la période estivale s'ouvre plus aux usages moins statiques.

Pour les pratiques de kitesurfing (planche aérotractée), la stabilité peut être trompeuse. En effet, si la baisse du nombre de pratiquants est faible (213 personnes à 207), le nombre de départ (25) a été largement compensé par l'arrivée de nouveaux pratiquants (19). Après nous être interrogés sur le poids des activités sur la plage d'Aytré avant et après la fermeture, nous pouvons maintenant essayer de suivre les évolutions concernant plus spécialement les usagers qui pratiquaient la plage avant la fermeture.

Tableau 1 – Des pratiquants qui arrêtent souvent leur pratique avec la fermeture de la baignade

Les pratiques...	Pratiquants avant la fermeture à la baignade	... parmi ces pratiquants ceux qui	
		continuent la pratique après la fermeture <i>Effectif (% des pratiquants avant)</i>	ont arrêté la pratique avec la fermeture <i>Effectif (% des pratiquants avant)</i>
Pêcher à pied	158	79 (50 %)	79 (50 %)
Faire du Kite ou de la planche	213	188 (88,3 %)	25 (11,7 %)
Se baigner	603	158 (26,2 %)	445 (73,8 %)
Jeux de sable avec les enfants	409	297 (72,6 %)	112 (27,4 %)
Se reposer ou bronzer	636	462 (72,6 %)	174 (27,4 %)
Se promener / jogging	802	755 (94,1 %)	47 (5,9 %)

Source : Enquête ICOMABIO 2020 – 19/05-20/09/2020 - 992 répondants

Sur les 992 répondants 924 avaient des pratiques avant et 925 après, sachant que la différence correspond à un nombre de personnes ayant abandonné toutes pratiques à peu près équivalent au nombre de celles ayant débuté des pratiques à Aytré depuis la fermeture de la baignade.

Les kitesurfeurs et les promeneurs sont en effet peu nombreux à avoir cessé leur pratique dans la baie depuis l'interdiction de la baignade (respectivement 11,7 % et 5,9 %), sachant que l'abandon n'est de plus pas toujours lié aux conditions sanitaires : déménagement, changement de pratique, etc. Mais il est clair que pour d'autres pratiques la situation est moins simple : un gros quart (27,4 %) de ceux qui pratiquaient la plage pour le repos, bronzage et jeux de plage ont arrêté cette pratique à Aytré et trois personnes sur quatre (73,8 %) pratiquant le bain ne se baignent plus à Aytré. Il semble logique que la pratique de la plage souffre de l'interdiction de la baignade, alors que celle-ci reste ouverte pour toutes les autres pratiques. En effet, s'exposer au soleil sans pouvoir se rafraîchir par le bain n'est pas vraiment satisfaisant. C'est sans doute la raison pour laquelle de nombreux usagers (59 %) continuent de se tremper les pieds quand ils viennent à la plage à Aytré. La baisse des pratiques de sable est aussi probablement suscitée par l'idée que le sable peut être porteur des agents de la contamination au même titre que l'eau. Plus largement, l'interdiction de se baigner a contraint de nombreux baigneurs à privilégier d'autres plages pour le bain, déplaçant de fait nombre de pratiques.

Il est intéressant de voir que les pêcheurs à pied se sentent moins concernés que les baigneurs, la moitié a arrêté sa pratique dans la baie, mais l'autre continue. Il faut dire que la pratique concerne une zone éloignée

de la plage et que les parcs à huîtres proches des zones de pêche à pied ne sont pas officiellement concernés par la pollution.

1.1.2.2 Des usagers qui s'adaptent à la situation ?

Si la plupart des usagers n'ont pas abandonné toutes leurs pratiques en lien avec la plage d'Aytré (6,5% des répondants seulement ont arrêté toutes pratiques) en général avec le maintien de l'activité de promenade, la moitié d'entre eux (51,5 %) a interrompu une partie de ses pratiques suite à la fermeture à la baignade. Il est alors intéressant de s'interroger sur les phénomènes de report, sachant qu'Aytré était, pour ceux qui la fréquentaient avant la fermeture de la baignade, une plage centrale dans leurs pratiques. Les trois quarts (72%) classaient Aytré dans les trois plages proches (accessible dans la journée) qu'ils fréquentaient le plus. Après la fermeture, ce n'est plus que la moitié des répondants (47,4 %) qui la classe dans leur « top 3 ». Si l'on regarde avant la fermeture, Aytré était la plage la plus fréquentée par les répondants à l'enquête devant les plages reconnues de la Station de Châtelaiillon-Plage à cinq kilomètres au Sud et celle des Minimes à La Rochelle à quatre kilomètres au Nord. C'est Châtelaiillon-Plage qui bénéficie le plus de la fermeture de la baignade. De manière étrange la deuxième plage connaissant une augmentation notable et celle de Sablanceaux dans l'île de Ré. Il faut dire que cette première plage de l'île de Ré accessible en bus urbain a pu bénéficier d'un report des Rochelais qui fréquentaient Aytré et pour qui la plage rétaise n'est pas plus éloignée et présente certaines caractéristiques proches en matière d'étendue et de possibilité de trouver des espaces de faible densité d'occupation. Autrement des plages plus confidentielles, mais encore plus proche, comme celle d'Angoulins ou la plage du Roux (les deux sont à moins de deux kilomètres de la plage d'Aytré) qui restent des plages secondaires (faible étendue, présence de galets ou de platier rocheux) ont aussi vu leur fréquentation augmenter suite à la fermeture de la baignade à Aytré.

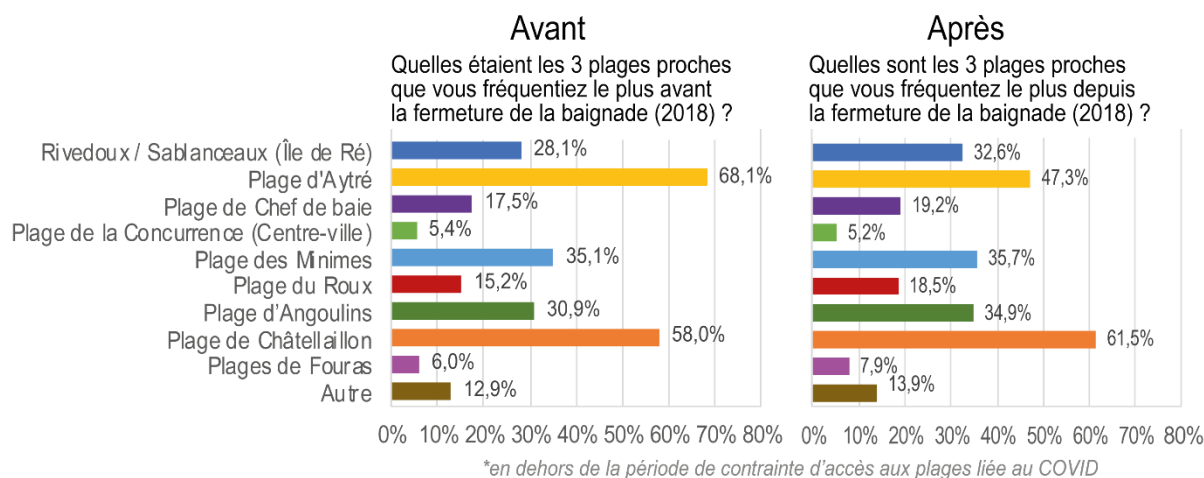


Figure 7 – Aytré, une plage dont la place change dans les préférences locales depuis la fermeture de la baignade.

Source : Enquête ICOMABIO 2020 – 19/05-20/09/2020 - 992 répondants

Si les usagers peuvent déplacer leurs pratiques, la proximité affective et géographique avec le lieu les incite à rester ouvert à une possible cohabitation avec la contamination si celle-ci, en lien avec des causes « naturelles », pouvait être définie dans le temps (marée) ou dans l'espace. Plus de la moitié des répondants se dit (plutôt) prête à se baigner dans une partie de la baie (56,6 %) si la contamination apparaît à un autre endroit précis de la baie. De la même façon, plus de la moitié des répondants se dit (plutôt) prête à se baigner à des heures précises et différentes chaque jour (53,6 %) si l'on est capable de démontrer que la contamination apparaît seulement à des moments précis de la marée, en lien avec le phénomène de balayage des fientes d'oiseaux.

La réponse de la population est donc globalement homogène, néanmoins on note que les usagers en fonction de leurs pratiques réagissent de manière contrastée entre ceux qui continuent leurs pratiques et ceux ont arrêtés ou les ont déplacées sur d'autres plages locales. Trois nuances en termes de réponse à la situation de contamination ont donc été analysées suite à ce constat.

1.2 4. Des nuances dans la réponse des usagers en fonction des pratiques

La population enquêtée, certes homogène, a néanmoins des pratiques différentes de la plage d'Aytré qui peuvent entraîner des nuances dans la réponse à la situation de contamination. Pour autant, l'usage récréatif de cette plage fait souvent appel chez un même usager à différentes pratiques : les individus peuvent à la fois se baigner, se promener et bronzer. Les enquêtés sont en effet majoritairement des multipratiquants (73,4 % des répondants d'aujourd'hui et 83 % des pratiquants d'avant). Le nombre de combinaison de pratiques est presque infini, il n'est donc pas envisageable d'aborder la réponse en fonction de chacune des combinaisons. Mais des nuances apparaissent cependant pour certains groupes de pratiques. Ce sont donc les principales nuances de réponse selon les pratiques qui sont ici présentées. Elles ne constituent donc pas la réponse des uns s'opposant à la réponse des autres, mais bien des nuances dans la réponse globale vue à travers le prisme d'une pratique ou d'un groupe de pratiques. Ainsi, les trois quarts des kitesurfeurs sont aussi des promeneurs (143 sur 207).

Les pratiques, ont été regroupées en trois groupes, selon le niveau supposé de « proximité » de ces pratiques à la contamination. Le premier type concerne les enquêtés vus à travers une pratique liée à l'eau (baignade, sports nautiques, pêche) ; le second type concerne la population vue à travers ses pratiques sur le sable (repos, bronzage, jeux de plage) ; le dernier type concerne les répondants qui fréquentent la baie pour des pratiques de promenade/jogging. Les variations dans les réponses ont aussi été prises en compte pour les pratiques dont l'évolution depuis la fermeture a été notable et les effectifs statistiquement significants.

1.2.1 4.1 La réponse des usagers ayant ou ayant eu des pratiques liées à l'eau

Les usagers qui ont des pratiques liées à l'eau (baignade, sports nautiques, pêche) malgré l'interdiction de se baigner ont des réponses similaires. Les usagers qui ont eu des pratiques liées à l'eau avant l'interdiction présentent également des réponses homogènes. Pour autant, entre les usagers ayant une pratique en lien avec l'eau aujourd'hui et ceux ayant arrêté ces pratiques, la réception et les réactions divergent.

1.2.1.1 *Les accommodements de ceux qui continuent à pratiquer l'élément marin*

Globalement, les répondants ayant des pratiques au contact de l'eau aujourd'hui rejettent fortement l'idée d'une contamination. En effet, ces usagers doutent beaucoup plus que la moyenne de l'information sur cette pollution (entre 40,6 % et 57,2 % contre 30,3 % pour l'ensemble). Certains peuvent mettre en avant l'absence de symptômes malgré leurs pratiques liées à l'eau pour justifier de cette position. Il est notable que les individus ayant ces types de pratiques sont relativement peu inquiets et sont un peu plus tolérants sur la diversité des origines de la contamination. Ils sont nombreux à estimer en conséquence que l'interdiction est inutile/trop sévère, et ce beaucoup plus que la moyenne (entre 28,7 % et 48,7 %), d'où des transgressions de l'interdit plus courantes aussi. Néanmoins, parmi ces répondants qui ont des pratiques au contact de l'eau, les kitesurfeurs et véliplanchistes sont plus « modérés » avec une réception plus proche de celle du profil général. Il faut dire qu'ils ne sont pas eux concernés par l'interdiction, ce qui peut expliquer le moindre « durcissement » de leur position.

Tableau 2 – Des nuances dans la réponse des usagers en fonction des pratiques présentes ou passées

Part des répondants qui ...	Ensemble des répondants à la question	Se baigne aujourd'hui	Se trempe les pieds aujourd'hui	pêche à pied aujourd'hui	Kitesurf ou planche aujourd'hui	Ne se baigne plus	Ne se trempe plus les pieds	Ne pêche plus (à pied)
		se sentent attachés à la plage	82,7%	95,9%	90,9%	89,7%	91,3%	85,6%
se sentent proches de la nature	67,5%	73,3%	68,1%	73,6%	77,3%	68,3%	67,7%	72,2%
ont une faible confiance dans les informations fournies par les scientifiques	20,6%	27,9%	21,5%	28,7%	15,0%	16,4%	18,9%	29,1%
ont une faible confiance dans les informations institutionnelles	37,9%	41,9%	37,2%	40,2%	37,2%	38,0%	41,4%	60,8%
doutent de l'information sur le problème de la qualité des eaux de baignade	30,3%	57,2%	40,6%	45,5%	31,0%	25,0%	21,7%	26,0%
sont inquiétés par la mauvaise qualité des eaux	45,3%	17,8%	35,8%	26,0%	41,5%	57,6%	63,7%	65,8%
considèrent tolérable une cont. ayant pour origine l'écosystème et/ou la faune sauvage	90,8%	92,4%	92,7%	89,7%	96,1%	90,3%	88,4%	84,8%
considèrent tolérable une contamination ayant pour origine les animaux de compagnie	15,4%	26,7%	19,2%	21,8%	20,8%	9,4%	9,5%	11,4%
considèrent tolérable une contamination apportée par les eaux de ruissellement	21,4%	34,9%	26,1%	28,7%	20,3%	19,3%	14,4%	10,1%
pensent que l'interdiction de la baignade est inutilement sévère	19,6%	48,7%	28,7%	48,1%	17,5%	15,0%	9,0%	38,4%
ont vu leur image de la plage se dégrader suite à la fermeture de la baignade	29,8%	19,2%	23,7%	29,9%	19,8%	39,3%	46,0%	46,8%
pensent que "contaminée" est le terme le plus approprié pour qualifier la plage d'Aytré	14,0%	2,9%	7,7%	13,8%	5,3%	22,2%	26,7%	22,8%
ont arrêté toutes leurs pratiques de la plage suite à la fermeture de la baignade	6,5%					10,2%	15,3%	13,5%
ont arrêté une partie de leurs pratiques de la plage suite à la fermeture de la baignade	51,5%	5,8%	48,4%	42,5%	33,2%	89,8%	84,7%	86,5%
classaient Aytré parmi leurs 3 plages proches les plus fréquentées avant la fermeture	72,0%	79,5%	75,2%	76,7%	73,8%	76,0%	73,1%	78,4%
classent Aytré parmi leurs 3 plages proches les plus fréquentées après la fermeture	47,4%	75,0%	60,3%	60,3%	64,2%	34,4%	24,4%	32,4%
sont prêts à se baigner dans une zone délimitée si la cont. est circonscrite spatialement	56,6%	79,1%	70,6%	71,3%	59,4%	60,2%	46,0%	60,8%
sont prêts à se baigner à des horaires précis si la cont. est circonscrite temporellement	53,6%	73,3%	67,7%	69,0%	55,6%	56,4%	43,5%	59,5%
Effectif des répondants de chaque catégorie	992	172	452	87	207	445	285	79

Part des répondants qui ...	Ensemble des répondants à la question	Repos bronzage aujourd'hui	Jeux de sable aujourd'hui	Repos bronzage avant	Jeux de sable avant	Promenade/jogging aujourd'hui	... dont ne pratique que la promenade	... dont se promène avec un chien
		se sentent attachés à la plage	82,7%	89,2%	89,2%	75,9%	83,0%	86%
se sentent proches de la nature	67,5%	70,7%	65,5%	60,9%	68,8%	69%	65,8%	69,0%
ont une faible confiance dans les informations fournies par les scientifiques	20,6%	21,0%	21,8%	23,0%	17,9%	20%	23,0%	20,3%
ont une faible confiance dans les informations institutionnelles	37,9%	37,6%	38,5%	42,5%	50,9%	37%	38,8%	41,1%
doutent de l'information sur le problème de la qualité des eaux de baignade	30,3%	33,7%	35,5%	26,1%	20,8%	31%	22,9%	35,2%
sont inquiétés par la mauvaise qualité des eaux	45,3%	42,8%	45,8%	58,4%	57,5%	43%	48,6%	40,8%
considèrent tolérable une cont. ayant pour origine l'écosystème et/ou la faune sauvage	90,8%	92,3%	92,3%	87,4%	83,0%	91%	85,5%	91,1%
considèrent tolérable une contamination ayant pour origine les animaux de compagnie	15,4%	16,8%	14,5%	10,9%	10,7%	15%	11,2%	31,6%
considèrent tolérable une contamination apportée par les eaux de ruissellement	21,4%	24,9%	24,6%	13,8%	14,3%	21%	14,5%	22,2%
pensent que l'interdiction de la baignade est inutilement sévère	19,6%	24,8%	26,2%	13,7%	13,4%	21%	9,3%	27,5%
ont vu leur image de la plage se dégrader suite à la fermeture de la baignade	29,8%	27,6%	24,6%	47,1%	54,5%	29%	38,8%	26,6%
pensent que "contaminée" est le terme le plus approprié pour qualifier la plage d'Aytré	14,0%	12,0%	13,5%	24,7%	28,6%	14%	19,1%	12,7%
ont arrêté toutes leurs pratiques de la plage suite à la fermeture de la baignade	6,5%			23,4%	20,0%			
ont arrêté une partie de leurs pratiques de la plage suite à la fermeture de la baignade	51,5%	56,8%	63,1%	76,6%	80,0%	58%	66,9%	47,9%
classaient Aytré parmi leurs 3 plages proches les plus fréquentées avant la fermeture	72,0%	75,1%	76,6%	72,5%	74,5%	72%	62,7%	69,0%
classent Aytré parmi leurs 3 plages proches les plus fréquentées après la fermeture	47,4%	57,5%	53,4%	17,0%	23,6%	49%	30,3%	54,9%
sont prêts à se baigner dans une zone délimitée si la cont. est circonscrite spatialement	56,6%	65,3%	66,5%	46,6%	51,8%	59%	34,9%	63,3%
sont prêts à se baigner à des horaires précis si la cont. est circonscrite temporellement	53,6%	63,9%	64,0%	40,8%	41,1%	57%	32,2%	59,5%
Effectif des répondants de chaque catégorie	992	518	325	174	112	819	152	158

Source : Enquête ICOMABIO 2020 – 19/05-20/09/2020 - 992 répondants

L'image de la plage s'est aussi moins dégradée chez les personnes ayant gardé une pratique liée à l'eau malgré la fermeture à la baignade. Ils gardent donc une bonne image de la plage d'Aytré, ceci est

d'autant plus vrai pour les baigneurs et les kitesurfeurs. En effet, leur image s'est moins dégradée et les termes faisant référence à la contamination (polluée, interdite, contaminée) sont moins retenus comme appropriés pour décrire la baie. Seuls 5 baigneurs sur 172 choisissent un de ces terme péjoratifs pour « dire » la plage (soit 2,9 % des répondants de leur catégorie).

Il est notable aussi de voir qu'une proportion importante de ces répondants pratiquent la plage « comme avant ». C'est particulièrement vrai pour ceux qui ont continué à se baigner qui sont presque absents (5,8%) des enquêtés ayant cessé une partie de leurs pratiques de la baie (tableau 2). Les kitesurfeurs et véliplanchistes sont eux aussi plus discrets dans cette catégorie (33,2%) qui pourtant compte plus d'un enquêté sur deux à l'échelle de l'ensemble des enquêtés (51,5%).

L'expression de cet attachement pour la plage d'Aytré chez ceux qui continuent à avoir des pratiques aquatiques s'exprime par le fait qu'elle reste parmi les plages « préférées » de ces usagers. L'évolution du classement des plages les plus fréquentées montre que la place de la plage d'Aytré reste forte pour les baigneurs (moins 4,5 points entre avant et après la fermeture de la baignade) et les kitesurfeurs (moins 9,6 points). Enfin, ces pratiquants étant toujours au contact de l'eau malgré la contamination, ils sont sans surprise les plus ouverts aux solutions de cohabitation avec la contamination.

1.2.1.2 L'inquiétude qui domine chez ceux qui ont arrêté leurs pratiques en contact avec l'eau

Ceux qui ont arrêté les pratiques au contact de l'eau sont, en toute logique, à la fois plus réceptifs à l'idée de la contamination et plus inquiets. En effet, ces personnes doutent moins de l'information sur la qualité de l'eau (25%) que la moyenne (30,3%). L'écart n'est cependant pas énorme ce qui peut s'expliquer par une confiance dans les informations issues du monde scientifique ou institutionnel proche de la moyenne. Cette situation est confirmée pour les anciens baigneurs, mais pas pour ceux qui ont arrêté la pêche à pied qui ont un profil beaucoup plus méfiant face à l'information « officielle » (tableau 2). Ces anciens pêcheurs sont aussi les plus inquiets sur qualité de l'eau (65,8 %), beaucoup plus que la moyenne (45,3%) et même que les anciens baigneurs (57,6 %). Le fait que les pêcheurs soient les plus inquiets peut se comprendre puisque la plupart des produits collectés (crabes, coquillages, etc.) sont consommés par les familles, mais là encore il serait intéressant de comprendre pourquoi seuls 25 % de ceux qui continuent à pêcher déclarent être inquiétés par la qualité des eaux. L'ancienneté de la pratique et l'expérience sur le long terme de la consommation des produits pêchés peut expliquer cette situation. On peut supposer que ceux qui ont arrêté la pêche à pied avaient une pratique plus récente ou plus irrégulière associée à une expérience et un désir différent.

L'inquiétude qui existe chez ces pratiquants d'avant, notamment les pêcheurs, est associée à une tolérance plus faible que la moyenne envers les diverses sources de contamination (tableau 2). Les anciens baigneurs pensent quant à eux que l'interdiction est justifiée dans leur très grande majorité (85%).

Si la perception de la situation de contamination est plutôt négative chez les usagers qui avaient une pratique liée à l'eau, leur réaction à la situation est elle aussi marquée. La dégradation de l'image de la plage est ainsi nette chez les anciens baigneurs (39,3 %) ou les anciens pêcheurs à pied (46,8 %). Il est cependant notable que, comme nous l'avons déjà signalé, il s'agit plus de nuances à une situation moyenne (29,8 % de l'ensemble des répondants ont vu leur image de la plage se dégrader) que de véritables différences de profil.

En effet ils restent arithmétiquement nombreux à déclarer que leur image de la plage ne s'est pas dégradée malgré l'arrêt de leur pratique. Ils ne sont d'ailleurs que 1 sur 4 à choisir le terme de « contaminée » pour qualifier la plage.

Cependant, beaucoup plus que les autres répondants, ces usagers ont déplacé leurs pratiques vers d'autres plages et un sur dix a même stoppé l'ensemble de ses pratiques sur la plage d'Aytré. Si avant la fermeture de la baignade, les trois quarts des pratiquants classaient Aytré parmi les trois plages proches qu'ils fréquentaient le plus, après la fermeture, ils ne sont plus qu'un tiers à la classer dans ce « top 3 ». Pour autant, ces pratiquants se déclarent plutôt prêts, comme les autres répondants, à se baigner sous conditions en cohabitant avec une contamination circonscrite spatialement et temporellement (tableau 2).

1.2.2 4.2 La réponse mesurée des usagers ayant des pratiques de sable

La réponse des pratiquants ayant ou ayant eu des pratiques au contact du sable est proche de ceux ayant eu des pratiques aquatiques. Elle reste cependant en général plus mesurée et donc plus proche de la moyenne. Nous avons déjà signalé que la baie d'Aytré, sans possibilité de bain, est moins attractive pour les pratiques de plage, d'autant plus si les usagers s'inquiètent pour leur santé ou celle des enfants jouant dans le sable. Pour deux répondants sur trois pratiquants les jeux de sable aujourd'hui, la contamination inquiète pour la santé des enfants, alors qu'ils ne sont qu'un tiers dans l'ensemble des répondants. En effet, sur les plages de l'Atlantique ou une partie importante du sable peut être recouverte par l'eau lors de certaines marées, le sable peut être considéré comme porteur de la contamination et présenter un risque pour la santé.

Cette réponse empreinte d'inquiétude est bien sûr forte chez ceux qui avaient ces pratiques de sable avant la fermeture de la baignade et qui ont aujourd'hui déserté la plage pour ce type de pratiques. Ils sont plus inquiets, moins tolérants concernant l'origine de la contamination et ils acceptent mieux l'interdiction. Leur image de la plage est également plus dégradée que la moyenne avec une association légèrement plus importante de la plage à la contamination (Tableau 2). Enfin, ces usagers délaissent Aytré au profit d'autres plages plus nettement que les autres. Alors qu'ils étaient 3 sur 4 à répondre qu'Aytré faisait partie des trois plages proches les plus fréquentées avant la fermeture de la baignade, ce que représentait la situation moyenne, ils ne sont plus qu'1 sur 5 à la garder dans leur top 3 des plages les plus fréquentées après. Cette valeur est très basse au regard de l'ensemble des répondants qui sont 1 sur 2 (47,4%) à continuer à déclarer Aytré comme une de leurs trois plages locales les plus fréquentées. On signalera donc que si un quart seulement des pratiquants a arrêté les pratiques de sable à Aytré (voir Tableau 1), ils sont beaucoup plus nombreux à ne plus fréquenter la plage pour ces pratiques avec la même régularité, privilégiant d'autres plages de manière courante.

En matière de réception de l'interdiction, un quart de ceux qui fréquentent encore la plage considère qu'elle est inutilement sévère. Quant aux propositions d'aménagement de la baignade dans des zones et horaire précis pour cohabiter avec la contamination leur réponse est plutôt positive (plus de 60%). Au final ces réponses mesurées par rapport aux réponses moyennes soulignent l'absence de controverse autour de la perception de la contamination et de l'interdiction de la baignade.

1.2.3 4.3 Une réponse des promeneurs vraiment uniforme ?

La réponse des enquêtés ayant des pratiques de promenade et de jogging présente certains caractères particuliers pour cette enquête. Cette pratique existe durant toute l'année, et n'est pas directement en contact avec l'eau ou le sable (Figure 8). Les répondants déclarant cette pratique sont aussi très nombreux (819 promeneurs sur 992 répondants) ce qui implique que leur profil est très proche du profil « général ». Toutefois, en observant les usagers ayant la promenade comme seule pratique ou ceux pratiquant la promenade accompagnée d'un chien, des nuances apparaissent.

La réponse des promeneurs/joggeurs ayant uniquement cette pratique aujourd'hui à Aytré est intéressante. D'abord parce qu'une grande majorité d'entre eux (66,9 %) avait d'autres pratiques à Aytré avant l'interdiction de la baignade. Ces promeneurs sont des usagers de la baie qui acceptent la mesure d'interdiction (ce sont ceux qui acceptent le plus l'interdiction) puisqu'ils ont pour la moitié (52 %) arrêté de se baigner et ils ont même décidé d'arrêter toute autre activité que la promenade sur la plage. Ces individus ont confiance en l'information sur la contamination et ils en doutent moins que la moyenne. Leur attachement à la plage moins marqué et une fréquentation de la plage d'Aytré moins importante peuvent expliquer une plus grande facilité à délaisser le lieu et à y arrêter certaines pratiques. En effet, pour ces répondants, la plage d'Aytré était déjà moins classée que la moyenne parmi les plages les plus fréquentées avant la fermeture de la baignade. L'interdiction de la baignade a aussi dégradé leur image de la plage de manière plus forte que la moyenne et ces pratiquants semblent beaucoup moins prêts à cohabiter avec la contamination, comme le montre leur réticence à se baigner dans un endroit précis ou à un moment précis. Cette catégorie de plageurs, puisque nous parlons ici de personnes n'ayant que la pratique de la promenade/jogging à Aytré, se distingue donc comme ayant une relation plus distante avec la plage, comme si ce mono-usage impliquait une relation moins « entière », moins impliquée au lieu.



Figure 8 – La plage d'Aytré pratiquée pour la promenade avec ou sans chien en toutes saisons
Source : Photo : Luc Vacher 2021

La réponse des promeneurs avec chien est intéressante, puisque les déjections canines ont pu être pointée du doigt comme élément d'explication de la contamination. De plus, les incivilités de certains maîtres ne

respectant pas les interdictions estivales de promenade des chiens sur la plage sont régulièrement signalées voire entraînent des tensions entre usagers. La réponse à la situation de contamination est cependant proche du profil général. Pour autant, ils doutent un petit peu plus de l'information de la contamination et celle-ci les inquiète un petit peu moins. Ils se démarquent par contre, sans surprise, vis-à-vis de leur tolérance à une contamination qui proviendrait des animaux de compagnie (31,6 %) mais sans que le décalage avec l'acceptation de l'ensemble des répondants (15 %) soit véritablement imposant. Pour les autres causes probables de contamination, les promeneurs avec chien ne sont cependant pas plus tolérants que les autres.

Au final comme nous l'avions signalé, il s'agit plus de nuances au profil général que nous pouvons observer à travers ces tris des réponses en fonction d'entrées par différentes pratiques. Le fait qu'il n'existe pas de véritable polémique pouvant générer des contrastes forts au niveau de la réponse et que la plupart des pratiquants soit des multi-pratiquants ne permet pas de mettre en valeur des profils contrastés soulignant peut-être aussi au final une certaine homogénéité de la population de répondants.

1.3 Conclusion

L'annonce de la contamination et l'interdiction de la baignade qui en découle dans une plage fréquentée de l'agglomération rochelaise ne génère pas de réactions extrêmes. La réponse des enquêtés est assez homogène et peu encline à la controverse. Ils sont aussi très nombreux à déclarer que leur représentation de la plage n'a pas été dégradée par la mise en lumière de la contamination. L'image positive du lieu qui perdure contraste néanmoins avec l'adaptation de leur pratique, qui révèle moins de mesure.

La réponse des enquêtés exprime donc une forme de modération. Pourtant, les répondants sont là devant une situation de contamination qui pourrait appeler au fantasme et aux accusations de conspiration. Cette contamination invisible, qui ne peut faire appel aux sens pour confirmer son existence, implique que l'on accepte son existence à travers ce qui en est dit par les « autorités ». Le contexte de la pandémie de Covid-19 montre que cette acceptation ne se fait pas toujours facilement et qu'elle est souvent brouillée par des phénomènes de rejet plus global.

Cependant, le Covid est facilement attribuable à une intrusion étrangère, voire une machination, dans notre univers protégé, comme la contamination industrielle ou nucléaire est facilement assimilable à des accidents dont la responsabilité est associée à des élites distantes. La contamination fécale apparaît elle comme plus triviale. Elle est plus proche de nous puisque tout le monde est potentiellement concerné par la production du contaminant. C'est peut-être ce qui la rend d'une certaine manière plus acceptable. Comme on a pu le voir, ils sont nombreux à accepter la possibilité d'une cohabitation avec la contamination dans le même espace si l'on garantit une mise à distance de leur pratique sur des temps et des espaces définis. Cette cohabitation


possible est sans doute révélatrice d'un niveau de confiance satisfaisant dans le suivi sanitaire des eaux de baignade. Pourtant ce type de contamination pourrait être assimilé à des « dysfonctionnements » et générer des réactions de colère face à la situation. Rien de tel à Aytré, où la réception de l'information sur la contamination reste peu vindicative.

Cette situation est peut-être liée au fait que la plage continue d'être fréquentée entre autres pour de très populaires promenades. L'interdiction de la baignade n'a pas entraîné une interruption de toutes les pratiques. Le fait que l'on ne puisse plus s'y baigner a même généré chez certains un sentiment de nouvelle légitimité. Les propriétaires de chien qui promènent leurs animaux en dehors des périodes autorisées redoutent moins les réflexions des baigneurs qui ne sont désormais plus dans leur droit pour faire des remarques sur les incivilités. Les kitesurfeurs qui devaient respecter la zone de baignade qui leur était interdite n'ont plus à se préoccuper des autres usagers de l'élément marin. Ces observations rappellent la complexité de l'espace de pratique plage et les cohabitations qui s'organisent dans cet espace récréatif.

La réponse mesurée des enquêtés est sans doute aussi liée au fait que l'espace local propose des alternatives proches pour les pratiques de baignades. On signalera cependant que certains de ces espaces se sont inventés en grande partie avec le report des pratiques et n'ont pas encore de reconnaissance officielle, comme la plage du Roux : il n'y a pas de poste de secours et de suivi sanitaire et elle ne figure pas dans la liste des plages de l'agglomération. Le fait que l'interdiction de la baignade ne soit pas appliquée/surveillée est aussi un autre élément important dans l'absence de polémique. La presse locale et les réseaux sociaux ne révèlent aucun cas de personnes s'étant fait verbaliser pour baignade illégale. Le débat sur la justesse des sanctions et la justification de l'interdiction n'existe donc pas.

On notera cependant que, malgré l'attachement signalé par les usagers à cet environnement proche et des réponses soulignant le maintien de la bonne image de la plage, les pratiques de la plage d'Aytré sont en forte baisse. Les déclarations indiquent même que la régularité de la fréquentation est encore plus impactée, ce qui souligne un décalage certain entre un discours où la dimension affective l'emporte et des actions plus pragmatiques.

Pour conclure, il faut souligner que le contexte sanitaire qui favorise l'acceptation de restriction forte impactant la qualité de vie, joue très probablement sur la réaction douce des usagers de la plage d'Aytré à l'interdiction de la baignade en lien avec l'identification d'une contamination fécale.

- 
- Altman, I., Low, S.M., 1992. Place attachment, New York, Plenum, 336 p.
- Amalric, M., Cirelli C., Larrue C., 2015. Quelle réception sociale pour l'ingénierie écologique industrielle ? L'insertion socio-territoriale des zones humides artificielles, *Vertigo*, 15 (3)
<https://doi.org/10.4000/vertigo.16713>
- Bailly, A. S., 1977. La perception de l'espace urbain : les concepts, les méthodes d'études, leur utilisation dans la recherche urbanistique, Paris, Centre de recherche d'Urbanisme, 264 p.
- Bailly, A. dir., 1984. Les concepts de la géographie humaines, Paris, Masson, 204 p.
- Bedri, Z., Corkery, A., O'Sullivan, J. J., Deering, L. A., Demeter, K., Meijer, W.G., O'Hare, G., Masterson, B., 2016. Evaluating a microbial water quality prediction model for beach management under the revised EU Bathing Water Directive, *Journal of Environmental Management*, 167, pp. 49–58.
<http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.10.046>
- Bickerstaff, K., Walker, G., 2001. Public understanding of air pollution : the 'localization' of environmental risk, *Global Environmental Change*, n° 11, 133-145.
[https://doi.org/10.1016/S0959-3780\(00\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0959-3780(00)00063-7)
- CEVIPOF, 2021. En qu(o)i les Français ont-ils confiance aujourd'hui ? Vague 12bis, Une embellie sanitaire qui n'endigue ni la défiance ni la crise sociale, mai 2021, Opinionway, SciencesPo CEVIPOF, 72 p.
<https://www.sciencespo.fr/cevipof/fr/content/les-resultats-par-vague.html>
- Dachary-Bernard, J., Lyser, S., 2016. Aménités et hétérogénéités des préférences en matière d'aménagement du littoral : Le cas des touristes sur le Bassin d'Arcachon, *Revue d'Économie Régionale & Urbaine*, n°4, 847-876.
<https://doi.org/10.3917/reru.164.0847>
- Day, R. J., 2006. Traffic-related air pollution and perceived health risk : Lay assessment of an everyday hazard, *Health, Risk & Society*, vol. 8, n° 3, 305-322.
<https://doi.org/10.1080/13698570600871869>
- Debarbieux B., 1998. Les problématiques de l'image et de la représentation en géographie in Bailly A. (coord.), *Les concepts de la géographie humaine*, Paris, Armand Colin, 199-211.
- Direction générale de la Santé, 2021. Eaux de baignade, Organisation du contrôle, [en ligne] URL : <https://baignades.sante.gouv.fr/>. Consulté le 12 novembre 2021.

- Duboudin, C., 2007. Classement de la qualité des eaux de baignade à l'échelon national par la méthode de la nouvelle directive européenne 2006/7/CE, Méthode et résultats généraux, Maisons-Alfort, Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, 15 p.
- Evrard, B., Féménias, D., Bussi, M., 2011. Pêche à pied en sortie d'estuaire de Seine, Espace populations sociétés, 137-151.
<https://doi.org/10.4000/eps.4391>
- Geffroy, G., Papinot, C., 2005. Pollution littorale et "alimentation naturelle". La consommation des produits de collecte en Bretagne (enquête), Terrains & Travaux, 2005/2, n° 9, 159-176.
<https://doi.org/10.3917/tt.009.0159>
- Guais, A., Vacher, L., Vye, D., 2011. Rapport Campagne d'enquêtes été 2010, Fréquentation des plages de Charente-Maritime, La Rochelle, Observatoire des Pratiques de Tourisme et de Loisir-ECOP, UMR LIENSs, CNRS - Université de La Rochelle, 186 p.
<https://fr.calameo.com/read/000634056d728b5bf38c0>
- Guyonnard, V., 2017. Dimensions cachées et attentes spatiales dans un espace de pratique de tourisme et de loisir. Une analyse géographique de la plage en Charente-Maritime (France). La Rochelle : université de La Rochelle, thèse de doctorat en géographie, 394 p.
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01545942>
- Hobson-West, P., 2003. Understanding vaccination resistance : moving beyond risk, Health, Risk & Society, pp. 273-283.
<https://doi.org/10.1080/13698570310001606978>
- Koehren, M., Guyonnard, V., Vacher, L., Vye, D., 2015. Rapport campagne d'enquêtes juillet-août 2014 Fréquentation des plages de Charente-Maritime, Observatoire des Pratiques de Tourisme et de Loisir-ECOP, UMR LIENSs, CNRS - Université de La Rochelle, 210 p.
<https://fr.calameo.com/read/000634056d728b5bf38c0>
- Krupka, E., Gendre, D., Lafay, C., Le Dez, O., Gelineau, P., Perault-Pochat M.-C., 2005. Perception de l'information orale et écrite par 50 volontaires sains d'une étude monocentrique, Thérapie, 60 (1), pp. 31-38.
<https://doi.org/10.2515/therapie:2005004>
- Le Corre, N., Peuziat, I., Cosquer, A., Bernard, N., Michot, T., Pensec, C., 2018. Sports de nature dans les aires protégées littorales et marines. Profils des pratiquants, motivations à la pratique, rapports à la nature. Résultats d'une enquête nationale (2016-2018). Fiches de synthèse, Université de Bretagne Occidentale, 66 p.

<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01960348>

Mesch, G.S., Manor, O., 1998. Social ties, environmental perception and local attachment, *Environment and Behavior*, 30, pp. 504-519.

<https://doi.org/10.1177/001391659803000405>

Scannell, L., Gifford, R., 2010. Defining place attachment : A tripartite organizing framework. *Journal of Environmental Psychology*, 30, pp. 1-10.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvp.2009.09.006>

Sebastien, L., 2016. L'attachement au lieu, vecteur de mobilisation collective ?, *Norois*, 2016/1-2, n°238-239, pp. 23-41.

<https://doi.org/10.4000/norois.5846>

Semmoud, N., 2008, La réception sociale de l'urbanisme : L'exemple d'un quartier stéphanois : Bellevue. In SECHET (Raymonde), GARAT (Isabelle), ZENEIDI (Djemila). *Espaces en transactions*, Presses Universitaires de Rennes, 121-142.

Schultz, P.W., 2002, Inclusion with Nature: The Psychology Of Human-Nature Relations in Schmuck P. & Schultz P.W., *Psychology of sustainable development*, Boston, Kluwer Academic Publishers, 61-78.

Tabuteau, D., 2007, La sécurité sanitaire, réforme institutionnelle ou résurgence des politiques de santé publiques ?, *Les Tribunes de la santé*, n°3, vol 16, 87-103.

<https://doi.org/10.4000/eps.4391>

Tuan, Y. F., 1977, *Space and place : The perspective of experience*, Minnesota, The University of Minnesota Press, 234.

Vacher, L., (dir), Bouquet, C., Brunello, P., Guyonnard, V., Koehren, M., 2015. *Atlas de la fréquentation des plages de Charente-Maritime, Campagne 2014*, Observatoire des Pratiques de Tourisme et de Loisir-ECOP de l'UMR 7266 LIENSs, CNRS - Université de La Rochelle, 329 p.

http://ecop.univ-lr.fr/Production_Atlas.htm

Wakesfield, S., S. Elliot, D. Cole et J. Eyles, 2001, Environmental risk and (re)action : air quality, health and civic involvement in an urban industrial neighbourhood, *Health and Place*, n° 7, 163-177.

[https://doi.org/10.1016/S1353-8292\(01\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S1353-8292(01)00006-5)

Zinn, J.O., 2008, Heading into the unknown : Everyday strategies for managing risk and uncertainty, *Health, Risk & Society*, vol. 10, n° 5, 439-450.

<https://doi.org/10.1080/13698570802380891>

CHAPITRE 7 : SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

En France, 3 328 sites de baignade (eaux douces et eaux marines) ont été recensés en 2020 dont 37 n'ont fait l'objet d'aucun contrôle sanitaire en raison de leur fermeture durant la saison balnéaire (Environnement et santé, juillet 2021). Les surveillances sanitaires réalisées durant l'année 2020 sur les 3 291 sites de baignade ont montré que 1,5% de ces sites étaient de qualité insuffisante. Ainsi, la qualité microbiologique des eaux de baignade diminue progressivement d'années en années, et peut représenter un problème majeur de santé publique. Il demeure alors primordial de lutter contre la dégradation de ces environnements pour préserver l'équilibre écologique des milieux aquatiques et assurer la sécurité sanitaire des baigneurs. Parmi les sites avec une faible qualité microbiologique, sont recensées les deux zones de baignade de la baie d'Aytré où a été réalisée notre étude. Ce manuscrit présente une reprise et un approfondissement, à l'aide de nouvelles techniques et d'une approche pluridisciplinaire, des différentes hypothèses étudiées depuis le début des années 2000 par la collectivité de l'agglomération de la Rochelle concernant la problématique de la contamination fécale de la baie d'Aytré. Cette étude met en évidence trois contributions majeures pour étudier la qualité microbiologique des écosystèmes côtiers.

- ***Pertinence de réaliser des séries d'échantillons pour l'analyse de la qualité microbiologique des eaux de baignade***

L'analyse de la qualité microbiologique des eaux de baignade est réalisée généralement à partir d'un unique échantillon. Dans cette étude le suivi de la qualité microbiologique des eaux de baignade a été réalisé avec des triplicats d'échantillonnage (trois répliqués pour un même échantillon). L'analyse du niveau de contamination dans les différents répliqués d'un même échantillon a montré une variation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale entre les répliqués d'un même échantillon prélevé à environ 5 minutes d'intervalle. En effet, pour certains prélèvements, un, deux, ou les trois répliqués du même échantillon pouvaient être en dépassement des seuils réglementaires. Notre étude met ainsi en évidence la limite de se baser sur un unique échantillon pour déterminer la qualité microbiologique des eaux de baignade. Pour ces types d'écosystèmes, il serait intéressant de se baser sur un nombre d'échantillons plus élevé pour

s'affranchir de la variabilité de l'échantillonnage et ainsi obtenir des résultats plus représentatifs de l'environnement étudié.

- ***Combinaison de plusieurs types d'analyses et de marqueurs pour une bonne estimation de l'origine d'une contamination fécale***

Le suivi de la qualité microbiologique des eaux de baignade de la baie d'Aytré réalisé de février 2019 à février 2020 a montré qu'au Platin Nord, 3 échantillons d'eau étaient en dépassement des seuils réglementaires en *E. coli* et 11 échantillons étaient en dépassement des seuils réglementaires en entérocoques. Au Platin Sud, 3 échantillons d'eau étaient en dépassement des seuils réglementaires en *E. coli* et 15 échantillons étaient en dépassement des seuils réglementaires en entérocoques. Ainsi, au total, sur une année entière de suivi, 24% des échantillons d'eau du Platin Nord et 32% des échantillons d'eau du Platin Sud étaient en dépassement des seuils réglementaires pour au moins l'un des deux indicateurs de contamination fécale. **Le niveau de contamination de la baie d'Aytré était relativement faible et les dépassements des seuils réglementaires étaient principalement dus aux entérocoques.**

La caractérisation de l'origine des contaminants fécaux a été réalisée par la combinaison de plusieurs méthodes : (1) analyse d'isolats pour déterminer la diversité des espèces d'entérocoques responsables des dépassements des seuils réglementaires, (2) analyse de profils protéiques de souches bactériennes pour caractériser l'origine de souches bactériennes indicatrices d'une contamination fécale (3) recherche de marqueurs génétiques et (4) de marqueurs chimiques utilisés comme traceurs de sources microbiologiques pour estimer la place des différentes origines possibles en fonction des usages de la baie. Ainsi, nous avons d'abord analysé plus en détail l'une des principales limites de la méthode normée de quantification des entérocoques. En effet, cette méthode n'est pas spécifique aux espèces d'entérocoques d'origine fécale (*E. faecium*, *E. faecalis*) (International Organisation for Standardisation, 1999) ; elle permet également de quantifier des entérocoques d'origine ubiquiste et d'origine environnementale.

Contribution des souches environnementales aux dépassements des seuils réglementaires

Nous avons effectué un sous-échantillonnage des espèces d'entérocoques à partir de 6 microplaques indiquant des dépassements des seuils réglementaires en entérocoques. L'analyse de **la diversité des isolats d'entérocoques a permis** d'identifier 6 espèces principales d'entérocoques : *E. faecium*, *E. faecalis* les principales espèces d'origine fécale, *E. durans* et *E. hirae* les espèces d'origine ubiquiste et *E. casseliflavus* et *E. mundtii* les espèces environnementales. Cette analyse du profil de population (proportion d'une espèce bactérienne dans une population donnée) de ces espèces a montré **que les dépassements des seuils réglementaires peuvent être dus totalement ou en partie à des bactéries environnementales**. Ceci indique que la méthode d'analyse normalisée de détermination de la qualité microbiologique des eaux de baignade n'est pas adéquate pour déterminer de manière certaine le niveau de contamination fécale d'un écosystème de baignade. Pour une meilleure analyse du niveau de contamination des eaux de baignade pour ce type de site, "particulier", il serait intéressant de prendre en compte la part des espèces fécales/environnementales présentes sur un échantillon contaminé. Cette approche a été élaborée, dans le cadre de la thèse, avec l'appui du laboratoire national de référence, à savoir le Laboratoire d'hydrologie de l'ANSES de Nancy, partenaire de ce projet afin d'apporter son expertise dans les échanges sur les questions liées à la contamination des eaux de baignade sur des sites présentant des particularités marquées. De plus, bien que cette thèse ait mis en évidence la contribution de bactéries environnementales sur le niveau de contamination, il est nécessaire de poursuivre ces recherches afin d'appréhender de manière plus fine les rôles des entérocoques environnementaux et leurs interactions avec d'autres communautés phytoplanctoniques comme le microphytobenthos et/ou les épiphytes dans les milieux aquatiques. Des études précédentes ont montré des relations fortes entre les concentrations en entérocoques et celles en chlorophylle-*a* (Byappanahalli et al., 2012). Ainsi, il est possible que le phytoplancton et/ou le microphytobenthos présent naturellement en baie d'Aytré et dans les canaux des marais aux alentours puissent jouer un rôle sur la structuration et la dynamique des entérocoques.

La caractérisation des marqueurs protéiques indique une origine animale

Dans cette étude, nous avons aussi développé des modèles d'algorithme génétiques pour une caractérisation rapide de l'origine de la contamination fécale dans un milieu donné. Ces modèles permettent de discriminer des souches bactériennes appartenant à la même espèce en fonction de leurs empreintes protéiques spécifiques à leur origine. Dans cette étude, les 3 modèles développés ont permis de classer 259 souches bactériennes d'*E. coli*, d'*E. faecium* et d'*E. faecalis* en fonction de leurs origines. Ces analyses ont montré que 65% des isolats analysés étaient d'origine animale et 28% des isolats étaient d'origine humaine. Ces résultats indiquent que la contamination fécale était majoritairement d'origine animale. Le développement de modèle d'algorithme génétique pour discriminer les espèces bactériennes indicatrices fécales a permis de mettre en évidence des différences de profils protéiques de ces souches bactériennes en fonction de leur origine. Les protéines discriminantes des bactéries fécales qui ont permis de créer ces modèles pourraient être utilisées comme de nouvelles cibles de traceurs de sources microbiologiques. Les modèles d'algorithme génétique utilisés dans cette étude sont des outils pilote qui, pour être utilisés en routine dans la caractérisation de l'origine des indicateurs de contamination fécale, doivent être implémentés avec un plus grand nombre de souches de référence d'une part, et d'autre part, doivent être validés avec des bases de données de souches provenant d'autres sites sachant que ces bactéries sont "sites dépendants".

Les marqueurs génétiques indiquent une origine animale

La recherche de **traceurs de sources microbiologiques** dans les 27% des échantillons d'eau en dépassement des seuils réglementaires du Platin Nord et les 32% des échantillons du Platin Sud a montré que le marqueur cheval (**HoF597F**) **était le marqueur le plus abondant** et il a été détecté dans tous les échantillons. Cependant, l'analyse de la spécificité de ce marqueur a indiqué que ce marqueur ne semblait pas être uniquement spécifique à une origine équine. Néanmoins, ces premiers résultats semblent être cohérents compte tenu de la fréquentation de la plage pour des balades à cheval et de la présence d'un centre équestre à quelques centaines de mètres de celle-ci. Ce centre équestre effectue des épandages de fumiers (fèces de cheval+paille) sur des champs situés à proximité de la baie. Les chevaux sont donc présents à proximité de la baie durant toute l'année, ce

qui semble corroborer les résultats de l'estimation de cette origine équine présente dans tous les échantillons contaminés indépendamment de la saison. Néanmoins, il serait nécessaire de faire des analyses plus approfondies avec des marqueurs plus spécifiques aux chevaux pour valider ces résultats. Il serait aussi intéressant de réaliser un suivi de ce traceur sur différents sites du bassin versant de la baie pour expliquer sa dynamique. La présence de deux centres équestres à proximité de la baie d'Yves peut expliquer la présence des mêmes indicateurs équins dans les échantillons prélevés dans cette baie voisine sélectionnée pour analyser l'importance d'une configuration géographique approchante.

Le deuxième marqueur le plus abondant était le marqueur d'origine aviaire (**GDF**) **qui était abondant dans quelques échantillons**. L'origine aviaire a été la dernière hypothèse mise en avant pour expliquer l'origine de cette contamination fécale de la baie d'Aytré. Les analyses de quantification de ces marqueurs ainsi que la mise en évidence de l'absence d'accumulation de germes fécaux à marée montante (suivi en balayage) montrent que les oiseaux peuvent contribuer à la contamination fécale de la baie d'Aytré, mais que de manière ponctuelle.

Le marqueur humain (**HF183**) **était le marqueur le moins abondant des trois quantifiés**. De plus, les faibles concentrations des marqueurs chimiques caféine et paracétamol confirment les résultats obtenus avec le marqueur génétique et les marqueurs protéiques : **l'homme contribue faiblement à la contamination fécale** observée dans la baie d'Aytré. L'analyse par PCR de l'occurrence du marqueur chien réalisée à partir des échantillons en dépassement des seuils réglementaires a montré que ce marqueur est présent dans 40% des échantillons du Platin Nord et 60% des échantillons du Platin Sud. Cependant la méthode de PCR est moins spécifique que la méthode de qPCR. Ainsi, les quantifications de ce marqueur sont en cours de réalisation pour pouvoir estimer la contribution de l'origine canine par rapport aux autres origines identifiées. Tous ces marqueurs ont été détectés avec des abondances plus élevées au niveau du Platin Sud qu'au niveau du Platin Nord car le nombre d'échantillons en dépassement des seuils réglementaires était plus élevé au niveau de la zone sud.

Cette recherche de traceurs de sources microbiologiques montre que la contamination fécale observée dans la baie d'Aytré est majoritairement d'origine animale et elle correspondrait plus à une contamination d'origine équine. L'analyse des marqueurs génétiques a indiqué que les marqueurs

d'origine équine et canine étaient présents dans les échantillons d'eau mais qu'ils présentaient une faible spécificité. Pour une meilleure estimation de la contribution de chaque origine sur le niveau de cette contamination fécale, il est donc essentiel d'analyser et de tester d'autres types de marqueurs d'origine spécifique. Il s'agit notamment des virus entériques, d'autres bactéries fécales (comme *Arcobacter spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*) et des molécules chimiques d'origine spécifique.

L'analyse de la variation de la diversité des communautés bactériennes a permis de mettre en évidence des OTUs appartenant à la famille des *Spirosomaceae* (du phylum Bacteroidetes) présents uniquement dans les échantillons contaminés. Ainsi, des analyses plus précises sont en cours de réalisation pour déterminer les caractéristiques et la dynamique de ces OTUs en lien avec le niveau de contamination.

Notre étude montre un certain nombre de limites pour les différents outils de caractérisation de l'origine d'une contamination fécale. Ainsi, c'est **la combinaison de plusieurs types d'analyses, d'indicateurs et de traceurs** de sources microbiologiques comme celle réalisée dans cette étude qui permet d'identifier efficacement les différentes origines de la contamination fécale d'un écosystème côtier et d'estimer la contribution de chaque origine sur le niveau de cette contamination.

Les analyses ponctuelles réalisées autour de la baie d'Aytré (au niveau du bassin versant, au large de la baie et au niveau du port de plaisance) pour identifier les principales sources de cette contamination fécale ont permis d'écarter certaines sources de cette contamination. Il s'agit d'une potentielle contamination provenant du port de plaisance ou en dehors de la baie (au large du pertuis). Nos analyses ont montré que le niveau de contamination des eaux de baignade pouvait être lié à la mauvaise qualité des eaux du bassin versant de la baie à travers les exutoires de marais au nord et les exutoires ostréicoles situés au sud. Ces corrélations sont observées particulièrement par temps de pluie, lorsque l'apport en eau douce depuis ces canaux n'est pas régulé. La pluviométrie est ainsi l'un des principaux facteurs corrélés positivement aux abondances des indicateurs de contamination fécale. En effet, les abondances les plus élevées en bactéries fécales sont observées en période de fortes pluies.

Ces premières observations indiquent que les bactéries « environnementales » et intestinales (animales et humaines) dont la concentration dans les eaux de baignade augmente avec les évènements de pluie (ou de tempête) sont responsables du niveau de contamination élevé de la baie d'Aytré. Ceci se traduit par de fortes abondances en bactéries fécales et par des dépassements ponctuels des seuils réglementaires en entérocoques principalement.

- ***Surveillance saisonnière des différents compartiments d'un écosystème côtier pour déterminer la qualité microbiologique des eaux de baignade***

Après avoir déterminé l'origine et les principales sources de cette contamination fécale, nous sommes interrogés sur sa dynamique spatio-temporelle pour tenter d'expliquer la persistance et la récurrence de cette contamination fécale.

Le suivi durant une année de la qualité microbiologique des eaux de baignade réalisé sur les deux sites de baignade de la baie d'Aytré a montré **une variation saisonnière de l'abondance des indicateurs de contamination fécale**. Des abondances élevées en entérocoques et en *E. coli* ont été observées durant l'hiver, l'été et l'automne avec des dépassements ponctuels des seuils réglementaires. Les mêmes variations saisonnières ont été observées dans le sédiment. Cependant, l'abondance des indicateurs de contamination fécale de l'eau est corrélée positivement avec celle du sédiment uniquement au niveau du Platin Nord. De plus, l'abondance des indicateurs de contamination fécale dans le sédiment montre une concentration plus faible entre 10 g de sédiment et 100 ml d'eau lorsque les indicateurs de contamination fécale étaient en dépassement des seuils réglementaires dans l'eau. Ainsi, le suivi annuel réalisé montre que **le sédiment ne constitue pas une source diffuse de la contamination fécale** dans cet écosystème. Cette hypothèse peut être écartée.

Ces résultats sont confirmés par l'étude comparative réalisée à la baie d'Yves qui a montré les mêmes variations saisonnières de l'abondance des deux indicateurs de contamination fécale. Cette étude comparative a également permis de montrer que cette contamination fécale n'est pas spécifique à la baie d'Aytré. Ces résultats indiquent que **la configuration spatiale similaire de la baie autant que**

sa situation géographique plus spécifique peuvent être des facteurs influençant la dynamique spatiale et temporelle de la contamination fécale. Les analyses de l'origine des contaminants fécaux dans les échantillons en dépassement des seuils réglementaires de la baie d'Yves ont montré les mêmes proportions d'abondance avec le marqueur cheval qui est le marqueur le plus abondant suivi par le marqueur aviaire puis le marqueur humain ; le marqueur chien a été le marqueur le moins détectés dans ce site. Cette étude comparative nous a permis de confirmer les résultats du suivi annuel et d'invalider certaines hypothèses. Cependant, il serait intéressant de réaliser une étude similaire dans une plage avec un contexte géographique différent (à l'embouchure de l'estuaire de la Gironde par exemple, voire sur toute la partie sud-ouest de la façade atlantique de la région Nouvelle Aquitaine dont certaines zones de baignade connaissent la même problématique) pour montrer que ce phénomène semble se retrouver dans des écosystèmes intertidaux sablo-vaseux abrités dans des baies et protégés des courants et des vagues. Ces études permettront entre autres d'adapter les normes européennes pour ces types d'écosystèmes dont les caractéristiques topographiques et environnementales peuvent influencer le niveau de contamination fécale.

Dans cette étude nous n'avons pas analysé la qualité microbiologique du sable de plage situé en zone supralittorale. Cependant de nombreuses études ont mis en évidence un apport important de bactéries fécales du sable de plage vers les eaux de baignade (Byappanahalli et al., 2012; Matthew et al., 2011; Weiskerger et al., 2019; Whitman et al., 2014). D'autres études ont montré qu'il existe plus de risque d'être en contact avec de fortes concentrations en bactéries fécales sur le sable de plage que dans les eaux de baignade (Heaney et al., 2015, 2012). Ainsi, il serait intéressant d'analyser la qualité microbiologique du sable de la plage d'Aytré pour déterminer un lien possible entre la qualité microbiologique du sable et la contamination dans les deux zones de baignade.

Le suivi en quadrillage de la qualité microbiologique de l'eau et du sédiment de la baie a également permis de confirmer que le sédiment ne représente pas une source diffuse de cette contamination fécale. En effet, le quadrillage réalisé sur 20 points de prélèvements pendant deux saisons différentes a montré une homogénéité spatiale de l'abondance des entérocoques alors que l'abondance des *E. coli* présentait un gradient de bord avec des concentrations plus élevées sur des sites à proximité des exutoires. Cependant, comme les *E. coli* renseignent sur une contamination fécale récente et les

entérocoques indiquent une contamination plus ancienne, nos résultats semblent indiquer que la contamination proviendrait du bassin versant de la baie. Ces résultats confirment aussi que les exutoires sont de véritables sources de cette contamination fécale qui pourrait provenir du bassin versant de la baie, du moins en temps de pluie. Les mêmes variations ont été observées au cours du suivi en balayage pour analyser les effets de la marée montante sur le niveau de contamination de la baie d'Aytré. En effet, les abondances des indicateurs de contamination fécale entre le sédiment et l'eau n'étaient pas corrélées et il n'y avait pas d'accumulation de l'abondance des indicateurs de contamination fécale en fonction de la marée montante ce qui montre que cette contamination n'est pas due à la re-suspension des bactéries fécales du sédiment vers la colonne d'eau. Ces résultats viennent appuyer les perspectives énoncées précédemment. En effet, nous avons montré que la contamination provient du bassin versant et du bord de la baie plutôt que du large de la plage. Ainsi, il serait intéressant d'analyser la qualité microbiologique du sable de la plage d'Aytré pour mieux comprendre l'effet de bord mis en évidence dans cette étude.

Pour comprendre la dynamique saisonnière de cette contamination fécale, les corrélations entre l'abondance des indicateurs de contamination fécale et les paramètres environnementaux (physico-chimique, météorologique et biotiques) ont permis de **mettre en évidence deux cycles de contamination en fonction des saisons**. La température, la salinité et la pluviométrie sont les principaux paramètres corrélés à l'abondance des indicateurs de contamination fécale. En automne et en hiver, l'abondance des indicateurs de bactéries fécales était corrélée avec les quantités de précipitations et la concentration en nutriments. Pendant l'été, les températures et la salinité élevées semblent être des conditions favorables à la croissance de ces bactéries entériques halotolérantes et thermophiles.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats permettent de décrire la dynamique de la contamination fécale de la baie d'Aytré. C'est une plage abritée dans une baie qui est protégée par les îles de Ré et d'Oléron. Cet écosystème est un milieu naturel se trouvant dans un environnement relativement urbanisé avec une pression anthropique importante certaine. La plage est aussi fréquentée par des chiens, des chevaux et des oiseaux. En période de pluie, les eaux pluviales par le lessivage des sols se chargent en bactéries fécales d'origine environnementale (provenant du matériel végétal des zones de marais par exemple), animale (cheval > oiseaux > chien) et en nutriments et se déversent dans la baie à travers les exutoires situés au bord de la plage. Les événements de pluie correspondent aux dépassements des seuils réglementaires observés durant le suivi annuel. Cependant cet écosystème intertidal étant favorable à la multiplication des bactéries fécales, leur abondance reste élevée mais en dessous des seuils réglementaires. Particulièrement en automne et en hiver, leur abondance est corrélée avec les quantités de précipitations et la concentration en nutriment et pendant l'été, les températures et la salinité élevées semblent être des conditions favorables à la croissance de ces bactéries entériques halotolérantes et thermophiles. Ces mécanismes expliquent le bruit de fond en *E. coli* et en entérocoques observé durant tout le suivi annuel.

Néanmoins, **cette contamination ne renvoie pas une mauvaise image de cette plage** bien qu'une partie des Aytrésiens ait changé leurs usages au niveau de la baie et délocalisé certaines de leurs pratiques. De même, l'interdiction des activités de baignade a entraîné une augmentation de la fréquentation de la plage par les chiens, les chevaux notamment en été alors que l'accès à la plage leur est interdit durant ces périodes. En outre, même avec la fermeture de la baignade, la plage est toujours fréquentée pour ce type d'activités. Ces observations montrent que le risque de santé publique est peut-être aujourd'hui plus important qu'avant la fermeture de la baignade. En effet, notre enquête a montré qu'une contamination fécale d'origine animale et environnementale est plus acceptée par les populations locales. Ainsi, il serait intéressant de réaliser une étude épidémiologique pour évaluer les effets réels de cette contamination sur la santé humaine.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdelzaher, A., Wright, M.E., Ortega, C., 2010. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. *Appl. Environ. Microbiol* 76, 724–732. <https://doi.org/10.1128/AEM.02127-09>
- Ackerman, D., Weisberg, S.B., 2003. Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches. *J. Water Health* 01, 85–89. <https://doi.org/10.2166/wh.2003.0010>
- Aminot, A., Kérouel, R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu, Ifremer. ed. Méthodes d’analyse en milieu marin.
- Anderson, K., Gaston, K.J., 2013. Lightweight unmanned aerial vehicles will revolutionize spatial ecology In a nutshell : *Front Ecol Env.* 11, 138–146. <https://doi.org/10.1890/120150>
- Anderson, Kimberly L, Whitlock, J.E., Harwood, V.J., 2005. Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. *Appl Env. Microbiol* 71, 3041–3048. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3041>
- Anderson, K.L., Whitlock, J.E., Harwood, V.J., 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl Env. Microbiol* 71, 3041–3048.
- Andrew, S., 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.
- Anhalt, J., Fenselau, C., 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 47, 219–25.
- ASCONIT, 2017. Plage du platine (Aytré) - R evision 2016 du profil de baignade (TYPE 3). La Rochelle.
- Ballesté, E., Belanche-Muñoz, L.A., Farnleitner, A.H., Linke, R., Sommer, R., Santos, R., Monteiro, S., Maunula, L., Oristo, S., Tiehm A, A., Stange, C., Blanch, A.R., 2020. Improving the identification of the source of faecal pollution in water using a modelling approach: From multi-source to aged and diluted samples. *Water Res.* 171, 12. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115392>
- Barbier, E.B., Hacker, S.D., Kennedy, C., Koch, E.W., Stier, A.C., Silliman, R., B., 2011. The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecol. Soc. Am.* 81, 169–193. <https://doi.org/10.1890/10-1510.1>
- Bent, S., Forney, L., 2008. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J.* 2, 689–95. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.44>
- Benton, C., Khan, F., Monaghan, P., Richards, W., Sheddens, C., 1983. The contamination of a major water supply by gull (*Larus* sp.). *Water Res.* 17, 789–798. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90073-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90073-8)
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., Petit, F., 2013. Evidence for Coexistence of

- Distinct *Escherichia coli* Populations in. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4684–4693. <https://doi.org/10.1128/AEM.00698-13>
- Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., 2011. Environnement et microorganismes pathogènes de l’homme, in: PUPPA (Ed.), *Écologie Microbienne Microbiologie Des Milieux Naturels Anthropisés*. p. 1002.
- Bitton, G., 2005. *Wastewater microbiology*, third edit. ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, Canada.
- Bizzini, A., Jatón, K., Romo, D., Bille, J., Prod, G., Greub, G., 2011. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry as an Alternative to 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Difficult-To-Identify Bacterial Strains □ †. *J. Clin. Microbiol.* 49, 693–696. <https://doi.org/10.1128/JCM.01463-10>
- Blais, M.-A., Côté, C., Villemur, R., Généreux, M., Cantin, P., Villion, M., 2015. Revue des méthodes de détermination de sources de contamination fécale de l’eau. Rapport présenté au ministère du Développement durable, de l’Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques.
- Blaustein, R. a., Pachepsky, Y., Hill, R.L., Shelton, D.R., Whelan, G., 2013. *Escherichia coli* survival in waters: temperature dependence. *Water Res* 47, 569–578. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.027>.
- Blott, S.J., Pye, K., 1986. Gradistats: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Dev. Water Sci.* 26, 1237–1248. [https://doi.org/10.1016/S0167-5648\(08\)70015-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5648(08)70015-7)
- Boehm, A.B., Ashbolt, N.J., Jr, J.M.C., Dunbar, L.E., Fleming, L.E., Gold, M.A., Hansel, J.A., Hunter, P.R., Ichida, A.M., Mcgee, C.D., Soller, J.A., Weisberg, S.B., 2009. A sea change ahead for recreational water quality criteria. *J. Water Health* 7, 9–20. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.122>
- Boehm, A.B., Fuhrman, J.A., Mrše, R.D., Grant, S.B., 2003. Tiered approach for identification of a human fecal pollution source at a recreational beach: Case study at Avalon Bay, Catalina Island, California. *Environ. Sci. Technol.* 37, 673–680. <https://doi.org/10.1021/es025934x>
- Boehm, A.B., Graham, K.E., Jennings, W.C., 2018. Can we swim yet? Systematic review, meta-analysis, and risk assessment of aging sewage in surface waters. *Environ. Sci. Technol. Sci. Technol.* 52, 9634–9645. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01948>
- Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Caporaso, J.G., 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Bonato, B., Benedetti, D., Canepari, P., Lleo, M., 2005. Survival of enterococcal species in aquatic environments 54, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.03.016>

- Bonilla, T.D., Nowosielski, K., Esiobu, N., McCorquodale, D.S., Rogerson, A., 2006. Species assemblages of *Enterococcus* indicate potential sources of fecal bacteria at a south Florida recreational beach. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 800–815. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.03.004>
- Bouguéneq, T., Horaud, C. LE, 1989. Streptococcaceae, in: *Bacteriologie Médicale*. Paris, p. 1107.
- Bouvy, M., Leboulanger, C., Bouvy, M., Briand, E., Boup, M.M., Got, P., Leboulanger, C., Bettarel, Y., Arfi, R., 2008. Effects of sewage discharges on microbial components in tropical coastal waters (Senegal , West Africa). *Mar. Freshw. Res.* 59, 838–839. <https://doi.org/10.1071/MF07244>
- Braatz, S., Fortuna, S., Broadhead, J., Leslie, R., 2007. Coastal Protection in the Aftermath of the India Ocean Tsunami: What Role for Forests and Trees? Proceedings of the Regional Technical Workshop, Khao Lak, Thailand. New Zealand.
- Bradshaw, J.K., Snyder, B.J., Oladeinde, A., Spidle, D., Berrang, M.E., Meinersmann, R.J., Oakley, B., Sidle, R.C., Sullivan, K., Molina, M., 2016. Characterizing relationships among fecal indicator bacteria, microbial source tracking markers, and associated waterborne pathogen occurrence in stream water and sediments in a mixed land use watershed. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.014>
- Brégeon, F., Brioude, G., Dominicis, F. De, Journo, B.D., Flaudrops, C., Rolain, J., Raoult, D., Thomas, A., 2014. MALDI-ToF Mass Spectrometry for the Rapid Diagnosis of Cancerous Lung Nodules 9, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097511>
- Brooks, W., Corsi, S., Fienen, M., Carvin, R., 2016. Environmental Modelling & Software Predicting recreational water quality advisories : A comparison of statistical methods. *Environ. Model. Softw.* 76, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2015.10.012>
- Bussi, G., Whitehead, P.G., Thomas, A.R.C., Masante, D., Jones, L., Cosby, B.J., Emmett, B.A., Malham, S.K., Prudhomme, C., Prosser, H., 2017. Climate and land-use change impact on faecal indicator bacteria in a temperate maritime catchment (the River Conwy , Wales). *J. Hydrol.* 553, 248–261. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2017.08.011>
- Buttigieg, P.L., Ramette, A., 2014. Biogeographic patterns of bacterial microdiversity in Arctic deep-sea sediments (HAUSGARTEN, Fram Strait). *Front Microbiol.* 5, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00660>
- Byamukama, D., Mach, R.L., Kansime, F., Manafi, M., Farnleitner, A.H., 2005. Discrimination Efficacy of Fecal Pollution Detection in Different Aquatic Habitats of a High-Altitude Tropical Country , Using Presumptive Coliforms , *Escherichia coli* , and *Clostridium perfringens* Spores 71, 65–71. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.65>
- Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J., 2012. Enterococci in the Environment. *Methods Mol. Biol.* 76, 685–706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>

- Byappanahalli, M.N., Richard, L., Shively, D.A., Sadowsky, M.J., Ishii, S., 2006. Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environ. Microbiol.* 8, 504–513. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00916.x>
- Cabelli, V.J., Dufour, A.P., McCabe, L.J., Levin, M.A., 1982. Swimming-Associated Gastroenteritis and Water Quality. *Am. J. Epidemiol.* 115, 606–616. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113342>
- Callahan, B.J., Mcmurdie, P.J., Holmes, S.P., 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis 11, 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Al., E., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Carney, R., Labbate, M., Siboni, N., Tagg, K., Mitrovic, S., Seymour, J., 2019. Urban beaches are environmental hotspots for antibiotic resistance following rainfall. *Water Res.* 167, 115081. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115081>
- Chao, A., 1984. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population, in: *Scandinavian Journal of Statistics*. Wiley, pp. 265–270.
- Chapman, A., 2014. It ' s okay to call them drones 1. *Unmanned Veh. Syst.* 2, 1–3. <https://doi.org/10.1139/juvs-2014-0009>
- Chen, W., Pan, Y., Yu, L., Yang, J., Zhang, W., 2017. Patterns and Processes in Marine Microeukaryotic Community Biogeography from Xiamen Coastal Waters and Intertidal Sediments, Southeast China. *Front Microbiol.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01912>
- Cheung, W.H.S., Chang, K.C.K., Hung, R.P.S., 1991. Variations in microbial indicator densities in beach waters and health-related assessment of bathing water quality. *Epidemiol. Infect.* 329–344. <https://doi.org/10.1017/S0950268800048482>
- Cheung, W.H.S., Chang, K.C.K., Hung, R.P.S., Kleevens, J.W.L., 1990. Health effects of beach water pollution in Hong Kong. *Epidemiol. Infect.* 105, 139–162. <https://doi.org/10.1017/S0950268800047737>
- Christ, A.P.G., Ramos, S.R., Cayô, R., Gales, A.C., Hachich, E.M., Sato, M.I.Z., 2017. Characterization of *Enterococcus* species isolated from marine recreational waters by MALDI-TOF MS and Rapid ID API® 20 Strep system. *Mar. Pollut. Bull.* 118, 6. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.025>
- Chun, C.L., Kahn, C.I., Borchert, A.J., Byappanahalli, M.N., Whitman, R.L., Peller, J., et al., 2015. Prevalence of toxin-producing *Clostridium botulinum* associated with the macroalga

- Cladophora in three Great Lakes: growth and management. *Sci. Total Environ. Total Env.* 511, 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.080>
- Chupin, C., Ballu, V., Testut, L., Tranchant, Y.-T., Calzas, M., Poirier, E., Coulombier, T., Laurain, O., Bonnefond, P., 2020. Mapping Sea Surface Height Using New Concepts of Kinematic GNSS Instruments. *Remote Sens.* 12, 2656. <https://doi.org/10.3390/rs12162656>
- Clermont, O., Gordon, D.M., Brisse, S., Walk, S.T., Denamur, E., 2011. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages : *Env. Microbiol* 13, 2468–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02519.x>
- Clermont, O., Stephane, B., Bingen, E., 2000. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000>
- Cochard, R., S. L. Ranamukhaarachchi, G. P. Shivakotib, O. V., Shipin, P.J., Edwards, K., Seeland, T., 2008. The 2004 tsunami in Aceh and Southern Thailand: a review on coastal ecosystems, wave hazards and vulnerability. *Perspectives in Plant Ecology. Evol. Syst.* 10, 3–40. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2007.11.001>
- Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D., 2003. Evaluation of F-RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6507–6514. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003>
- Cole, J., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Arris, R., Al., E., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucl Acids Res* 37, D141–D145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn879>
- Collins, D., Farrow, E., 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus*. *Int. J. Syst. BACTERIOLO* 34, 220–223. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-2-361>
- Corinaldesi, C., Danovaro, R., Dell’Anno, A., 2005. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 46–50. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.46-50.2005>
- Costanza, R., J, R.A., Groot, R. De, Farberll, S., Grassot, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., Neillt, R.V.O., J, J.P.J., Raskin, R.G., Suttonllll, P., Belt, M. Van Den, 1997. value of the world ’ s ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(98\)00020-2](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(98)00020-2)
- CREOCEAN, 2005. Etude des causes de la contamination bactériologique des eaux de baignade de la plage du Platin (Aytré) Rapport de synthèse : bilan de l’étude. La Rochelle.
- Crowther, J., Kay, D., Wyer, M.D., 2002. Faecal-indicator concentrations in waters draining lowland pastoral catchments in the UK : relationships with land use and farming practices. *Water Res.* 36, 1725–1734. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00394-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00394-3)

- Crutsinger, G.M., Short, J., Sollenberger, R., 2016. The future of UAVs in ecology: an insider perspective from the Silicon Valley drone industry. *J. Unmanned Veh. Syst.* 4, 161–168. <https://doi.org/10.1139/juvs-2016-0008>
- Cui, H., Yang, K., E, P., Yan, T., 2013. Spatial and temporal variation in enterococcal abundance and its relationship to the microbial community in Hawaii beach sand and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3601–3609. <https://doi.org/10.1128/AEM.00135-13>
- D'Hondt, S., Jørgensen, B.B., Miller, D.J., Batzke, A., Blake, R., Cragg, B.A., Al., E., 2004. Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments. *Science* (80-.). 306, 2216–2221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1101155>.
- De Koste, C.G., Brul, S., 2016. MALDI-TOF MS identification and tracking of food spoilers and food-borne pathogens. *Curr. Opin. Food Sci.* 10, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.11.004>
- Decamp, O., and Warren, A., 2000. Investigation of *Escherichia coli* removal in various designs of subsurface flow wetlands used for wastewater treatment. *Ecol. Eng.* 14, 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(99\)00007-5](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(99)00007-5)
- Denis, M., Rose, V., Nagard, B., Serghine, J., Meunier, M., Benoit, F., Rince, A., Cauvin, E., Gourmelon, M., 2019. Comparison of *Campylobacter jejuni* using MALDI-TOF to identify relationships between different origins : poultry , bovine , sheep , shorebird , river and shellfish, <https://www.researchgate.net/publication/336140746> Comparison.
- Derrien, M., 2011. Validation de l'utilisation des stéroïdes en tant qu'outil de traçage de l'origine des contaminations fécales des eaux de surface. Morgane DERRIEN. Université de Rennes 1.
- 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 fecal Bacteroidales bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3184–3191. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3184-3191.2005>
- Dixon, P., 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J Veg Sci* 14, 927–930. [https://doi.org/10.1658/1100-9233\(2003\)014\[0927:VAPORF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1658/1100-9233(2003)014[0927:VAPORF]2.0.CO;2)
- Donahue, A., Feng, Z., Solo-gabriele, H.M., Kelly, E., Reniers, A., 2017. Significance of beach geomorphology on fecal indicator bacteria levels. *Mar. Pollut. Bull.* 121, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.05.024>
- Dore, W., Henshilwood, K., Lees, D., 2000. Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1280–1285. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1280-1285.2000>
- Doumith, M., Day, M.J., Hope, R., Wain, J., Woodford, N., 2012. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3108–3110. <https://doi.org/10.1128/JCM.01468-12>

- Duarte, C.M., Borja, A., Carstensen, J., Elliott, M., 2015. Paradigms in the Recovery of Estuarine and Coastal Ecosystems. *Estuaries Coasts* · 1, 43. <https://doi.org/10.1007/s12237-013-9750-9>
- Duhamel, S., 2006. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments 64, 316–332. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.05.008>
- Dutilh, B.E., Cassman, N.A., Mcnair, K., Sanchez, S.E., Silva, G.G.Z., 2014. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat. Commun* 5, 4498–4498. <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>
- EC, 2006. EU Bathing Water Directive 2006/7/EC.
- Edberg, S., Rice, E., Karlin, R., Allen, M., 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *J. Appl. Microbiol.* 88, 106S-116S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x>
- Egis eau, 2011a. Profil de vulnérabilité des eaux de baignade de type 3 - plage du platine commune d’Aytré- Eaux pluviales primaires.
- Egis eau, 2011b. Etude de l’hypothèse d’une résurgence karstique dans la baie du Platin (Aytré), commune d’Aytré eaux pluviales primaires. La Rochelle.
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2017. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287-1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- European Committee for Standardization, 1997. European Committee for Standardization EN 1484 - Water analysis - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC). Paris.
- European Parliament and Council., 2006. The management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC, Official Journal of the European Union. Europa, Brussels, Belgium.
- Falentin, H., Auer, L., Mariadassou, M., Pascal, G., Rué, O., Dugat-bony, E., Delbes, C., Nicolas, A., Rifa, E., Mondy, S., Falentin, H., Auer, L., Mariadassou, M., Pascal, G., Rué, O., Falentin, H., Auer, L., Mariadassou, M., Pascal, G., Rué, O., Dugat-bony, E., Delbès, C., Nicolas, A., Rifa, E., Mondy, S., Boulch, M. Le, Cauquil, L., Hernandez-, G., Terrat, S., Abraham, A., 2019. Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s’initier aux analyses métabarcoding : Partage de pratiques et retours d’expérience des membres du pôle mé- tagénomique du PEPI IBIS. *Cah. des Tech. l’INRA* 97, 0–23.
- Farhan Mohammad Khan, P.R.G., 2019. *Escherichia coli* (E. coli) as an indicator of fecal contamination in water: A review. *Environ. Sci. Eng.* 1–11. <https://doi.org/10.20944/preprints201910.0081.v1>
- Feng, B.W., Li, X.R., Wang, J.H., Hu, Z.Y., Meng, H., Xiang, L.Y., Al., E., 2009. Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70, 236–248. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00772.x>

- Feng, P.C.S., Hartman, P.A., 1982. Fluorogenic Assays for Immediate Confirmation of *Escherichia colit*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1320–1329. <https://doi.org/10.1128/AEM.43.6.1320-1329.1982>
- Feng, S., Bootsma, M., McLellan, S.L., 2018. Human-associated Lachnospiraceae genetic markers improve detection of fecal pollution sources in urban waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 1–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.00309-18>
- Feng, Z., Reniers, A., Haus, B.K., Solo-gabriele, H.M., Kelly, E.A., 2016. Wave energy level and geographic setting correlate with Florida beach water quality 104, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.011>
- Ferguson, C.M., Coote, B.G., Ashbolt, N.J., Stevenson, I.M., 1996. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Res.* 30, 2045–2054. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00079-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00079-6)
- Fernandez-Leborans, G., Gabilondo, R., Ruiz-Álvarez, S., 2007. Inter-annual depth-dependent toxicity and bioaccumulation of cadmium in marine benthic protist communities., in: *Oceanologia*. pp. 305–336.
- Fleisher, J.M., Kay, D., Wyer, D., Godfree, A.F., 1998. Estimates of the severity of illnesses associated with bathing in marine recreational waters contaminated with domestic sewage. *Int. J. Epidemiol.* 27, 722–726. <https://doi.org/10.1093/ije/27.4.722>
- Flynn, K.F., Chapra, S.C., 2014. Remote Sensing of Submerged Aquatic Vegetation in a Shallow Non-Turbid River Using an Unmanned Aerial Vehicle 12815–12836. <https://doi.org/10.3390/rs61212815>
- Folk, R.L., Ward, W.C., 1957. Brazos river bar: A study in the significance of grain size parameters. *J. Sediment. Petrol.* 27, 3–26. <https://doi.org/10.1306/74D70646-2B21-11D7-8648000102C1865D>
- Fráter, T., Juzsakova, T., Lauer, J., Dióssy, L., Rédey, A., 2015. Unmanned aerial vehicles in environmental monitoring-an efficient way for remote sensing. *J. Environ. Sci. Eng.* 4, 85–91. <https://doi.org/10.17265/2162-5298/2015.02.004>
- French Association for Standardization, 2004. 2004 French Association for Standardization XP X33-019 - Sludge Characterization - Positive *E. coli* Beta glucuronidase Enumeration - Miniaturized Liquid Method (Rating: X33-019). Geneva , Switzerland.
- French Association for Standardization, 1999. 1999 French Association for Standardization NF EN ISO 9308-3 - Water Quality. Detection and Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria in Surface and Waste Water. Miniaturized Method (Most Probable Number) by Inoculation in Liquid Medium. Geneva , Switzerland.
- Fuhrman, J.A., 2009. Microbial community structure and its functional implications. *Nature* 459, 193–199. <https://doi.org/10.1038/nature08058>

- Galand, P.E., Lucas, S., Fagervold, S.K., Pruski, A.M., Vétion, G., Dupuy, C., Guizien, K., 2016. Disturbance Increases Microbial Community Diversity and Production in Marine Sediments 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01950>
- Galand, P.E., Potvin, M., Casamayor, E.O., Lovejoy, C., 2010. Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean. *ISME Journal*. J. 4, 564–576. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.134>
- Garabetian, F., Lyautey, E., Bourasseau, L., Daffe, G., Girault, E., Jude-Lemeilleur, F., Leconte, M., Persilie, E., Raymond, N., Thevand, A., Vitte, I., 2014. Identification des sources de contamination fécales en milieu côtier (IDFEC)- Validation d'une base de données de Microbial Source Tracking pour le bassin d'Arcachon. *Tech. - Sci. - Methodes* 38–49. <https://doi.org/10.1051/tsm/201304038>
- Ge, Z., Whitman, R.L., Nevers, M.B., Phanikumar, M.S., 2012. Wave-induced mass transport affects daily *Escherichia coli* fluctuations in nearshore water. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2204–2211. <https://doi.org/10.1021/es203847n>
- Gerba, C., McLeod, J., 1976. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 114–120. <https://doi.org/10.1128/aem.32.1.114-120.1976>
- Gerba, C.P., 2000. Assessment of Enteric Pathogen Shedding by Bathers during Recreational Activity and its Impact on Water Quality. *Quant. Microbiol.* 2, 55-68. <https://doi.org/10.1023/A:1010000230103>
- Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N., 2014. *Enterococci From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston.
- 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. *Env. SciTech* 39, 5157–5169. <https://doi.org/10.1021/es048120k>
- Gleeson, C., 1997. 'The Coliform Index and Waterborne Disease.' (E. and F. N. Spoon: London.) CRC Press.
- Gobet, A., Boer, S., SM, H. Al, 2012. Diversity and dynamics of rare and of resident bacterial populations in coastal sands. *J. ISME* 6, 542–553. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.132>
- Gómez-doñate, M., Payán, A., Cortés, I., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J., Muniesa, M., 2011. Isolation of bacteriophage host strains of *Bacteroides* species suitable for tracking sources of animal faecal. *Environ. Microbiol.* 13, 1622–1631. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02474.x>
- Gordon, D.M., Clermont, O., Tolley, H., Denamur, E., 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups : multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method 10, 2484–2496. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x>

- Gordon, D.M., Cowling, A., 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 149, 3575–3586. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26486-0>
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Le Mennec, C., Mieszkin, S., Ponthoreau, C., Gendronneau, M., 2010a. Application of library-independent microbial source tracking methods for identifying the sources of faecal contamination in coastal areas. *Water Sci. Technol.* 61, 1401–1409. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.033>
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Mieszkin, S., Marti, R., Wéry, N., Jardé, E., Derrien, M., Jadas-Hécart, A., Communal, P.Y., Jaffrezic, A., Pourcher, A.M., 2010b. 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.* 1, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.061>
- Gourmelon, M., Durand, G., 2013. Des micro-organismes et des composés chimiques pour identifier les sources de contamination fécale : étude de leur persistance en microcosmes et de leur présence dans les eaux à l'échelle d'un bassin versant. <https://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2012.9.14>
- Green, H.C., Dick, L.K., Gilpin, B., Samadpour, M., Field, K.G., 2012. Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 503–510. <https://doi.org/10.1128/AEM.05734-11>
- Green, H.C., Haugland, R.A., Varma, M., Millen, H.T., Borchardt, M.A., Field, K.G., Walters, W.A., Knight, R., Sivaganesan, M., Kelty, C.A., Shanks, C., n.d. Improved HF183 Quantitative Real-Time PCR Assay for Characterization of Human Fecal Pollution in Ambient Surface Water. <https://doi.org/10.1128/AEM.04137-13>
- Gu, M., Minard, G., Van, V.T., Dubost, A., Moro, C.V., 2018. Short-term impacts of anthropogenic stressors on *Aedes albopictus* mosquito vector microbiota 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy188>
- Halliday, E., Mclellan, S.L., Amaral-zettler, L.A., Sogin, M.L., Gast, R.J., 2014. Comparison of Bacterial Communities in Sands and Water at Beaches with Bacterial Water Quality Violations. *PLoS One* 9, e90815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090815>
- Hancock, L., Gilmore, M., 2006. Pathogenicity of enterococci., in: Fischetti, VA, RP Novick, JJ Ferretti, DA Portnoy et JI Rood, É. (Ed.), *Gram-Positive Pathogens*. pp. 251–258.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J.R., Masago, Y., Sano, D., Katayama, H., 2018. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.004>
- Hartard, C., 2017. Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs du danger viral lié à la pollution fécale des matrices hydriques et alimentaires. Université de Lorraine.
- Hartl, D.L., Dykhuizen, D.E., 1984. The population genetics of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*

18, 31–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.ge.18.120184.000335>

- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B., 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3163–3170.
- Havelaar, A.H., Pot-Hogbeem, W.M., 1988. F-Specific RNABacteriophages As Model Viruses In Water Hygiene: Ecological Aspects. *Ecol. Asp. Water Sci. Technol.* 20, 399–407. <https://doi.org/10.2166/wst.1988.0312>
- Heaney, C.D., Exum, N.G., Dufour, A.P., Brenner, K.P., Haugland, R.A., Chern, E., Schwab, K.J., Love, D.C., Serre, M.L., Noble, R., Wade, T.J., Public, E., Division, H., Health, N., States, U., Protection, E., States, U., Protection, E., Hill, C., 2015. Water quality, weather and environmental factors associated with fecal indicator organism density in beach sand at two recreational marine beaches. *Sci Total Environ.* 1, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.113>
- Heaney, C.D., Sams, E., Dufour, A.P., Brenner, K.P., Haugland, R.A., Chern, E., Wing, S., Marshall, S., Love, D.C., Serre, M., Noble, R., Wade, T.J., 2012. Fecal Indicators in Sand, Sand Contact, and Risk of Enteric Illness Among Beachgoers. *Epidemiology* 23, 95–106. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31823b504c>
- Hernandez, J.F., Guibert, J.M., Delattre, J.M., Oger, C., Charriere, C., Hughes, B., Serceau, R., Sinegre, F., 1991. Evaluation of a miniaturized procedure for enumeration of *Escherichia coli* in sea water, based upon hydrolysis of 4-methylumbelliferyl B-D-glucuronide. *Water Res.* 25, 1073–1078. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90200-A](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90200-A)
- Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M., Whittam, T.S., 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multi-copy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Bacteriol. J* 172, 6175–6181. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6175-6181.1990>
- Holland, R.D., Duffy, C.R., Rafii, F., Sutherland, J.B., Heinze, T.M., Holder, C.L., Voorhees, K.J., Jr, J.O.L., 1999. Identification of Bacterial Proteins Observed in MALDI TOF Mass Spectra from Whole Cells. *Am. Chem. Soc.* 71, 3226–3230. <https://doi.org/10.1021/ac990175v>
- Huggett, J., M., Hayakawa, H., D., Rappé, S., M., 2012. Genome sequence of strain HIMB624, a cultured representative from the OM43 clade of marine Betaproteobacteria. *Stand. Genomic Sci.* 6, 11–20. <https://doi.org/10.4056/sigs.2305090>
- Hughes, J.B., Daily, G.C., Ehrlich, P.R., 1997. Population Diversity: Its Extent and Extinction. *Science* (80-.). 278, 689–692. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.689>
- Hugoni, M., Taib, N., Debros, D., 2013. Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6004–6009. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216863110>
- Hugoni, M.H., Escalas, A., Bernard, C., Nicolas, S., Jézéquel, D., Vazzoler, F., Sarazin, G.,

- Leboulanger, C., Bouvy, M., Got, P., Ader, M., Troussellier, M., Agogué, H., 2018. Spatiotemporal variations in microbial diversity across the three domains of life in a tropical thalassohaline lake (Dziani Dzaha, Mayotte Island). *Mol. Ecol.* 27, 9. <https://doi.org/10.1111/mec.14901>
- IAWPRC, 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25, 529–545. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90126-B](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90126-B)
- International Organisation for Standardisation, 2013. 2013 International Organisation for Standardisation ISO 15923-1- Water quality - Determination of selected parameters by discrete analysis systems - Part 1: Ammonium, nitrate, nitrite, chloride, orthophosphate, sulfate and silicate with photometric detecti. Geneva , Switzerland.
- International Organisation for Standardisation, 2005. 2005 European Committee for Standardization EN 872 - Water quality - Determination of suspended solids - Method by filtration through glass fibre filters. Paris.
- International Organisation for Standardisation, 1999. 1999 International Organisation for Standardisation NF EN ISO 7899-1 - Water Quality. Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci in Surface and Waste Water. Miniaturized Method (Most Probable Number) by Inoculation in Liquid Medium. Geneva , Switzerland.
- International Organisation for Standardisation, 1993. 1993 International Organisation for Standardisation ISO 11465 - Soil quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method. Geneva , Switzerland.
- International Organisation for Standardisation, 1988. 1988 International Organisation for Standardisation ISO 14235 - Soil quality - Determination of organic carbon by sulphochromic oxidation. Geneva , Switzerland.
- Ishii, S., Ksoll, W.B., Hicks, R.E., Sadowsky, M.J., 2006. Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 612–621. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.612>
- Jamieson, R., Joy, D.M., Lee, H., Kostaschuk, R., Gordon, R., 2005. Transport and deposition of sediment associate *Escherichia coli* in natural streams. *Water Res.* 39, 2665–2675. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.040>
- Janelidze, N., Jaiani, E., Lashkhi, N., Tskhvediani, A., Kokashvili, T., Gvarishvili, T., Jgenti, D., Mikashavidze, E., Diasamidze, R., Narodny, S., Obiso, R., Whitehouse, C.A., Huq, A., Tediashvili, M., 2011. Microbial water quality of the Georgian coastal zone of the Black Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 573–580. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.11.027>
- Jang, J., Hur, H., Sadowsky, M.J., Byappanahalli, M.N., Yan, T., Ishii, S., 2017. Environmental *Escherichia coli* : ecology and public health implications — a review. *J. Appl. Microbiol.* 123, 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>

- Jardé, E., Jeanneau, L., Harrault, L., Quenot, E., Solecki, O., Petitjean, P., Lozach, S., Chevé, J., Gourmelon, M., 2018. Application of a microbial source tracking based on bacterial and chemical markers in headwater and coastal catchments. *Sci. Total Environ.* 610–611, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.235>
- Jeanneau, L., Solecki, O., Wéry, N., Jardé, E., Gourmelon, M., Communal, P.Y., Jadas-Hécart, A., Caprais, M.P., Gruau, G., Pourcher, A.M., 2012. Relative decay of fecal indicator bacteria and human-associated markers: A microcosm study simulating wastewater input into seawater and freshwater. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2375–2382. <https://doi.org/10.1021/es203019y>
- Kacar, A., Omuzbuken, B., 2017. Assessing the seawater quality of a coastal city using fecal indicators and environmental variables (eastern Aegean Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 123, 400–403. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.052>
- Karl, D., 2002. Nutrient dynamics in the deep blue sea. *Trends Microbiol.* 10, 410–418. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02430-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02430-7)
- Khandeparker, L., Desai, D. V, Sawant, S.S., Krishnamurthy, V., Anil, C., 2020. Spatio-temporal Variations in Bacterial Abundance with an Emphasis on Fecal Indicator Bacteria and *Vibrio* spp. in and around Visakhapatnam Port , East Coast of India. *ASEAN J. Sci. Technol. Dev.* 37, 91–99. <https://doi.org/10.29037/ajstd.619>
- Kildare, B.J., Leutenegger, C.M., McSwain, B.S., Bambic, D.G., Rajal, V.B., Wuertz, S., 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: A Bayesian approach. *Water Res.* 41, 3701–3715. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.037>
- Kilpper-balz, K.H.S.A.N.D.R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov . *Int. J. Syst. BACTERIOLO* 34, 31–34. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-1-31>
- Klemas, V. V, 2015. Coastal and Environmental Remote Sensing from Unmanned Aerial Vehicles : An Overview 1260–1267. <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-15-00005.1>
- Knowlton, M.F., Jones, J.R., 2009. Lake and Reservoir Management Fecal Bacteria , Nutrients , Chlorophyll , and Dissolved Oxygen in a Constructed Habitat Wetland Receiving Treated Municipal Effluent and River Water 2381. <https://doi.org/10.1080/07438140309354083>
- Koh, C.H., Khim, J.S., 2014. The Korean tidal flat of the Yellow Sea: physical setting, ecosystem and management. *Ocean. Coast. Manag.* 102, 398–414. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2014.07.008>
- Koparan, C., Koc, A.B., Privette, C. V., Sawyer, C.B., 2018a. In situ water quality measurements using an unmanned aerial vehicle (UAV) system. *Water (Switzerland)* 10. <https://doi.org/10.3390/w10030264>
- Koparan, C., Koc, A.B., Privette, C. V., Sawyer, C.B., Sharp, J.L., 2018b. Evaluation of a UAV-

- assisted autonomous water sampling. *Water* (Switzerland) 10. <https://doi.org/10.3390/w10050655>
- Kott, Y., Roze, N., Sperber, S., Betzer, N., 1974. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Res.* 8, 165–171. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(74\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(74)90039-6)
- Kucuksezgin, F., Gonul, L.T., Pazi, I., Kacar, A., 2020. Assessment of seasonal and spatial variation of surface water quality : Recognition of environmental variables and fecal indicator bacteria of the coastal zones of Izmir Bay , Eastern Aegean. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 28, 100554. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100554>
- Kuhns, M., Zautner, A.E., Rabsch, W., Zimmermann, O., Weig, M., Bader, O., Groß, U., 2012. Rapid Discrimination of *Salmonella enterica* Serovar Typhi from Other Serovars by MALDI-TOF Mass Spectrometry 7, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040004>
- Lally, H.T., O'Connor, I., Jensen, O.P., Graham, C.T., 2019. Can drones be used to conduct water sampling in aquatic environments? A review. *Sci. Total Environ.* 670, 569–575. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.252>
- Largier, J., Taggart, M., 2006. Improving water quality at enclosed beaches - A Report on the Enclosed Beach Symposium and Workshop (Clean Beaches Initiative).
- Largier, J.L., Lawrence, C.A., Roughan, M., Kaplan, D.M., Dever, E.P., Dorman, C.E., Kudela, R.M., Bollens, S.M., Wilkerson, F.P., Dugdale, R.C., 2006. WEST : A northern California study of the role of wind-driven transport in the productivity of coastal plankton communities. *Deep. Res Ocean.* 53, 2833–2849. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2006.08.018>
- Laureano-rosario, A.E., Symonds, E.M., Rueda-roa, D., Otis, D., Muller-karger, F.E., 2017. Environmental Factors Correlated with Culturable Enterococci Concentrations in Tropical Recreational Waters : A Case Study in Escambron Beach , San Juan , Puerto Rico. *Int. J. Environ. Res. Public Heal. Artic.* 14, 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121602>
- Lavergne, C., Agogué, H., Leynaert, A., Raimonet, M., Wit, R. De, 2017. Factors influencing prokaryotes in an intertidal mudflat and the resulting depth gradients. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.03.008>
- Lavergne, C., Beaugeard, L., Dupuy, C., Courties, C., Agogué, H., 2014. An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 105, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.002>
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4214–4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.01036-05>
- Leboulanger, C., Kenmogne, D., Ludovic, J., Happi, M., Estim, F., 2021. Urban inputs of fecal bacteria to the coastal zone of Libreville , Gabon , Central Western Africa 168.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112478>

- Lee, H., Mok, Y., Lul, S., Yoo, Y., Kim, D., Lee, J., Kwon, B., Seong, J., Kim, J., 2021. Science of the Total Environment Environmental drivers affecting the bacterial community of intertidal sediments in the Yellow Sea. *Sci. Total Environ.* 755, 142726. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142726>
- Li, M., Mi, T., He, H., Chen, Y., Zhen, Y., Yu, Z., 2021. Science of the Total Environment Active bacterial and archaeal communities in coastal sediments: Biogeography pattern, assembly process and co-occurrence relationship. *Sci. Total Environ.* 750, 142252. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142252>
- Liang, Z., He, Z., Zhou, X., Powell, C.A., Yang, Y., He, L.M., 2013. Impact of mixed land-use practices on the microbial water quality in a subtropical coastal watershed. *Sci. Total Environ.* 449. <https://doi.org/doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.087>
- Lipp, E.K., Kurz, R., Vincent, R., Rodriguez-Palacios, C., Farrah, S., Rose, J., 2001. The Effects of Seasonal Variability and Weather on Microbial Fecal Pollution and Enteric Pathogens in a Subtropical Estuary. *Estuaries* 24, 266–276. <https://doi.org/doi:10.2307/1352950>
- Lorenzen, C.J., 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep. Res Ocean.* 13, 223–227. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(66\)91102-8](https://doi.org/10.1016/0011-7471(66)91102-8)
- Lu, J., Domingo, J.W.S., Lamendella, R., Edge, T., Hill, S., 2008. Phylogenetic Diversity and Molecular Detection of Bacteria in Gull Feces Phylogenetic Diversity and Molecular Detection of Bacteria in Gull Feces □. <https://doi.org/10.1128/AEM.00019-08>
- Luck, G.W., Daily, G.C., Ehrlich, P.R., 2003. Population diversity and ecosystem services 18, 331–336. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00100-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00100-9)
- Magoc, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Makhalanyane, T.P., Valverde, A., Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J.-B., Cowan, D.A., 2015. Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 203–221. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu011>
- Manero, A., Vilanova, X., Cerda-Cuellar, M., Blanch, A.R., 2002. Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of Enterococci. *Water Res.* 36, 2831–2835. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00486-9](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00486-9)
- Manfreda, S., Id, M.F.M., Id, P.E.M., Lucas, R., Pajuelo, V., Id, M., Id, G.M., Dor, E. Ben, Id, D.H., 2018. Environmental Monitoring. *Remote Sens. Rev.* 10, 641. <https://doi.org/10.3390/rs10040641>

- Maraccini, P.A., Mattioli, M.C.M., Sassoubre, L.M., Cao, Y., Gri, J.F., Ervin, J.S., Werfhorst, L.C. Van De, Boehm, A.B., 2016. Solar Inactivation of Enterococci and Escherichia coli in Natural Waters: Effects of Water Absorbance and Depth. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5068–5076. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00505>
- Marie, D., Partensky, F., Vaultot, D., Brussaard, C., 1999. Enumeration of Phytoplankton, Bacteria, and Viruses in Marine Samples. *Curr. Protoc. Cytom.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1111s10>
- Matthew, C.P., Solo-Gabriele, H.M., Piggot, A.M., Klaus, J.S., Yifan, Z., 2011. Relationships Between Sand and Water Quality at Recreational Beaches. *Water Res.* 45, 6763–6769. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.028>
- Mauffret, A., Caprais, M.P., Gourmelon, M., 2012. Relevance of Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophages for efficient fecal contamination tracking at the level of a catchment in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5143–5152. <https://doi.org/10.1128/AEM.00315-12>
- Maunula, L., Kaupke, A., P.Vasickova, Söderberg, K., Kozyra, I., Lazic, S., Poel, W.H.M. van der, Al., E., 2013. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Intern J Food Microbiol* 167, 177–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.003>
- Mayer, R.E., Reischer, G.H., Ixenmaier, S.K., Derx, J., Blaschke, A.P., Ebdon, J.E., Linke, R., Egle, L., Ahmed, W., Blanch, A.R., Byamukama, D., Savill, M., Mushi, D., Edge, T.A., Schade, M.A., Aslan, A., Brooks, Y.M., Sommer, R., Mach, R.L., Savio, D., Zessner, M., Farnleitner, A.H., 2018. Global Distribution of Human-Associated Fecal Genetic Markers in Reference Samples from Six Continents. *Environ. Sci. Technol.* 52, 5076–5084. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04438>
- McCarthy, D.T., Jovanovic, D., Lintern, A., Teakle, I., Barnes, M., Deletic, A., Coleman, R., Rooney, G., Prosser, T., Coutts, S., Hipsey, M.R., Bruce, L.C., Henry, R., 2017. Source tracking using microbial community fingerprints: Method comparison with hydrodynamic modelling. *Water Res.* 109, 253–265. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.043>
- McLellan, S.L., 2004. Genetic diversity of Escherichia coli isolated from urban rivers and beach water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4658–4665. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4658-4665.2004>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mestre, M., Höfer, J., Gasol, J.M., Jeffrey, W.H., 2020. Seasonal Variation of Bacterial Diversity Along the Marine Particulate Matter Continuum 11, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01590>
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7. <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-08>
- 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. *J. Appl. Microbiol.* 108, 974–984. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04499.x>
- Mitsuoka, T., Hayakawa, K., 1973. [The fecal flora in man. I. Composition of the fecal flora of various age groups] *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie. Medizinische Mikrobiol. und Parasitol.* 223, 333–342.
- Monteith, D.T., Stoddard, J.L., Evans, C.D., Wit, H.A. De, Forsius, M., Jeffries, D.S., Vuorenmaa, J., Keller, B., Wilander, A., Skjelkva, B.L., 2007. Dissolved organic carbon trends resulting from changes in atmospheric deposition chemistry. *Nature* 450, 537–541. <https://doi.org/10.1038/nature06316>
- Mookerjee, S., Batabyal, P., Halder, M., Palit, A., 2014. Specificity of coliphages in evaluating marker efficacy: A new insight for water quality indicators. *J. Virol. Methods* 208, 115–118. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.036>
- Moore, D.F., Guzman, J.A., McGee, C., 2008. Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1017–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03828.x>
- Moreno, S.H., Bolívar-anillo, H.J., Soto-varela, Z.E., Aranguren, Y., Pichón, C., Andrés, D., Daza, V., Anfuso, G., 2019. Microbiological water quality and sources of contamination along the coast of the Department of Atlántico (Caribbean Sea of Colombia). Preliminary results. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.054>
- Morgan, B.J., Stocker, M.D., Valdes-Abellan, J., Kim, M.S., Pachepsky, Y., 2020. Drone-based imaging to assess the microbial water quality in an irrigation pond: A pilot study. *Sci. Total Environ.* 716, 135757. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135757>
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>
- Ndione, M., Ory, P., Agion, T., Treilles, M., Vacher, L., Simon-Bouhet, Benoit Maëlig, L.B., Pineau, P., Montanié, H., Agogué, H., 2022. Temporal variations in fecal indicators bacteria in bathing waters and sediments on a coastal ecosystem (Aytré Bay, Charente-Maritime, France). *Mar. Pollut. Bull. prep* 175, 12. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113360>
- Ness, G.E., Hood, M.A., 1982. Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 578–584. <https://doi.org/10.1128/aem.43.3.578-584.1982>
- Newton, A., Icely, J., Cristina, S., Perillo, G.M.E., Turner, R.E., Ashan, D., Cragg, S., Luo, Y., Tu,

- C., Li, Y., 2020. Anthropogenic , Direct Pressures on Coastal Wetlands 8, 1–29. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00144>
- Nguyen, K.H., Senay, C., Young, S., Nayak, B., Lobos, A., Conrad, J., Harwood, V.J., 2018. Determination of wild animal sources of fecal indicator bacteria by microbial source tracking (MST) influences regulatory decisions. *Water Res.* 144, 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.034>
- Noble, R.T., Lee, I.M., Schiff, K.C., 2004. Inactivation of indicator microorganisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. *J. Appl. Microbiol. Appl. Microbiol.* 96, 464–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02155.x>
- Ochman, H., Selander, R.K., 1984. Standard Reference Strains of *Escherichia coli* from Natural Populations 157, 690–693. <https://doi.org/10.1128/jb.157.2.690-693.1984>
- Ogorzaly, L., Gantzer, C., 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater. *J. Virol. Methods* 138, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004>
- Overbey, K., 2014. Sewage impacts on water quality and antibiotic resistance in beach waters in the galápagos islands, ecuador.
- Pajares, G., 2015. Overview and Current Status of Remote Sensing Applications Based on Unmanned Aerial Vehicles (UAVs) 281–330. <https://doi.org/10.14358/PERS.81.4.281>
- Park, Y., Kim, M., Pachepsky, Y., Choi, S., Cho, J., Jeon, J., Cho, K.H., 2018. Development of a Nowcasting System Using Machine Learning Approaches to Predict Fecal Contamination Levels at Recreational Beaches in Korea. *J. Environ. Qual.* 47, 1094–1102. <https://doi.org/10.2134/jeq2017.11.0425>
- Paula, A., Christ, G., Rodrigues, S., Cayô, R., Cristina, A., Maria, E., Inês, M., Sato, Z., 2017. Characterization of *Enterococcus* species isolated from marine recreational waters by MALDI-TOF MS and Rapid ID API ® 20 Strep system. *Mar. Pollut. Bull. J.* 118, 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.025>
- Pedrós-Alió, C., 2012. The rare bacterial biosphere. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 4, 449–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100948>
- Peterson, B.G., 2007. Overview of Performance Analytics' Charts and Tables. Chicago, IL.
- Pham Tan, J., 2017. Compréhension, explications et perception des phénomènes ponctuels de dégradations de la qualité des eaux, en lien avec la marée montante dans la baie d'Aytré (17).
- Pham Tan, J., 2016. Mémoire de Master 1-Sciences Pour l'Environnement-Mention Géographie Appliquée à la Gestion des Littoraux Pour la Communauté d'Agglomération de la Rochelle.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Env.*

- Microbiol 64, 3376–3382. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3376-3382.1998>
- Pommepeuy, M., Caprais, M.P., Gourmelon, M., Saux, J.C. Le, Guyader, F. Le, 2006. Fecal Contamination in Coastal Areas : An Engineering Approach. *Ocean. Heal. Pathog. Mar. Environ.* 331–359. <https://doi.org/10.1007/0-387-23709-7>
- Powers, N.C., Wallgren, H.R., Marbach, S., Turnera, J.W., 2020. Relationship between Rainfall, Fecal Pollution, Antimicrobial Resistance, and Microbial Diversity in an Urbanized Subtropical Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1229–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01229-20>.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Glo, F.O., Yarza, P., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project : improved data processing and web-based tools 41, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team, 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reischer, Georg Hubert, Reischer, Georg H, Kasper, D.C., Steinborn, R., Mach, R.L., Farnleitner, A.H., 2014. Quantitative PCR Method for Sensitive Detection of Ruminant Fecal Pollution in Freshwater and Evaluation of This Method in Alpine Karstic Regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 5610–5614. <https://doi.org/10.1128/AEM.00364-06>
- Rhee, D.S., Kim, Y.D., Kang, B., Kim, D., 2018. Applications of unmanned aerial vehicles in fluvial remote sensing: an overview of recent achievements. *KSCE J. Civ. Eng.* 22, 588–602. <https://doi.org/10.1007/s12205-017-1862-5>
- Rippy, M.A., Franks, P.J.S., Feddersen, F., Guza, R.T., Moore, D.F., 2013. Physical dynamics controlling variability in nearshore fecal pollution : Fecal indicator bacteria as passive particles. *Mar. Pollut. Bull.* 66, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.09.030>
- Robertson, B.R., Button, D.K., 1989. Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size and apparent DNA content by flow cytometry. *Cytometry* 10, 70–76. <https://doi.org/10.1002/cyto.990100112>
- Rochelle-Newall, E., Nguyen, T.M.H., Le, T.P.Q., Sengtaheuanghoung, O., Ribolzi, O., 2015. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: Knowledge gaps and future directions. *Front. Microbiol.* 6, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00308>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, 2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Russell, T.L., Yamahara, K.M., Boehm, A.B., 2012. Mobilization and transport of naturally occurring enterococci in beach sands subject to transient infiltration of seawater. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5988–5996.
- SAFEGE, 2010. Étude hydrogéologique de la nappe littorale à Aytré (17) Rapport final.
- Sakic, P., Chupin, C., Ballu, V., Coulombier, T., Morvan, P.Y., Urvoas, P., Beauverger, M., Royer,

- J.Y., 2021. Geodetic Seafloor Positioning Using an Unmanned Surface Vehicle—Contribution of Direction-of-Arrival Observations. *Front. Earth Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/feart.2021.636156>
- Salazar, G., Sunagawa, S., 2017. Marine microbial diversity. *Curr. Biol.* 27, R489–R494. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.017>
- Santos, T., Capelo, J.L., Santos, H.M., Oliveira, I., Marinho, C., Gonçalves, A., Araújo, J.E., Poeta, P., Igrejas, G., 2015. Use of MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting to characterize *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates. *J. Proteomics* 1874–3919. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.02.017>
- Sauget, M., Cholley, P., Vannier, A., Thouverez, M., Nicolas-Chanoine, M.-H., Hocquet, D., Bertrand, X., 2016a. Trends of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 subclone in a French hospital over a 15-year period. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 744–747. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.023>
- Sauget, M., Cholley, P., Vannier, A., Thouverez, M., Nicolas-Chanoine, M.-H., Hocquet, D., Bertrand, X., 2016b. Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : application aux principales espèces bactériennes responsables d' infections nosocomiales, Français.
- Savichtcheva, O., Okayama, N., Okabe, S., 2007. Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Res.* 41, 3615–3628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.028>
- Scheurer, M., Brauch, H., Lange, F.T., 2009. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal Bioanal Chem* 394:, 1585–1594. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2881-y>
- Schuurman, T., Boer, R.F. De, Kooistra-smid, A.M.D., Zwet, A.A. Van, 2004. Prospective Study of Use of PCR Amplification and Sequencing of 16S Ribosomal DNA from Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Bacterial Meningitis in a Clinical Setting. *J. Clin. Microbiol.* 42, 734–740. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.734>
- Scott, T.M., Solutions, H.C., Harwood, V.J., Chivukula, V., 2004. Water for Reuse Reduction of Pathogens , Indicator Bacteria, and Alternative Indicators by Wastewater Treatment and Reclamation Processes. <https://doi.org/10.2166/ws.2003.0069>
- 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 7, 249–259. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00702.x>
- Shen, Z., Duan, C., Zhang, C., Carson, A., 2013. Using an intervening sequence of *Faecalibacterium* 16S rDNA to identify poultry feces. *Water Res.* 47, 6415–6422. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.013>

- Shuval, H., 2003. Estimating the global burden of thalassogenic diseases : human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. *J. Water Health* 0.1, 53–64. <https://doi.org/10.2166/wh.2003.0007>
- Signoretto, C., Burlacchini, G., Lleo, M., Pruzzo, C., Zampini, M., Pane, L., Franzini, G., Canepari, P., 2004. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the Nonculturable State to Plankton Is the Main Mechanism Responsible for Persistence of This Bacterium in both Lake and Seawater 70, 6892–6896. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6892>
- Silva, C., Calva, E., Maloy, S., 2014. The source of current H7N9 infection in humans., in: *Chin. Sci. Bull. (Ed.), One Health: People, Animals, and the Environment*. American Society for Microbiology, Washington. pp. 137–148.
- Sobsey, M.D., Perdue, R., Overton, M., Fisher, J., 2003. Factors influencing faecal contamination in coastal marinas. *Water Sci. Technol.* 47, 199–204. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0195>
- Sogin, L. M., Morrison, G. H., Huber, A. J., Welch, M. D., Huse, M. S., Neal, R. P., Arrieta, M. J., Herndl, G. J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12115–12120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>
- Sokolova, E., Astrom, J., Pettersson, T.J., Bergstedt, O., Hermansson, M., 2012. Decay of Bacteroidales genetic markers in relation to traditional fecal indicators for water quality modeling of drinking water sources. *Environ. Sci. Technol. Sci. Technol.* 46, 892–900. <https://doi.org/10.1021/es2024498>
- 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 Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.012>
- Song, K., Brewer, A., Ahmadian, S., Shankar, A., Detweiler, C., Burgin, A.J., 2017. Using unmanned aerial vehicles to sample aquatic ecosystems. *Limnol. Oceanogr. Methods* 15, 1021–1030. <https://doi.org/10.1002/lom3.10222>
- Stachler, E., Akyon, B., Carvalho, N.A. De, Ference, C., Bibby, K., 2018. molecular indicators of human fecal pollution in an impacted urban watershed Correlation of crAssphage qPCR markers with culturable and molecular indicators of human fecal pollution in an impacted urban watershed. *Environ. Sci. Technol.* 52, 7505–7512. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00638>
- Stachler, E., Bibby, K., 2014. Metagenomic Evaluation of the Highly Abundant Human Gut Bacteriophage CrAssphage for Source Tracking of Human Fecal Pollution. *Sci. Technol. Lett.* 1, 405–409. <https://doi.org/10.1021/ez500266s>
- Staley, Z.R., Chuong, J.D., Hill, S.J., Grabuski, J., Shokralla, S., Hajibabaei, M., Edge, T.A., 2018. Fecal source tracking and eDNA profiling in an urban creek following an extreme rain event. *Sci. Rep.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32680-z>

- Stoeckel, D.M., Harwood, V.J., 2007. MINIREVIEW Performance , Design , and Analysis in Microbial Source Tracking Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2405–2415. <https://doi.org/10.1128/AEM.02473-06>
- Tartera, C., Jofre, J., ., 1987. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1632–1637. <https://doi.org/10.1128/aem.53.7.1632-1637.1987>
- Teeling, H., Fuchs, B., Bennke, C., Krüger, K., Chafee, M., Kappelmann, L., Al., E., 2016. Recurring patterns in bacterioplankton dynamics during coastal spring algae blooms. *Elife* 5, e11888. <https://doi.org/10.7554/eLife.11888>
- Telford, R.J., Vandvik, V., Birks, H.J.B., 2006. Dispersal limitations matter for microbial morphospecies. *Science*. *Science* (80-.). 312, 1015. <https://doi.org/10.1126/science.1125669>
- Terada, A., Morita, Y., Hashimoto, T., Mori, T., Ohba, T., Yaguchi, M., Kanda, W., 2018. Water sampling using a drone at Yugama crater lake, Kusatsu-Shirane volcano, Japan. *Earth, Planets Sp.* 70, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40623-018-0835-3>
- Thi, H., Nguyen, M., Thi, Q., Le, P., Garnier, J., Janeau, J., 2016. Seasonal variability of faecal indicator bacteria numbers and die-off rates in the Red River basin , North Viet Nam. *Nat. Publ. Gr.* 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep21644>
- Thingstad, T.F., 2000. Elements of a Theory for the Mechanisms Controlling Abundance, Diversity, and Biogeochemical Role of Lytic Bacterial Viruses in Aquatic Systems. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1320–1328. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1320>
- Thoe, W., Gold, M., Griesbach, A., Grimmer, M., Taggart, M.L., Boehm, A.B., 2014. ScienceDirect Predicting water quality at Santa Monica Beach : Evaluation of five different models for public notification of unsafe swimming conditions. *Water Res.* 67, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.001>
- Thoe, W., Lee, O.H.K., Leung, K.F., Lee, T., Ashbolt, N.J., Yang, R.R., Chui, S.H.K., 2018. Twenty fi ve years of beach monitoring in Hong Kong : A re-examination of the beach water quality classi fi cation scheme from a comparative and global perspective. *Mar. Pollut. Bull.* 131, 793–803. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.002>
- Toledo-arana, A., Valle, J., Solano, C., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Penade, R., Agrobiotecnologi, I. De, 2001. The Enterococcal Surface Protein , Esp , Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation 67, 4538–4545. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4538>
- Tourret, J., Willing, Benjamin P Croxen, M.A., Dufour, N., Dion, S., Wachtel, S., Denamur, E., Finlay, B.B., 2016. Small Intestine Early Innate Immunity Response during Intestinal Colonization by *Escherichia coli* Depends on Its Extra-Intestinal Virulence Status. *PLoS One* 11. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0153034>

- USEPA, 2009. Review of Published Studies to Characterize Relative Risks from Different Sources of Fecal Contamination in Recreational Water. Off. Water, United States Environ. Prot. Agency, Washingt. D.C.
- Vadde, K.K., Mccarthy, A.J., Rong, R., Sekar, R., Walsh, D.A., 2019. Quantification of Microbial Source Tracking and Pathogenic Bacterial Markers in Water and Sediments of Tiaoxi River (Taihu Watershed) 10, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00699>
- Van der Wal, T., Abma, B., Viguria, A., Previnaire, E., Zarco-Tejada, P.J., Serruys, P., van Valkengoed, E., van der Voet, P., 2013. Fieldcopter: unmanned aerial systems for crop monitoring services., in: Agriculture, P. (Ed.), European Conference on Precision Agriculture. Lleida, Spain, pp. 169–175.
- Vernozy-rozand, C., Montet, M.-P., 2005. *Escherichia coli* O157:H7, 2e éd. Col. ed.
- Verzani, J., 2014. Using R for Introductory Statistics Hardcover, 2nd, Secon ed. CRC Press.
- Viau, E.J., Goodwin, K.D., Yamahara, K.M., Layton, B.A., Burns, L., Tong, H., Wong, S.H.C., Sassoubre, L.M., Lu, Y., Boehm, A.B., 2011. Bacterial pathogens in Hawaiian coastal streams d Associations with fecal indicators , land cover , and water quality 5, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.033>
- Vörösmarty, C.J., Mcintyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Vo, C.J., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., Davies, P.M., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467, 7. <https://doi.org/10.1038/nature09440>
- Wade, T.J., Calderon, R.L., Sams, E., Beach, M., Brenner, K.P., Williams, A.H., Dufour, A.P., 2006. Rapidly measured indicators of recreational water quality are predictive of swimming-associated gastrointestinal illness. *Environ. Health Perspect.* 114 |, 5. <https://doi.org/10.1289/ehp.8273>
- Walk, S., Alm, E., Calhoun, L., Mladonicky, J., Whittam, N., 2007. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Env. Microbiol* 9, 2274–2288. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01341.x>
- Walters, W., Hyde, E.R., Berg-lyons, D., Ackermann, G., 2015. Transcribed Spacer Marker Gene Primers. *Am. Soc. Microbiol.* 1, 1–10. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15.Editor>
- Wang, D., Farnleitner, A.H., Field, K.G., Green, H.C., Shanks, O.C., Boehm, A.B., 2013. Enterococcus and *Escherichia coli* fecal source apportionment with microbial source tracking genetic markers e Is it feasible? *Water Res.* 47, 6849–6861. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.058>
- Wang, L., Liu, L., Zheng, B., Zhu, Y., Wang, X., 2013. Analysis of the bacterial community in the two typical intertidal sediments of Bohai Bay , China by pyrosequencing. *Mar. Pollut. Bull.* 72, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.04.005>

- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Watts, A.C., Ambrosia, V.G., Hinkley, E.A., Field, M., 2012. *Remote Sensing* 1671–1692. <https://doi.org/10.3390/rs4061671>
- Weiskerger, C.J., Brandao, J., Ahmed, W., Aslan, A., Avolio, L., Badgley, B.D., Boehm, A.B., Edge, T.A., Fleisher, J.M., Heaney, C.D., Jordao, L., Kinzelman, J.L., Klaus, J.S., Pierre, J., Kleinheinz, G.T., Robinson, C., Phanikumar, M.S., Piggot, A.M., Pitk, T., Sadowsky, M.J., Staley, C., Staley, Z.R., Symonds, E.M., Vogel, L.J., Yamahara, K.M., Whitman, R.L., Solo-gabriele, H.M., Harwood, V.J., 2019. Impacts of a changing earth on microbial dynamics and human health risks in the continuum between beach water and sand. *Water Res.* 162, 456–470. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.07.006>
- Weyhenmeyer, G.A., Müller, R.A., 2016. Sensitivity of freshwaters to browning in response to future climate change 225–239. <https://doi.org/10.1007/s10584-015-1514-z>
- Whiley, H., Austin, J., Da Silva, G.M., Ross, K., 2018. Faecal indicator bacteria present in sand at south port beach, south Australia. *J. Coast. Res.* 34, 215e219. <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-16-00183.1>
- Whitman, R.L., Harwood, V.J., Edge, T.A., Nevers, M.B., Byappanahalli, M., Vijayavel, K., Brandão, J., Sadowsky, M.J., Alm, E.W., Crowe, A., Ferguson, D., Ge, Z., Halliday, E., Kinzelman, J., Kleinheinz, G., Przybyla-Kelly, K., Staley, C., Staley, Z., Solo-Gabriele, H.M., 2014. Microbes in beach sands: Integrating environment, ecology and public health. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 13, 329–368. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9340-8>
- Whitman, R.L., Nevers, M.B., 2003. Foreshore Sand as a Source of *Escherichia coli* in Nearshore Water of a Lake Michigan Beach. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5555–5562. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5555>
- Whitman, R.L., Nevers, M.B., Byappanahalli, M.N., Al, W., 2006. Examination of the Watershed-Wide Distribution of *Escherichia coli* along Southern Lake Michigan : an Integrated Approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7301–7310. <https://doi.org/10.1128/AEM.00454-06>
- Whittam, T.S., Ochman, H., Selander, R.K., 1983. Geographic components of linkage disequilibrium in natural populations of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 1, 67–83. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040302>
- Wich, S.A., Koh, L.P., 2018. *Conservation Drones: Mapping and Monitoring Biodiversity.*, Oxford University Press, New York. Oxford Scholarship. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198787617.001.0001>
- Williamson, C.E., Madronich, S., Lal, A., Zepp, R.G., Lucas, R.M., Overholt, E.P., et al., 2017. Climate change-induced increases in precipitation are reducing the potential for solar ultraviolet radiation to inactivate pathogens in surface waters. *Sci. Rep.* 7, 12.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13392-2>

- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary. *Mol. Microbiol.* 60, 1136–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>
- Wong, K., Fong, T.T., Bibby, K., Molina, M., 2012. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ. Int.* 45, 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.02.009>
- World Health Organization, 2003. Guidelines for safe recreational water. Geneva, Switzerland.
- Worm, B., Barbier, E.B., Beaumont, N., Duffy, J.E., Folke, C., Halpern, B.S., Jackson, C.J.B., Lotze, K.H., Micheli, F., Palumbi, S.R., Sala, E., Selkoe, K.A., Stachowicz, J.J., Watson, Reg, 2006. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* (80-.). 3, 787–90. <https://doi.org/10.1126/science.1132294>
- Wu, M.Z., O’Carroll, D.M., Vogela, L.J., Robinson, C., 2017. Effect of low energy waves on the accumulation and transport of fecal indicator bacteria in sand and pore water at freshwater beaches. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2786–2794. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05985>
- Yahya, M., Blanch, A.R., Meijer, W.G., Antoniou, K., Hmaied, F., Ballesté*, E., 2017. Comparison of the Performance of Different Microbial Source Tracking Markers among European and North African Regions. *J. Environ. Qual.* 46, 760–766. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.11.0432>
- Yang, J., Jiang, H., Wu, G., Liu, W., Zhang, G.J., 2016. Distinct factors shape aquatic and sedimentary microbial community structures in the lakes of western China. *Front. Microbiol.* 7, 1782. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01782>
- Yilmaz, P., Parfrey, L., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F., 2014. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Acids Res.* 42, D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Yu, L., Zhang, Y. J., W., Liu, L.M., Yang, J., 2015. Determining microeukaryotic plankton community around Xiamen Island, Southeast China, using Illumina MiSeq and PCR-DGGE techniques. *PLoS One* 10, e0127721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127721>
- Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W.H., Run, J., Wei, C.L., Wee, S., Soh, L., Hibberd, M.L., Liu, E.T., Rohwer, F., Ruan, Y., 2006. RNA Viral Community in Human Feces: Prevalence of Plant Pathogenic Viruses. *PLoS Biol.* | 4, 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040003>
- Zhang, Y., Wu, R., Lin, K., Wang, Y., Lu, J., 2020. Performance of host-associated genetic markers for microbial source tracking in China. *Water Res.* 175, 115670. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115670>
- Zimmer-Faust, A.G., Thulsiraj, V., Marambio-Jones, C., Cao, Y., Griffith, J.F., Holden, P.A., Jay,

J.A., 2017. Effect of freshwater sediment characteristics on the persistence of fecal indicator bacteria and genetic markers within a Southern California watershed. *Water Res.* 119, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.028>

ANNEXES

Annexe 1

Préparation des échantillons pour la diversité bactérienne

I/ Préparation des solutions de fixation pour le terrain

1- Solution tampon

1-1 EDTA (0,5M) : L'EDTA se dissout à pH basique (≥ 8)

Utiliser de l'EDTA **disodium salt dihydrate**

1/ Dans un flacon de 500ml, peser 93,03g d'EDTA . 2H₂O et y ajouter 400ml eau MilliQ

2/ Mettre sur l'agitateur thermique jusqu'à dissolution

3/ Ajouter 15g de NaOH pellets (pastilles) ou NaOH solution (mettre moins de 15g : réaction exothermique)

4/ Ajuster le pH à 8 et compléter à 500ml avec de l'eau MilliQ

- Conserver à 4°C

1-2 Sodium citrate

1/ Dans un flacon de 250ml peser 73,525g de sodium citrate (**Sigma E-6635 C₁₀H₁₄N₂O₈ 2H₂O**) + 200ml d'eau MilliQ

2/ Mettre sur l'agitateur thermique jusqu'à dissolution puis ajuster à 250ml avec de l'eau MilliQ

- Conserver à 4°C

2- Solution de RNAlater

Le RNAlater sert à la préservation des ARN le temps de la filtration. La vaisselle doit être bien stérile et autoclavée.

⇒ Pour préparer 1,5L

1/ Peser 700g d'ammonium sulfate (CMS 7783-20-2 A4418-5kg) dans un flacon de 2 litres

2/ Ajouter 935ml d'eau MilliQ autoclavée

3/ Agiter jusqu'à dissolution

4/ Ajouter 25ml de sodium citrate 1M

5/ Ajouter 40ml d'EDTA (0,5M)

6/ Après dissolution totale le pH est à 7,7 ; il faut l'ajuster à 5,2 en utilisant du H₂SO₄ (acide sulfurique) concentré (goutte par goutte)

7/ Compléter le volume à 1,5L

- Stocker à 4°C dans la chambre froide dans le bac ICOMABIO.

Annexe 2

Date d'application	05/02/2020	Rédaction	H Frappereau G Peyrat	Vérification / Approbation	SDU	Diffusion	STE
--------------------	------------	-----------	----------------------------------	----------------------------	------------	-----------	------------

SOMMAIRE

I - METHODE

I - 1 - Introduction

I - 2 - Objet et domaine d'application

I - 3 - Principe d'analyse

- 4 - Références

- MODE OPERATOIRE

II - 1 - Gestion des échantillons à réception II - 2 – Préparation des échantillons II - 2 - a - Préparation de l'échantillon vierge

II - 2 - b - Préparation de l'échantillon dopé

II - 2 - c - Extraction sur cartouche manuelle – SPE offline

II - 2 - d - Extraction sur cartouche automatisée – SPE offline

II - 2 – e - Fin de préparation de l'échantillon après extraction SPE

II - 3 - Préparation de la série d'analyse

II - 3 - a - Préparation de la gamme d'étalonnage et QC

II - 3 - b - Préparation des contrôles extraits

II - 3 - c - Préparation des phases mobiles pour HPLC

II - 3 - d - Préparation de la chaîne analytique (HPLC + MSMS)

II - 4 - Création de la séquence d'analyse

- 5 - Lancement de la série d'analyse

- INTERPRETATION DE LA SERIE

III - 1 - Interprétation de la série sur le Browser

III - 2 - Exporter les données

- 3 - Exploitation des résultats

- NETTOYAGE

- TRAITEMENT DES ECARTS

- LOGIGRAMME DECISIONNEL

AVERTISSEMENT SET PRECAUTIONS DE SECURITE

DES GANTS DOIVENT ETRE UTILISES LORS DE LA MANIPULATION DES

SUBSTANCES DE REFERENCES ET CE QUELLES QUE SOIENT LEURS CONCENTRATIONS. IL EST CONSEILLE D'UTILISER UN MASQUE DE PROTECTION AVEC LES POUDRES ET LES SOLUTIONS COMMERCIALES AINSI QUE DE TRAVAILLER SOUS HOTTE ASPIRANTE DES QUE POSSIBLE TOUT AU LONG DE LA MANIPULATION.

I - METHODE.

I.1 – Introduction.

Cette procédure décrit le principe de l'analyse multi-résidus en chromatographie en phase liquide avec détection en spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS) pour des molécules de Médicaments et autres substances de soins corporels en matrice Eaux de mer. Elle est appliquée par le technicien en chromatographie.

I.2 – Objet et domaine d'application.

La présente procédure décrit une méthode d'extraction et d'analyse pour le dosage de certains composés médicamenteux et de soins corporels présents dans les eaux de mer. Les molécules recherchées pour lesquelles s'applique cette procédure sont les suivantes :

1- Hydroxyibuprofène	Kétoprofène
2- Hydroxyibuprofène	Méthyl parabène
2-(3 trifluorométhylphénoxy)nicotinamide = Acide niflumique	Métronidazole
Acide fénofibrique	Norethindrone
Caféine	Oxazepam
Carbamazépine	Paracétamol = Acétaminophène
Cyclophosphamide	Propyl parabène
Diclofenac	Sotalol
Ethyl parabène	Tramadol
Ibuprofène	

I.3 – Principe d'analyse.

Qualification et quantification par chromatographie liquide haute performance couplée à un triple quad. Cette analyse se fait en injection directe.

I.4 – Références.

- Norme NFT 90-210 « Validation d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence ».

- Procédure générale de préparation et de nettoyage du consommable utilisé en chimie
INS-METH-LOGIS-19016
- Procédure d'utilisation du chromatographe en phase liquide PUHPLC couplé à la spectrométrie de masse en tandem **INS-MATE-CHIMT-19009**
- Procédure de préparation et de stockage des échantillons dans le secteur Hydrologie
INS-ESSA-DOHYE-19001
- Procédure de gestion des produits soumis à déclaration préalable **INS-CONS-TULLE19001-b**
- Registre de suivi des substances stupéfiantes et psychotropes **ENR-HYSE-TULLE19033-a**
- Procédure générale de nettoyage des locaux, des équipements et des tenues de travail
INS-LOCO-LOGIS-19004
- Procédure d'exploitation des essais inter laboratoires en Hydrologie
PRO-QUAL-DOHYE-19004
- Procédure générale de vérification des volumes **INS-METR-TULLE-19026**

– **MODE OPERATOIRE.**

– **Gestion des échantillons à réception.**

L'échantillon est prélevé dans un flaconnage spécifique en polypropylène (PP) de 250mL. A l'arrivée de l'échantillon au laboratoire, il est stocké au congélateur (salle 414) à 18°C et à l'obscurité.

– **Préparation des échantillons.**

Décongeler l'échantillon 12h avant l'extraction en chambre froide. Pour chaque échantillon, un ajout dosé à 0.100 µg/L sera préparé de la même façon que l'échantillon vierge.

Consommables et solvants :

Digitube 50mL avec bouchon
 Seringue 20mL sans aiguille
 Filtre STERIVEX™ HV 0.45 micron FILTER UNIT
 Pot pH 125 mL en PP
 Tube en verre à usage unique
 Pipette pasteur en plastique à usage unique
 Cartouches OASIS® HLB 3CC (60mg) Extraction Cartridges
 Vials en verre WATERS

Eau Ultrapure EUP
Eau d'EVIAN®
MeOH
HCl 1N

II.2. a - Préparation de l'échantillon vierge

Prélever environ 50 mL d'échantillon avec un digitube 50mL

Filtrer les 50 mL d'échantillon dans un pot pH préalablement identifié avec le N° éch F Mettre à pH 2 avec du HCl 1N

NB : Les filtrations seront réalisées avec une seringue de 20mL munie d'un filtre STERIVEX™ HV 0.45 micron FILTER UNIT

II.2.b. - Préparation de l'échantillon dopé

Prélever précisément 50 mL d'échantillon avec un digitube 50mL

Doper les 50 mL à 0.100 µg/L avec 50 µL de SF2 GAM EDM (cf § II.3.a. Préparation de la gamme et QC)

Filtrer les 50 mL d'échantillon dans un pot pH préalablement identifié avec N° éch AD F Mettre à pH 2 avec du HCl 1N

NB : Préparer un flacon d'EUP à pH 2 (500 mL pour 40 cartouches) lors de la mise à pH des échantillons vierges et dopés.

L'extraction des molécules peut être réalisée manuellement dans le service hygiène alimentaire (cf § II.2.c Extraction sur cartouche manuelle – SPE offline) ou en automatique à l'aide de l'appareil GILSON situé dans le service MPO dans la salle 409 (cf § II.2.d Extraction sur cartouche automatisée – SPE offline).

II.2.c - Extraction sur cartouche manuelle – SPE offline

L'extraction sur cartouche est réalisée avec du MeOH et de l'EUP à pH2. Des cartouches OASIS® HLB 3CC (60mg) Extraction Cartridges sont utilisées pour la SPE.

Préparer un Vac Elut avec le nombre de cartouches à réaliser. Vérifier qu'une pompe à vide est proche et fonctionnelle de la hotte de manipulation, elle servira pour l'amorçage des cartouches et le séchage. Pour faciliter le chargement de l'échantillon filtré sur la cartouche, prélever 5 mL d'échantillon filtré dans un tube en verre préalablement identifié et utiliser une pipette pasteur pour le transfert du tube en verre vers la cartouche.

Les étapes à réaliser sur la cartouche sont les suivantes :

Conditionnement de la cartouche	1mL de MeOH
Equilibrage	2 x 3 mL d'EUP pH 2
Chargement de l'échantillon filtré pH2	5mL
Rinçage	2 x 2.5 mL d'EUP pH2

Séchage de la colonne 5 min

Elution 2 x 1mL de MeOH

Pour les étapes de conditionnement, d'équilibrage et de chargement de l'échantillon aucun tube ne sera placé sous les cartouches, le mélange sera mis dans un bac de récupération des déchets chimiques.

Pour l'étape d'élution un tube en verre préalablement identifié sera positionné sous la cartouche afin de récupérer l'extrait d'environ 2 mL.

II.2.d - Extraction sur cartouche automatisée – SPE offline

Prélever 6 mL d'échantillon filtré pH2 dans un tube en verre à usage unique préalablement identifié
Préparer un flacon en verre brun de 125 mL avec du MeOH Préparer 3 flacons en verre brun de 125 mL avec de l'EUP à pH2


Munir les cartouches SPE d'un bouchon et les positionner sur le portoir prévu

/ ! \ ATTENTION au sens de positionnement de la cartouche

Positionner les tubes en verre Gilson préalablement identifiés sur un portoir 103, afin de récupérer l'extrait

Préparer un flacon 1L rempli d'EUP pour les purges et les rinçages de l'aiguille de l'appareil Gilson.

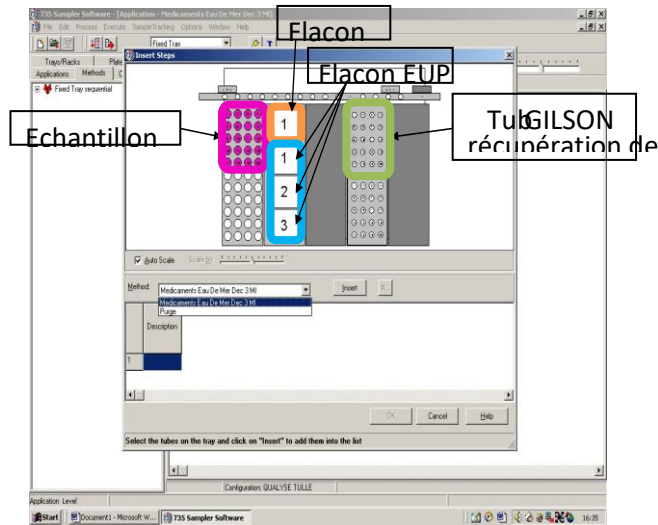
Positionner les tubes en verre avec les échantillons sur le portoir 22 puis les flacons en verre avec le MeOH et l'EUP pH2 sur le portoir 61, les cartouches SPE muni d'un bouchon et les tubes en verre GILSON (portoir 103) à l'endroit prévu.

 Vérifier que le tube en verre avec l'échantillon filtré pH2 correspond avec le tube de récupération (même N°ECH sur les 2 tubes)

NB : Le flacon de rinçage est à changer à chaque lancement de série d'extraction sur cartouche

Une séquence permet de réaliser 20 extractions sur cartouches

Mettre le matériel sous tension et ouvrir l'arrivée d'Azote située au mur



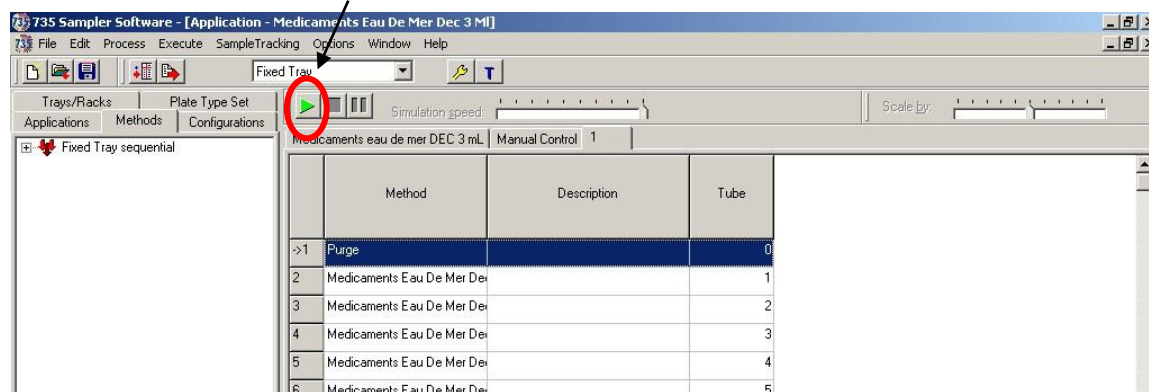
L'appareil GILSON est piloté à l'aide du logiciel « 735 Sampler Software ».

A vérifier avant chaque lancement de séquence :

- Présence d'une ligne avec la méthode de purge au début de la séquence
- Présence des tubes en verre avec les échantillons filtrés pH2 (correctement positionnés sur le portoir)
- Présence des cartouches SPE avec bouchon et qu'elles soient correctement placées
- Présence des tubes de collecte annotés avec le N°ECH correspondant
- Présence de suffisamment de solvant
- Le bidon de récupération ne doit pas être plein et bien positionné
- Ouverture de la vanne de gaz

Après avoir vérifié les différents points ci-dessus la série d'extraction peut être lancée.

Lancement série d'extraction



Lorsque la série d'extraction est terminée :

Récupérer les tubes en verre Gilson où se trouvent les extraits.

Transférer chaque extrait dans un tube en verre préalablement identifié
Rincer le tube en verre Gilson avec 200 µL de MeOH – Répéter l'opération 2 fois.

II.2.e – Fin de préparation de l'échantillon après extraction SPE

Evaporer sous azote l'extrait pour descendre à un volume d'environ 500µL – température du bain à 47°C – évaporation pendant environ 8 min

Ajouter 100 µL d'eau EVIAN à l'extrait dans le tube en verre

Vortexer

Transférer l'extrait dans un vial en verre WATERS préalablement identifié EDM N° éch Rincer le tube en verre avec 200 µL de MeOH – Répéter l'opération 2 fois

Evaporer le reste de MeOH jusqu'à atteindre un volume final de 100 µL – température 47°C – évaporation pendant environ 20 min

Ajouter 1390 µL d'eau EVIAN dans le vial (2 x 695 µL)

Volume final 1490 µL - ce volume est à répartir dans deux vials afin d'avoir un vial de garde qui sera conservé au congélateur et un vial pour l'analyse conservé au réfrigérateur.

Vial de garde : Prélever 745 µL dans un vial WATERS identifié EDM N° éch – vial à conserver au congélateur

Vial analyse : Conserver au frigo le vial avec les 745 µL d'extrait restants qui servira pour l'analyse.

II.3 – Préparation de la série d'analyse.

Tous les réactifs et produits utilisés doivent être d'une pureté analytique suffisante et connue afin de ne pas donner lieu à l'apparition de pics interférents.

Les principaux médicaments sont disponibles commercialement sous la forme de poudre ou de liquide, en unitaire ou en mélange.

Les différentes substances commerciales sont stockées à 20°C salle 323, 4°C ou -18°C salle 422 selon les spécifications fournies par le fabricant sur le certificat d'analyse.

Les solutions à façon (unitaire ou mélange) sont suivies par un contrôle de la masse de leur flaconnage afin de remédier aux incertitudes relatives à l'évaporation du solvant. Après réception de la solution ou lors de sa préparation, avant ainsi qu'après chaque utilisation, la masse de l'ensemble Flaconnage + Solution doit être contrôlée afin de pouvoir, le cas échéant, compléter la masse avec le solvant de dilution lors de l'utilisation suivante.

L'oxazépam est une substance soumise à réglementation et doit faire l'objet d'une autorisation de détention au sein du laboratoire (article R.5132-88 du code de la Santé Publique). Elle est classée comme psychotrope. Nous avons une autorisation pour acquérir, détenir et mettre en œuvre la molécule sous ce conditionnement :

OXAZEPAM 1mg/ml : 1 ampoule de 1ml dosée à 1 mg/ml d'Oxazépam. Cette autorisation est à renouveler à chaque commande du produit.

Une fiche de suivi d'utilisation du réactif doit être remplie à chaque utilisation. Cette fiche est référencée ENR-HYSE-TULLE-19033-a.

Les solutions Gamme et QC sont indépendantes : faites soit par pesées indépendantes soit proviennent d'une source différente à l'exception de l'oxazépam (solution interne par pesée, commerciale...)

Préparation des solutions de la gamme à partir de :

2 solutions internes par pesée de poudre de 10 mg dans 100 mL d'ACN : SM1 GAM MED 100ppm (9 composés),
SM4 GAM MED 100ppm (5 composés)
1 solution interne par pesée de poudre de 5 mg dans 50 mL d'ACN : SM GAM Carbamazépine Epoxyde 100ppm
1 solution interne par pesée de poudre de 5mg dans 50 mL de MeOH : SM2 GAM MED 100ppm (7 composés)
1 solution interne par pesée de poudre de 10 mg dans 100 mL de MeOH : SM3 GAM MED 100ppm (9 composés)
1 solution commerciale d'Oxazepam à 1000ppm unitaire de chez Sigma Aldrich conservée à -18°C pendant la durée indiquée par le fournisseur

Préparation des solutions QC :

† La solution QC MED MIX est préparée à partir de :

1 solution commerciale « PHARMA-MIX 28 » à 100 ppm de chez LGC Standard dans le MeOH conservée à 4°C pendant la durée indiquée par le fournisseur

1 solution commerciale « Diclofenac sodium salt » à 100 ppm de chez LGC Standard dans le MeOH conservée à 4°C pendant la durée indiquée par le fournisseur ou une solution interne par pesée de poudre 10mg dans 100mL de MeOH.

1 solution interne dans le MeOH MIX 6 composés ou 6 solutions unitaires internes (Theophylline, Iopromide, Valsartan, Methyl Parabene, Ethyl Parabene, Propyl Parabene) (pesées de poudres : 10mg dans 100mL de MeOH)

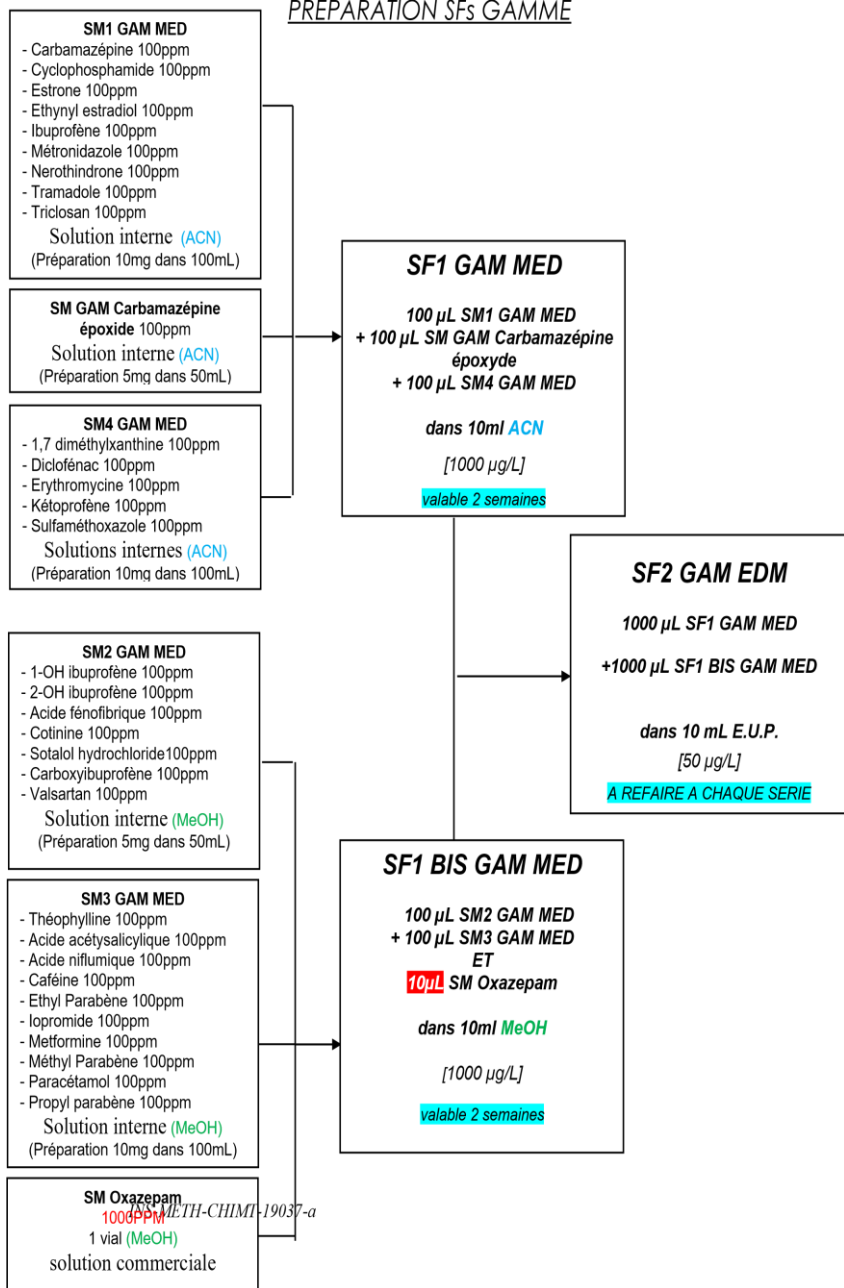
1 solution commerciale d'Oxazepam à 1000 ppm unitaire de chez Sigma Aldrich conservée à -18°C pendant la durée indiquée par le fournisseur

Au regard du prix d'achat et des conditionnements faibles des poudres, la préparation des solutions mères pourra être aménagée selon les tests de poudres réalisés et validés.

II.3.a – Préparation de la gamme d'étalonnage et QC

Préparer les Solutions filles de l'étalonnage

PREPARATION SFs GAMME



Préparation de la gamme d'étalonnage.

 Réalisation des solutions en Matrice Evian


□ Mettre 100 mL d'Eau d'EVIAN dans les flacons en PP
12 au total pour blanc + gamme + Qc
Réaliser les dopages comme indiqué ci-dessous.

Niveaux de calibration	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
[conc.] µg/L	0.02	0.03	0.050	0.100	0.150	0.200	0.300	0.500	0.750	1
V SF2 GAM MED (µL)	20	30	50	100	150	200	300	500	750	1000
V EVIAN.	QSP 100 mL d'eau EVIAN.									

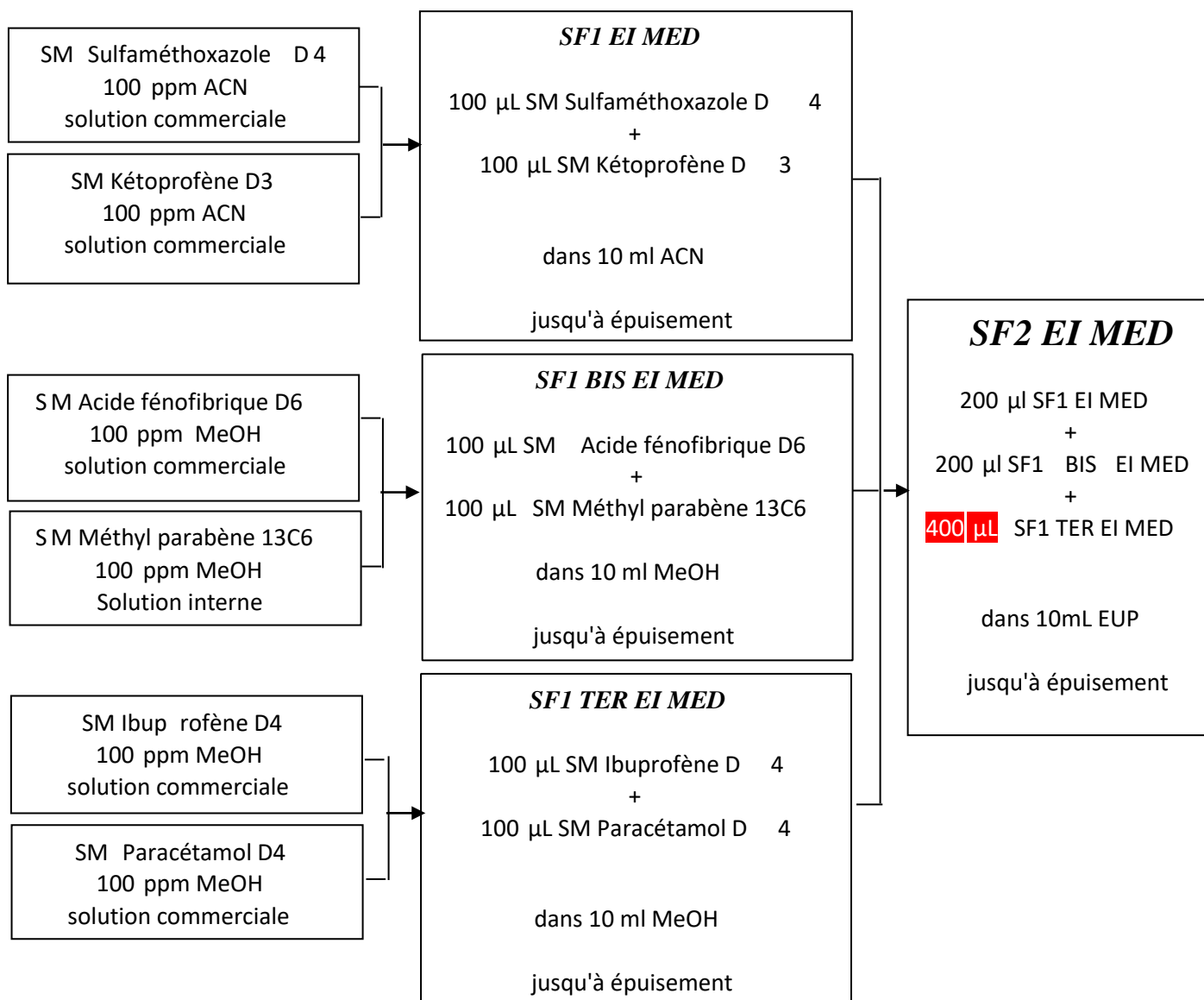
Homogénéiser le flacon

Préparer un flacon de rinçage (blanc) avec 100 mL d'eau EVIAN
Prélever 745 µL dans des vials en verre Shimadzu préalablement identifiés.

Préparation des contrôles qualité (Qc).

 Réalisation de la SF1 dans le MeOH et SF2 dans l'EUP
Préparer une SF1 QC MIX MED puis une SF2 QC EDM
Réaliser des QC de la même façon que le point L4 100ppt

Préparation des Etalons internes.



Ajout des Etalons internes.

Avant injection, introduire 5 µL de solution SF2 EI MED dans chacun des vials (gamme, Qc, Blc, QC ext, Blc extrait, LQ extrait, Echantillons). Vortexer le vial.



Seront préparés pour chaque série d'extraction : - 1 Blanc extrait
3 LQ extrait, concentrations 10, 20, 50ppt
1 QC extrait, concentration 100ppt

Préparation du Blanc extrait :
Prélever 50 mL d'EVIAN avec un digitube 50 mL
Filtrer les 50 mL dans un pot pH
Mettre à pH 2 avec du HCl 1N

Préparation de la LQ10 extrait :

Prélever 50 mL d'EVIAN avec un digitube 50 mL

Doper les 50 mL à 0.010 µg/L avec 5µL de SF2 QC EDM

Filtrer les 50 mL dans un pot pH

Mettre à pH 2 avec du HCl 1N

Préparation de la LQ20 extrait :

Prélever 50 mL d'EVIAN avec un digitube 50 mL

Doper les 50 mL à 0.020 µg/L avec 10µL de SF2 QC EDM

Filtrer les 50 mL dans un pot pH

Mettre à pH 2 avec du HCl 1N

Préparation de la LQ50 extrait :

Prélever 50 mL d'EVIAN avec un digitube 50 mL

Doper les 50 mL à 0.050 µg/L avec 25µL de SF2 QC EDM

Filtrer les 50 mL dans un pot pH

Mettre à pH 2 avec du HCl 1N

Préparation du QC extrait = Rendement :

Prélever 50 mL d'EVIAN avec un digitube 50 mL

Doper les 50 mL à 0.100 µg/L avec 50µL de SF2 QC EDM

Filtrer les 50 mL dans un pot pH

Mettre à pH 2 avec du HCl 1N

Effectuer l'extraction sur cartouche SPE de la même façon que les échantillons (extraction SPE en manuelle § II.2.c ou extraction SPE en automatique § II. 2.d) puis suivre les étapes de fin de préparation comme les échantillons § II.2.e.

II.3.c – Préparation des phases mobiles pour HPLC.

Tous les réactifs et produits utilisés doivent être d'une pureté analytique suffisante et connue afin de ne pas donner lieu à l'apparition de pics interférents.

NB : La qualité des solvants est vérifiée à chaque réception d'un nouveau lot et à chaque série avec les blancs analytiques.

Voie AA : Eau Ultra pure 0.05 % acide acétique (500 µl dans un litre). Laisser agiter pendant 5 minutes et transvaser dans un flacon identifié adapté à la HPLC

Voie BA : Acétonitrile ULTRA GRADIENT HPLC JT baker 0.05 % acide acétique (500 µl dans un litre). Laisser agiter pendant 5 minutes et transvaser dans un flacon identifié adapté à la HPLC

II.3.d – Préparation de la chaîne analytique (HPLC + MSMS).

La séparation des composés est effectuée sur une chaîne HPLC (Nexera x2 Shimadzu) avec une détection en spectrométrie de masse en tandem sur un appareil 8050 LCMSMS Shimadzu.

Colonne analytique utilisée:

Cartouche de garde AJO – 7510 (AQ C18 4*2 mm) de chez Phénomenex

Eclipse Plus C18 3.5µm 2.1x150mm de chez Agilent

Longueur : 150mm

Diamètre : 2,1 mm

Epaisseur film : 3,5µm

Injecteur automatique

Détecteur à spectrométrie de masse en tandem.

Préparation de l'analyseur MSMS.

Ballaster la pompe

Vérifier que la masse soit en standby et contrôler l'état de propreté de la source

+ DL (INS-MATE-CHIMT-19009)

Effectuer un nettoyage si nécessaire de la source

(INS-MATE-CHIMT-19009).

Noter les taches de maintenance effectuées sur le tableau de suivi

Préparation de la chaîne HPLC.

Créer un dossier avec la date du jour pour y copier-coller la méthode à utiliser à partir de la méthode sous

C:\LabSolutions\Data\PROJET 135 EAUX DE MER \

METHODES EDM \ EDM MEDICAMENTS ID EDM



Ouvrir le logiciel et allumer la chaîne analytique (INS-MATE-CHIMT19009).

Charger la méthode copiée et l'activer en cliquant sur « download » (INSMATE-CHIMT-19009).

Purger les voies des modules 1465d-14 et 1465-e-14 (INS-MATE-CHIMT-

19009). Ouvrir les vannes au niveau des 2 pompes et appuyer sur « Pump » et sur « Purge ». Le message purging apparait au niveau de chaque pompe. A la disparition du message, refermer les vannes et réactiver les pompes. Faire également une purge manuelle de la boucle d'injection type R0-R1-R2 Laisser stabiliser pendant au moins 30 minutes et jusqu'à obtention d'une pression stable pour une température du four colonne stable.

II.4 – Création de la séquence d'analyse.

Se reporter à la procédure INS-MATE-CHIMT-19009 pour créer une séquence d'analyse ou REAL TIME BATCH.

Une séquence type doit être composée de la sorte :

Un rinçage

Gamme

Rinçage

Blanc analytique

Blanc extrait

QC 100ppt

QC extrait 100ppt = Rendement

Environ 8 échantillons (vierge +AD)

QC 100ppt

Environ 8 échantillons (vierge +AD)

Rinçage

LQs extraites 10, 20 et 50ppt

QC 100ppt

□ Rinçage

Folder: C:\Lab Solutions\Data\PROJET 135 EAUX DE MER\METHODE EDM

Analysis	Vial#	Tray	Sample Name	Sample Type	Analysis Ty	Method File	Data File	Level	Inj. Volume	Data
1	1	1	R1	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
2	2	1	L1	1:Standard	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	1	100	
3	3	1	L2	1:Standard	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	2	100	
4	4	1	L3	1:Standard	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	3	100	
5	5	1	L4	1:Standard	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	4	100	
6	6	1	L5	1:Standard	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	5	100	
7	7	1	L6	1:Standard	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	6	100	
8	8	1	L7	1:Standard	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	7	100	
9	9	1	L8	1:Standard	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	8	100	
10	10	1	L9	1:Standard	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	9	100	
11	11	1	L10	1:Standard	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	10	100	
12	12	1	R2	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
13	13	1	BLANC	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
14	14	1	QC1	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
15	15	1	BLANC EXT	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
16	16	1	QC EXT	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
17	17	1	ech 1 ext	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
18	18	1	ech 1 D ext	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
19	19	1	ech 2 ext	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
20	20	1	ech 2 D ext	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
21	21	1	ech 3 ext	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
22	22	1	ech 3 D ext	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
23	23	1	ech 4 ext	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
24	24	1	ech 4 D ext	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
25	25	1	ech 5 ext	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	
26	26	1	ech 5 d ext	0:Unknown	MIT MQT	MEDICAMENTS ID EDM_EN PRODUCTION.lcm	uto Filename)	0	100	

Settings

ASCI Conversion File Conversion QA/QC Folder Option Items

General Bracket Data File Name Startup Shutdown

Create filenames automatically with

Prefix: EDM MEDIC

Items List: Batch File Name Selected Items: Sample Name

Batch Table Row#

Programmer un volume d'injection de 100µL.

Mettre la gamme en standard au niveau du Sample Type et renseigner le niveau de calibration dans la colonne Level.

Penser à programmer un « Data File Name » en automatique du type « EDM MEDIC Sample Name ».

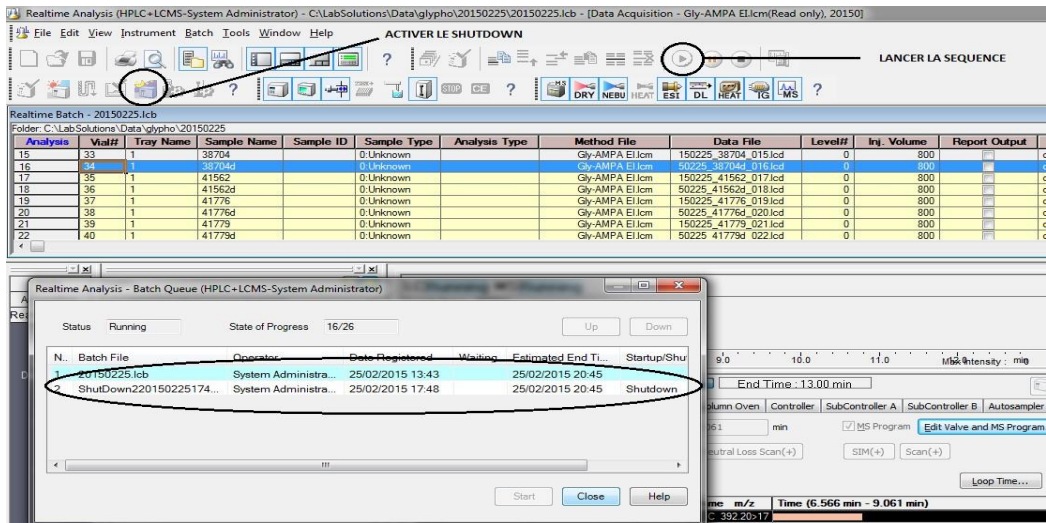
II.5 – Lancement de la série d'analyse.

Se reporter à la procédure INS-MATE-CHIMT- 19009 pour lancer la série d'analyse.

Charger les vials dans le rack-changer.

Lancer les séquences d'analyse en les ajoutant dans la liste des tâches.

Activer le shutdown automatique de l'appareil



- INTERPRETATION DE LA SERIE.

Se reporter à la procédure INS-MATE-CHIMT- 19009 pour l'utilisation du logiciel de retraitement.

- **Interprétation de la série avec le logiciel de retraitement lab solution Insight.**

Ouvrir le logiciel lab solution Insight.



Ouvrir la méthode de la série en cliquant sur load method.

Importer les datas en cliquant sur import puis sélectionner les échantillons.

OU

Ouvrir le batch entier (tous les runs) en cliquant sur Open.

A partir de l'onglet edit cliquer sur integrate batch pour processor les échantillons puis vérifier leurs intégrations.

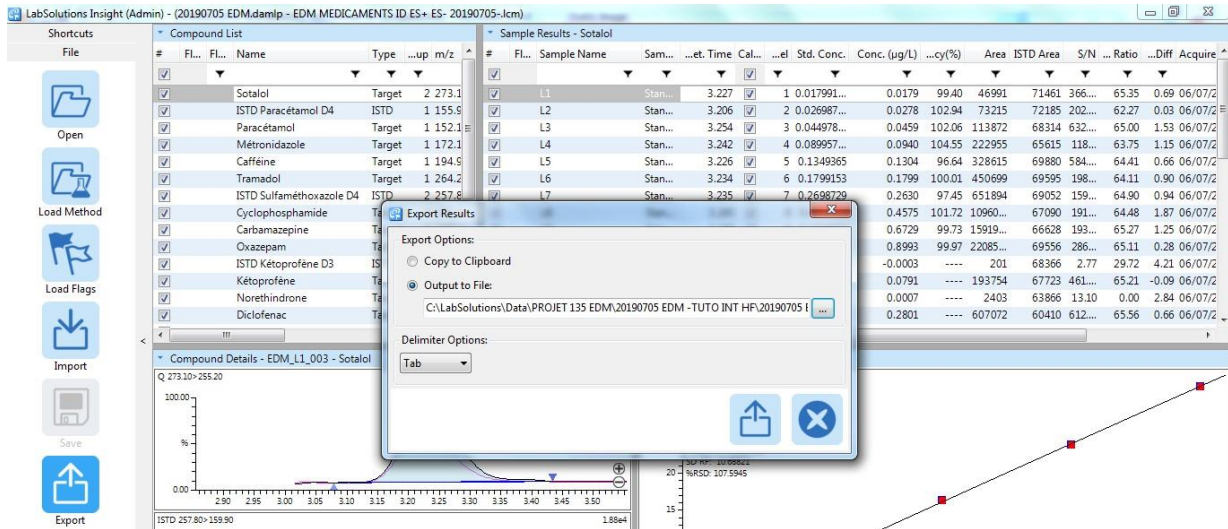
Supprimer les points de gamme aberrants en s'appuyant sur la valeur du coefficient R² ainsi que sur les valeurs « accuracy » (écart des points de gamme à la valeur théorique).

Sauvegarder le projet en cliquant sur save au niveau de l'onglet file.

- **Exporter les données et impression des résultats.**

Exporter les données sous txt en cliquant sur export

Imprimer les résultats par échantillon



Imprimer tous les datas des échantillons.

– **Exploitation des résultats.**

Compléter les cartes de contrôles.

Ouvrir les fichiers SCC4LCMSMS-MEDIC EDM-UU (cartes de contrôles) □ Ouvrir le fichier text de transfert généré par le logiciel de retraitement.

ATTENTION A NE JAMAIS SAUVEGARDER LES MODIFICATIONS ÉVENTUELLES APPORTÉES AU FICHIER AFIN DE GARDER L’ORIGINAL !!!

Compléter les cartes de contrôles avec les informations nécessaires (Tr, Aire du L4 (100ppt), [C] du blanc extrait, du QC extrait (= RDT), des LQs extraites et des QC ainsi que les concentrations théoriques de ces différents contrôles.

Utiliser les macros « effacer cartes » et « créer cartes » et l’aide à l’interprétation du tableau en spécifiant le n° de la série.

Interprétation des cartes de contrôles :

Les cartes sur le temps de rétention, la sensibilité et la pente de l’étalonnage sont justes là à but informatif et permettent de dégager une indication sur un éventuel problème.

Les cartes sur le Qc extrait, LQ extraite et Qc sont à but restrictif.

Carte sur Temps de rétention : permet juste de suivre un éventuel problème HPLC (fuite, vieillissement colonne, erreur dans phase mobile, ...).

Carte sur la sensibilité : Permet de suivre la sensibilité du détecteur. La cible de la carte correspond aux aires moyennes obtenues lors de la validation de la méthode. Néanmoins, le paramètre essentiel est le rapport S/N. Le facteur limitant à une sensibilité moindre est donc la possibilité d'interpréter chromatographiquement la LQ en matrice de chaque série.

Carte sur les pentes de l'étalonnage Evian : Cette carte permet de vérifier la justesse de l'étalonnage et la dégradation de la solution mère. Cette carte n'est là qu'à titre indicatif, la carte sur les contrôles qualité étant là pour vérifier la justesse de l'étalonnage. Néanmoins, la concordance de ces deux cartes permet de cibler la source de l'éventuel défaut de justesse (mauvaise préparation de la gamme, du Qc, dégradation des solutions mères...).

Par exemple, la sensibilité chute et pente et Qc bons : Dégradation de la sensibilité du détecteur. La sensibilité et la pente chute ainsi que Qc fort : Dégradation de la solution d'étalonnage.

Interprétation chromatographique de la LQ extraite : Imprimer le chromatogramme de la LQ extraite et vérifier s'il est interprétable pour chacune des molécules. Cette exploitation permet de vérifier que l'analyseur est assez sensible pour tenir les LQ annoncées. Elever les LQ en conséquence si besoin. Regarder le Rapport Signal/Bruit : il doit être supérieur à 8.

NB : Le responsable de secteur et d'unité sont informés et valident cette modification lors du rendu des résultats et de leurs validations.

Remarque : Pour certaines molécules, le rapport R S/N calculé pour la LQ est très souvent <8 (2-hydroxy-ibuprofène notamment). Regarder l'allure du chromatogramme afin de conclure.

Carte de contrôle sur les Qc extraits (=Rendement) : Cette carte permet de suivre le bon déroulement de l'extraction SPE au cours du temps. Les LQs extraites sont corrigées par ce rendement et par conséquent ces valeurs doivent répondre IMPERATIVEMENT aux critères statistiques définis lors de la validation et reportés en limites sur la carte de contrôle.

Carte de contrôle sur la LQ extraite : Cette carte permet de vérifier la justesse de l'étalonnage à la LQ et donc pour les échantillons. Les résultats de ce contrôle en EVIAN® dopé à la LQ sont impactés par les rendements (la carte l'impacte automatiquement).

Carte de contrôle sur les Contrôles Qualité Evian : Cette carte est là pour vérifier la justesse de l'étalonnage tout au long de la série.

Exploitation du blanc analytique : Un blanc analyse Evian est réalisé à chaque série afin de vérifier l'absence de contamination pouvant impacter le résultat sur les échantillons. Le blanc doit être inférieur à ½ LQ afin de limiter l'impact sur les échantillons à la LQ et répondre néanmoins aux critères spécifiques de la NFT 90-210 imposant un écart maximal d'exactitude à la LQ de 60 %.

Exploitation du blanc extrait : Un blanc extrait Evian est réalisé à chaque série afin de vérifier l'absence de contamination pouvant impacter le résultat sur les échantillons. Le blanc extrait doit être inférieur à ½ LQ en prenant en compte le facteur de pré-concentration afin de limiter l'impact sur les échantillons à la LQ et répondre néanmoins aux critères spécifiques de la NFT 90-210 imposant un écart maximal d'exactitude à la LQ de 60 %.

Remarque n°1 : Se reporter au logigramme décisionnel pour plus d'explications. Tout écart par rapport à ce logigramme doit faire l'objet d'une fiche d'écart ou au minimum être justifié sur la fiche d'interprétation (pour les cas n'ayant pas d'impact sur le rendu des résultats).

*Remarque n°2 : Les limites des cartes de contrôles ont été définies à partir :
Des incertitudes spécifiques de la méthode pour les cartes sur le Q_c extrait (=RDT) et LQ extraite.
Des incertitudes spécifiques de la méthode pondérées à 75 % pour la carte sur les Q_c (car pas de matrice réelle).
Fixés arbitrairement à +/- 30 % pour les cartes sur sensibilité et pente.
Fixés normativement pour la carte sur les temps de rétention.*

NB : la méthode n'est pas validée, les incertitudes ont été choisies et fixées en attendant d'obtenir les valeurs réelles issues de la validation.

Remarque n°3 :

Utiliser les fichiers « *FINTERMEDIC EDM-UU* » et « *FINTER MEDIC ISTD EDM-UU* » pour le rendu des résultats et suivre les indications fournies par la macro EXCEL.

ATTENTION : NE JAMAIS SAUVEGARDER CE FICHIER POUR LE CONSERVER VIERGE A CHAQUE FOIS !!!

Appliquer les rendements obtenus par ajout dosé de l'échantillon.

Les résultats doivent être rendus avec deux chiffres significatifs.

Si dans un chromatogramme, aucun pic n'apparaît au temps de rétention spécifique de la molécule recherchée, on considère que le composé n'est pas détecté. Un échantillon est considéré comme positif si le TR ne diffère pas de +/- 2.5% du TR spécifique de la molécule et si son Ratio ion quali/ion quanti ne diffère pas de +/- 30% de celui d'un contrôle.

Pour les composés n'ayant pas de transition de qualification suffisamment sensible, l'allure du pic et le temps de rétention seront observés.

Prendre pour référence le Q_c extrait (=RDT) de la série afin de garder une homogénéité dans le rendu de résultat des échantillons.

Lorsqu'un échantillon est positif mais que son ratio diffère de +/- 30% de celui du contrôle, faire une interprétation sur la seconde transition si possible (cas du méthyl parabène)

- NETTOYAGE

Se reporter à la procédure INS-MATE-CHIMT-19009.

L'entretien de routine des LC-MSMS (changement de colonne, aiguille, frittés, pistons ainsi que le nettoyage de la source, ...) est effectué par le technicien de chromatographie lorsque cela est nécessaire.

Toutes les opérations inhérentes à l'appareillage sont répertoriées sur les fiches de vie de l'appareil ou le tableau récapitulatif des opérations de maintenance.

Un contrat de maintenance avec la société SHIMADZU est établi pour toute intervention préventive et curative.

– TRAITEMENT DES ECARTS

Se reporter au logigramme en annexe 1 pour interpréter les différents contrôles.

Le logigramme suivant est présenté sous forme de tableau qui illustre un nombre non exhaustif de possibilités.

Les différents écarts sont répertoriés dans le logiciel Dysfind et sont gérés au niveau du secteur chromatographie. Si le résultat n'est pas rendu, il n'est pas nécessaire de faire une fiche d'anomalie.

Si seulement une partie des molécules sortent des limites de contrôles, expliquer sur la fiche d'interprétation pourquoi le résultat est validé.

– LOGIGRAMME (TABLEAU) DECISIONNEL

Le logigramme suivant présenté sous forme de tableau présente un nombre non exhaustif de possibilités. Chaque valeur sortant des cartes de contrôles doit faire l'office d'une conclusion justifiée sur la fiche d'interprétation.

Ce logigramme permet d'interpréter une série à une date donnée.

Mais il est PRIMORDIAL de savoir prendre le recul nécessaire régulièrement pour interpréter les cartes de contrôles dans leur globalité et d'effectuer une étude des tendances.

Par exemple, une carte où les valeurs des Qc extrait (=RDT) sortent régulièrement de part et d'autre des limites peut signifier une incertitude de la méthode sous évaluée et à réajuster.

INTERPRETATION	CRITERES	DECISION	ACTION	CRITERES	ACTION	CAUSES / OBSERVATIONS
1/ Etude du blanc analytique	Blanc < 1/2 LQ	OK	Passer à l'étape 2		OK Pas d'impact Passer à l'étape 2	
		BAD	Regarder le possible impact d'une pollution sur les ech	Si ech < LQ Si ech > LQ	Si éch > LQ : reanalyser l'éch	Si l'ensemble des ech est impacté : Nettoyage et maintenance sur analyseur (clapets, frittes, Source, DL, ...) et relancer la série
2/ Etude du blanc extrait	Blanc extrait < 1/2 LQ en prenant en compte le facteur de pré-concentration	OK	Passer à l'étape 3		OK Pas d'impact Passer à l'étape 3	
		BAD	Regarder le possible impact d'une pollution sur les ech	Si ech < LQ Si ech > LQ	Si éch > LQ : reanalyser l'éch et si nécessaire le réextraire	Interpréter la série dans sa globalité et vérifier si cela ne provient pas de la préparation de la gamme.
3/ Exploitation de l'étalonnage-suites des EMAs	EMA étalonnage série ≤ EMA étalonnage validation	OK	Passer à l'étape 4		Passer à l'étape 4	
		BAD	Supprimer les points d'étalonnage aberrants (il doit rester au minimum 5 points de gamme)	Nbre de points ≥ 5 et critères EMA vérifiés Nbre de points ≤ 5 et/ou critères EMA non vérifiés	Elever la LQ de la molécule à la concentration présentant une justesse acceptable. Rendre la molécule Non Accréditée si la gamme est difficilement exploitable	Si cet état se répète sur l'ensemble des molécules, cela provient d'une erreur de préparation de l'étalonnage. Repréparer la gamme et relancer la série
4/ Exploitation carte sur Tr	LCI < Tr < LCS	OK	Passer à l'étape 5		Passer à l'étape 5	
		BAD	Recaler les temps de rétention	Possible Molécule sort des segments analytiques et par conséquent inexploitable	Relancer une nouvelle série	Repréparer phase mobile, vérifier pression colonne, vérifier absence de fuite, ...
5/ Exploitation carte sur sensibilité	S > LCI	OK	Passer à l'étape 6		Passer à l'étape 6	
		BAD	Exploiter la LQ matrice chromatographiquement	LQ exploitable LQ non exploitable	Elever la LQ proportionnellement	Si S BAD, P BAD et QC BAD pour ensemble des molécules, cela provient certainement d'une erreur dans la gamme - Repréparer la série et relancer. Si S BAD, P OK et Qc OK pour ensemble des molécules, cela provient certainement d'une baisse de sensibilité du détecteur (DL, bouche ?)

INTERPRETATION	CRITERES	DECISION	ACTION	CRITERES	ACTION	CAUSES / OBSERVATIONS
6/ Exploitation Chromatographique de la LQ	RS/N > 8	OK	Passer à l'étape 7		Elever la LQ proportionnellement et passer à l'étape 7	/ ! certaines molécules R S/N < 8 - l'allure du pic sera observé
		BAD	Vérifier Etalons interne pour contrôler la qualité de l'injection et effet de matrice	EI OK EI BAD	PB analytique sur cette injection - se servir du Qc extrait (-RDT) pour évaluer la LQ chromatographique et ajuster la LQ en conséquence	Si aucun run exploitable pour une LQ max à 0,050 µg/L, résoudre le pb et relancer la série.
7/ Exploitation carte de contrôle sur les Pentés	LCI < P < LCS	OK	Passer à l'étape 8		Justesse vérifiée passer à l'étape 8	Provient d'une perte de sensibilité sur cette molécule. Si toutes les molécules impactées, peut provenir d'une erreur dans l'étalon interne.
		BAD	Exploiter carte sur Qc	LCI < QC < LCS QC < LCI ou QC > LCS	QC > LCS et échantillon < LQ - OK QC > LCS et échantillon > LQ - rendre NC et confirmer le résultat QC < LCI, rendre NC en élevant proportionnellement la LQ	Si P Bad et Qc Bad pour la majorité des molécules, cela provient d'une erreur de justesse de l'étalonnage - Repréparer gamme et relancer série.
8/ Exploitation carte sur Qc	LCI < Qc < LCS	OK	Passer à l'étape 9		Si pente OK, erreur de préparation du Qc : Repréparer le Qc et relancer la série. Si pente BAD, erreur dans étalonnage et se reporter au point n°5	
		BAD	Exploiter les QC dans la globalité en vérifiant si les Qc sont bad pour l'ensemble des molécules, à partir de quand dans la série le ou les Qc sont mauvais ...	Si Qc BAD pour ensemble des molécules tout au long de la série Si Qc bad pour qq molécules	QC > LCS et échantillon < LQ - OK QC > LCS et échantillon > LQ = Rendre NC et confirmer le résultat QC < LCI, Elever la LQ et rendre NC les échantillons encadrés par des Qc BAD	Si Qc > LCS sur l'ensemble de la série, cela provient d'une dégradation de la molécule dans la SM de l'étalonnage - Trouver la solution pour la série prochaine Si Qc < LCI sur l'ensemble de la série, cela provient d'une dégradation de la molécule dans la SM du QC. Trouver la solution pour la prochaine série. Si Qc < LCI en fin de série, cela traduit une dégradation des conditions analytiques au cours de la série - Ouvrir une fiche de vie de méthode sous Dysfind pour tracer et corriger ce défaut de justesse

INTERPRETATION	CRITERES	DECISION	ACTION	CRITERES	ACTION	CAUSES / OBSERVATIONS
9/ Exploitation carte sur Qc extrait (=RDT)	LCI < RDT < LCS	OK	Passer à l'étape 10			
		BAD	Exploiter la carte sur les LQ extraites, les LQ étant corrigées par les RDT		Passer à l'étape 10	
10/ Exploitation carte sur LQ	LCI < LQ < LCS	OK	Passer à l'étape 11			
		BAD		LQ > LCS LQ < LCI	Si échantillon < LQ - OK Si échantillon > LQ, rendre NC et confirmer le résultat Augmenter proportionnellement la LQ, si échantillon > LQ, rendre NC et confirmer le résultat	
11/ Exploitation des EI des échantillons (RESTRICTIF)	LCI < EI < LCS 60% < EI < 140%	OK	Rendre l'échantillon			
		BAD		EI < LCI (le résultat est sur-évalué)	Si 40% < EI < 60% et si éch < LQ : Acceptable Si EI < 40% et si éch < LQ : réanalyser l'échantillon Si éch > LQ : réanalyser l'échantillon	Vérifier qu'il n'y a pas de problème d'injection
		BAD		EI > LCS (le résultat est sous-évalué)	Augmenter la LQ x 2 de la molécule impactée EI > 150 % et éch > LQ ou éch < LQ Réanalyser l'échantillon sauf si LQ et/ou QC dépendent de la même manière et ont des LCI OK	
	EI à nouveau BAD après 2nde analyse de l'éch	BAD	Rendre NC et élever les LQ en conséquence			/ ! Vérifier que le pic n'est pas coupé à cause d'un décalage (effet matrice)

Annexe 3

Extraction simultanée d'ADN et d'ARN de filtres (eau filtrée avec du RNA later, filtre conservé dans du RNA later et mis à -80°C si possible)

Protocole selon M. Hugoni (LMGE, Clermont-Ferrand)

Préparation des solutions

✓ Tampon de lyse (ne se conserve pas longtemps)

glucose 50 mM, EDTA 10 mM tris 25 mM pH 8

Solution de GLUCOSE 1M

Pour 50 mL, peser 9.008g de glucose (Sigma G8270, 180.16 g/mol)

Ajouter 50 ml d'eau MilliQ préfiltrée à la seringue (0.2μ)

Agiter en ajoutant l'eau car le glucose cristallise

Solution d'EDTA 0.5M

Pour 50 mL, peser 9.305g d'EDTA (EDTA disodium salt, E6635, sigma)

Ajouter 1 g de pastilles de soude NaOH

Compléter avec 50 ml d'eau MilliQ préfiltrée

Rq : Se dissout à pH 8, si pas dissout, ajouter de la solution de soude (salle algo)

Solution de Tris 0.5M

Pour 50 ml, peser 3.0285 g de Tris (Sigma 93362, 121.14g/mol) (Rq : le Trizma base T1503 de la salle physio est Ok)

Dissoudre dans 50 mL d'eau milliQ préfiltrée glacée

Pour le tampon de lyse (15 ml) final

	Ci (mmol/L)	Cf (mmol/L)	Vf (mL)	Vi (mL)
glucose	1000	50	15	0.75
EDTA	500	10	15	0.3
tris	500	25	15	0.75
H2O				13.2

Protéinase K à 20 mg/L

Préparation de 1 mL

Utiliser de l'eau ultra pure de bio mol

Faire des aliquots de 200 μl, 100 μl et 50 μl

Peut être conservé à -20°C

Solution de SDS 20%

20g dans 100 mL

Utiliser de l'eau MilliQ préfiltrée

Préparation de 20 mL donc 4g de SDS.

Extraction

Nettoyer toute la paille et le matériel au produit anti-RNase (Zap d'Ambion ou autre)

AVANT

Allumer un bain marie à 65°C et un autre à 37°C

Aller chercher de l'azote liquide

Préparer la solution de lysozyme 40 mg/mL (faire le calcul par rapport au nombre d'échantillon, utiliser de l'eau ultra pure de bio mol)

Aller chercher le beta-mercpto

Avec des pinces Millipore préalablement nettoyées, sortir le filtre décongelé et le mettre dans un tube de 2 mL

Ajouter 425 µL de tampon de lyse (glucose 50 mM, EDTA 10 mM tris 25 mM pH 8) 3- Homogénéiser
Faire 3 fois un passage azote liquide (à aller chercher dans la soute avec le récipient adapté) /65°C pour le choc thermique

Ajouter 25 µL de Lysozyme 40 mg/mL (solution fraîche)

Incuber à 37°C pendant 45 min

Ajouter 8 µL de protéinase K 20 mg/ml et 26 µL de SDS 20 %

Incuber à 55°C pendant 2h

Récupération du "jus" dans un nouveau tube 2 mL

(A FAIRE SOUS LA HOTTE)

10- Préparer une solution de Beta mercaptoéthanol (frigo, salle culture cellulaire, physio) avec du

tampon RLT plus du kit QIAGEN : 10 µL de beta mercaptoéthanol pour 1 mL de RLT 11- Ajouter 500

µL de mix beta + RLT dans chaque tube

Passer au kit Qiagen (All prep, DNA/RNA Mini kit, ref 80204)

12- Centrifuger le lysat pendant 3 min à >10.000 rpm

13 - Récupérer le surnageant

14- Transférer, 700 µL par 700 µL, le surnageant dans les colonnes violettes (All prep DNA column),

centrifuger 30 s à > 10.000 rpm

15 - RECUPERER LE FILTRAT (IL CONTIENT L'ARN !!) dans un tube Falcon stérile de 15 mL et mettre de

côté les colonnes violettes (qui contiennent l'ADN) dans des tubes de 2 mL et les conserver à TA

(pour les traiter ultérieurement (pendant l'étape de DNase de l'ARN)

EXTRACTION d'ARN

16- Ajouter un volume d'éthanol 70% (faire le mix éthanol 70%/EUP dans un falcon 45 mL) au filtrat
ARN, mixer en pipettant

17 - Transférer, 700 µL par 700 µL, ce mix dans les colonnes roses (RNAeasy spin column), centrifuger
15 s à > 10.000 rpm, jeter le filtrat

Ajouter 700 µL de tampon RW1, centrifuger 30 s à > 10.000 rpm, jeter le filtrat

Ajouter 500 µL de tampon RPE, centrifuger 30 s à > 10.000 rpm, jeter le filtrat

Ajouter 500 µL de tampon RPE, centrifuger 2 min s à > 10.000 rpm, jeter le filtrat

Remettre les colonnes dans des tubes propres de 2 mL, centrifuger 1 min s à > 10.000 rpm

Placer les colonnes dans des tubes 2 mL (pour bien distinguer les culots en étape 28), ajouter 40 µL

(entre 30 et 50 µL) de RNase free water pour éluer l'ARN, centrifuger 1 min s à > 10.000 rpm,

récupérer le filtrat

ETAPE DE DNase

Utilisation de la DNase de Turbo Ambion

Utiliser des barrettes ou des tubes 0.5 mL

Dans un tube de 2 mL (pour bien distinguer les culots en étape 28); pour les 40 µL d'ARN, y ajouter 4
µL de tampon turbo 10x (0.1 V) et 0.8 µL de DNase Ambion (0.02 V) (faire un mix n+1 pour l'ensemble
des échantillons à traiter et donc ajouter dans chaque tube 4.8µL)

Incuber 30 min à 37°C (utiliser incubateur de paillasse)

Pendant ce temps, faire l'extraction d'ARN

25 –Rajouter dans chaque tube, 4 µL de tampon d'inactivation (Inactivation Reagent :
solution blanchâtre, à remuer avant d'ajouter)

Laisser incuber à TA pendant 5 min en vortexant les tubes toutes les min

Centrifuger, si possible 1min30 à 10.000 g

28 – Récupérer le surnageant, y prélever 3 µL pour le dosage au Nanodrop (ne pas oublier le blanc),
conserver le reste à -80°C dans des tubes Safe Lock 1.5 mL bien étiquetés.

EXTRACTION d'ADN

Ajouter 500 µL de tampon AW1 sur les colonnes violettes (cf étape 15), centrifuger 30 s à > 10.000
rpm, jeter le filtrat

Ajouter 500 µL de tampon AW2, centrifuger 2 min à > 10.000 rpm, jeter le filtrat

Remettre les colonnes dans des tubes propres, centrifuger 1 min à > 10.000 rpm 32- Placer les colonnes dans des tubes 1.5 mL (ependord, safe lock), ajouter 50 µl de tampon EB pour éluer l'ADN, incubé à TA pendant 1 min, centrifuger 1 min s à > 10.000 rpm, récupérer le filtrat
33 – Y prélever 3 µl pour le dosage au Nanodrop (ne pas oublier le blanc), conserver le reste à -20°C bien dans des tubes Safe Lock bien étiquetés.

Annexe 4

RNA PowerSoil®
Total RNA Isolation Kit

Catalog No.	Quantity
12866-25	25 Preps

Instruction Manual

New protocol instructions:

(Steps 3-5) Phenol:chloroform:isoamyl alcohol (pH 6.5 – 8.0, [User supplied]) is now added before vortexing begins rather than being added after 5 minutes of vortexing.

(Step 12) The incubation at Step 12 is recommended to be carried out at room temperature. The previous protocol instructions were to incubate at -20°C for 30 minutes. If you have previously used the -20°C incubation before and know that your soil type yields good results at that temperature, you may continue to follow that protocol.



Version: 11132015 Table of Contents

Introduction	3
Protocol Overview	3
Equipment Required	4
Kit Contents & Storage	4
Precautions & Warnings	4
Important Notes for Use: Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol	5
Protocols:	
Experienced User Protocol	6
Detailed Protocol (Describes what is happening at each step)	8
LifeGuard™ Soil Preservation Solution Protocol	11

Hints & Troubleshooting Guide	12
Contact Information	14
Products recommended for you	15

Introduction

MO BIO Laboratories' RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit is designed to isolate total RNA from organisms found in soil. The properties of this kit permit consistent removal of humic substances, fulvic acids, and other RT-PCR inhibitors from RNA purified from soil. Diverse soil types, including compost, manure, estuary sediment, and other soil types high in organic content, have successfully provided intact and RT-PCR amplifiable RNA using this kit. The RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit reliably provides RNA for experiments requiring qualitative and quantitative RT-PCR analysis.

For collection and transport of soils needed for RNA extraction, the LifeGuard™ Soil Preservation Solution is a specially formulated treatment that protects the viability of bacteria in soil while keeping them in stasis. RNase and DNase activity is prevented allowing accurate full length cDNA synthesis and 16S rRNA profiling on samples collected in the field. Microbial community profiles are maintained in soils stabilized with LifeGuard™ for up to 30 days at -20°C, 1 week at 4°C, and 3 days at room temperature. *We do not recommend the use of RNALater and RNAProtect for preservation of nucleic acids in soils.*

Protocol Overview

For use with up to 2 grams of soil, homogenization occurs in a 15 ml tube containing silica carbide beads, lysis buffers, phenol:chloroform:isoamyl alcohol pH 6.5-8, and IRS, to ensure a complete lysis of all microorganisms and neutralization of RNases. Cleared lysates are precipitated to concentrate the total nucleic acids and pellets are resuspended in a buffer optimized for binding to anion-exchange gravity flow columns. RNA is eluted using a high salt buffer and precipitated to obtain the final pure RNA resuspended in RNase-Free water. DNA may be purified separately from the RNA using an alternative high salt buffer provided in a kit called the RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit. Nucleic acids are ready to use in enzymatic applications.

This kit is for research purposes only. Not for diagnostic use.

Other Related Products	Catalog No.	Quantity
RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit	12867-25	25 preps
LifeGuard™ Soil Preservation Solution	12868-100	100 ml
	12868-1000	1000 ml
RTS DNase™ Kit	15200-50	50 preps
UltraClean® PCR Clean-Up Kit	12500-50	50 preps
	12500-100	100 preps
	12500-250	250 preps

IMPORTANT: This kit requires user provided phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, pH 6.5 – 8.0).

This reagent can be purchased from Amresco, Incorporated or VWR International (see List of Recommended Vendors for Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol in the Hints and Troubleshooting Guide).

The phenol:chloroform:isoamyl alcohol may also be user made (please refer to, Preparing

Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol in the Hints and Troubleshooting Guide for preparation instructions). NOTE: Phenol and phenol:chloroform:isoamyl alcohol are subject to oxidation reactions that cause them to become yellow or pink colored, which serves as an indicator that the phenol is NOT useable for RNA extraction. Using colored phenol or colored phenol:chloroform:isoamyl alcohol will result in quality compromised RNA. Prior to each use, a sample of the phenol:chloroform:isoamyl alcohol should be placed in a clear container and its clarity determined. When not in use, store the phenol:chloroform:isoamyl alcohol at 4°C in the dark. Securely cap when not in use and do not expose to light for prolonged periods.

Equipment Required

Centrifuge capable of centrifuging 15 ml tubes (2500 x *g* minimum)

Microcentrifuge (13,000 x *g*)

Pipettor (20 µl to 1000 µl)

Serological pipettes (1 ml and 10 ml)

Heat block (set at 45°C) (optional)

Vortex-Genie² Vortex (MO BIO Catalog# 13111-V or 13111-V-220)

RNase-Free Gloves (MO BIO Catalog# 1556-S (small), 1556-M (medium) and 1556-L (large))

Lab Cleaner for RNase Removal (MO BIO Catalog# 12095-500) Vortex Adapter (MO BIO Catalog# 13000-V1-15)

Reagents Required but not Included Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol Solution

Kit Contents

Kit Catalog# 12866-25		
Component	Catalog #	Amount
Bead Tubes (with 1.5 g beads)	12866-25-PBT	25
Bead Solution	12866-25-BS	69 ml
Solution SR1	12866-25-1	7 ml
Solution SR2	12866-25-2	22 ml
Solution SR3	12866-25-3	42 ml
Solution SR4	12866-25-4	6 x 27.5 ml
Solution SR5*	12866-25-5	110 ml
Solution SR6*	12866-25-6	28 ml
Solution SR7	12866-25-7	3 ml
RNA Capture Columns	12866-25-SF	25
15 ml Collection Tubes	12866-25-T1	100
2.2 ml Collection Tubes	12866-25-T2	25

*Solutions SR5 and SR6 must be shaken before use to ensure consistent results

Kit Storage

Kit reagents and components should be stored at room temperature (15-30°C).

Precautions

Please wear gloves when using this product. Avoid all skin contact with kit reagents. In case of contact, wash thoroughly with water. Do not ingest. See Material Safety Data Sheets for emergency procedures in case of accidental ingestion or contact. All MSDS information is available upon request (760-9299911) or at www.mobio.com. Reagents labeled flammable should be kept away from open flames and sparks.

WARNING: Solution S4 is flammable. Wear gloves, laboratory coat and safety glasses when handling phenol. Phenol:chloroform:isoamyl alcohol is a caustic organic solution. User should review the vendor provided MSDS and accident procedures for this reagent. Do not inhale vapors. Follow local ordinances for disposal of phenol waste. Phenol is highly corrosive and can cause severe burns. Chloroform is a carcinogen. In the event of an accident, seek medical attention immediately.

IMPORTANT NOTES FOR USE: Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol

Warning: Phenol and Chloroform are organic compounds that are toxic and potentially dangerous to your health and safety. Please see all manufacturers' warnings and precautions before working with these compounds. Phenol and phenol:chloroform:isoamyl alcohol are subject to oxidation reactions that cause them to become yellow or pink colored, which serves as an indicator that the phenol is NOT useable for RNA extraction. Using colored phenol or colored phenol:chloroform:isoamyl alcohol will result in quality compromised RNA. Prior to each use, a sample of the phenol:chloroform:isoamyl alcohol should be placed in a clear container and its clarity determined. When not in use store the phenol:chloroform:isoamyl alcohol at 4°C in the dark. Securely cap when not in use and do not expose to light for prolonged periods.

Preparing Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol Solution

Mix 25 parts purified phenol, 24 parts chloroform, and one part isoamyl alcohol. This solution can be stored under TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) or 0.1M Tris, pH 8.0, for periods up to 3 months at 4°C. Store in an amber bottle to protect from light. It is recommended, if storing under TE Buffer, to add a small volume of a Tris buffer to this solution.

NOTE: Chloroform is mixed with phenol to increase the efficiency of nucleic acid extractions by reducing losses of DNA and RNA at the phenol:aqueous interphase. Chloroform denatures proteins and aids in the removal of lipids, while isoamyl alcohol reduces foaming during the extraction and facilitates the separation of the aqueous and organic phases.

List of Recommended Vendors for Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol

Vendor Name	Chemical Name	Catalog Number	Volume (ml)
Amresco, Incorporated*	Phenol: Chloroform (pH 6.7/8.0) 25:24:1 premixed with isoamyl alcohol	0883-100	100
Amresco, Incorporated*	Phenol: Chloroform (pH 6.7/8.0) 25:24:1 premixed with isoamyl alcohol	0883-400	400
VWR International**	Phenol: Chloroform premixed with Isoamyl Alcohol 25:24:1	100513-510	100
VWR International**	Phenol: Chloroform Buffered Solution 25:24:1	IB05174	400

*www.amresco-inc.com or (US) 800.829.2802

** www.vwr.com or (US) 800.932.5000

* **International customers should contact their local distributor

Experienced User Protocol

Wear RNase-Free Gloves (1556) at all times and remove RNase from the work area using Lab Cleaner (12095) for RNase Removal. Both of these products are available from MO BIO. Please see the “Products recommended for you” section at the end of this manual.

Add up to 2 g of soil to the 15 ml Bead Tube (provided).

Note: Please refer to Hints and Troubleshooting Guide for information regarding the amount of soil to process.

Add 2.5 ml of Bead Solution to the Bead Tube followed by 0.25 ml of Solution SR1 and 0.8 ml of Solution SR2.

Add 3.5 ml of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (pH 6.5 – 8.0, [User supplied]) to the bead tube, cap and vortex to mix until the biphasic layer disappears.

Place the Bead Tube on the Vortex Adapter (MO BIO Catalog # 13000-V1-15) and vortex at maximum speed for 15 minutes.

Remove the Bead Tube from the Vortex Adapter and centrifuge at 2500 x *g* for 10 minutes at room temperature.

Remove the Bead Tube from the centrifuge and carefully transfer the upper aqueous phase (avoiding the interphase and lower phenol layer) to a clean 15 ml Collection Tube (provided). The thickness of the interphase will vary depending on the type of soil used. Discard the phenol:chloroform:isoamyl alcohol in an approved waste receptacle.

Note: The biphasic layer will be thick and firm in soils high in organic matter and may need to be pierced to remove the bottom phenol layer.

Add 1.5 ml of Solution SR3 to the aqueous phase and vortex to mix. Incubate at 4°C for 10 minutes.

Centrifuge at 2500 x *g* for 10 minutes at room temperature. Transfer the supernatant, without disturbing the pellet (if there is one), to a new 15 ml Collection Tube (provided).

Add 5 ml of Solution SR4 to the Collection Tube containing the supernatant, invert or vortex to mix, and incubate at room temperature for 30 minutes.

Note: The previous protocol instructions were to incubate at -20°C for 30 minutes. If you’ve used the -20°C incubation before and know that your soil type yields good results at that temperature, you may continue to follow that protocol.

Centrifuge at 2500 x *g* for 30 minutes at room temperature.

Decant the supernatant and invert the 15 ml Collection Tube on a paper towel for 5 minutes. Note: Depending on soil type, the pellet may be large and/or dark in color.

Shake Solution SR5 to mix. Add 1 ml of Solution SR5 to the 15 ml Collection Tube and resuspend the pellet completely by repeatedly pipetting or vortexing to disperse the pellet.

Note: Depending on the soil type, the pellet may be difficult to resuspend. Resuspension may be aided by placing the tubes in a heat block or water bath at 45°C for 10 minutes, followed by vortexing. Repeat until the pellet is resuspended.

Prepare one RNA Capture Column (provided) for each RNA Isolation Sample:
Remove the cap of a 15 ml Collection Tube (provided) and place the RNA Capture Column inside the 15 ml Collection Tube. The column will hang in the 15 ml Collection Tube.

Add 2 ml of Solution SR5 to the RNA Capture Column and allow it to gravity flow through the column and collect in the 15 ml Collection Tube. Allow Solution SR5 to completely flow through the column (Optional: The Collection Tube may be emptied after Solution SR5 has completely flowed through the column. Note: DO NOT ALLOW THE COLUMN TO DRY OUT PRIOR TO LOADING THE RNA ISOLATION SAMPLE.)

Add the RNA Isolation Sample from Step 12 onto the RNA Capture Column and allow it to gravity flow through the column. Collect the flow through in the 15 ml Collection Tube.

Wash the column with 1 ml of Solution SR5. Allow it to gravity flow and collect the flow through in the 15 ml Collection Tube.

Transfer the RNA Capture Column to a new 15 ml Collection Tube (provided). Shake Solution SR6 to mix and then add 1 ml of Solution SR6 to the RNA Capture Column to elute the bound RNA into the 15 ml Collection Tube. Allow Solution SR6 to gravity flow into the 15 ml Collection Tube. Note: The RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit is available for DNA elution (MO BIO Catalog# 12867-25). See the DNA Elution Procedure in the Hints and Troubleshooting Guide or contact MO BIO for details at technical@mobio.com.

Transfer the eluted RNA to a 2.2 ml Collection Tube (provided) and add 1 ml of Solution SR4. Invert at least once to mix and incubate at -20°C for a minimum of 10 minutes.

Centrifuge the 2.2 ml Collection Tube at 13,000 x *g* for 15 minutes at room temperature to pellet the RNA.

Decant the supernatant and invert the 2.2 ml Collection Tube onto a paper towel for 10 minutes to air dry the pellet.

Resuspend the RNA pellet in 100 µl of Solution SR7. For information on removal of genomic DNA from RNA, see the Hints and Troubleshooting Guide on page 13.

Thank you for choosing the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit.

Detailed Protocol (Describes what is happening at each step)

Wear RNase-Free Gloves (1556) at all times and remove RNase from the work area using Lab Cleaner (12095) for RNase Removal. Both of these products are available from MO BIO. Please see the “Products recommended for you” section at the end of this manual.

Add up to 2 g of soil to the 15 ml Bead Tube (provided).

Note: Please refer to Hints and Troubleshooting Guide for information regarding the amount of soil to process.

Add 2.5 ml of Bead Solution to the Bead Tube followed by 0.25 ml of Solution SR1 and 0.8 ml of Solution SR2.

What's happening: The Bead Solution is a buffer used to disperse cells and soil particles. Solution SR1 contains SDS and other disruption agents which aid in complete cell lysis. In addition to aiding in cell lysis, SDS is an anionic detergent that breaks down fatty acids and lipids associated with the cell membrane of several organisms. Solution SR2 is a precipitation reagent used to remove non-DNA organic and inorganic material including cell debris and proteins. Note: If it gets cold, Solution SR1 will form a white precipitate. Heating to 60°C will dissolve the SDS and will not harm the other disruption agents.

Add 3.5 ml of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (pH 6.5 – 8.0, [User supplied]) to the bead tube, cap and vortex to mix until the biphasic layer disappears.

What's happening: Phenol:chloroform:isoamyl alcohol is added to maximize lysing efficiency and yield. Lysed cell components are trapped in the solvent and proteins are denatured leaving the nucleic acid in solution.

Place the Bead Tube on the Vortex Adapter (MO BIO Catalog# 13000-V1-15) and vortex at maximum speed for 15 minutes.

What's happening: Cells are lysed by combination of chemical agents from steps 1-3 and the mechanical shaking introduced by vortexing. The MO BIO Vortex Adapter is designed to be a simple cost effective platform to facilitate the homogenization and cell lysis of samples. An alternative to the MO BIO Vortex Adapter would be to attach your tubes to your platform with tape. Note that tape can become loose and may result in uneven shaking and lysis efficiency resulting in inconsistent results or lower yields.

Remove the Bead Tube from the Vortex Adapter and centrifuge at 2500 x g for 10 minutes at room temperature.

What's happening: Centrifugation results in phase separation of the sample mixture. Three phases will be visible after centrifugation. The lower organic phase containing proteins and cellular debris, the interphase containing humics and other organic and non-organic material, and the upper aqueous phase containing total nucleic acid. Note: The thickness of the interphase will depend on the sample type. Samples high in organic content will have a thicker interphase.

Remove the Bead Tube from the centrifuge and carefully transfer the upper aqueous phase (avoiding the interphase and lower phenol layer) to a clean 15 ml Collection Tube (provided).

The thickness of the interphase will vary depending on the type of soil used.

Note: Discard the phenol:chloroform:isoamyl alcohol in an approved waste receptacle. The biphasic layer will be thick and firm in soils high in organic matter and may need to be pierced to remove the bottom phenol layer for disposal.

What's happening: The upper aqueous phase containing the total nucleic acids from the sample is transferred to a new tube. Cellular debris, proteins, and organic material are left behind. Take care not to transfer material from the lower phase or the interphase.

Add 1.5 ml of Solution SR3 to the aqueous phase and vortex to mix. Incubate at 4°C for 10 minutes.

What's happening: Solution SR3 is a secondary precipitation step to further remove proteins and cellular debris.

Centrifuge at 2500 x g for 10 minutes at room temperature. Transfer the supernatant without disturbing the pellet (if there is one) to a new 15 ml Collection Tube (provided).

What's happening: The supernatant containing nucleic acids are transferred to a new 15 ml tube. Nonnucleic acid material is left behind.

Add 5 ml of Solution SR4 to the Collection Tube containing the supernatant, invert or vortex to mix, and incubate at room temperature for 30 minutes.

Note: The previous protocol instructions were to incubate at -20°C for 30 minutes. If you've used the -20°C incubation before and know that your soil type yields good results at this temperature, you may continue to follow that protocol.

Centrifuge at 2500 x g for 30 minutes at room temperature.

Decant the supernatant and invert the 15 ml Collection Tube on a paper towel for 5 minutes. Note: Depending on soil type, the pellet may be large and/or dark in color.

What's happening: Solution SR4 is 100% Isopropanol. Nucleic acid is precipitated and the Isopropanol is discarded.

Shake Solution SR5 to mix. Add 1 ml of Solution SR5 to the 15 ml Collection Tube and resuspend the pellet completely by repeatedly pipetting or vortexing to disperse the pellet. Note: Depending on the soil type, the pellet may be difficult to resuspend. Resuspension may be aided by placing the tubes in a heat block or water bath at 45°C for 10 minutes, followed by vortexing. Repeat until the pellet is resuspended.

What's happening: Solution SR5 is a proprietary salt solution used to resuspend the precipitated nucleic acids from step 11. It is also used to equilibrate the RNA capture column in step 13 and to wash and prep the column for the elution of RNA in step 17 below.

Prepare one RNA Capture Column (provided) for each RNA Isolation Sample:

Remove the cap of a 15 ml Collection Tube (provided) and place the RNA Capture Column inside the 15 ml Collection Tube. The column will hang in the 15 ml Collection Tube.

Add 2 ml of Solution SR5 to the RNA Capture Column and allow it to gravity flow through the column and collect in the 15 ml Collection Tube. Allow Solution SR5 to completely flow through the column (Optional: The Collection Tube may be emptied after Solution SR5 has completely flowed through the column. Note: DO NOT ALLOW THE COLUMN TO DRY OUT PRIOR TO LOADING THE RNA ISOLATION SAMPLE.)

Add the RNA Isolation Sample from Step 12 onto the RNA Capture Column and allow it to gravity flow through the column. Collect the flow through in the 15 ml Collection Tube.

Wash the column with 1 ml of Solution SR5. Allow it to gravity flow and collect the flow through in the 15 ml Collection Tube.

What's happening: The sample is added to the RNA Capture Column and the nucleic acids are bound to the column matrix. The Capture Column is then washed with a second volume of Solution SR5 to ensure unbound contaminants are removed from the sample and column prior to the elution of RNA.

Transfer the RNA Capture Column to a new 15 ml Collection Tube (provided). Shake Solution SR6 and then add 1 ml of Solution SR6 to the RNA Capture Column to elute the bound RNA into the 15 ml Collection Tube. Allow Solution SR6 to gravity flow into the 15 ml Collection Tube.

What's happening: The Solution SR6 RNA elution buffer is a proprietary salt solution that allows for the preferential release of RNA from the RNA Capture Column leaving DNA, residual debris, and inhibiting substances in the column.

Note: The RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit is available for DNA elution (MO BIO Catalog# 12867-25). See the DNA Elution Procedure in the Hints and Troubleshooting Guide or contact MO BIO for details at technical@mobio.com.

Transfer the eluted RNA to a 2.2 ml Collection Tube (provided) and add 1 ml of Solution SR4. Invert at least once to mix and incubate at -20°C for a minimum of 10 minutes.

Centrifuge the 2.2 ml Collection Tube at 13,000 x *g* for 15 minutes at room temperature to pellet the RNA.

Decant the supernatant and invert the 2.2 ml Collection Tube onto a paper towel for 10 minutes to air dry the pellet.

What's happening: Solution SR4 is 100% Isopropanol. Eluted RNA from the Capture Column is precipitated, centrifuged, and allowed to air dry prior to resuspending and concentrating.

Resuspend the RNA pellet in 100 µl of Solution SR7. For information on removal of genomic DNA from RNA, see the Hints and Troubleshooting Guide on page 13.

What's happening: Solution SR7 is RNase/DNase-Free water used to resuspend the pelleted RNA. Solution SR7 contains no EDTA. RNA is now ready for any downstream application. For long term storage of samples 10 mM Tris pH 8.0 or TE buffer may be used to resuspend the pelleted RNA.

Thank you for choosing the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit.

Protocol for LifeGuard™ Soil Preservation Solution

Add between 2 and 2.5 volumes of LifeGuard™ Soil Preservation Solution per gram of soil. For example 1 gram of soil would require 2 to 2.5 ml of LifeGuard™. If you are collecting the soil directly into the RNA PowerSoil® 15 ml Bead Tube, add 5 ml of LifeGuard™ into a 2 gram soil sample.

Note: If you are working with sediment samples, use 3 volumes of LifeGuard™ per gram of wet weight.

Vortex or hand-mix the solution and soil until the entire sample is saturated with solution. Excess LifeGuard™ Solution should be sitting on top of your soil sample.

Store at -20°C, 4°C, or room temperature as desired. When ready to process the RNA, centrifuge the sample at 2500 x *g* for 5 minutes to collect the soil. Remove the LifeGuard™ Soil Preservation Solution from the tube.

If you collected soil directly in the 15 ml Bead Tube, you can remove the LifeGuard™ after centrifugation and continue at step 2 of the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit protocol.

If you stabilized soil in another vessel, weigh the amount of soil you need and transfer to the 15 ml Bead Tube, or a conical tube, and then centrifuge to remove the LifeGuard™ Solution.

A number of different soils have been tested using LifeGuard™ and each soil will differ in its biomass and its saturation with water. Sediment samples require a higher volume of LifeGuard™ (3:1) due to dilution of the reagent.

Biomass content may play a role in the stabilization of soils at different temperatures and the ability of LifeGuard™ to freeze the community profile. For a soil with unknown microbial content or where temperatures may exceed room temperature (22-25°C), it may be preferable to store the soil at -20°C or 4°C to ensure the original community profile is maintained and to use more than 2.5 ml of LifeGuard™ per gram of soil. For long term storage and transport (>30 days), store stabilized soil at -20°C.

Hints and Troubleshooting Guide

Soil Types and Soil Amount to Process

The yield and purity of RNA will depend on the soil type processed. The RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit has been validated with diverse soil types that represent a wide range of physical, chemical and biological characteristics. In our experience, it is possible to use up to a maximum of 2 g for most soil types. For soils with high organic content, 1 g of soil typically gives an adequate amount of RNA while reducing the potential for DNA carryover during purification.

For sediment samples, more soil may be used. We have used up to 5 grams of sediment with the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit. You may increase the volume of Solution SR4 at step 9 to equal the volume of lysate.

Some soils and sediments may contain excess salinity. This is visualized after step 10 by a large white or yellow salty pellet. This type of pellet may result in reduced nucleic acid yields. If you have a salt enriched soil or sediment, to overcome the precipitation of salt in the pellet after Solution SR4, incubate the samples at room temperature for 30 minutes instead of -20°C. Proceed as directed for the rest of the protocol.

Phase Separation of Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol

To ensure effective phenol:chloroform:isoamyl alcohol and aqueous phase separation, centrifuge 15 ml tubes at 2,500 x g at room temperature for at least 10 minutes (step 5). Following centrifugation, the interphase thickness between the phenol:chloroform:isoamyl alcohol and aqueous layers will vary depending on the organic content of the soil. Care should be taken to avoid the lower phenol phase and the interphase containing protein and lipid when removing the aqueous upper phase. If a portion of the phenol layer or the interphase is removed, recentrifuge the transferred aqueous phase containing tube to obtain a phase separation that will permit removing the aqueous phase. Alternatively, an equal volume (2 ml) of chloroform may be added to the phenol or interphase contaminated aqueous phase, inverted or vortexed to mix, and the tubes centrifuged at 2,500 x g for 10 minutes at room temperature. Remove the upper aqueous phase and discard the lower chloroform:phenol interphase. Then combine with the rest of the aqueous phase and continue with protocol.

Pellet Resuspension in Solution SR5

Soil types with a high organic content may yield RNA pellets that are difficult to resuspend. Heating the RNA pellet in Solution SR5 at 45°C will aid in the resuspension process. Disrupting the RNA pellet with a pipette tip and vortexing vigorously will also aid in RNA resuspension. It is important to resuspend the pellet completely before applying it to the column in step 14. Failure to completely

resuspend the RNA pellet will result in RNA loss through reduced column binding and will result in reduced column flow rate.

Column Flow

The RNA Capture Columns are rated for gravity flow and should not be used with centrifugal or vacuum force. Additional positive pressure can be applied to the column using a 5 cc syringe barrel. Hold the 5 cc syringe barrel flush against the top of the RNA Capture Column and gently push the syringe inside the 5 cc barrel to force air through the RNA Capture Column. Flow rate should not exceed 1 drop per second.

Hints and Troubleshooting Guide cont.

DNA Contamination of the RNA

DNA carryover typically does not occur with the majority of soil types, however certain soils high in organic matter may present unique carryover situations. The purified RNA may be tested for potential

DNA carryover by agarose gel analysis or by performing PCR with qualified primers on the isolated RNA without performing prior reverse transcription amplification. The absence of a detectable amplification fragment by agarose electrophoresis indicates the absence of detectable carryover DNA. In the event DNA is detected, DNase treatment of the isolated RNA is recommended.

For removal of genomic DNA from RNA preps, we recommend the RTS DNase Kit (MO BIO Catalog# 15200-50). The RTS DNase Kit uses a high velocity DNase enzyme which is efficiently removed post-digestion using a resin which inactivates and binds to the enzyme. RNA is purified away from DNase without the use of inhibitors (EDTA) or heat and is ready to use in your next application.

Multiple Elutions from the Same Column

Multiple elutions beyond those called for in the protocol are not recommended when using the Capture Columns. Although a small amount of additional RNA or DNA (if using the RNA PowerSoil[®] DNA Elution Accessory Kit, MO BIO Catalog# 12867-25) may come off the column with multiple elutions, the inhibitors associated with the starting material will also begin to wash off the column and could cause inhibition in downstream applications.

Co-Isolation of DNA from the RNA Capture Column

After the RNA is eluted from the RNA capture column the DNA may also be eluted from the same column using the RNA PowerSoil[®] DNA Elution Accessory Kit (MO BIO Catalog# 12867-25). The capture column is placed in a new 15 ml tube and the DNA elution buffer is added to the column and the DNA is eluted in a separate tube. Everything required for DNA isolation is provided in the kit.

DNA Elution Procedure (RNA PowerSoil[®] DNA Elution Accessory Kit Catalog #12867-25 Required)

Transfer the RNA Capture Column from step 19 of the RNA PowerSoil[®] Total RNA Isolation Kit (MO BIO Catalog #12866-25) to a 15 ml Collection Tube (provided). Shake Solution SR8, then add 1 ml of Solution SR8 to the Capture Column to elute the bound DNA into the 15 ml Collection Tube. Allow Solution SR8 to gravity flow through the 15 ml Collection Tube.

Transfer the eluted DNA to a 2.2 ml Collection Tube (provided) and add 1 ml of Solution SR4. Invert at least once to mix and incubate at -20°C for a minimum of 10 minutes.

Centrifuge the 2.2 ml Collection Tube at 13,000 x *g* for 15 minutes at room temperature to pellet the DNA.

Decant the supernatant and invert the 2.2 ml Collection Tube onto a paper towel for 10 minutes to air dry the pellet.

Resuspend the DNA pellet in 100 µl of Solution SR7.

Contact Information

Technical Support:

Phone MO BIO Laboratories, Inc. Toll Free 800-606-6246, or 760-929-9911

Email: technical@mobio.com

Fax: 760-929-0109

Mail: MO BIO Laboratories, Inc, 2746 Loker Ave West, Carlsbad, CA 92010

Ordering Information:

Direct: Phone MO BIO Laboratories, Inc. Toll Free 800-606-6246, or 760-929-9911

Email: orders@mobio.com

Fax: 760-929-0109

Mail: MO BIO Laboratories, Inc, 2746 Loker Ave West, Carlsbad, CA 92010

For the distributor nearest you, visit our web site at www.mobio.com/distributors

Products recommended for you

For a complete list of products available from MO BIO Laboratories, Inc., visit www.mobio.com

Description	Catalog No.	Quantity
RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit	12867-25	25 preps
LifeGuard™ Soil Preservation Solution	12868-100 12868-1000	100 ml 1000 ml
RTS DNase™ Kit	15200-50	50 preps
PowerSoil® DNA Isolation Kit	12888-50 12888-100	50 preps 100 preps
PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit	12855-50 12855-100	50 preps 100 preps
PowerMicrobiome™ RNA Isolation Kit	26000-50	50 preps
PowerWater® RNA Isolation Kit	14700-50-NF	50 preps
PowerPlant® RNA Isolation Kit	13500-50	50 preps
UltraClean® Lab Cleaner	12095-500 12095-1000	500 ml squeeze bottle 1 L bottle
RNase-Free Gloves	1556-XS 1556-S 1556-M 1556-L	X-Small (Bag of 150) Small (Bag of 150) Medium (Bag of 150) Large (Bag of 150)

Annexe 5

RNA PowerSoil®
DNA Elution Accessory Kit

Catalog No.	Quantity
12867-25	25 Preps

Instruction Manual

Please Recycle

Version: 04282014

Table of Contents

Introduction	3
Protocol Overview	3
Equipment Required	5
Kit Contents & Storage	5
Precautions & Warnings	5
Protocols:	
Experienced User Protocol	6
Detailed Protocol (Describes What is Happening in Each Step)	7
Hints & Troubleshooting Guide	8
Contact Information	9
Products recommended for you	10

Introduction

MO BIO Laboratories' RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit is designed to co-isolate DNA for the recovery of the total nucleic acid content of the original sample. When used in combination with the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit (catalog #12866-25) both the RNA and the DNA can be isolated and eluted into two separate fractions.

Protocol Overview

After the RNA is eluted from the RNA capture column using the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit, the column is placed in a new 15 ml tube. The DNA elution buffer is added to the column and DNA is preferentially eluted from the proprietary matrix of the capture column. DNA is then concentrated and ready for use for downstream applications without further handling or purification.

This kit is for research purposes only. Not for diagnostic use.

Other Related Products	Catalog No.	Quantity
RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit	12866-25	25 preps
RNase-Free Gloves	1556-XS	
1556-S		
1556-M		
1556-L	bag of 150 bag of 150 bag of 150 bag of 150	
UltraClean® Lab Cleaner	12095-500	
12095-1000	500 ml spray bottle	
1 liter bottle		

Equipment Required:

Microcentrifuge (13,000 x g)

Pipettor (20 µl to 1000 µl)

Serological pipettes (1 ml and 10 ml)

Vortex

RNase-Free Gloves (MO BIO Catalog # 1556-S (small), 1556-M (medium) and 1556-L (large))

Lab Cleaner for RNase Removal (MO BIO Catalog # 12095-500, 12095-1000) Vortex Adapter (MO BIO Catalog # 13000-V1-15)

Reagents Required but Not Included

RNA PowerSoil® RNA Isolation Kit (MO BIO Catalog # 12866-25)

Kit Contents

Kit Catalog# 12867-25

Component	Catalog #	Amount
Solution SR4	12867-25-1	27.5 ml
Solution SR7	12867-25-2	3 ml
Solution SR8	12867-25-3	27.5 ml
15 ml Collection Tubes	12867-25-T1	25
2.2 ml Collection Tubes	12867-25-T2	25

Kit Storage

Kit reagents and components should be stored at room temperature (15 to 30°C).

Precautions

Please wear gloves, laboratory coat and safety glasses when using this product. Avoid skin contact with kit reagents. In case of contact, wash the affected area thoroughly with soap and water. Do not ingest. See Material Safety Data Sheets (MSDS) for emergency procedures in case of accidental contact or ingestion. MSDS information is available upon request (760-929-9911) or at www.mobio.com.

WARNING: Reagent SR4 is flammable and should be kept away from open flames and sparks.

IMPORTANT NOTE FOR USE: Wear RNase and DNase-Free gloves at all times. Remove RNases and DNases from work surfaces with Lab Cleaner before starting. These products are available separately from MO BIO Laboratories, Inc. (refer to the “Equipment Required” section).

Experienced User Protocol

Please wear gloves at all times.

DNA Elution Procedure

1. Transfer the RNA Capture Column from step 16 of the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit (MO BIO Catalog # 12866-25) to a 15 ml Collection Tube (provided) and add 1 ml of Solution SR8 to the RNA Capture Column to elute the bound DNA into the 15 ml Collection Tube. Allow Solution SR8 to gravity flow into the 15 ml Collection Tube.
2. Transfer the eluted DNA to a 2.2 ml Collection Tube (provided) and add 1 ml of Solution SR4. Invert at least once to mix and incubate at -20°C for 10 minutes.
3. Centrifuge the 2.2 ml Collection Tube at 13,000 x g for 15 minutes at room temperature to pellet the DNA.
4. Decant the supernatant and invert the 2.2 ml Collection Tube onto a paper towel for 10 minutes to air dry the pellet.
5. Resuspend the DNA pellet in 100 µl of Solution SR7.

Note: Although RNA carryover does not occur with the majority of soil types, certain soils high in organic matter may present unique carryover situations. In situations where the absence of RNA contamination is critical, an RNase treatment of the isolated DNA is recommended; see the Hints and Troubleshooting Guide for instruction.

Thank you for choosing the RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit.

Detailed Protocol (Describes what is happening at each step) Please wear gloves at all times.

DNA Elution Procedure

1. Transfer the RNA Capture Column from step 16 of the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit

(catalog #12866-25) to a 15 ml Collection Tube (provided) and add 1 ml of Solution SR8 to the RNA Capture Column to elute the bound DNA into the 15 ml Collection Tube. Allow Solution SR8 to gravity flow into the 15 ml Collection Tube.

What's happening: The Solution SR8 elution buffer is a salt solution that allows for the preferential release of DNA from the RNA Capture Column leaving residual debris and inhibiting substances in the column.

2. Transfer the eluted DNA to a 2.2 ml Collection Tube (provided) and add 1 ml of Solution SR4. Invert at least once to mix and incubate at -20°C for 10 minutes.
3. Centrifuge the 2.2 ml Collection Tube at 13,000 x g for 15 minutes at room temperature to pellet the DNA.
4. Decant the supernatant and invert the 2.2 ml Collection Tube onto a paper towel for 10 minutes to air dry the pellet.

What's happening: Solution SR4 is 100% Isopropanol. Eluted DNA from the Capture Column is precipitated, centrifuged, and allowed to air dry prior to resuspending and concentrating.

5. Resuspend the DNA pellet in 100 µl of Solution SR7.

What's happening: Solution SR7 is RNase/DNase-Free water used to resuspend the pelleted DNA. Solution SR7 contains no EDTA. DNA is now ready for any downstream application. For long term storage of samples 10 mM Tris pH 8.0 or TE buffer may be used to resuspend the pelleted DNA.

Note: Although RNA carryover does not occur with the majority of soil types, certain soils high in organic matter may present unique carryover situations. In situations where the absence of RNA contamination is critical, an RNase treatment of the isolated DNA is recommended; see Additional Information Section for instruction).

Thank you for choosing the RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit.

Hints and Troubleshooting Guide

Soil Types and Soil Amount Processed

The yield and purity of DNA and RNA isolated using the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit in combination with the RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit will depend on the soil type processed. A wide range of soil types can be processed with different physical, chemical and biological characteristics including compost, manure, estuary sediment, and other soil types high in organic content. In our experience, it is possible to use up to a maximum of 2 g for most soil types. For soils with high organic content, as little as 0.25 g of soil will yield an adequate amount of total nucleic acid from a sample and reduce the potential for DNA and RNA elution crossover between fractions. We recommend at most 0.25-0.5 g for absorbent soils like potting soil or peat.

Column Flow

The RNA Capture Columns used in the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit and in combination with the RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit are rated for gravity flow and should not be used with centrifugal or vacuum force.

DNase/RNase Digestion Procedure

Note: ONLY RNase-Free DNase may be used with this protocol. The presence of RNases will result in digested RNA.

The presence of carryover DNA with RNA or vice versa isolated using the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit in combination with the RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit does not occur with the majority of soil types. It has been noted, however, that soils with high organic matter content may show crossover of DNA or RNA between fractions.

The following protocol should serve as a guide to the enzymatic digestion of either the DNA or RNA in the fraction of interest.

- a. Add the appropriate amount of enzyme buffer and or water and up to 4 Units of DNase or RNase enzyme to the nucleic acid sample to obtain a total volume of 200 µl. A typical 10X DNase/RNase digestion buffer is 10 mM CaCl₂ and 10 mM MgCl₂ in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5.
- b. Incubate at 37°C for 30 to 45 minutes.
- c. Add 200 µl of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (pH 6.5 – 8.0) and vortex to mix. Incubate at room temperature for 5 minutes.
- d. Centrifuge the sample at 10,000 x g for 5 minutes.
- e. Carefully remove the upper aqueous phase and transfer it to a new tube.
- f. Add 1/10th volume of 5M NaCl, two volumes of 100% ethanol and invert to mix.
- g. Incubate at -20°C for 30 minutes and centrifuge at 10,000 x g for 10 minutes.
- h. Decant the supernatant and air dry the pellet.
- i. Resuspend the pellet in an appropriate volume of Solution SR7.

Multiple Elutions from the Same Column

Multiple elutions beyond those called for in the protocol are not recommended when using the RNA Capture Columns. Although a small amount of additional RNA or DNA may come off the column with multiple elutions, the inhibitors associated with the starting material will also begin to wash off the column and could cause inhibition in downstream applications.

Contact Information

Technical Support:

Phone MO BIO Laboratories, Inc. Toll Free 800-606-6246, or 760-929-9911

Email: technical@mobio.com

Fax: 760-929-0109

Mail: MO BIO Laboratories, Inc, 2746 Loker Ave West, Carlsbad, CA 92010

Ordering Information:

Direct: Phone MO BIO Laboratories, Inc. Toll Free 800-606-6246, or 760-929-9911

Email: orders@mobio.com

Fax: 760-929-0109

Mail: MO BIO Laboratories, Inc, 2746 Loker Ave West, Carlsbad, CA 92010

For the distributor nearest you, visit our web site at www.mobio.com/distributors

Products recommended for you

For a complete list of products available from MO BIO Laboratories, Inc., visit www.mobio.com

Description	Catalog No.	Quantity	
RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit	12866-25	25 preps	
LifeGuard™ Soil Preservation Solution	12868-100		
12868-1000	100 ml		
1000 ml			
PowerSoil® DNA Isolation Kit	12888-50		
12888-100	50 preps		
100 preps			
Vortex-Genie® 2 Vortex			
13111-V			
13111-V-220	1 unit (120V)		
1 unit (220V)			
Vortex Adapter for Vortex Genie® 2	13000-V1-15	Holds 4 (15 ml) Tubes	
RTS DNase™ Kit	15200-50	50 preps	

**Dynamique et identification des sources de contamination fécale dans un espace littoral
connaissant des pratiques de tourisme et de loisirs : l'exemple de la baie d'Aytré.**

Résumé :

La qualité microbiologique des eaux de baignade diminue progressivement d'années en années, et peut être un problème majeur de santé publique. Ainsi, des surveillances sanitaires de la qualité microbiologique des eaux de baignade sont effectués conformément à la directive européenne (2006/7/EC) pour assurer la sécurité sanitaire des baigneurs et préserver l'image de ces écosystèmes.

Depuis de nombreuses années, la baie d'Aytré (Charente Maritime, France), a été classée en « qualité insuffisante » et cette plage est interdite à la baignade depuis 2018. Les enjeux sanitaires et le rôle prépondérant de cette plage sur le développement touristique et l'économie locale ont conduit à rechercher l'origine et le déterminisme spatiotemporel de cette contamination fécale.

Cette thèse présente une approche intégrée de l'analyse de la contamination fécale de la baie d'Aytré par une étude pluridisciplinaire de différentes hypothèses analysées depuis le début des années 2000 par les collectivités locales.

Le niveau de contamination fécale des eaux de baignade durant une année était relativement faible avec une variation saisonnière notable de l'abondance des indicateurs de contamination fécale *Escherichia coli* et entérocoques. Les dépassements des seuils réglementaires sur 24% et 32% des échantillons d'eau du Platin Nord et du Platin Sud, les deux sites de baignade de la baie d'Aytré étaient principalement dus aux entérocoques. La qualité microbiologique du sédiment au cours du temps a montré que le sédiment n'était pas une source diffuse de contamination dans l'eau.

L'analyse combinée des marqueurs protéiques, génétiques et chimiques a révélé la présence d'une part d'espèces d'entérocoques d'origine environnementale et d'autre part une contamination d'origine animale principalement et une faible contribution de l'origine humaine.

La stratégie d'analyse élaborée et les outils développés au cours de cette étude permettront d'améliorer les méthodes de surveillance sanitaire des eaux de baignade.

Mots clés : Contamination fécale, écosystème côtier, dynamique spatio-temporelle, origine humaine ou non humaine (animale).

**Dynamics and identification of fecal contamination sources in a coastal area with tourism and
leisure practices: example of Aytré Bay.**

Summary:

The microbiological quality of bathing water is progressively decreasing from year to year, and can constitute a major public health problem. Thus, sanitary monitoring of the microbiological quality of bathing waters is carried out in accordance with the European directive (2006/7/EC) to ensure the sanitary safety of bathers and preserve the image of these recreational ecosystems.

For many years, the bay of Aytré (Charente Maritime, France), has been classified as "poor quality" and this beach is prohibited for bathing since 2018. The health issues and the preponderant role of this beach on the tourism development and the local economy led to investigate the origin and the spatiotemporal determinism of this fecal contamination.

This thesis presents an integrated approach to the analysis of the fecal contamination of Aytré Bay through a multidisciplinary study of different hypotheses analyzed since the beginning of the 2000s by the local authorities.

The level of fecal contamination of the bathing water during a year was relatively low with a notable seasonal variation in the abundance of the fecal contamination indicators *Escherichia coli* and enterococci. Exceedances of the regulatory thresholds on 24% and 32% of the water samples from Platin Nord and Platin Sud, the two bathing sites in Aytré Bay, were mainly due to enterococci. The microbiological quality of the sediment over time showed that the sediment was not a diffuse source of contamination in the water.

The combined analysis of protein, genetic and chemical markers revealed the presence of enterococci species of environmental origin on the one hand, and on the other hand, a contamination of mainly animal origin and a small contribution from human origin.

The analytical strategy and tools developed during this study will help to improve the sanitary surveillance methods of bathing waters.

Key words: Fecal contamination, coastal ecosystem, spatiotemporal dynamics, human or non-human (animal) origin.

