

RAPPORT FINAL

DÉVELOPPER UNE PROCÉDURE ET DES OUTILS POUR LA DÉTERMINATION DES SOURCES DE CONTAMINATION FÉCALE DE L'EAU À L'AIDE DE MARQUEURS GÉNÉTIQUES

Auteurs : Élodie LAROCHE, Mylène GÉNÉREUX, Félix RACINE-BRASSARD, Cathy ST-LAURENT et Caroline CÔTÉ
Responsable scientifique : Caroline CÔTÉ, agr., Ph.D.

Rapport présenté au ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs
Version finale : 2 avril 2024

Projet IRDA # : 400 171



L'IRDA a été constitué en mars 1998 par quatre membres fondateurs, soit le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ), l'Union des producteurs agricoles (UPA), le ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP) et le ministère de l'Économie, de l'Innovation et de l'Énergie (MEIE).

L'IRDA est une corporation de recherche à but non lucratif qui travaille à chaque année sur une centaine de projets de recherche en collaboration avec de nombreux partenaires du milieu agricole et du domaine de la recherche.

Notre mission

L'IRDA a pour mission de réaliser des activités de recherche, de développement et de transfert en agroenvironnement visant à favoriser l'innovation en agriculture, dans une perspective de développement durable.

Notre vision

L'IRDA est reconnu à l'échelle canadienne comme un chef de file en recherche, développement et transfert en agroenvironnement. L'IRDA se démarque par son approche intégrée et par le dynamisme de ses partenariats qui lui permettent d'anticiper les problèmes et de proposer des solutions novatrices répondant aux besoins des agriculteurs et de la société.

Pour en savoir plus

www.irda.qc.ca

PARTENAIRES FINANCIERS ET COLLABORATEURS



« Cette initiative est financée par le Fonds bleu dans le cadre du Plan national de l'eau de la Stratégie québécoise de l'eau, qui déploie des mesures concrètes pour protéger, utiliser et gérer l'eau et les milieux aquatiques de façon responsable, intégrée et durable. »

DÉVELOPPER UNE PROCÉDURE ET DES OUTILS POUR LA DÉTERMINATION DES SOURCES DE CONTAMINATION FÉCALE DE L'EAU À L'AIDE DE MARQUEURS GÉNÉTIQUES

Rapport final

Présenté au ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP)

Édifice Marie-Guyart, 3^e étage

675 Boul. René-Lévesque Est

Québec (Québec), CANADA G1R 5V7

LE RAPPORT PEUT ÊTRE CITÉ COMME SUIV :

Généreux M., É. Larouche, F. Racine-Brassard, C. St-Laurent et C. Côté. 2024. Développer une procédure et des outils pour la détermination des sources de contamination fécale de l'eau à l'aide de marqueurs génétiques. Rapport final. IRDA. 162 pages et annexes.

© Institut de recherche et de développement en agroenvironnement inc. (IRDA)

ÉQUIPE DE RÉALISATION DU PROJET ET DE RÉDACTION DU RAPPORT

- **Caroline Côté**, agr., Ph.D., chercheuse en hygiène de l'environnement agricole
- **Mylène Généreux**, M.Sc., professionnelle de recherche
- **Élodie Larouche**, M.Sc., professionnelle de recherche
- **Félix Racine-Brassard**, étudiant-stagiaire, Université de Sherbrooke
- **Cathy St-Laurent**, B.Sc., professionnelle de recherche
- **Éliane Latour**, technicienne de laboratoire
- **Annie Fortin**, B.Sc., technicienne de laboratoire
- **Ève-Marie Cyr**, assistante de recherche
- **Coralie Boivin**, assistante de recherche

Les lecteurs qui souhaitent commenter ce document peuvent s'adresser à :

Caroline Côté

Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA)

335 rang des Vingt-Cinq Est, St-Bruno-de-Montarville (Québec) J3V 0G7

Téléphone : 450 653-7368, poste 310

Courriel : caroline.cote@irda.qc.ca

REMERCIEMENTS

Ce projet de recherche a été réalisé grâce à une aide financière accordée par le MELCCFP suite à l'appel d'offre public 1905-P-380. L'équipe de l'IRDA tient particulièrement à souligner la collaboration de Michel Patoine et de Manuela Villion du MELCCFP, qui ont joué un rôle important dans les discussions quant au choix des marqueurs génétiques à cibler et à la mise au point de la méthode. L'équipe remercie aussi Émilie Gagnon et Karine Labrecque du MELCCFP pour leur soutien et confiance tout au long du mandat.

L'équipe tient également à remercier Mick Wu, biostatisticien à l'IRDA, ainsi que les équipes respectives de l'Institut national de la recherche scientifique (INRS), d'Agrinova, de l'Organisme de bassin versant de la rivière Yamaska, ainsi que du club conseil Profit-eau-sol pour leur aide précieuse dans le cadre du 4^e livrable du mandat.

RÉSUMÉ

En 2019, l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) a été mandaté par le ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP) pour développer une procédure qui permettrait d'identifier les espèces animales à l'origine de la contamination fécale de l'eau à l'aide de marqueurs génétiques. Ultimement, l'identification de la source de contamination devait permettre de mettre en place des recommandations et un cadre réglementaire mieux ciblé et plus efficace. Les outils développés devaient également être utilisés par les producteurs agricoles, les inspecteurs et les divers intervenants de façon à mieux identifier les actions permettant d'améliorer la qualité de l'eau. Aussi, il était visé que les données puissent être utilisées comme appui scientifique supplémentaire lors d'évaluation de la source de contamination de l'eau. La méthode développée devait ainsi être validée non seulement au niveau de la spécificité et de la sensibilité, mais aussi au niveau de sa facilité d'interprétation, de son applicabilité, de sa validité et de son efficacité sur le terrain.

Les travaux se sont échelonnés d'octobre 2019 à mars 2023. La première année du projet s'est déroulée en trois temps. D'abord, une recension de la littérature visant à choisir les marqueurs génétiques ciblant les diverses sources possibles de contamination fécale a été réalisée. Cette étape, ajoutée à l'analyse des séquences d'ADN dans la plateforme publique libre d'accès GenBank®, a permis de déterminer que les microorganismes du phylum *Bacteroidetes*, plus spécifiquement l'ordre des *Bacteroidales*, semblaient être les plus prometteurs pour détecter l'origine de la contamination fécale de l'eau. Le tableau suivant présente les marqueurs associés à leurs amorces et sondes respectives.

Cible	Nom du marqueur	Amorce sens	Amorce anti-sens	Sonde	Référence
Universels	BacGen	BacGen-F	BacGen-R	BacGen-TP	Lee <i>et al.</i> , 2010
Humain	HumM2	HumM2F	HumM2R	HumM2P	Shanks <i>et al.</i> , 2009
Porc	Pig-1-Bac	Pig-1-Bac32Fm	Pig-1-Bac108R	Pig-1-Bac44P	Mieszkin <i>et al.</i> , 2009
Poulet	Chicken/Duck-Bac	qCD362F-HU	qcD464R-HU	qBac394 MGB-HU	Kobayashi <i>et al.</i> , 2013
Bovin	BacBov1	BacBov-F1	BacBov-R1	BacBov-TP1	Lee <i>et al.</i> , 2010
Ruminant	BacR	BacR-F	BacR-R	BacR-Probe	Marti <i>et al.</i> , 2011

Ensuite, la mise au point d'une méthode de détection a été entreprise pour chacun des marqueurs, notamment en mesurant les limites de détection et de quantification, ainsi que leur spécificité dans les matrices suivantes :

- lisier de porc
- lisier de bovin
- fumier de poulet
- fumier de bovin
- sol agricole loameux
- sol agricole sableux
- eau de surface

- eau souterraine
- eaux usées municipales brutes
- eaux usées municipales traitées

Des échantillons de fèces de chevreuil, d'oies blanches et de bernaches du Canada ont été ajoutés à la liste des échantillons prévus afin de vérifier la capacité de discrimination entre les marqueurs bovin et ruminant, ainsi que poulet/dinde et oiseaux sauvages.

Finalement, la persistance des marqueurs et d'*E. coli* dans les lisiers et fumiers durant l'entreposage a été évaluée sur plusieurs semaines afin d'établir leurs constantes de décroissance. Les essais ont été réalisés avec quatre matrices, soit le lisier de porc, le lisier de bovin, le fumier de poulet et le fumier de bovin. Des sous-échantillons des matrices ont été entreposés à 4 et 12 °C durant 57 jours à l'obscurité. Des analyses hebdomadaires des marqueurs dans chaque matrice, en plus de la détermination des populations d'*E. coli*, ont permis de renseigner sur le devenir des marqueurs et des bactéries indicatrices de contamination fécale selon les conditions d'entreposage en pots en conditions contrôlées.

En deuxième année de projet, la contribution relative des sources de contamination fécale dans l'eau a été déterminée en conditions contrôlées en contaminant des échantillons d'eau de provenances diverses à l'aide de lisier de porc, de fumier de poulet, de lisier de bovin et d'eaux usées municipales. Les marqueurs génétiques ciblés ont été quantifiés avant et après la contamination des échantillons, ainsi que dans les lisiers, fumiers et eaux usées. Les essais ont été réalisés avec cinq échantillons différents d'eau de surface et cinq échantillons d'eau de puits. Du lisier de porc à l'engraissement, du lisier de bovin laitier en stabulation libre, des fientes de poules pondeuses sans ripe ainsi que de l'eau usée municipale non traitée ont été utilisés comme intrants pour contaminer les échantillons d'eau. Les populations d'*E. coli* et les concentrations des six marqueurs à l'étude ont été déterminées avant et après la contamination par les intrants.

La troisième année du mandat a été consacrée au suivi environnemental des marqueurs génétiques dans des sols agricoles suivant l'épandage d'engrais organiques. D'abord, un dispositif en parcelles instrumentées de façon à récolter l'eau de ruissellement et l'eau s'infiltrant dans le sol a été mis à profit à la ferme expérimentale de l'IRDA à Saint-Bruno-de-Montarville. Quatre traitements (trois dates d'épandage de lisier de porc et un témoin sans lisier) ont été répétés trois fois au champ pour un total de 12 parcelles expérimentales. Les marqueurs à l'étude ont été quantifiés dans le lisier épandu, ainsi que dans le sol et l'eau lors d'événements de pluie provoquant le ruissellement. Ensuite, huit autres parcelles présentant des types de sol différents ont reçu du lisier de porc ou du fumier de bovin. Des échantillons de sol et d'eau s'infiltrant dans le sol ont aussi été prélevés dans ces parcelles. Le suivi a été réalisé entre mai et novembre 2021 dans toutes les parcelles. La détermination des populations en *E. coli* et en marqueurs génétiques ont permis d'analyser le transport et le suivi de ces contaminants dans le sol et l'eau.

La dernière année du projet a été consacrée à la validation sur le terrain de la procédure développée. Des bassins versants faisant l'objet d'un suivi ou de projets de recherche en cours ont été ciblés afin de bénéficier de données complémentaires lorsque possible (ex. caractérisation des activités et des sources de contamination du bassin,

matières en suspension, populations d'*E. coli*) aidant à l'interprétation des résultats. Entre mars et novembre 2022, des échantillons d'eau ont été prélevés à cinq endroits dans trois bassins versants. Dans les Laurentides, le bassin versant de la rivière du Chicot a été ciblé, où deux points de prélèvement ont été déterminés avec l'aide du MELCCFP et du Club conseil Profit-eau-sol à Mirabel. En Montérégie, deux bassins versants ont fait l'objet de l'étude, soit le ruisseau au Castor, où seul l'exutoire à Pike river a été ciblé, ainsi que le Lac Boivin à Granby, où deux points référant à des sous-bassins différents ont été ciblés. Le ruisseau au Castor fait l'objet d'un suivi de l'IRDA et du MELCCFP depuis plusieurs années, et un projet chapeauté par l'INRS est présentement en cours. Le bassin versant du Lac Boivin a été ciblé avec la participation de l'organisme de bassin versant de la rivière Yamaska.

À l'issue des travaux, une procédure et des outils ont été élaborés pour la détermination des sources de contamination fécale de l'eau qui incluent :

- L'identification des données qui devraient être collectées par les intervenants lors d'un échantillonnage, sous forme d'un formulaire à remplir.
- La procédure d'échantillonnage et de conservation des échantillons.
- La procédure de conservation de l'ADN.
- La méthode de quantification des marqueurs génétiques et la forme de présentation des résultats.

TABLE DES MATIÈRES

MISE EN CONTEXTE	13
1 RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	14
1.1 Méthodes de traçage des sources de contamination de l'eau	14
1.2 Détection des marqueurs génétiques développés chez les <i>Bacteroidetes</i>	18
1.2.1 Marqueurs génétiques universels	19
1.2.2 Marqueurs génétiques ciblant l'humain	23
1.2.3 Marqueurs génétiques ciblant les bovins.....	26
1.2.4 Marqueurs génétiques ciblant le porc.....	27
1.2.5 Marqueurs génétiques ciblant le poulet	28
1.2.6 Marqueurs génétiques ciblant les ruminants.....	29
1.3 Critères de performance des analyses	30
1.3.1 Sensibilité et spécificité des marqueurs	30
1.4 Persistance des marqueurs génétiques.....	31
1.4.1 Facteurs abiotiques	31
1.4.2 Facteurs biotiques	32
1.5 Principaux constats.....	33
2 DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE PAR PCR QUANTITATIVE	34
2.1 Methodologie	34
2.1.1 Température d'hybridation des amorces.....	34
2.1.2 Concentration des amorces et de la sonde	34
2.1.3 Limites de détection et de quantification	34
2.2 Mesures de performance de la méthode.....	35
2.2.1 Spécificité.....	35
2.2.2 Sensibilité.....	35
2.2.3 Précision	36
2.2.4 Valeurs prédictives positives et négatives.....	36
2.3 Contrôles	37
2.3.1 Contrôle matrice.....	37
2.3.2 Contrôle environnemental	37
2.3.3 Contrôle positif et négatif.....	37

2.3.4	Contrôle interne d'amplification	38
3	DÉTERMINATION DES SOURCES DE CONTAMINATION FÉCALE	39
3.1	Sélection des marqueurs génétiques	39
3.2	Protocoles utilisés.....	45
3.2.1	Échantillonnage et extraction d'ADN	45
3.2.2	PCR en temps réel.....	46
3.3	Résultats	48
3.3.1	Marqueur universel BacGen	49
3.3.2	Marqueurs humains BacHum, HF183 et HumM2	51
3.3.3	Marqueur porcin Pig-1-Bac.....	53
3.3.4	Marqueur bovin BacBov1	55
3.3.5	Marqueur ruminant BacR	56
3.3.6	Marqueurs poulets Chicken/Duck-Bac et <i>Brevibacterium</i>	58
3.3.7	Bilan	59
4	IMPACT DE L'ENTREPOSAGE DES FUMIERS ET LISIERS.....	62
4.1	Méthodologie	62
4.2	Résultats	63
4.2.1	Matières sèches et masse volumique	63
4.2.2	Populations d' <i>E. coli</i>	65
4.2.3	Marqueurs génétiques	70
4.2.4	Bilan	78
5	CONTRIBUTIONS RELATIVES DES SOURCES DE CONTAMINATION FÉCALE DE L'EAU	80
5.1	Méthodologie	80
5.2	Résultats	81
5.2.1	Matières sèches et masse volumique	81
5.2.2	Populations de bactéries <i>E. coli</i>	81
5.2.3	Marqueurs génétiques dans les intrants.....	83
5.2.4	Marqueurs génétiques dans les échantillons d'eau	85
5.2.5	Taux de recouvrement.....	91
5.2.6	Bilan	92
6	ÉVALUATION DU DEVENIR ENVIRONNEMENTAL DES MARQUEURS GÉNÉTIQUES <i>BACTEROIDALES</i>	94
6.1	Dispositifs expérimentaux	94

6.2	Méthodologie	95
6.3	Résultats	97
6.3.1	Épandages et échantillonnages réalisés	97
6.3.2	Échantillons de lisier de porc utilisés lors des épandages sur les parcelles principales en loam argileux.	100
6.3.3	Échantillons de sol et d'eau provenant du site expérimental principal en loam argileux	102
6.3.4	Échantillons de lisier de porc et de fumier de bovin utilisés pour les épandages dans les parcelles en loam sableux et argile lourde	110
6.3.5	Échantillons de sol et d'eau provenant des parcelles de sol de type loam sableux et argile lourde.	111
6.4	Bilan	116
7	VALIDATION DE LA PROCÉDURE DÉVELOPPÉE SUR LE TERRAIN	118
7.1	Méthodologie	118
7.1.1	Amélioration de la sensibilité du marqueur BacR avec la méthode qPCR	118
7.1.2	Bassin versant du Lac Boivin	119
7.1.3	Bassin versant de la rivière du Chicot.....	122
7.1.4	Bassin versant du Ruisseau au Castor	125
7.2	Résultats	128
7.2.1	Résultats de l'amélioration de la sensibilité du marqueur BacR avec la méthode qPCR.....	128
7.2.2	Bassin versant du Lac Boivin	129
7.2.3	Bassin versant de la Rivière du Chicot.....	134
7.2.4	Bassin versant du Ruisseau au Castor	137
7.2.5	Analyse statistique – corrélation entre <i>E. coli</i> et marqueurs BacGen	141
8	PROCÉDURE GLOBALE ET RECOMMANDATIONS POUR LA DÉTERMINATION DES SOURCES DE CONTAMINATION FÉCALE DE L'EAU.....	145
8.1	Procédure d'échantillonnage et de conservation des échantillons	145
8.2	Données À collectER par les intervenants du MELCCFP lors d'un échantillonnage	147
8.3	Procédure d'extraction et de conservation de l'ADN.....	147
8.4	Méthode d'analyse des échantillons.....	148
8.5	Méthode de présentation des résultats.....	152
	CONCLUSIONS	154
	RÉFÉRENCES.....	157

ANNEXE 1 - Description des principaux marqueurs *Bacteroidetes* documentés en PCR quantitative.

ANNEXE 2 - Description des principaux marqueurs mitochondriaux documentés en PCR quantitative.

ANNEXE 3 – Protocole : Extraction de l'ADN génomique dans les matières fécales.

ANNEXE 4 – Protocole : Extraction de l'ADN génomique dans les échantillons d'eau.

ANNEXE 5 – Protocole : Détermination de la température d'hybridation des amorces - méthode du gradient de température.

ANNEXE 6 - Protocole : Détermination des limites de détection et de quantification et de la spécificité des marqueurs.

ANNEXE 7 - Protocole : Effet des conditions d'entreposage des fumiers et lisiers sur les marqueurs génétiques.

ANNEXE 8 - Protocole : Détermination des populations d'*E. coli* par plaques Pétrifilms™.

ANNEXE 9 - Résultats des essais d'entreposage (activité 3) rapportés en base sèche.

ANNEXE 10 – Protocole : Évaluation des contributions relatives des marqueurs dans l'eau.

ANNEXE 11 – Protocole : Détermination des populations d'*E. coli* dans l'eau par filtration sur membrane.

ANNEXE 12 – Résultats des contributions relatives dans l'eau : Concentrations des *E. coli* et marqueurs avant et après la contamination par les intrants.

ANNEXE 13 – Protocole d'extraction d'ADN génomique dans les échantillons de sol.

ANNEXE 14 – Résultats optimisation BacR.

ANNEXE 15 – Résultats des populations d'*E. coli*, de marqueurs et des LOD dans l'eau des bassins versants à l'étude.

ANNEXE 16 – Données de température de l'air et de précipitations répertoriées dans les bassins versants en 2022.

ANNEXE 17 – Protocole d'échantillonnage et de conservation des échantillons.

ANNEXE 18 – Formulaire d'observation terrain.

ANNEXE 19 – Modèle proposé de rapport d'analyse et présentation des résultats.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Exemples de méthodes de traçage de contamination fécale.	15
Tableau 2.	Évaluation des critères de sélection des marqueurs généraux.	40
Tableau 3.	Évaluation des critères de sélection des marqueurs humains.	41
Tableau 4.	Évaluation des critères de sélection des marqueurs bovins..	42
Tableau 5.	Évaluation des critères de sélection des marqueurs pour les ruminants.	43
Tableau 6.	Évaluation des critères de sélection des marqueurs pour le poulet.	44
Tableau 7.	Évaluation des critères de sélection des marqueurs porcins..	44
Tableau 8.	Liste des standards utilisés pour chaque marqueur.....	47
Tableau 9.	Conditions d'amplification qPCR des marqueurs évalués.	48
Tableau 10.	Résumé des teneurs en matières sèches utilisées pour rapporter les résultats qPCR en base sèche selon la matrice.	49
Tableau 11.	Concentrations du marqueur universel BacGen mesurées dans les échantillons de matières fécales, lisiers, fumiers et eaux usées (n=19).	51
Tableau 12.	Concentrations du marqueur universel BacGen mesurées dans les échantillons d'eau (n=12).	51
Tableau 13.	Concentrations du marqueur porcine Pig-1-Bac mesurées dans les échantillons trouvés positifs (n=9).....	54
Tableau 14.	Concentrations du marqueur bovin BacBov1 mesurées dans les échantillons trouvés positifs (n=24).....	56
Tableau 15.	Concentrations du marqueur ruminant BacR mesurées dans les échantillons trouvés positifs (n=6).....	57
Tableau 16.	Concentrations du marqueur ruminant Chicken/Duck-Bac mesurées dans les échantillons trouvés positifs (n=14).....	59
Tableau 17.	Limites de détection et de quantification des marqueurs ciblés, calculées à partir des séquences standards diluées.....	60
Tableau 18.	Analyse de variance du taux de matières sèches (%) des quatre matrices évaluées selon la température et la durée d'entreposage.....	64
Tableau 19.	Analyse de variance des populations d' <i>E. coli</i> (UFC/g en base humide) des quatre matrices évaluées selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	66
Tableau 20.	Constantes de décroissance des populations d' <i>E. coli</i> selon le type de fumier et la température.	70
Tableau 21.	Analyse de variance de la quantité de marqueurs (Log ₁₀ nb copies/g en base humide) dans le lisier de porc selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	76
Tableau 22.	Analyse de variance du marqueur BacGen (Log ₁₀ nb copies/g en base humide) dans le fumier de poulet selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	77
Tableau 23.	Constantes de décroissance (k) et intervalles de confiance à 95 % des <i>E. coli</i> définies par type de matrice selon la température d'entreposage.	78

Tableau 24.	Comparaison entre les concentrations des marqueurs au début et à la fin de l'entreposage par type de matrice selon la température d'entreposage.	79
Tableau 25.	Population d' <i>E. coli</i> dans les intrants.....	82
Tableau 26.	Concentration et pureté de l'ADN dans les intrants.	83
Tableau 27.	Contribution relative des marqueurs spécifiques par rapport au marqueur général BacGen dans les intrants.....	85
Tableau 28.	Limites de détection des marqueurs dans les échantillons d'eau contaminés.....	86
Tableau 29.	Concentrations attendues des marqueurs dans les échantillons d'eau contaminés.....	86
Tableau 30.	Contribution relative des marqueurs spécifiques par rapport au marqueur général BacGen dans les échantillons d'eau contaminés.	91
Tableau 31.	Taux de recouvrement (%) des bactéries <i>E. coli</i> et des marqueurs dans les échantillons d'eau de surface et de puits.	92
Tableau 32.	Calendrier des principales opérations au champ réalisées dans le dispositif en loam argileux.	98
Tableau 33.	Calendrier des principales opérations au champ réalisées dans les dispositifs en loam sableux et en argile.....	98
Tableau 34.	Dates d'échantillonnages de sol et d'eau sur le site expérimental en loam argileux.	99
Tableau 35.	Échantillonnages de sol et d'eau sur le site expérimental en argile lourde.....	100
Tableau 36.	Échantillonnages de sol et d'eau sur le site expérimental en loam sableux.	100
Tableau 37.	Populations en bactéries <i>E. coli</i> dans les échantillons de lisier de porc épandu sur le loam argileux.....	101
Tableau 38.	Concentration du marqueur Pig-1-Bac dans les échantillons de sol de type loam argileux trouvés positifs (n=12).	105
Tableau 39.	Concentration du marqueur Pig-1-Bac dans les échantillons trouvés positifs d'eau de ruissellement provenant des parcelles en loam argileux (n=8).	110
Tableau 40.	Populations en bactéries <i>E. coli</i> dans les échantillons de fumier de bovin et de lisier de porc utilisés lors des épandages sur les sols de type argile lourde et loam sableux.....	110
Tableau 41.	Populations des bactéries <i>E. coli</i> dans les échantillons d'eau des piézomètres provenant des parcelles de sol en argile lourde et loam sableux (n=6).	116
Tableau 42.	Résumé des principales caractéristiques des trois bassins versants à l'étude.....	127
Tableau 43.	Comparaison des résultats obtenus avant et après l'amélioration de la sensibilité du marqueur ruminant BacR.	129
Tableau 44.	Contenu en marqueurs génétiques des échantillons de lisier et de fumiers analysés dans le bassin versant du ruisseau au Castor.	140
Tableau 45.	Conditions d'amplification qPCR du marqueur général BacGen, des marqueurs spécifiques ainsi que l'IAC.....	150
Tableau 46.	Protocole d'amplification qPCR du marqueur général BacGen et des marqueurs spécifiques.	151

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Résumé de l'arbre phylogénétique des <i>Bacteroidetes</i> selon le <i>Catalogue of life 2019</i> (Naturalis Biodiversity, s.d.).	16
Figure 2. Teneur en matières sèches du lisier de porc, du fumier de bovin et du lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	64
Figure 3. Teneur en matières sèches du fumier de poulet selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	65
Figure 4. Populations d' <i>E. coli</i> dans le lisier de porc selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	67
Figure 5. Populations d' <i>E. coli</i> dans le lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	67
Figure 6. Populations d' <i>E. coli</i> dans le fumier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	68
Figure 7. Populations d' <i>E. coli</i> dans le fumier de poulet selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	69
Figure 8. Marqueurs universels BacGen quantifiés dans le fumier et le lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	71
Figure 10. Marqueurs ruminants BacR quantifiés dans le fumier et le lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	72
Figure 11. Ratios entre les quantités de marqueurs spécifiques et les marqueurs universels mesurés dans le fumier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	73
Figure 12. Ratios entre les quantités de marqueurs spécifiques et les marqueurs universels mesurés dans le lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	73
Figure 13. Marqueurs universels BacGen quantifiés dans le lisier de porc selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	74
Figure 14. Marqueurs porcins Pig-1-Bac quantifiés dans le lisier de porc selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	75
Figure 15. Ratios entre les quantités de marqueurs spécifiques et les marqueurs universels mesurés dans le lisier de porc selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	75
Figure 16. Marqueurs universels BacGen quantifiés dans le fumier de poulet selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.	77
Figure 17. Population de bactéries <i>E. coli</i> dans les échantillons d'eau.	82
Figure 18. Concentration des marqueurs dans les intrants.	84
Figure 19. Contribution relative des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans les intrants en ne considérant pas BacR et BacGen.	84
Figure 20. Contribution relative des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans les intrants en ne considérant pas BacBov1 et BacGen.	85

Figure 21. Concentration des marqueurs dans l'eau de surface après la contamination par les intrants.....	87
Figure 22. Concentration des marqueurs dans l'eau de puits après la contamination par les intrants.	88
Figure 23. Contributions relatives des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans l'eau de surface après la contamination par les intrants en ne considérant pas BacR et BacGen.	89
Figure 24. Contributions relatives des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans l'eau de surface après la contamination par les intrants en ne considérant pas BacBov1 et BacGen.	89
Figure 25. Contributions relatives des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans l'eau de puits après la contamination par les intrants en ne considérant pas BacR et BacGen.	90
Figure 26. Contributions relatives des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans l'eau de puits après la contamination par les intrants en ne considérant pas BacBov1 et BacGen.	90
Figure 27. Plan du site expérimental principal en sol de type loam argileux.....	95
Figure 28. Plans des sites expérimentaux en sol de type argile lourde et loam sableux.	95
Figure 29. Concentration du marqueur général BacGen et des marqueurs spécifiques dans les échantillons de lisier de porc.	102
Figure 30. Population d' <i>E. coli</i> dans le sol de type loam argileux des 12 parcelles principales.	103
Figure 31. Concentration moyenne du marqueur général BacGen dans le sol loam argileux.....	104
Figure 32. Population d' <i>E. coli</i> dans l'eau des piézomètres du champ principal en sol loam argileux. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard.....	106
Figure 33. Concentration moyenne du marqueur général BacGen dans l'eau des piézomètres du champ principal en sol loam argileux.....	107
Figure 34. Population d' <i>E. coli</i> dans l'eau de ruissellement du champ principal loam argileux.	108
Figure 35. Concentration moyenne du marqueur général BacGen dans l'eau de ruissellement du champ principal en loam argileux.	109
Figure 36. Concentration du marqueur général BacGen et des marqueurs spécifiques dans le lisier de porc et le fumier de bovin.	111
Figure 37. Population d' <i>E. coli</i> dans le sol en argile lourde.	112
Figure 38. Concentration du marqueur général BacGen dans le sol de type argile lourde.	113
Figure 39. Population d' <i>E. coli</i> dans le sol loam sableux.	114
Figure 40. Concentration du marqueur général BacGen dans le sol loam sableux.	115
Figure 41. Bassin versant du Lac Boivin, points d'échantillonnage de l'eau en 2022 et sites de surverses.	120
Figure 42. Photos du site d'échantillonnage à l'exutoire du Ruisseau Bouchard prises à différentes dates en 2022.	121
Figure 43. Schéma du bassin versant de la rivière du Chicot.	123
Figure 44. Sous-bassins versants de la rivière du Chicot, points d'échantillonnage ciblés en 2022 et ouvrages de surverses.....	124
Figure 45. Sous-bassins versants de la rivière du Chicot et points d'échantillonnage ciblés en 2022.....	124

Figure 46. Photos du site d'échantillonnage situé à l'exutoire du ruisseau des Anges vers la rivière du Chicot (station T3) à deux dates en 2022.	125
Figure 47. Schéma du bassin versant du Ruisseau au Castor et point d'échantillonnage en 2022.	126
Figure 48. Photos du site d'échantillonnage situé près de l'exutoire du ruisseau au Castor à deux dates en 2022.	127
Figure 49. Populations d' <i>E. coli</i> au cours de la saison 2022 aux deux stations d'échantillonnage du bassin versant du Lac Boivin.	130
Figure 50. Relation entre les marqueurs et les populations d' <i>E. coli</i> à la station Bouchard du bassin versant du Lac Boivin d'avril à novembre 2022.	132
Figure 51. Relation entre les marqueurs et les populations d' <i>E. coli</i> au réservoir Lemieux du bassin versant du Lac Boivin d'avril à juin 2022.	133
Figure 52. Populations d' <i>E. coli</i> au cours de la saison 2022 aux deux stations d'échantillonnage du bassin versant de la Rivière du Chicot.	134
Figure 53. Relation entre les marqueurs et les populations d' <i>E. coli</i> à la station P1 du bassin versant de la Rivière du Chicot d'avril à novembre 2022.	135
Figure 54. Relation entre les marqueurs et les populations d' <i>E. coli</i> au à la station T3 du bassin versant de la Rivière du Chicot d'avril à novembre 2022.	136
Figure 55. Populations d' <i>E. coli</i> au cours de la saison 2022 à la station d'échantillonnage du bassin versant du Ruisseau au Castor.	137
Figure 56. Relation entre les marqueurs <i>Bacteroidetes</i> et les populations d' <i>E. coli</i> au bassin versant du Ruisseau au Castor de mars à novembre 2022.	139
Figure 57. Distribution des données d' <i>E. coli</i> (haut) et BacGen (bas) en fonction de la date et selon le site de prélèvement.	142
Figure 58. Distribution des données d' <i>E. coli</i> en fonction de BacGen selon la date et le site de prélèvement.	143
Figure 59. Distribution des données d' <i>E. coli</i> en fonction de BacGen, toutes dates et sites de prélèvement confondus.	144
Figure 60. Distribution des données normalisées d' <i>E. coli</i> en fonction de BacGen, toutes dates et sites de prélèvement confondus.	144

MISE EN CONTEXTE

La contamination de l'environnement par des matières fécales représente un risque potentiel pour la santé publique et contribue à l'augmentation des coûts publics de traitement de l'eau. Bien que certains indices permettent parfois de cibler l'origine potentielle de cette contamination, il est généralement difficile de la déterminer avec certitude. Ceci conduit à des difficultés dans l'élaboration d'outils d'encadrement visant la protection et la restauration des plans d'eau contaminés, ainsi que l'accès à des données objectives en cas de litige concernant la qualité de l'eau.

Le développement d'une procédure efficace de détermination des sources de contamination fécale et de leurs contributions relatives repose sur un bon choix de marqueurs. Considérant le volume important de références scientifiques sur le sujet, une recension de la littérature s'avérait nécessaire en début de mandat afin de cibler les bonnes amorces et de documenter leur spécificité et ce, en tenant compte du contexte d'utilisation des marqueurs dans l'environnement. L'objectif principal de cette revue de littérature était d'identifier les marqueurs qui seront utilisés pour l'ensemble de l'étude afin de cibler ceux indiquant une contamination fécale de toutes espèces animales confondues (universels), ainsi que ceux associés à l'homme, aux porcs, aux bovins, aux ruminants et au poulet. Une attention particulière a été portée envers les marqueurs ayant été développés en qPCR avec des sondes de la technologie Taqman®, puisqu'elle est reconnue comme ayant généralement une meilleure spécificité et sensibilité pour les échantillons environnementaux (Purcell *et al.*, 2016). Afin de s'assurer de la spécificité des amorces de façon théorique, la Plateforme publique Genbank® a également été consultée (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

À la suite des étapes de mise au point en laboratoire, de la quantification et de l'évaluation du devenir des marqueurs dans différentes matrices incluant des effluents d'élevage, des matières fécales fraîches d'animaux sauvages, d'eau de surface et souterraine, ainsi que dans le sol, la méthode a été appliquée en bassins versants. Cette ultime étape a permis de peaufiner la méthode de façon à proposer un protocole que les futurs intervenants pourront appliquer. Ainsi, des protocoles d'échantillonnage et d'analyse, incluant le mode de présentation des résultats, ainsi que des recommandations sur la conservation des échantillons d'eau et d'extraits d'ADN sont proposés.

1 RECENSION DE LA LITTÉRATURE

Cette revue de la littérature, réalisée en 2019-2020, a comme objectifs de documenter les différents marqueurs génétiques utilisés pour le traçage des sources de contamination fécale, leurs limites de détection et de quantification dans les échantillons, ainsi que de fournir de l'information sur les différents facteurs abiotiques et biotiques pouvant influencer les méthodes de traçage.

La détection des coliformes fécaux, *Escherichia coli* (*E. coli*) et entérocoques est réalisée depuis plusieurs décennies afin de déterminer s'il y a contamination de l'eau par des matières fécales (Mattioli *et al.*, 2017). Leur faible pathogénicité, leur concentration élevée dans les échantillons d'eaux contaminées, ainsi que le lien qu'ils ont avec les agents pathogènes en font des bons indicateurs de contamination fécale (Harwood *et al.*, 2014). Plusieurs autres microorganismes d'origine fécale peuvent en effet être retrouvés dans les eaux de surface contaminées (ex : virus, protozoaires, bactéries). Cependant, ces microorganismes ne permettent pas de connaître la source ou l'hôte responsable de la contamination fécale. Plusieurs sont difficiles et coûteux à cultiver et à identifier. De plus, ils peuvent être distribués inégalement dans l'environnement et être présents en faible concentration, compliquant ainsi leur détection dans les échantillons d'eau. Par conséquent, les indicateurs de contamination fécale sont utilisés pour décrire la qualité microbiologique de l'eau.

1.1 MÉTHODES DE TRAÇAGE DES SOURCES DE CONTAMINATION DE L'EAU

Depuis quelques décennies, la détermination des sources de contamination fécale dans l'environnement, particulièrement dans l'eau, est de plus en plus utilisée à l'échelle mondiale. En effet, la qualité de l'eau demeure d'intérêt et ce, autant dans les pays développés qu'en développement, que ce soit pour les activités de contact direct (baignade) ou indirect (pêche sportive), la consommation humaine, l'abreuvement des animaux ou l'irrigation des cultures. Le fait de connaître l'origine de la contamination favorise une meilleure gestion de celle-ci et permet de vérifier, par exemple, les installations septiques environnantes si l'origine de la contamination est humaine. Plusieurs méthodes ont été mises au point afin de déterminer les sources de contamination fécale potentielles, celles-ci pouvant être réparties en quatre grands groupes, selon que soient requises ou non la mise en culture des microorganismes ou une banque de matériel microbien de référence (Blais *et al.*, 2015). Le Tableau 1 présente des exemples liés à chaque type.

Tableau 1. Exemples de méthodes de traçage de contamination fécale.

Type de méthode	Principe et exemple	Principaux avantages	Principaux inconvénients
Caractérisation génotypique ou phénotypique de microorganismes spécifiques dépendante de culture et de matériel microbien de référence	Bactéries intestinales ayant des caractéristiques génotypique ou phénotypiques spécifiques à l'hôte, souvent <i>E. coli</i>	Cible des bactéries indicatrices de contamination fécale de routine et historiquement utilisées dans la réglementation canadienne	Nécessité de référer à du matériel géographiquement restreint et de bâtir sa propre banque de référence
Marqueurs génétiques indépendante de culture et de matériel microbien de référence	Méthodes moléculaires avec marqueurs génétiques	Pas de pré-culture des organismes cibles; bonne stabilité géographique des marqueurs	Nécessite des infrastructures et expertise de laboratoire spécialisées
Méthode dépendante de culture et indépendante de matériel microbien de référence	Analyse des coliphages à ARN F+ (sous-groupes propres aux animaux vs humains)	Matériel cible important dû à l'étape initiale d'enrichissement	Représentation variable des sous-groupes de coliphages chez les humains
Méthode indépendante de culture et dépendante de matériel microbien de référence	Analyse des communautés microbiennes totales avec l'ARN 16S	Pas de pré-culture des organismes cibles	Manque d'essais réalisés à grande échelle

Adapté de Blais *et al.* (2015)

Le traçage à l'aide de marqueurs génétiques ciblant des microorganismes spécifiques à un hôte (ex : humain, bovin, porcin) est une méthode indépendante de la mise en culture et de matériel microbien de référence. Un marqueur génétique, dans un contexte de traçage, est une séquence d'ADN spécifique à un hôte et retrouvé sur un gène connu. Cette méthode semble la plus prometteuse dans le contexte de ce mandat, bien que des infrastructures et du personnel de laboratoire spécialisés soient nécessaires. Plusieurs équipes ont identifié des marqueurs hautement spécifiques à l'échelle mondiale, incluant le Canada, et beaucoup d'information est disponible. C'est notamment pour cette raison que cette méthode a été ciblée dans le cadre de ce projet. Les prochains paragraphes brossent un portrait des possibilités de marqueurs.

Les marqueurs génétiques ciblant les *Bacteroidetes* ont été introduits à la fin du 20^e siècle (Harwood *et al.*, 2014). Les *Bacteroidales*, ordre faisant partie des *Bacteroidetes*, sont généralement présentes en plus grande quantité dans les fèces d'animaux que les bactéries *E. coli* (Weidhaas *et al.*, 2015). Ces bactéries ont ainsi le potentiel d'être utilisées pour la détection de la contamination fécale. Les *Bacteroides*, principal genre des *Bacteroidales*, peuvent représenter jusqu'à 30 % de toutes les bactéries intestinales chez l'humain (Salyers, 1984). La Figure 1 résume l'arbre phylogénétique de ce groupe de microorganismes. Grâce aux analyses d'hétérogénéité de longueur de séquences isolées à partir d'organismes hôtes, il a été possible de trouver des séquences spécifiques conservées chez certains microorganismes du microbiome de ces organismes hôtes. À partir de ces séquences, des amorces

ont été développées dans le cadre de méthodes de polymérisation en chaîne (*Polymerase chain reaction* – PCR), ce qui permet de tracer l'origine de la contamination fécale (Green *et al.*, 2014, Green *et al.*, 2011; Haugland *et al.*, 2010; Dick *et al.*, 2005; Bernhard et Field, 2000).

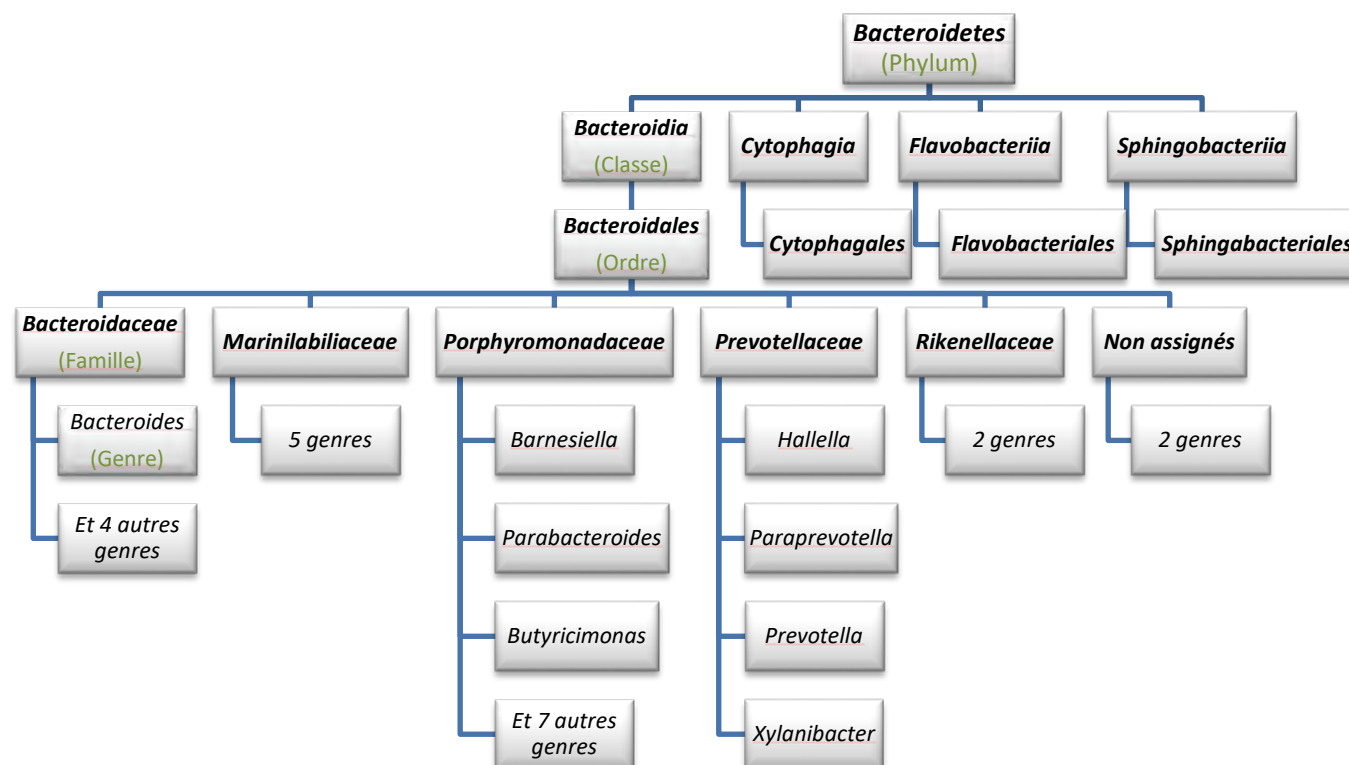


Figure 1. Résumé de l'arbre phylogénétique des *Bacteroidetes* selon le *Catalogue of life* 2019 (Naturalis Biodiversity, s.d.).

D'autres microorganismes ont aussi été rapportés dans la littérature pour déterminer l'origine de la contamination (Blais *et al.*, 2015). Par exemple, notons les archées méthanogènes *Methanobrevibacter smithii* et *Methanobrevibacter ruminantium* qui ciblent les humains et les ruminants, respectivement (Johnston *et al.*, 2013 ; Ufnar *et al.*, 2007). Notons aussi plusieurs types de virus, particulièrement les bactériophages, les polyomavirus humains et les adénovirus. La plupart des virus ont été décrits pour cibler une origine humaine, bien que certains adénovirus aient été utilisés pour cibler aussi les bovins et les porcs (Spilki *et al.*, 2013; Maluquer de Motes *et al.*, 2004; Hundesa *et al.*, 2009). Bien que souvent spécifiques à leur hôte, peu de marqueurs ont été développés pour différencier les espèces animales. Finalement, quelques études ont également été réalisées sur l'évaluation des *Bifidobacterium* pour déterminer l'hôte à l'origine de la contamination environnementale (Gómez-Doñate *et al.*, 2012; Ballesté et Blanch, 2011). Par exemple, l'espèce *Bifidobacterium adolescentis* a bien été corrélée à une origine humaine, alors que la variabilité s'est révélée plus importante pour le porc et le bovin (Ballesté et Blanch, 2011). Les essais préliminaires en PCR nichée avaient conclu que l'espèce *B. saeculare* s'associait bien à la volaille, mais les essais subséquents en électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) n'ont pas confirmé cette affirmation (Ballesté et Blanch, 2011). Les méthodes développées requéraient une étape de culture des bactéries,

et l'équipe de recherche travaille désormais à cibler des amorces pour réaliser la détection en PCR quantitative (qPCR). Un an plus tard, la même équipe a publié des amorces en qPCR ciblant différentes espèces de *Bifidobacterium* spécifiques à l'humain, au poulet, aux bovins et au porc. Leur méthode s'est révélée parfaitement spécifique. Toutefois, la variété de marqueurs décrits dans la littérature scientifique est plutôt faible, et davantage de travaux sont nécessaires avant d'opter pour cette méthode à plus grande échelle.

Des marqueurs génétiques mitochondriaux ont également été développés, mais leur usage est moins répandu (Villemur *et al.*, 2015; Baker-Austin *et al.*, 2010). Le principe général veut que les cellules épithéliales de la paroi de l'intestin, par phénomène apoptotique normal, se détachent et se retrouvent dans les matières fécales des animaux et des humains en grande quantité. L'ADN mitochondrial est un élément génétique propre à l'organisme hôte et est absolument spécifique. Des régions de l'ADN mitochondrial spécifiques à l'hôte ont donc été décrites et servent à cibler l'origine de la contamination (Villemur *et al.*, 2015 ; Vuong *et al.*, 2013; Tambalo *et al.*, 2012; Caldwell et Levine, 2009; Kortbaoui *et al.*, 2009; Caldwell *et al.*, 2007; Martellini *et al.*, 2005). L'ADN mitochondrial est abondant dans les matières fécales, les séquences de cet ADN sont accessibles dans les bases de données de nombreux animaux et il est spécifique à son hôte (Villemur *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'ADN mitochondrial est présent dans toutes les cellules. Ainsi, une contamination par des cellules épithéliales de la peau, des cheveux ou de la salive lors de l'échantillonnage de l'eau ou lors de l'extraction de l'ADN pourrait donner un faux résultat de contamination fécale humaine (Caldwell *et al.*, 2011). De ce fait, l'usage des marqueurs mitochondriaux demande une attention particulière lors des échantillonnages, des analyses de laboratoire et du traitement des données.

Peu importe le microorganisme ciblé, l'analyse de l'ARN 16S représente actuellement la cible la plus couramment utilisée dans l'étude de l'évolution bactérienne, des liens phylogénétiques entre taxons, de la diversité bactérienne dans l'environnement, ainsi que de l'abondance relative des différents groupes microbiens (Louca *et al.*, 2018; Vetrovsky et Baldrian, 2013). Le gène codant pour cet ARN est distribué universellement au sein des espèces, est peu affecté par les transferts horizontaux de matériel génétique et s'est hautement conservé dans le temps, mises à part certaines régions variables spécifiques à leurs hôtes respectifs, le rendant intéressant pour l'analyse phylogénétique. Une des limites de cette cible génétique concerne cependant son nombre de copies par génome, variant entre 1 à 15 selon les espèces bactériennes (Vetrovsky et Baldrian, 2013), rendant difficile l'interprétation de l'analyse métagénomique (Louca *et al.*, 2018). Suite à l'analyse de 59 génomes issus de 37 genres et 52 espèces de *Bacteroidetes*, Vetrovsky et Baldrian (2013) en ont rapporté $3,5 \pm 1,5$ copies par génome. Chez le genre *Bacteroides*, le nombre de copies a été évalué entre 4 et 7 par génome ou par cellule (Lee *et al.*, 2010).

Caractéristiques à retrouver chez un marqueur de contamination fécale

En résumé, un marqueur idéal devrait être :

- 1- retrouvé uniquement chez la population hôte et non les autres espèces (spécificité);
- 2- distribué uniformément dans la population hôte et ce, de façon stable géographiquement et dans le temps;
- 3- quantifiable et ce, de façon représentative au niveau de contamination;

- 4- persistant de façon constante et prévisible dans le temps, sans être affecté par l'environnement. La persistance ne doit cependant pas être trop élevée si l'objectif est de déterminer une contamination fécale récente.

Aucun des microorganismes ou groupes de microorganismes présentement évalués comme marqueurs ne répond à tous ces critères. Par contre, l'analyse des *Bacteroidetes*, notamment le gène codant pour l'ARN 16s, est couramment utilisée et plusieurs études publiées sont disponibles. Le choix s'est donc porté sur ce groupe de bactéries. La prochaine section détaille les marqueurs spécifiques, ainsi que leur détection et quantification.

1.2 DÉTECTION DES MARQUEURS GÉNÉTIQUES DÉVELOPPÉS CHEZ LES *BACTEROIDETES*

Plusieurs équipes de recherche ont développé des amorces et des sondes pouvant être utilisées pour détecter des séquences spécifiques de gènes de *Bacteroidetes* (phylum), *Bacteroidales* (ordre), *Bacteroides* ou *Prevotella* (genres) à l'aide de méthodes telles que la PCR conventionnelle, la PCR nichée et la qPCR. Cette dernière est la méthode la plus utilisée, puisqu'elle permet de quantifier rapidement les gènes ciblés dans les échantillons et de comparer les résultats obtenus entre les échantillons.

Afin de bien comprendre ce qui est rapporté dans les études, voici, en résumé, quelques détails sur les composantes d'une réaction qPCR. Les amorces sont de courtes séquences d'ADN qui bordent la séquence spécifique ciblée chez l'organisme hôte. La sonde, utilisée en qPCR, est une courte séquence d'ADN dotée d'une molécule chimique fluorescente, le fluorophore, et est incluse dans la séquence cible. Ceci augmente la spécificité de la réaction tout en activant le signal de fluorescence tout au long de la réaction. En effet, il est possible que les amorces utilisées seules soient reconnues dans un échantillon non ciblé, et la présence d'une troisième séquence reconnue améliore la spécificité de la réaction. C'est l'intensité de la fluorescence qui permet de quantifier la présence de l'organisme cible. Finalement, quelques études rapportent l'usage d'un contrôle interne d'amplification (IAC), qui est une séquence d'ADN unique dont la séquence des amorces a été ajoutée afin de vérifier l'inhibition des réactions PCR. Cette séquence est donc ajoutée dans l'échantillon à analyser, et devrait toujours donner un signal positif.

Des marqueurs spécifiques aux *Bacteroidales* provenant d'humains, de porcins, de bovins, de ruminants, du poulet, du canard, de la Bernache du Canada, de canins et du rat musqué ont été rapportés dans des articles publiés au cours des dernières années. Un résumé des principaux marqueurs génétiques utilisés en qPCR ciblant l'ADN des *Bacteroidetes* est présenté à l'Annexe 1. En complément d'information, ceux ciblant l'ADN mitochondrial ont été ajoutés à l'Annexe 2. Quelques marqueurs ont été testés par plus d'une équipe de recherche, alors que d'autres n'ont été rapportés qu'une seule fois. Il est à noter que les études ont généralement été réalisées à l'aide de différents réactifs qPCR, thermocycleurs et protocoles d'amplification. Les articles ne contiennent cependant pas toujours toutes ces informations (Piorkowski *et al.*, 2014; Fremaux *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Layton *et al.*, 2006). Pourtant, il a été rapporté que les réactifs qPCR et le modèle du thermocycleur pouvaient affecter la reproductibilité de la méthode qPCR (Harwood *et al.*, 2014; Bustin *et al.*, 2009). Ceci est aussi

mentionné sur les sites internet des compagnies distributrices de produits pour la PCR, notamment Thermo Fisher Scientific et Bio-Rad, où de l'information intéressante est proposée sur les principes de base de la méthode¹.

Le protocole d'amplification qPCR ainsi que la concentration des amorces et des sondes sont déterminés en fonction des réactifs qPCR utilisés. Les compagnies recommandent généralement à leurs clients de suivre un protocole en fonction du mélange réactionnel (*Master mix*) commercialisé (ex : Bio-Rad, Thermo Fisher Scientific, IDT). Aussi, les sondes mentionnées dans les articles ne contiennent pas toujours de détails concernant le type de fluorophore (ex : FAM, VIC, TET) et d'extincteur (ex : MGB, NFQ1) utilisés. Certaines équipes de recherche ont rapporté des quantités d'amorces et de sondes utilisées, mais pas les concentrations finales retrouvées dans les réactions qPCR (Villemur *et al.*, 2015; Mieszkin *et al.*, 2009 ; Okabe *et al.*, 2007; Layton *et al.*, 2006). Des concentrations d'amorces trop élevées pourraient mener à des dimères d'amorces, de la non-spécificité ou même perturber le bon fonctionnement de la polymérase provenant du mélange réactionnel utilisé. Cette affirmation est également partagée sur les sites commerciaux spécialisés, dans les sections sur le diagnostic des problèmes rencontrés².

Les prochaines sections font la revue des principaux marqueurs développés selon la cible recherchée. Dans le but de cibler les marqueurs, une attention particulière a été portée sur les études qui présentent le développement de ceux-ci dans les matières fécales, et non pas celles qui ont utilisé la démarche dans un contexte de traçage des sources de contamination. Celles-ci feront l'objet des rapports subséquents, notamment lorsqu'il sera question de la persistance dans l'environnement (eau et sol). L'analyse des articles scientifiques a donc été réalisée, lorsque possible, selon les critères suivants :

1. Marqueurs ciblant les *Bacteroidetes* ou *Bacteroidales* ou *Bacteroides*;
2. Méthode développée en qPCR avec la technologie Taqman®;
3. Information détaillée sur le protocole et la démarche utilisés pour développer les amorces et leur évaluation;
4. Études réalisées au Canada ou en Amérique du Nord;
5. Marqueurs évalués par plus d'une équipe de recherche issues de contextes géographiques différents.

1.2.1 Marqueurs génétiques universels

La détection des marqueurs universels, c'est-à-dire ne ciblant aucun animal spécifiquement, sert à renseigner sur le niveau global de contamination fécale. De plus, dans une optique de traçage de la source de contamination dans l'eau, cette donnée sert à mesurer les contributions relatives de chacun des marqueurs spécifiques, en autant que chacun cible le même groupe/famille de microorganismes. Par exemple, il serait possible de déterminer les proportions (%) de chaque espèce animale dans la contamination totale d'un échantillon provenant de l'environnement si chaque marqueur cible les *Bacteroidales*. La part de la charge totale n'ayant été attribuée à

¹ <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>; <https://www.bio-rad.com/en-ca/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>.

² New England Biolabs : <https://international.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide>
Sigma Aldrich: <https://www.sigmaldrich.com/life-science/roche-biochemical-reagents/working-with-pcr.html>.

aucun marqueur ciblé pourra ainsi être déterminée. Celle-ci pourrait représenter par exemple la contamination provenant de la faune.

Parmi le nombre élevé de marqueurs développés dans le monde pour cibler les *Bacteroidetes* ou *Bacteroidales* généraux, les six marqueurs suivants ont été évalués en se basant sur les critères de sélection décrits précédemment, soit BacUni 1 et 2 (Marti *et al.*, 2011; Kildare *et al.*, 2007), GenBac2 (Siefring *et al.*, 2008; Dick et Field, 2004), GenBac3 (Weidhaas *et al.*, 2015; Siefring *et al.*, 2008), BacGen (Lee *et al.*, 2010) et AllBac (Fremaux *et al.*, 2010; Mieszkina *et al.*, 2009; Layton *et al.*, 2006).

Les marqueurs **BacUni 1 et 2** développés par Kildare *et al.* (2007) ciblant l'ARNr 16s des *Bacteroidales* se sont avérés efficaces à détecter les microorganismes dans tous les échantillons testés, tel que souhaité. Les échantillons de matières fécales provenaient de plusieurs sites en Californie (États-Unis (É-U)), ainsi que de l'Équateur. L'ADN total d'un échantillon fécal de 220 mg a été extrait dans un volume final de 200 µl dont 10 µl ont été utilisés dans une réaction qPCR de 25 µl. Ainsi, 100 % des échantillons de fèces d'origine humaine (n=18), bovine (n=8), équine (n=8), canine (n=8), féline (n=7), de goélants (n=10), ainsi que d'échantillons d'eaux usées brutes (n=14) se sont révélés positifs. Les auteurs ont également rapporté une bonne sensibilité et reproductibilité de la méthode, aucun faux positif ni faux négatif n'ayant été détecté lors d'un test à l'aveugle dans des échantillons d'eau contaminés avec des volumes connus d'eaux usées et/ou de matières fécales animales. Aucun échantillon provenant de porcs ou de poulets n'a été évalué. Les limites de détection et de quantification ont été mesurées en insérant les séquences spécifiques des marqueurs recherchés dans des plasmides et de l'eau pure. Les limites rapportées étaient de 2 et 30 copies de gènes/réaction (0,2 et 3 copies/µl d'extrait d'ADN), respectivement, dans les mêmes volumes de réaction que pour les échantillons. Ce marqueur a également été utilisé dans une étude réalisée dans l'est de l'Ontario (Canada) par l'équipe de Marti *et al.* (2011) sur le développement d'un marqueur spécifique au rat musqué. Mis à part un échantillon de fèces de rat musqué qui s'est révélé négatif (n=10), tous les autres échantillons fécaux provenant d'humains (n=20), bovins (n=22), porcs (n=6), castors (n=17), rats laveurs (n=3) et de marmottes (n=3) ont été positifs au marqueur universel. Encore une fois, aucun échantillon provenant de volailles n'a été évalué. Les limites de détection et de quantification n'ont été rapportées que pour le marqueur ciblant le rat musqué développé dans l'étude.

Les marqueurs **GenBac 2 et 3** développés par Siefring *et al.* (2008) et Dick et Field (2004) ciblent l'ARNr 16s des *Bacteroidetes*. La première équipe a comparé trois types d'équipements et de technologie qPCR (ABI modèle 7700/7900 avec Taqman®; ABI modèle 7900 avec Fast Mix; Cepheid SmartCycler avec Omni Mix), ainsi que différentes méthodes de préparation d'échantillons d'eau de surface prélevés dans trois états américains (Michigan, Mississippi et Louisiane), notamment la dilution des extraits d'ADN. Les échantillons présentaient des caractéristiques de salinité, conductivité électrique et turbidité variées. Après la filtration, les filtres ont été contaminés artificiellement en ajoutant 10 µl d'une solution contenant 5 000 cellules de *Bacteroides fragilis*. Les deux marqueurs ont été détectés dans tous les échantillons, mais avec des efficacités et sensibilités variant considérablement entre les appareils et technologies. En résumé, l'analyse avec le marqueur GenBac 2 présentait une moins grande sensibilité et efficacité d'amplification que le GenBac 3 et ce, avec les trois appareils. En effet, la sensibilité de GenBac 2 a varié entre 4,3 et 63,1 équivalent-cellules, et GenBac 3 entre 1,5 et 2,8 équivalent-cellules. Les limites ne sont pas rapportées en nombre de copies par réaction ni µl d'ADN. Les équivalents-cellules

sont définis par le ratio entre la quantité de cellules dans l'extrait original et le facteur de dilution de l'extrait, en assumant des volumes fixes extrait de 0,6 mL et analysé de 5 µL. L'interprétation de ce type de données est difficile. Le nombre de cellules de l'extrait original est calculé théoriquement à partir de cultures cellulaires pures. Finalement, les auteurs ont indiqué que les échantillons d'eau présentant une turbidité, salinité et conductivité élevées pouvait causer une inhibition de la réaction qPCR. L'analyse des extraits d'ADN non dilués a effectivement échoué, et les auteurs ont rapporté qu'une dilution 1 :5 était souvent suffisante pour pallier le problème, bien que la sensibilité de la méthode en soit réduite. Ils ont conclu qu'une étape de concentration et de purification de l'ADN pouvait être à considérer dans les cas où les échantillons sont turbides et que les populations bactériennes anticipées sont faibles. La seconde équipe a rapporté une limite de détection de 10 copies de gènes/réaction.

En 2010, le marqueur **GenBac3** développé par Siefring *et al.* (2008) aux États-Unis, est devenu partie prenante d'une méthode officielle de la US EPA afin de déterminer le niveau de contamination fécale de l'eau de surface, soit la méthode B (USEPA, 2010). Cette méthode a été développée sous la supervision du Dr Haugland de l'EPA et sert à quantifier les *Bacteroidales* dans l'eau en ciblant l'ARNr 16s de ces dernières. Les amorces sens et anti-sens décrites dans la méthode officielle ont été développées par Siefring *et al.* (2008) et Dick et Field (2004), respectivement. Cette méthode est en attente de validation en eau douce et salée, mais aucune mise à jour n'a été répertoriée depuis 2010.

En plus de porter sur le marqueur génétique GenBac3, l'étude de Dick et Field (2004) a proposé la comparaison avec la trousse de détection des *E. coli* et des coliformes totaux Colilert-18 pour estimer le niveau de contamination fécale dans l'eau. La méthode avec le milieu Colilert est acceptée par la US EPA pour évaluer le niveau de contamination fécale de l'eau, et les auteurs ont voulu développer une autre technique simple, rapide, spécifique et sensible. Les amorces développées par l'équipe se sont avérées efficaces à détecter les *Bacteroidetes* provenant d'humains, porcs, bovins, chats, chiens, wapitis, chevreuils et goélands. En résumé, les niveaux de *Bacteroidetes* mesurés par qPCR étaient corrélés avec les populations d'*E. coli* mesurées avec le Colilert-18 à certaines dilutions. Par contre, la corrélation entre ces deux paramètres était parfois difficile, puisque la limite de quantification supérieure de Colilert-18 était atteinte dans l'eau (2 419 nombre le plus probable (NPP) / 100 ml). La qPCR étant plus rapide et sensible que le Colilert-18, les auteurs ont conclu en son potentiel, mais ont recommandé davantage d'essais dans diverses conditions et contextes géographiques. Weidhaas *et al.* (2015) ont analysé le marqueur GenBac3 dans le fumier de volaille, rapportant entre autres le manque d'essais dans ce type de matrice. L'étude portait sur la persistance et le potentiel de recroissance des *Bacteroidales* dans le fumier en conditions aérobies et anaérobies. La détection du marqueur a été possible dans les échantillons, suggérant son potentiel comme marqueur général dans le traçage de la contamination fécale environnementale. Par contre, les auteurs ont démontré la recroissance des microorganismes en rapportant des niveaux du marqueur plus élevés dans le temps et ce, en conditions anaérobies et aérobies. Les limites de détection et de quantification n'ont pas été rapportées. L'étude s'est conclue avec une mise en garde générale quant à l'interprétation des résultats d'une étude de traçage de la contamination fécale utilisant les marqueurs de *Bacteroidales* dans des bassins versants où les élevages de volaille sont nombreux. La présence des marqueurs dans l'eau peut en effet être surreprésentée en raison de la recroissance des bactéries dans le fumier de poulet.

Le marqueur **BacGen**, développé par Lee *et al.* (2010) à partir d'échantillons prélevés en Ontario (Canada), cible l'ARNr 16s des *Bacteroidales*. Tel que souhaité pour un marqueur universel, la détection n'était pas spécifique et tous les échantillons d'origine humaine (n=16), bovine (n=18), porcine (n=10), équine (n=1), canine (n=4), féline (n=3), de chevreuil (n=3), d'oie (n=10), de goéland (n=4) et de raton laveur (n=1), ont été positifs. Aucun échantillon provenant de poulets n'a été évalué. L'étude servait entre autres à comparer l'utilisation des indicateurs standards de contamination fécale, soit *E. coli* et les entérocoques, aux *Bacteroidales*. Une faible corrélation a été observée entre les *Bacteroidales* et les *E. coli* ($R^2 = 0,22$), de même qu'entre les *Bacteroidales* et les entérocoques ($R^2 = 0,40$). D'autres auteurs avaient cependant rapporté que celles-ci parvenaient à mieux détecter une contamination fécale récente, et qu'elles indiquaient davantage la présence potentielle de microorganismes pathogènes tels qu'*E. coli* 0157:H7, *Salmonella* spp. et *Campylobacter* spp. (Fremaux *et al.*, 2009; Savichtcheva *et al.*, 2007; Walters *et al.*, 2007). La limite de détection, évaluée avec des plasmides où était intégrée la séquence recherchée à un ratio 1 : 1, était de 6,5 copies de gènes, soit entre 1 à 2 cellules de *Bacteroidales* par réaction PCR. La limite de quantification n'est pas décrite.

Le dernier marqueur, **AllBac**, est abondamment documenté. Développé en 2006 par Layton *et al.* à partir d'échantillons prélevés au Tennessee et en Pennsylvanie (États-Unis), il cible l'ARNr 16S des *Bacteroides*. Ces amorces ont été développées dans l'optique de remplacer *E. coli* comme indicateur de contamination fécale totale. Afin de cibler les séquences des amorces et de la sonde, l'équipe a d'abord construit une banque de séquences complètes de l'ARNr 16S des *Bacteroides* provenant de matières fécales d'humain (n=2), de poulet (n=1), de porc (n=2), de bovin (n=4), de cheval (n=2) et de chien (n=2). L'analyse des séquences avec la base de données GenBank® de NCBI a permis de définir les zones propices pour les amorces et la sonde et ce, afin que soient exclues les zones également spécifiques au genre *Prevotella*. Le design de la qPCR a donc permis de cibler spécifiquement les *Bacteroides* humains, porcins, bovins, aviaires (poulet) et canins. Les limites de détection et de quantification n'ont pas été présentées.

Dans une étude réalisée en France, en bassin versant agricole, afin de développer des marqueurs porcins, Mieszkin *et al.* (2009) ont également utilisé le marqueur AllBac pour mesurer la contamination générale des échantillons d'eau. Tous les échantillons de fèces d'origine humaine (n=24), porcine (n=25), bovine (n=10), ovine (n=10) et équine (n=10) ont été positifs. La limite de quantification de la méthode, évaluée à l'aide de plasmides incluant les séquences cibles, était de 1,6 copies de gènes par réaction de 25 µl (volume d'extrait d'ADN non décrit). La limite de quantification dans les échantillons de fèces a été calculée à 4,5 log₁₀ copies de gènes par gramme de fèces (base humide). Finalement, l'étude de Fremaux *et al.* (2010), portant sur le développement de marqueurs pour cibler la contamination de l'eau par la bernache du Canada dans l'ouest canadien (Saskatchewan), a aussi décrit l'utilisation du marqueur AllBac. La spécificité du marqueur a été de 100 %, mis à part pour des échantillons provenant de bernaches (94 %, n=101), de pigeons (88 %, n=25) et de goélands (88 %, n=16), appuyant le fait que les marqueurs sont davantage spécifiques aux mammifères. Ainsi, tous les échantillons provenant d'humains (n=31), bovins (n=41), porcs (n=48), poulets (n=34), canards (n=10), cygnes (n=1), orignaux (n=10), cerfs (n=30), caribous (n=10), bisons (n=10), chèvres (n=10) et chevaux (n=15), ont été positifs à AllBac. Tous les échantillons d'eau prélevés ont également été positifs au marqueur (n=75). La limite de détection, évaluée en utilisant des plasmides porteurs des séquences cibles, était de 2 copies de gènes par réaction PCR (1 copie /µl d'extrait d'ADN).

La limite de quantification, évaluée à partir des échantillons, était de 2,6 log₁₀ copies de gènes par gramme de fèces.

1.2.2 Marqueurs génétiques ciblant l'humain

Le marqueur HF183 ciblant l'humain a abondamment été documenté (Villemur *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2010; Haugland *et al.*, 2010; Mieszkina *et al.*, 2009; Kildare *et al.*, 2007; Seurinck *et al.*, 2005). Parmi les autres marqueurs répertoriés, notons HuBac (Layton *et al.*, 2006), BacHum (Lee *et al.*, 2010; Kildare *et al.*, 2007), BacH (Reisher *et al.*, 2007) et BFD (Converse *et al.*, 2009). Une attention particulière doit toutefois être portée aux groupes cibles (*Bacteroidales* vs *Bacteroides*), puisque plusieurs amorces et sondes ont été développées pour un marqueur portant le même nom. Dans tous les cas répertoriés, la séquence de l'amorce sens était cependant la même, les amorces antisens et les sondes différaient. Les séquences cibles sont contenues dans la région V2 du gène codant pour l'ARN 16s, une région hypervariable (Haugland *et al.*, 2010). La technologie utilisée peut également différer, notamment le SYBR® Green et les sondes Taqman®.

Basé en partie sur les travaux de Bernhard et Field (2000), Seurinck *et al.* (2005) ont développé le marqueur **HF183** qui cible l'ARNr 16S des *Bacteroides* spécifiques à l'humain avec les amorces HF183f et HF183r en SYBR® Green. Les échantillons ont été prélevés dans la région de Gent, en Belgique. Bien qu'un échantillon provenant de poulet ait causé des problèmes aux auteurs dans la mise au point de leur méthode, aucun échantillon provenant de chiens, chevaux, bovins et porcs n'ont été trouvés positifs. Le nombre d'échantillons évalués n'est pas mentionné. Par contre, le marqueur n'a pas été détecté dans un des échantillons humains testés. La limite de détection a été déterminée à 1,4 copies du gène par µl d'extrait d'ADN. Utilisant la même méthode, Kildare *et al.* (2007) ont détecté le marqueur dans des échantillons provenant de chien (25 %, n=8) et de chats (14 %, n=7), mais aucun échantillon provenant de bovins (n=8), chevaux (n=8), goélands (n=10) n'étaient positifs. Aussi, le marqueur a été détecté dans 61 % des échantillons d'origine humaine. Les limites de détection et de quantification déterminées par cette équipe ont été de 0,8 et 2,7 copies de gènes par réaction, respectivement (0,08 et 0,27 copies/µl d'extrait d'ADN). Dans l'étude française de Mieszkina *et al.* (2009), seuls les échantillons humains ont été trouvés positifs (n=24). Aucun porc (n=48), bovin (n=10), ovin (n=10) et équin (n=10) n'était positif. La limite de quantification rapportée était de 1,6 copies du gène par réaction PCR de 25 µl (analyse de plasmides contenant la séquence cible), et la limite de quantification calculée dans les échantillons était de 4,5 log₁₀ copies par gramme de fèces (base humide). En Ontario, l'équipe de Marti *et al.* (2011) ont détecté le marqueur HF183 dans un échantillon de fèces de marmotte, ainsi que dans 90 % des échantillons d'origine humaine. Aucun rat musqué (n=10), bovin (n=22), porc (n=6), castor (n=17) et raton laveur (n=3) n'était positif. Les limites de détection et de quantification n'ont pas été rapportées. Finalement, dans une étude réalisée au Bangladesh, Ahmed *et al.* (2010) ont détecté le marqueur dans un échantillon provenant de chien (n=5) et de chat (n=6), ainsi que dans 13 échantillons d'origine humaine (n=15). Aucun poulet et bovin ne s'est avéré positif. La limite de détection a été fixée à 10 copies du marqueur par µl d'extrait d'ADN.

Dans une étude réalisée aux États-Unis, Haugland *et al.* (2010) ont comparé plusieurs paires d'amorces afin de définir une région spécifique à l'humain et ce, en utilisant la technologie des sondes Taqman® plutôt que le SYBR®

Green. Parmi les amorces sens testées, notons HF183f, telle que décrite dans les études ci-haut. L'amorce antisens ainsi que la sonde utilisées étaient respectivement BFDRev et BFDFAM, non spécifiques et ciblant les *Bacteroidales* générales. Ainsi, les auteurs ont tenté de cibler l'ARNr 16S des *Bacteroidales* spécifiques à l'humain en utilisant l'amorce sens spécifique à l'humain. Par contre, outre l'échantillon d'origine humaine, les échantillons provenant de poulet et de chien ont été trouvés positifs. Tel que souhaité, les échantillons de porc, de bovin et de chat étaient négatifs. Les analyses ont été réalisées à partir d'un seul extrait d'ADN composé de 10 sous-échantillons de matières fécales. La limite de détection, évaluée avec des standards insérés dans des plasmides, a été de 10 copies par réaction (2 copies/ μ l d'ADN).

En continuité avec ces travaux, la même équipe américaine a utilisé l'amorce sens HF183 abondamment décrite, et a développé l'amorce antisens BacR287 afin de cibler une autre séquence de l'ARNr 16S des *Bacteroides* spécifiques à l'humain (Green *et al.*, 2014). La limite de détection, évaluée à partir de plasmides incluant les séquences cibles, était de 10 copies du marqueur par réaction de 25 μ l (entre 0,01 et 5 ng d'ADN). Ces amorces, accompagnées de la sonde BacP234MGB et du contrôle interne Bac234IAC, font partie de la méthode officielle 1696 de la USEPA (2019a) dont l'objectif est de caractériser le niveau de contamination fécale d'origine humaine dans l'eau. Les auteurs de l'étude ont recommandé d'évaluer localement la spécificité de la méthode, puisque des faux positifs provenant de chiens, dindes et poulets ont été détectés, quoiqu'avec une magnitude moins élevée que dans les échantillons humains. Selon le contexte, ils recommandent d'ailleurs l'utilisation du marqueur HumM2, dont la méthode 1697 a également été officialisée par la USEPA (2019b). Ainsi, selon les espèces animales présentes dans le bassin versant ou dans les environs du site d'échantillonnage, le marqueur humain choisi peut varier.

Le marqueur **HumM2**, toujours développé par la même équipe, cible la protéine hypothétique BF3236 des *Bacteroidales*, également dans le but de quantifier la contamination spécifique à l'humain dans l'eau (Shanks *et al.*, 2010 et 2009). L'article présente également les essais avec le marqueur **HumM3**, et les résultats de spécificité décrits dans le texte ne concordent pas avec le résumé de ceux-ci en tableau. Bref, bien que les deux marqueurs aient été détectés dans 100 % des échantillons humains, des faux positifs ont été détectés dans des échantillons provenant d'un wapiti, de six chèvres et deux poulets. En texte, il est mentionné que les isolats du wapiti et des chèvres ont été positifs au marqueur HumM3 et le poulet au HumM2, mais le contraire est indiqué en tableau. Aucun des échantillons de bovin (n=80), porc (n=22) et chevreuil (n=15) n'ont été trouvés positifs, pour ne nommer que ceux-là. La limite de détection des deux marqueurs, évaluée avec des plasmides, était de 10 copies du marqueur par réaction de 25 μ l.

Le marqueur **HuBac** développé aux États-Unis par Layton *et al.* (2006), permet de cibler l'ARNr 16S des *Bacteroides* spécifiques à l'humain. L'équipe a mis au point une méthode utilisant la technologie Taqman® avec ou sans extraction d'ADN. Tous les échantillons fécaux d'origine humaine ont été trouvés positifs, mais des échantillons provenant de porc, de bovin et de chien également, avec un taux global de 32 % de faux positifs. La non-spécificité du marqueur a été sensiblement la même dans les échantillons n'ayant pas passé par une étape d'extraction d'ADN. La limite de quantification, calculée à partir d'une série de dilutions de plasmides incluant la séquence cible, a été de 25 copies de gènes par réaction, soit entre trois et six cellules si on considère qu'il y a entre quatre et sept copies par génome (Lee *et al.*, 2010).

Le marqueur **BacHum**, décrit aux États-Unis par Kildare *et al.* en 2007, cible l'ARNr 16S des *Bacteroidales* spécifiques à l'humain. Mis à part un échantillon provenant du chien (n=8) et 12 d'origine humaine (n=18) positifs, aucun échantillon provenant de chats (n=7), bovins (n=8), chevaux (n=8), goélands (n=10) n'étaient positifs. Aussi, le marqueur a été détecté dans 100 % des échantillons d'eaux usées, suggérant sa bonne spécificité dès qu'il y a une source humaine, même si d'autres sources peuvent être présentes dans les eaux usées brutes. Les limites de détection et de quantification, évaluées dans un mélange de standards insérés dans des plasmides et de l'eau pure, étaient de 3,5 et 30 copies de gènes/réaction (0,35 et 3 copies/ μ l d'ADN), respectivement.

Un autre marqueur humain nommé **BacHum** a été décrit en Ontario (Canada) par Lee *et al.* (2010), la cible étant également l'ARNr 16S des *Bacteroidales*, mais les amorces et la sonde sont différentes. Bien que tous les échantillons de matières fécales humaines aient été trouvées positifs (n=16), il en a été de même pour les chats (n=3) et les chiens (n=4). De plus, trois échantillons provenant du porc ont aussi été positifs (n=10). Parmi les échantillons négatifs, notons des bovins (n=18), chevreuils (n=3), chevaux (n=1), goélands (n=4), oies (n=10) et rats laveurs (n=1). La limite de détection rapportée était de 6,5 copies de gènes, soit une à deux cellules de *Bacteroidales* par réaction. La limite de quantification n'a pas été décrite.

L'équipe de Reisher *et al.* (2007), en Autriche, a développé le marqueur humain **BacH** ciblant l'ARNr 16S des *Bacteroides*. Sur 41 échantillons d'origine humaine (matières fécales et eaux usées), un échantillon a été négatif. Parmi la panoplie d'espèces animales évaluées, dont des bovins (n=6), porcs (n=2), poulets (n=1), chevaux (n=3), chèvres (n=3), chevreuils (n=1), chiens (n=3) et chats (n=2), un seul isolat de chat a été trouvé positif. Pour certaines espèces animales, les échantillons évalués provenaient d'extraits d'ADN composés de 10 sous-échantillons de fèces. Les auteurs ont rapporté une limite de détection de six copies de gènes par réaction, et une limite de quantification de 30 copies par réaction de 25 μ l (2,4 et 12 copies par μ l d'ADN, respectivement).

Finalement, en Caroline du Nord (États-Unis), ciblant également l'ARNr 16S des *Bacteroides*, Converse *et al.* (2009) ont développé le marqueur **BFD** afin d'estimer le niveau de contamination fécale d'origine humaine dans les eaux récréatives, le but étant de la dissocier de la contamination par les goélands. Ainsi, le marqueur n'était pas présumé être hautement spécifique à l'humain. Dans un premier temps, l'équipe a donc vérifié la présence du marqueur dans les fèces de différentes espèces animales (humain, bovin, chien, chat, oie, pélican et opossum). Tous les échantillons étaient positifs, mais à des niveaux différents, les quantités de gènes dans les échantillons humains et de l'opossum étant plus élevées. Ensuite, des échantillons d'eau ont été inoculés avec des eaux usées ou des fèces de goélands. Le marqueur BFD a été trouvé avec au moins deux ordres de grandeurs de plus dans les échantillons humains. Puisque leur marqueur se retrouve en plus grande quantité dans les échantillons, les auteurs ont conclu en son bon potentiel pour définir la contamination fécale humaine dans l'eau. La limite de détection, évaluée à partir de cellules cultivées de *Bacteroides thetaiotaomicron*, était de 5 cellules par réaction de 25 μ l. En utilisant l'amorce sens décrite pour HF183 et l'amorce antisens BFDRev décrite par Converse *et al.* (2009), Green *et al.* (2014) ont rapporté une limite de détection de 100 copies de gènes par réaction de 25 μ l pour cette amplification. Celle-ci a été évaluée à partir de plasmides incluant les séquences cibles.

1.2.3 Marqueurs génétiques ciblant les bovins

Plusieurs marqueurs ont été développés afin de cibler une contamination fécale d'origine bovine. Parmi ceux-ci, notons CowM2 et CowM3 (Shanks *et al.*, 2008), BacCow (Kildare *et al.*, 2007), CowBac 1, 2 et 3 (Okabe *et al.*, 2007), Bobac (Layton *et al.*, 2006) et BacBov 1 et 2 (Lee *et al.*, 2010).

Les marqueurs **CowM2** et **CowM3** développés aux États-Unis par Shanks *et al.* (2008) ciblent une séquence spécifique aux bovins de l'ARNr 16S des *Bacteroidales*. Les auteurs avaient comme objectif de trouver des indicateurs de contamination fécale qui pourraient remplacer *E. coli* et les entérocoques, en plus de discriminer entre l'origine humaine et bovine. Ainsi, 204 échantillons de sources variées ont été évalués, incluant notamment l'humain (n=21), le porc (n=12), le chevreuil (n=6), la chèvre (n=10), le mouton (n=10) et le poulet (n=10). Les échantillons provenaient de six états américains. Aucun faux positif n'a été observé, et les marqueurs ont été quantifiés dans tous les échantillons de bovins, indiquant sa haute spécificité. Les auteurs ont également développé une méthode en multiplex incluant le marqueur CowM2 et un contrôle interne (IAC). Les résultats se sont avérés concluants, l'IAC ayant été quantifié dans tous les échantillons. Les deux méthodes ont révélé une limite de quantification de 25 copies de gènes par réaction de 25 µl (1 ng d'ADN), déterminée en insérant les séquences cibles dans des plasmides.

Le marqueur **BacCow** a été développé aux États-Unis sur des échantillons fécaux provenant de la Californie et de l'Équateur pour la détection de l'ARNr 16S de *Bacteroidales* provenant des bovins (Kildare *et al.*, 2007). Cependant, il a été plus tard reclassé comme étant plutôt spécifique aux *Bacteroidales* de ruminants, bien que plusieurs autres extraits d'ADN d'hôtes non désirés se soient avérés positifs (Odagiri *et al.*, 2015 ; Raith *et al.*, 2013). Dans leur étude initiale, Kildare *et al.* (2007) avaient également rapporté des résultats positifs dans trois échantillons de chevaux (n=8), bien que 100 % des bovins aient été positifs (n=8). Les limites de détection et de quantification rapportées, évaluées dans un mélange de plasmides intégrant les standards et de l'eau pure, étaient de 3,7 et 31 copies de gènes/réaction (0,37 et 3,1 copies/ µl d'ADN), respectivement.

Les marqueurs **CowBac 1, 2 et 3**, décrits en 2007 au Japon par Okabe *et al.*, ciblent l'ARNr 16S d'un groupe de bactéries ralliant les *Bacteroides* et les *Prevotella*. Bien que non spécifié par les auteurs, ces deux genres bactériens représentent les principaux membres de l'ordre des *Bacteroidales*. Les trois marqueurs ont présenté une bonne spécificité, tous les échantillons provenant de bovins ayant été positifs (n=7), sans que le soient les échantillons provenant d'humains (n=4) et de porcs (n=5). Les limites de détection et de quantification étaient de 4,3 et 63 copies de gènes par réaction de 25 µl, respectivement (1,72 et 25,2 copies par µl d'ADN).

Layton *et al.* (2006) ont développé le marqueur **BoBac** ciblant l'ARNr 16S des *Bacteroides* aux États-Unis (échantillons du Tennessee et de la Pennsylvanie). Des échantillons de source humaine (n=3), porcine (n=4), canine (n=4), équine (n=4) et bovine (n=6) provenant de trois états américains ont été évalués. Les auteurs ont également évalué l'impact de l'extraction d'ADN sur la quantification des marqueurs au qPCR. Pour les échantillons dont l'ADN a été extrait, tous les bovins ont été trouvés positifs, mais un échantillon provenant du chien a également été positif. Seuls les échantillons d'origine bovine ont été trouvés positifs lorsque l'équipe ne procédait pas à une étape d'extraction d'ADN. La limite de détection, calculée à partir d'une série de dilutions de plasmides incluant

la séquence cible, a été de 25 copies de gènes par réaction, soit entre trois et six cellules si on considère qu'il y a entre quatre et sept copies par génome (Lee *et al.*, 2010).

Les marqueurs **BacBov 1 et 2** ont été développés en Ontario en 2010 par Lee *et al.* et ciblent l'ARNr 16S des *Bacteroidales*. Les essais avec des échantillons fécaux de sources diverses ont révélé la parfaite spécificité des marqueurs pour le bovin (n=18), mais quelques faux positifs ont été révélés, notons trois échantillons provenant du chien (n=4) et deux du chevreuil (n=3). Les autres sources incluant l'humain et le porc étaient négatifs. Le poulet n'a pas été évalué. En rapportant les niveaux mesurés sur les *Bacteroidales* totales, les proportions de faux positifs, de l'ordre de 2 %, étaient beaucoup plus faibles que dans les échantillons de bovins, variant entre 30 et 50 % environ. Les auteurs concluent en l'utilité des marqueurs dans un contexte environnemental. Peu de distinction est faite entre les deux marqueurs, les deux semblant se conduire de la même façon. La limite de détection rapportée était de 10 copies de gènes, soit une à deux cellules de *Bacteroidales* par réaction. La limite de quantification n'a pas été décrite.

Dans un autre ordre d'idées, Shanks *et al.* (2014) ont étudié les taux d'excrétion de différents marqueurs génétiques et d'indicateurs de contamination fécale de l'eau en fonction de l'âge des animaux. Des troupeaux laitiers étaient séparés en 7 groupes d'âge et les matières fécales ont été prélevées aux 30 jours durant 10 mois. Les marqueurs CowM2, CowM3, GenBac n'ont pas été détectés chez les veaux de moins de 115 jours. Cette étude révèle l'importance de connaître le contexte agricole du bassin versant couvert par le point de prélèvement de l'eau analysée, car la contamination peut être sous-estimée en raison de l'âge de animaux.

1.2.4 Marqueurs génétiques ciblant le porc

Quatre principaux marqueurs ont été décrits afin de cibler une contamination d'origine porcine, dont deux en SYBR® Green, soit Pig-Bac 1 et 2 (Mieszkin *et al.*, 2009; Okabe *et al.*, 2007), et les deux autres avec des sondes, soit Pig-1-Bac et Pig-2-Bac (Marti *et al.*, 2011; Mieszkin *et al.*, 2009).

Le marqueur **Pig-Bac1**, développé au Japon, cible l'ARNr 16S des *Bacteroides-Prevotella* (Okabe *et al.*, 2007). Cette étude a porté sur le développement de marqueurs spécifiques à l'humain, aux porcs et aux bovins dans l'optique de quantifier la contamination fécale dans l'eau de surface. Le marqueur a effectivement été spécifique aux porcs (n=5), aucun échantillon provenant d'humains (n=4) et de bovins (n=7) n'ayant été positif. Les limites de détection et de quantification étaient de 4,3 et 63 copies de gènes par réaction de 25 µl, respectivement (1,72 et 25,2 copies par µl d'ADN).

Le marqueur **Pig-Bac2** a été développé dans les mêmes conditions que le marqueur précédent en ciblant l'ARNr 16S des *Bacteroides-Prevotella*, également au Japon (Okabe *et al.*, 2007). Les auteurs ont cependant rapporté une spécificité moins grande que le premier marqueur, des échantillons de bovins et d'humains ayant été trouvés positifs à 7 et 8 log₁₀ copies de gènes par gramme de fèces. Les auteurs concluent tout de même en son potentiel, étant donné que ces résultats étaient entre 3 et 4 fois moins élevés que dans les échantillons porcins. Les limites de détection et de quantification étaient les mêmes que pour le marqueur Pig-Bac1. Mieszkin *et al.* (2009) ont également évalué Pig-Bac2 dans des échantillons fécaux provenant de porc (n=10), ainsi que de sources diverses

(humain, bovin, mouton, cheval). Tous les échantillons porcins ont été trouvés positifs tel que souhaité, mais 30 échantillons des autres sources aussi, pour une spécificité globale du marqueur de 54 %. La limite de quantification, évaluée à partir de plasmides comportant la séquence cible était de 1,6 copies du gène, et la limite de quantification calculée dans les échantillons de 4,5 log₁₀ copies par gramme de fèces (base humide).

Les marqueurs **Pig-1-Bac** et **Pig-2-Bac** ont été développés en France par Mieszkina *et al.* (2009) et ciblent l'ARN 16S des *Bacteroidales*. Les deux marqueurs se sont révélés hautement spécifiques au porc, aucun des échantillons de provenance humaine (n=24), équine (n=10), bovine (n=10) et ovine (n=10) n'étant positif. Sur 79 échantillons de source porcine (fèces, lisier, lagune et compost), Pig-1-Bac n'a pas été détecté dans les échantillons provenant de la lagune d'entreposage du lisier. Pig-2-Bac s'est révélé parfaitement spécifique. Suite à l'analyse de dilutions en série de plasmides contenant la séquence cible, la limite de quantification rapportée était de 1,6 copies du gène. La limite de quantification dans les échantillons a été calculée à 4,5 log₁₀ copies par gramme de fèces (base humide). C'est d'ailleurs le marqueur qui a été utilisé dans l'étude de Marti *et al.* (2011) sur le développement de marqueurs pour cibler la contamination par la faune. Bien que 100 % des échantillons de fèces porcines aient été positifs (n=6), le marqueur a été détecté dans un échantillon humain (n=20) et trois de rats musqués (n=30). Aucun échantillon provenant du bovin (n=22), castor (n=17), marmotte (n=3) et raton laveur (n=3) n'a été positif. Les quantifications obtenues, ainsi que les limites de détection et de quantification n'ont pas été présentées (Marti *et al.*, 2011).

Tel que décrit pour les bovins, l'âge des porcs peut également avoir une influence sur l'excrétion des *Bacteroidetes* dans les matières fécales. Bien qu'aucune étude n'ait été répertoriée spécifiquement sur les marqueurs génétiques, quelques études de métagénomique ont porté sur le changement de microflore intestinale chez les porcs entre la pouponnière et l'engraissement (Frese *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2011), de même que l'impact du type d'alimentation (Verschuren *et al.*, 2018). Contrairement aux bovins, les populations de *Bacteroidaceae* diminuent dans le temps, et sont presque inexistantes à partir du 35^e jour d'âge (Frese *et al.*, 2015). Les populations de *Bacteroidetes* sont également plus importantes chez les animaux alimentés avec une ration contenant du blé et de l'orge que du maïs et du soja. Dans une optique de traçage de contamination fécale dans l'environnement, la connaissance des élevages présents à l'échelle du bassin versant est importante, certaines populations pouvant être mal représentées.

1.2.5 Marqueurs génétiques ciblant le poulet

Malgré le fait que l'élevage des poulets soit répandu à travers le monde, très peu d'études ont été réalisées pour développer des marqueurs spécifiques aux *Bacteroidetes* provenant des poulets (Kobayashi *et al.*, 2013; Phong *et al.*, 2010; Weidhaas *et al.*, 2015). En fait, il a été rapporté que les *Bacteroides* et les *Prevotella* ne constituent pas toujours les bactéries intestinales dominantes chez le poulet, ce qui pourrait expliquer la difficulté d'obtenir des résultats acceptables de sensibilité. Le marqueur **Chicken-Bac**, avec les amorces qC160F-HU et qBac265R-HU développées au Japon par Kobayashi *et al.* (2013), a démontré une sensibilité de 70 % dans les échantillons de fèces de poulets, mais le marqueur a aussi été détecté dans les fèces de vaches (39 %), de porc (8,3%) et de cygnes (12 %). La limite de quantification pour le marqueur Chicken-Bac a été de 63 copies de gènes par réaction de 25 µl (31,5 copies par µl d'ADN). Les chercheurs ont aussi développé le marqueur **Chicken/Duck-Bac**, avec les

amorces ciblant le poulet et le canard qCD362F-HU et qcD464R-HU. Ce marqueur a été détecté dans 96 % des fèces de canard et 61 % de celles du poulet. Par contre, ce marqueur n'a pas été retrouvé dans les autres fèces d'animaux testés. La limite de quantification pour le marqueur Chicken/Duck-Bac a été de 50 copies de gènes par réaction de 25 µl (25 copies par µl d'ADN).

1.2.6 Marqueurs génétiques ciblant les ruminants

Peu de marqueurs spécifiques aux ruminants ont été développés dans la littérature. Parmi ceux-ci, notons BacR (Marti *et al.*, 2011; Mieszkin *et al.*, 2009; Reischer *et al.*, 2006) et Rum-2-Bac (Mieszkin *et al.*, 2010). Dans un contexte de traçage des sources de contamination fécale de l'eau à l'échelle d'un bassin versant agricole, l'intérêt de dissocier les ruminants des bovins réside dans le fait que selon les régions, la contamination par les chevreuils, des ruminants, peut s'avérer importante et devrait être distinguée de la contamination par les élevages de bovins. Aucun marqueur pouvant faire cette distinction n'a cependant été répertorié.

Le marqueur **BacR** ciblant l'ARN 16S des *Bacteroidetes* et a été mis au point en Autriche par Reischer *et al.* (2006). Dix-neuf espèces animales ont servi de sources de matières fécales afin de vérifier la spécificité du marqueur, dont sept espèces de ruminants incluant les bovins (n=14), deux espèces de cerfs (n=18), les chamois (n=12), les moutons (n=6) et deux espèces de chèvres (n=7). Tous ces échantillons ont été trouvés positifs au marqueur BacR, et aucun non-ruminant (n=23), notamment l'humain, le porc, le poulet, le chien, le chat et le cheval. La limite de quantification, déterminée à partir des échantillons, a été évaluée à six copies de gènes par réaction de 25 µl (2,4 copies par µl d'ADN). La limite de détection, évaluée à partir de plasmides intégrant le standard, était de 5 copies par réaction (2 copies par µl d'extrait d'ADN). Plus tard en 2009, Mieszkin *et al.* ont évalué le marqueur en rapportant sa cible comme étant les *Bacteroidales* spécifiques aux ruminants, et non plus le phylum tel que décrit dans l'étude précédente. Cette information a également été reconduite par Marti *et al.* (2011). Ainsi, Mieszkin *et al.* (2009) ont quantifié le marqueur dans des échantillons de porcs, d'humains, de bovins et d'ovins, suggérant sa faible spécificité. La limite de détection déterminée après l'analyse de plasmides contenant la séquence cible, a été décrite à 1,6 copies du gène. La limite de quantification évaluée à partir des échantillons testés était de 4,5 log₁₀ copies par gramme de fèces. Dans le même ordre d'idées, Marti *et al.* (2011) ont observé un échantillon provenant de l'humain (n=20) et un échantillon du rat musqué (n=10) positifs, ainsi que 91 % des échantillons de bovins (n=22). Les limites de détection et de quantification n'ont pas été rapportées.

Le marqueur **Rum-2-Bac** a été développé en France par Mieszkin *et al.* (2010) à partir d'échantillons d'effluents municipaux et d'élevages (lisier de porc et fumier de bovin), ainsi que de matières fécales d'humains, bovins, porcs et oiseaux sauvages (goélands et oies). Il cible l'ARN 16S des *Bacteroidales*. À la suite de la mise au point de la séquence à cibler, l'équipe a évalué la spécificité du marqueur avec des échantillons provenant de bovins, moutons, chevaux, porcs, humains et oiseaux sauvages. Le marqueur Rum-2-Bac a été mesuré dans tous les échantillons de fèces de bovins (n=10) et de moutons (n=10), et dans 90 % des échantillons de fumier de bovins (n=10). Les limites de détection et de quantification étaient les mêmes que celles ayant été rapportées l'année précédente par l'équipe, soit 1,6 copies de gènes suite à l'analyse des plasmides contenant les séquences cibles et 4,5 log₁₀ copies par gramme de fèces dans les échantillons, respectivement.

1.3 CRITÈRES DE PERFORMANCE DES ANALYSES

L'évaluation et le traçage des sources de contamination microbiennes ont généralement été réalisés en fonction de la performance des analyses. Les critères de performance sont la sensibilité, la spécificité, la précision, les valeurs prédictives positives (ce qu'on prévoyait positif ou négatif et qui s'avère), ainsi que les valeurs prédictives négatives (ce qu'on prévoyait positif ou négatif et qui ne s'avère pas). Ces critères peuvent varier d'une région géographique à l'autre ainsi qu'en fonction des marqueurs sélectionnés (Somnark *et al.*, 2018b). La sensibilité est représentée par la proportion d'échantillons positifs qui sont réellement positifs (taux de vrais positifs), tandis que la spécificité est représentée par la proportion d'échantillons négatifs qui sont supposés être négatifs (taux de vrais négatifs) (Harwood *et al.*, 2014).

Il a été rapporté que les évaluations devraient atteindre une spécificité de 0,80 et une sensibilité de 0,90 (Ahmed *et al.*, 2016; Boehm *et al.*, 2013). Il a aussi été recommandé de calculer le nombre minimal d'échantillons à analyser afin d'être représentatif du nombre attendu de marqueurs en fonction du niveau de confiance et de l'erreur acceptable et ce, selon une méthode d'échantillonnage stratifié (Somnark *et al.*, 2018b). La méthode d'échantillonnage a ainsi un impact sur le nombre d'échantillons à analyser afin d'obtenir une évaluation fiable. En effet, différentes méthodes d'échantillonnage (ex : dirigé, aléatoire stratifié) peuvent être utilisées et choisies en fonction des sources potentielles de contamination fécale le long d'un cours d'eau par exemple (terres agricoles, élevages, station d'épuration d'eaux usées, etc.).

1.3.1 Sensibilité et spécificité des marqueurs

La revue des marqueurs publiés ciblant différentes séquences d'ADN de *Bacteroidetes* a aussi permis de valider la longueur des fragments amplifiés. Il a été observé que la longueur des fragments rapportée dans certains articles ne correspondait pas à celle obtenue avec la recherche de spécificité des amorces dans la base de données GenBank® de NCBI (Okabe *et al.*, 2007; Reischer *et al.*, 2006; Seurinck *et al.*, 2005). Étant donné que les banques de séquences génétiques telles que GenBank® (NCBI) sont constamment mises à jour, il est important de vérifier la spécificité théorique des marqueurs utilisés avec les nouvelles séquences de nucléotides disponibles. C'est le cas, par exemple, du marqueur AllBac rapporté par Layton *et al.* (2006) comme étant spécifique aux bactéries du genre *Bacteroides*. Cependant, après une vérification avec Primer-BLAST de NCBI le 3 décembre 2019, il est évident que ce n'est pas uniquement spécifique aux *Bacteroides*, mais aussi à d'autres genres tels que *Prevotella*. De ce fait, la spécificité théorique du marqueur doit se rapporter à l'ordre des *Bacteroidales*. Au début des années 2000, la recherche de nouveaux marqueurs était généralement réalisée à partir des séquences spécifiques aux genres *Bacteroides* et *Prevotella* (Harwood *et al.*, 2014). Ces bactéries sont retrouvées en grande quantité dans les matières fécales et sont strictement anaérobies, réduisant ainsi leur potentiel de croissance à l'extérieur des intestins d'animaux. Tel que mentionné plus tôt, Weidhaas *et al.* (2015) avaient par contre rapporté l'augmentation dans le temps de la détection des marqueurs génétiques spécifiques au poulet dans des échantillons de fumier entreposés en conditions aérobies et anaérobies.

La spécificité et la sensibilité des marqueurs ont généralement été testées avec différents extraits d'ADN provenant de matières fécales d'animaux ciblés ou non, ou d'effluents municipaux ou d'élevages, ainsi que d'eau

de surface. En plus de ces études, les revues de Somnark *et al.* (2018a) et Harwood *et al.* (2014) sont d'intérêt puisqu'elles ont documenté la spécificité des marqueurs vis-à-vis un hôte et comparé la performance de plusieurs paires d'amorces associées à des marqueurs de *Bacteroidales*, universels et spécifiques. Les données de sensibilité et de spécificité issues de plusieurs études y sont résumées. Bien que certains marqueurs performant mieux que d'autres, on y constate entre autres que des hôtes non-ciblés ont été trouvés positifs pour tous les marqueurs.

1.4 PERSISTANCE DES MARQUEURS GÉNÉTIQUES

Certaines études ont rapporté une persistance équivalente ou moindre des marqueurs de *Bacteroidales* comparativement aux indicateurs de contamination fécale classiques tels qu'*E. coli* (Tambalo *et al.*, 2012; Rogers *et al.*, 2011; Bell *et al.*, 2009). Pour cette raison, certains auteurs suggèrent que les marqueurs de *Bacteroidales* doivent être considérés comme indicatifs d'une contamination fécale relativement récente (Walters et Field, 2009).

Plusieurs études ont porté sur la détection des marqueurs de *Bacteroidales* dans l'eau afin de cibler la source de pollution (Ko *et al.*, 2018; Edge *et al.*, 2018; Marti *et al.*, 2013; Layton *et al.*, 2006). Ces auteurs se basaient uniquement sur les concentrations retrouvées ou l'occurrence de détection des marqueurs pour attribuer une source de contamination. Toutefois, la contamination fécale des plans d'eau peut être de sources diverses incluant une origine humaine (égouts, fosses septiques, surverses d'eaux usées) ou animale (faune, animaux domestiques, élevages). En bassin versant, il est donc requis de présenter les résultats en contributions relatives de ces différentes sources (Wang *et al.*, 2013). Toutefois, les marqueurs de *Bacteroidales* peuvent différer dans leur persistance et leur sensibilité aux conditions environnementales (Walters et Field, 2009), ainsi que dans les limites de détection et de quantification. Il est donc nécessaire de bien connaître les conditions d'analyse et d'échantillonnage des études de traçage des sources de contamination fécale pour en faire une bonne interprétation. L'évaluation des marqueurs dans l'eau sera davantage détaillée dans la deuxième année du mandat.

1.4.1 Facteurs abiotiques

Parmi les facteurs abiotiques affectant la persistance des *Bacteroidales*, notons la lumière naturelle du soleil, la salinité et la température. De façon générale, les études rapportent une corrélation positive entre la température et les taux de décroissance des bactéries, une corrélation négative avec la salinité, et une corrélation variable avec la lumière (Weidhaas *et al.*, 2015).

Certaines études ont rapporté que l'exposition à la lumière du soleil entraînait une réduction de la persistance de marqueurs génétiques de *Bacteroidales* (Green *et al.*, 2011; Bae et Wuertz, 2012). Toutefois, leur persistance sous la lumière était supérieure à celle d'*E. coli*. Dans la gamme de salinité entre 0 et 30 ppt, Okabe *et al.* (2007) ont observé qu'une augmentation de la salinité favorisait une persistance accrue de marqueurs génétiques de *Bacteroidales*. De plus, de façon générale, une augmentation de la température réduit la persistance de marqueurs de *Bacteroidales* dans la gamme de températures variant entre 4 et 30 °C (Bell *et al.*, 2009).

En conditions contrôlées, Mayer *et al.* (2015) ont étudié la persistance d'indicateurs bactériens et de marqueurs génétiques de *Bacteroidales* dans des eaux usées brutes et traitées entreposées pendant 11 jours à 5 ou 21 °C. Dans les eaux usées brutes, les marqueurs AllBac ont diminué de moins d'un log₁₀ en 11 jours (concentration initiale à 10 log₁₀ équivalent/100 ml). Les marqueurs humains BacHum sont passés de 9 à 8 log₁₀ équivalent/100 ml en 11 jours d'entreposage à 5 °C, et de 9 à 6 log₁₀ équivalent/100 ml à 21 °C. Un suivi sur les effluents traités a aussi été réalisé dans les mêmes conditions. Le traitement incluait une étape primaire mécanique, un traitement secondaire biologique par boues activées incluant une nitrification, dénitrification et l'enlèvement du phosphore. Aucune étape de désinfection n'était incluse. Tout comme pour les eaux usées brutes, les marqueurs généraux AllBac ont diminué d'un log₁₀ en 11 jours à 5 ou 21 °C, avec une concentration initiale à 8 log₁₀. Pour les marqueurs humains dont la concentration initiale était à 7 log₁₀/100 ml, une baisse de 1 et 3 log₁₀ a été remarquée à 5 et 21 °C, respectivement. Dans les deux cas, le traitement a induit une baisse de 2 log₁₀ des deux types de marqueurs.

Lim *et al.* (2018) ont entreposé des échantillons de lisier de porc à -20, 4, 20 et 37 °C durant 4 semaines. Les analyses ont été effectuées sur les communautés bactériennes totales par pyroséquençage. Les populations de *Bacteroides* sont demeurées stables (proportion semblable au lisier brut) à -20 et 4 °C. À 20 °C, les proportions ont augmenté entre la 3^e et la 4^e semaine d'entreposage. À 37 °C, les proportions de *Bacteroides* étaient plus élevées que dans le lisier brut dès la première semaine d'entreposage, et se sont maintenues par la suite.

Le climat, l'alimentation, les antibiotiques et d'autres facteurs associés à une région géographique peuvent avoir un impact sur les microorganismes du tractus gastrointestinal des animaux qui les portent. Ainsi, la performance des marqueurs associés à des hôtes spécifiques peut être influencée par la région géographique à l'étude (Somnark *et al.*, 2018b).

1.4.2 Facteurs biotiques

Les principaux facteurs biotiques contribuant à réduire la persistance des marqueurs génétiques de *Bacteroidales* sont la prédation, la compétition et la lyse virale. Ainsi, tel que rapporté par Bell *et al.* (2009), l'enlèvement d'une part importante de la charge microbienne par filtration peut entraîner une persistance accrue de marqueurs de *Bacteroidales*.

Quelques études ont porté sur la persistance des marqueurs exposés à diverses conditions. L'équipe de Burch *et al.* (2018) ont mesuré un abattement plutôt faible des marqueurs de *Bacteroidales* bovins et CowM2 à la suite de la digestion anaérobie de fumier de bovin, soit 0,78 et 0,70 log, respectivement. Les auteurs ont aussi évalué l'impact de la séparation du fumier, et ont conclu que la majorité des marqueurs se retrouvaient dans la fraction liquide.

Lv *et al.* (2017) ont observé que des conditions anaérobies favorisaient la présence de *Bacteroidales*. Ils ont prélevé des échantillons à plusieurs étapes d'un système de traitement d'eaux usées où se succèdent, dans l'ordre, des digesteurs anaérobie, anoxique et aérobie. Les principales bactéries détectées dans le premier digesteur étaient des *Bacteroidales* et représentaient 45 % de toutes les classes de bactéries détectées. Dans le second et dernier digesteur, les *Bacteroidales* représentaient respectivement 18 et 10 % des bactéries détectées.

Après avoir inoculé 900 ml de lisier de porc à 90 litres d'eau douce, Solecki *et al.* (2011) ont rapporté une persistance de 27 jours du marqueur Pig-2-Bac. La concentration initiale du marqueur dans l'eau s'élevait à 7 log₁₀ copies de gènes/100 ml, pour atteindre environ 3 log en 27 jours. La limite de quantification était de 1 250 copies de gènes par 100 ml. Comme 200 ml d'eau ont été filtrés au départ avec un volume final d'élution de 100 µl d'extrait d'ADN, la limite de quantification est calculée à 25 copies par µl d'ADN.

1.5 PRINCIPAUX CONSTATS

Il ressort de la recension de la littérature les constats généraux suivants :

- Les conditions biotiques et abiotiques influencent la persistance des *Bacteroidales* et les marqueurs génétiques associés, particulièrement la température et la compétition microbienne;
- Peu d'études ont évalué la spécificité des marqueurs pour toutes les espèces animales concernées dans l'évaluation de la contamination environnementale ciblée par le présent mandat. Pour faire un choix de marqueur, il faut effectivement se fier à des études réalisées dans des contextes différents;
- La plupart des marqueurs ont été développés à partir de moins de dix échantillons par espèce animale;
- Les limites de détection et de quantification des marqueurs de *Bacteroidales* sont variables, mais généralement en deçà de 10 et 50 copies de gènes par réaction de 25 µl, respectivement;
- Certains marqueurs n'ont aucune spécificité dans la banque de données GenBank® de NCBI, justifiant la nécessité de faire une mise à jour régulière (voir Annexe 1).

Les sources de contamination fécale de l'eau sont multiples et ce, particulièrement pour les eaux de surface. Il serait fastidieux d'inclure toutes les sources possibles dans l'environnement, particulièrement pour les sources fauniques pour lesquelles, d'ailleurs, peu de marqueurs sont disponibles. Ainsi, afin de quantifier la contribution relative des sources à la contamination fécale, il est essentiel de connaître la charge totale de marqueurs de *Bacteroidales* de toutes origines. Aussi, afin de ne pas surestimer ou sous-estimer la contribution d'une ou plusieurs de ces sources, il est essentiel de s'assurer que les limites de détection et de quantification sont comparables entre les différents marqueurs. De plus, les conditions d'entreposage (durée, température) des fumiers/lisiers et le traitement des eaux usées (ex. digestion aérobie) influencent les populations de *Bacteroidales* présentes dans ces intrants et ainsi l'impact des épandages sur la présence des marqueurs dans l'environnement. Le développement d'une méthode de détermination des contributions relatives des sources de contamination fécale de l'eau doit donc tenir compte des limites de détection et de quantification des marqueurs, des caractéristiques des sources de contamination, des types d'échantillons et des conditions d'échantillonnage. Toutefois, peu de données sont disponibles à ce sujet, particulièrement au Québec.

2 DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE PAR PCR QUANTITATIVE

2.1 MÉTHODOLOGIE

2.1.1 Température d'hybridation des amorces

À partir des informations rapportées dans les articles scientifiques, une première qPCR est d'abord réalisée avec les amorces et la sonde. Ce premier test implique un gradient de température d'hybridation qui permet de confirmer ou non la température d'hybridation des amorces rapportée dans la littérature. La température d'hybridation dépend principalement de la séquence des amorces et de la sonde, mais elle peut aussi être influencée par les réactifs PCR (« *Master mix* ») et leur concentration. Le gradient de température est effectué avec trois concentrations de la séquence d'ADN cible, nommée « standard », ainsi qu'au moins un échantillon et un blanc par température testée. En fonction des résultats obtenus, la température optimale est choisie et conservée pour tous les futurs essais de mise au point qPCR.

Puisque la sonde se lie au fragment d'ADN ciblé et non à tous ceux qui sont non-spécifiques, les amplicons sont mis sur gel d'agarose 3 % afin de vérifier que le fragment amplifié est de la bonne longueur, s'il y a des dimères d'amorces formés, et s'il y a une température qui permet de réduire la non-spécificité des amorces s'il y a lieu. Les résultats de la migration sur gel permettent ainsi de mieux faire le choix de la température d'hybridation.

2.1.2 Concentration des amorces et de la sonde

Dans le cas où le gradient de température a donné des résultats montrant de la non-spécificité et/ou des dimères d'amorces, il peut être préférable de tester d'autres concentrations de celles-ci ou de réactifs qPCR. Généralement, la concentration des amorces au qPCR se situe entre 250 et 1000 nM (concentration finale). Sur une même plaque qPCR, les trois concentrations du standard sont reprises avec l'échantillon test et les blancs. Cependant, ils sont testés en parallèle à différentes concentrations d'amorces et/ou de sonde.

2.1.3 Limites de détection et de quantification

Le fragment d'ADN cible est dilué en série jusqu'à ce qu'il ne reste plus de copies du gène. De ce fait, il est possible de déterminer la limite de détection du marqueur au qPCR, qui représente la plus faible quantité d'ADN pouvant être détectée au qPCR dans 95 % des cas. La limite de quantification est déterminée comme étant le dernier point de la courbe standard conservé pour la quantification du marqueur dans les échantillons. La plage dynamique de la courbe standard devrait couvrir au moins trois ordres de grandeur et idéalement s'étendre à 5 ou 6 \log_{10} concentrations (idéalement huit concentrations). L'efficacité (ratio entre le nombre de molécules cibles à la fin de la réaction sur le nombre de molécules au début de la réaction) doit se situer entre 90 et 110 % (idéalement 100 %) et le R^2 doit être plus grand que 0,975. L'intervalle de la courbe standard (du premier point jusqu'au dernier

point) doit inclure l'intervalle de l'ADN cible à quantifier dans les échantillons. La courbe standard se situe généralement entre 10 et 35 cycles d'amplification. Enfin, la courbe d'amplification doit être exponentielle et l'intensité de la fluorescence doit être similaire pour tous les points.

2.2 MESURES DE PERFORMANCE DE LA MÉTHODE

Somnark *et al.* (2018b) ont présenté une étude permettant l'évaluation de la performance des méthodes mises au point en traçage des contaminations environnementales. Lors de l'élaboration d'une méthode, quatre critères sont primordiaux, soit la spécificité, la sensibilité, la précision, ainsi que le taux de valeurs prédictives négatives ou positives. Les prochaines sous-sections résument chaque critère.

2.2.1 Spécificité

En bref, la spécificité d'une méthode dans le présent contexte se définit comme le taux d'échantillons qui devraient être effectivement négatifs, donc non détectés par un marqueur spécifique. Ce taux tient donc compte des échantillons détectés négatifs sur le nombre total d'échantillons supposément négatifs (incluant les faux positifs). Par exemple, un marqueur devant cibler une contamination humaine ne devrait pas donner un signal positif à un échantillon d'origine bovine, et vice versa.

La spécificité peut être déterminée à l'aide de cette formule:

$$\frac{VN}{VN + FP}$$

Où :

VN (vrais négatifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant négatifs qui sont réellement négatifs;

FP (faux positifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant négatifs qui se sont avérés positifs.

Sans que ce soit une recommandation stricte, la valeur minimale obtenue dans la mise au point d'une méthode de traçage de contamination fécale devrait être de 0.90 (Somnark *et al.*, 2018b).

2.2.2 Sensibilité

La sensibilité d'une méthode de détection se définit par son efficacité à détecter une cible lorsqu'elle est présente, et donc le taux d'échantillons qui devraient être effectivement positifs. Le nombre total d'échantillons qui devraient être positifs, incluant les faux négatifs, sont donc tenus en compte. Par exemple, dans le présent contexte, un échantillon d'origine bovine devrait donner un signal positif à un marqueur bovin et ce, même si le marqueur est en très faible quantité. Ce critère est particulièrement important dans un contexte environnemental, où une source d'eau ayant récemment été contaminée par une fosse septique défailante, par exemple, devrait donner un signal positif au marqueur humain, même si la contamination est faible.

La sensibilité peut être déterminée à l'aide de cette formule :

$$\frac{VP}{VP + FN}$$

Où :

VP (vrais positifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant positifs qui sont réellement positifs;

FN (faux négatifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant positifs qui se sont avérés négatifs.

Bien que ce ne soit pas une consigne stricte, la valeur minimale obtenue dans la mise au point d'une méthode de traçage de contamination fécale devrait être de 0.80 (Somnark *et al.*, 2018b).

2.2.3 Précision

La précision se définit par le taux d'échantillons effectivement positifs ou négatifs sur le total des échantillons évalués. Il s'agit en fait de l'efficacité de la méthode à prédire de façon juste les échantillons négatifs et positifs. Une valeur se rapprochant de 1.00 est donc recherchée.

La précision peut être déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\frac{VP + VN}{VP + FP + VN + FN}$$

Où :

VP (vrais positifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant positifs qui sont réellement positifs;

VN (vrais négatifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant négatifs qui sont réellement négatifs;

FP (faux positifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant négatifs qui se sont avérés positifs;

FN (faux négatifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant positifs qui se sont avérés négatifs.

2.2.4 Valeurs prédictives positives et négatives

Les valeurs prédictives positives (ou négatives) représentent le taux de vrais positifs (ou négatifs) sur l'ensemble des échantillons trouvés positifs (ou négatifs). Elles indiquent l'efficacité de la méthode à prédire des résultats justes. Tout comme pour la précision, des valeurs se rapprochant de 1.00 sont recherchées.

Les valeurs prédictives positives peuvent être déterminées à l'aide de la formule suivante :

$$\frac{VP}{VP + FP}$$

Où :

VP (vrais positifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant positifs qui sont réellement positifs;

FP (faux positifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant négatifs qui se sont avérés positifs.

Les valeurs prédictives négatives peuvent être déterminées à l'aide de la formule suivante :

$$\frac{VN}{VN + FN}$$

Où :

VN (vrais négatifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant négatifs qui sont réellement négatifs;

FN (faux négatifs) : nombre d'échantillons prédits comme étant positifs qui se sont avérés négatifs.

2.3 CONTRÔLES

Plusieurs types de contrôles qPCR peuvent être utilisés afin de s'assurer du bon déroulement de l'amplification et de la justesse des résultats, soit les contrôles matrice, environnemental, positif et négatif, ainsi qu'un contrôle interne d'amplification. Chaque type est résumé dans les sous-sections qui suivent.

2.3.1 Contrôle matrice

Le contrôle matrice sert à s'assurer que le type d'échantillon, la matrice, ne contient pas de composés provoquant l'inhibition de l'amplification PCR. Par exemple, il est reconnu que les substances humiques et la matière organique des sols réduisent l'efficacité de la technique, menant à de faux résultats négatifs. Ainsi, pour y pallier, deux sortes de contrôle matrice sont possibles, le positif et le négatif.

Le contrôle matrice positif représente donc un extrait d'ADN issu d'un échantillon reconnu comme étant négatif où une quantité connue d'ADN cible est ajoutée. À l'inverse, le contrôle matrice négatif consiste en un extrait d'ADN reconnu comme étant négatif où une quantité connue d'ADN non ciblé est ajoutée.

Dans un contexte de contamination environnementale, il est difficile de s'assurer qu'un échantillon est bel et bien négatif avant de s'en servir pour vérifier l'inhibition de la réaction, particulièrement dans des échantillons d'eau où les niveaux de marqueurs sont près ou sous la limite de détection. De plus, le fait de stériliser les échantillons avant d'y ajouter les ADN ciblé ou non ciblé modifie les paramètres physico-chimiques de la matrice, nuisant donc au but visé par ce type de contrôle. Par conséquent, un autre type de contrôle peut être utilisé pour déterminer l'inhibition de la réaction, le contrôle interne d'amplification (voir plus bas section 3.3.4).

2.3.2 Contrôle environnemental

Le contrôle environnemental inclut l'ajout d'eau ayant été exposée à l'environnement de travail dans le mélange réactionnel de la qPCR. Ce type de contrôle peut être utilisé lorsque l'ADN ciblé risque de se retrouver facilement dans l'environnement de travail (ex : air). Les *Bacteroidetes* étant des bactéries intestinales, le risque peut être considéré comme négligeable et ce contrôle est peu pertinent dans le contexte de cette étude.

2.3.3 Contrôle positif et négatif

Le contrôle positif PCR est un extrait d'ADN dont on est certain qu'il contient l'ADN cible. Deux types sont possibles. Par exemple, un échantillon peut être inoculé avec des bactéries *Bacteroidales* cultivées en laboratoire avant l'extraction d'ADN. Ensuite, il est possible de réutiliser un échantillon dont l'extrait a induit un signal positif fort au qPCR ciblé à plusieurs reprises.

À l'inverse, le contrôle négatif PCR est un extrait d'ADN dont on est certain qu'il ne contient pas l'ADN cible. À ne pas confondre avec les « blancs » (NTC – *no template control*) à inclure dans les analyses, qui ne contiennent pas d'extrait d'ADN du tout. Il est possible d'inclure un échantillon d'une autre source que celle visée par l'analyse et

qui devrait être négatif. Par exemple, un échantillon de provenance humaine peut servir de contrôle négatif dans une amplification ciblant un marqueur bovin. La spécificité de la méthode doit cependant être élevée.

2.3.4 Contrôle interne d'amplification

Finalement, souvent retrouvé dans la littérature scientifique, le contrôle interne d'amplification (*Internal Amplification Control- IAC*) est une séquence d'ADN différente du marqueur ciblé qui est ajoutée dans le mélange réactionnel en plus de l'extrait d'ADN provenant de l'échantillon. Deux amplifications distinctes sont produites, soit la séquence du marqueur cible si l'échantillon est positif, ainsi que le contrôle interne, d'une longueur différente. Ceci permet de vérifier que le mélange réactionnel est adéquat, que les amorces se lient effectivement, et que la matrice n'inhibe pas la réaction.

3 DÉTERMINATION DES SOURCES DE CONTAMINATION FÉCALE

3.1 SÉLECTION DES MARQUEURS GÉNÉTIQUES

Le choix des marqueurs s'est d'abord effectué en fonction des critères suivants, dont les détails sont présentés à l'Annexe 1 :

- Marqueurs développés et rapportés en qPCR
- Informations pertinentes concernant la qPCR
 - a. Séquence 5' – 3' des amorces et de la sonde
 - b. Fluorophore et extincteur utilisés pour la sonde
 - c. Longueur du fragment d'ADN amplifié
 - d. Concentration finale des amorces et de la sonde
 - e. Réactifs qPCR utilisés
 - f. Modèle du thermocycleur
 - g. Protocole d'amplification qPCR
 - i. Temps et températures
 - h. Fragment d'ADN ciblé par le marqueur
 - i. # accession(s) dans la base de données GenBank®
- Clarté des informations rapportées dans l'article scientifique
- Nombre d'équipes de recherche ayant rapporté des résultats en lien avec le marqueur
 - a. En tenant compte de l'année de publication des résultats
 - b. En tenant compte du contexte géographique

Par la suite, la spécificité théorique des amorces a été vérifiée avec Primer-BLAST de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), avec les banques de données Refseq RNA (organismes ciblés : *Bacteroidetes*) et nr (organismes ciblés : bactéries non cultivées 77133). En résumé, un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) est un algorithme qui permet d'aligner les séquences des amorces et des sondes à toutes les séquences d'ADN répertoriées dans une banque de données publique, afin de déterminer si 1) elles s'associent à une source répertoriée et 2) à quel type d'hôte elles s'associent. Dick et Field (2004) ont rapporté que des amorces présentant une spécificité égale ou supérieure à la spécificité de la sonde réduisaient les risques de biais durant la réaction qPCR, particulièrement lorsque le background en ADN des échantillons est complexe. Les résultats obtenus pour chaque marqueur sont résumés dans les Tableaux 2 à 7.

En somme, les paramètres suivants ont été vérifiés :

- Liste des organismes ciblés au genre (Ex : *Bacteroides*, *Prevotella*, *Petrimonas*, etc.);
- Longueur du fragment amplifié
 - a. Selon les auteurs
 - b. Selon les résultats du Primer-BLAST;
- Longueurs des amorces similaires
 - a. Une différence de trois nucléotides au maximum est acceptée;
- Températures de fusion similaires
 - a. Une différence d'un degré Celsius au maximum est acceptée;
- Contenu en nucléotides G et C
 - a. Pourcentage visé d'environ 50 %;
- L'auto-complémentarité
 - a. Probabilité que l'amorce se lie à elle-même
 - b. Score accepté jusqu'à 8.00;
- L'auto-complémentarité 3'
 - a. Probabilité que l'amorce se lie à elle-même à l'extrémité 3'. Des scores élevés favorisent la formation de dimères d'amorce
 - b. Score accepté jusqu'à 3.00.

Tableau 2. Évaluation des critères de sélection des marqueurs généraux. Les valeurs apparaissant en rouge représentent celles ne répondant pas aux critères de sélection prédéfinis.

Nom du marqueur, amorces et sonde	Référence	Longueur des amorces (pb)	Température de fusion des amorces (°C)	Contenu en G et C (%)	Auto-complémentarité	Auto-complémentarité 3'
BacUni BacUni-520f BacUni-690r2 BacUni-656p	Kildare <i>et al.</i> , 2007	24 24	57,14 58,69	37,50 41,67	8.00 6.00	2.00 4.00
GenBac 3 GenBac3F GenBac3R GenBac3P	Siefring <i>et al.</i> , 2008	19 20	57,91 59,54	57,89 55,00	5.00 3.00	0.00 1.00
BacGen BacGen-F BacGen-R BacGen-TP	Lee <i>et al.</i> , 2010	20 21	61,27 61,53	65,00 57,14	3.00 3.00	2.00 1.00

Bien que l'efficacité des trois marqueurs universels semble comparable, le choix s'est arrêté sur BacGen développé par Lee *et al.*, (2010). L'analyse Primer-BLAST des trois paires d'amorces a révélé que celles-ci étaient davantage

spécifiques aux *Bacteroidales* que les autres et permettaient de cibler un plus grand nombre de genres bactériens que BacUni. Le marqueur GenBac a été écarté puisqu'il cible les *Bacteroidetes*.

Tableau 3. Évaluation des critères de sélection des marqueurs humains. Les valeurs apparaissant en rouge représentent celles ne répondant pas aux critères de sélection prédéfinis.

Nom du marqueur, amorces et sonde	Référence	Longueur des amorces (pb)	Température de fusion des amorces (°C)	Contenu en G et C (%)	Auto-complémentarité	Auto-complémentarité 3'
HF183 HF183f HF183r (BacHum-193p possible)	Seurinck <i>et al.</i> , 2005	20 21	55,55 55,83	45,00 47,62	6.00 3.00	2.00 0.00
BacHum BacHum-160f BacHum-241r BacHum-193p	Kildare <i>et al.</i> , 2007	21 24	60,00 60,38	47,62 50,00	6.00 3.00	3.00 0.00
BacHum BacHum-F BacHum-R BacHum-TP	Lee <i>et al.</i> , 2010	20 19	60,11 59,00	60,00 59,00	6.00 6.00	6.00 4.00
HF183 HF183f BFDRRev BFDFAM	Haugland <i>et al.</i> , 2010	20 20	55,55 59,68	45,00 55,00	6.00 3.00	2.00 2.00
BFD BFDFor BFDRRev BFDFAM	Converse <i>et al.</i> , 2009	20 20	58,18 59,68	50,00 55,00	3.00 3.00	0.00 2.00
HumM2 HumM2F HumM2R HumM2P	Shanks <i>et al.</i> , 2009 et USEPA, 2019	22 30	58,19 58,95	45,45 30,00	2.00 6.00	0.00 4.00

L'analyse Primer-BLAST a aussi été réalisée pour le marqueur BacH de Reischer *et al.* (2007), d'abord pour connaître la longueur du fragment ciblé. L'analyse a révélé que peu importe la sonde, les amorces ciblent une seule souche de *Bacteroides* dans GenBank®. De plus, l'amorce antisens contient quatre nucléotides non spécifiques, ce qui suggère que ce marqueur n'est pas assez spécifique et ne cible pas suffisamment de souches de *Bacteroides* d'origine humaine.

Les premiers essais ont donc été réalisés avec le marqueur BacHum de Kildare *et al.* (2007), puisqu'il cible les *Bacteroidales* et ne présentait pas de problèmes suite à l'analyse Primer-BLAST. Dans une optique d'établir les contributions relatives dans l'eau, le fait de cibler les *Bacteroidales* demeure le critère primordial si les autres marqueurs font de même.

Suite à des résultats non spécifiques, notamment avec des échantillons provenant du poulet, les marqueurs HF183 (Seurinck *et al.*, 2005) et HumM2 (Shanks *et al.*, 2009) ont été évalués.

Tableau 4. Évaluation des critères de sélection des marqueurs bovins. Les valeurs apparaissant en rouge représentent celles ne répondant pas aux critères de sélection prédéfinis.

Nom du marqueur, amorces et sonde	Référence	Longueur des amorces (pb)	Température de fusion des amorces (°C)	Contenu en G et C (%)	Auto-complémentarité	Auto-complémentarité 3'
BacBov1 BacBov-F1 BacBov-R1 BacBov-TP1	Lee <i>et al.</i> , 2010	27 25	58,66 59,94	33,33 44,00	4.00 4.00	2.00 4.00
BacBov2 BacBov-F2 BacBov-R2 BacBov-TP2	Lee <i>et al.</i> , 2010	23 26	60,12 57,30	47,83 34,62	6.00 5.00	6.00 5.00
CowM2 CowM2F CowM2R CowM2P	Shanks <i>et al.</i> , 2008	21 24	60,20 60,14	52,38 41,67	4.00 3.00	0.00 3.00
CowM3 CowM3F CowM3R CowM3P	Shanks <i>et al.</i> , 2008	26 24	58,53 60,50	38,46 45,83	3.00 4.00	1.00 0.00
BoBac BoBac367f BoBac467r BoBac402Bhqf	Layton <i>et al.</i> , 2006	21 21	57,60 55,53	47,62 37,50	3.00 5.00	2.00 5.00

Bien que les auteurs ayant développé des marqueurs bovins aient rapporté une bonne spécificité, l'analyse NCBI en a fait autrement. Les marqueurs CowM2 et CowM3, particulièrement CowM2, développés initialement par Shanks *et al.* (2008), semblaient prometteurs. Cependant, l'analyse avec Primer-BLAST a révélé que les amorces n'étaient spécifiques à aucune des séquences d'ADN appartenant aux *Bacteroidetes* (analyse réalisée le 4

décembre 2019). De ce fait, ces amorces ne semblent pas être une bonne option afin de déterminer si la source de contamination fécale provient des bovins. Les premiers essais ont donc été réalisés avec le marqueur BacBov1 développé par Lee *et al.* (2010). Ce marqueur est utilisé par le Gouvernement de l'Ontario, présente moins de risques de dimères d'amorces et les températures d'hybridation sont similaires.

Tableau 5. Évaluation des critères de sélection des marqueurs pour les ruminants. Les valeurs apparaissant en rouge représentent celles ne répondant pas aux critères de sélection prédéfinis.

Nom du marqueur, amorces et sonde	Référence	Longueur des amorces (pb)	Température de fusion des amorces (°C)	Contenu en G et C (%)	Auto-complémentarité	Auto-complémentarité 3'
BacR BacR-F BacR-R BacR-Probe	Reischer <i>et al.</i> , 2006	18 18	57,88 57,23	61,11 61,11	2.00 4.00	2.00 4.00
Rum-2-Bac BacB2-590f Bac708Rm BacB2-626P	Mieszkina <i>et al.</i> , 2010	24 20	64,28 55,59	50,00 45,00	4.00 4.00	2.00 2.00

Le marqueur BacR a été choisi pour les premiers essais, puisqu'il semble mieux que Rum-2-Bac quant aux températures d'hybridation et à la longueur des amorces. Aussi, plusieurs équipes de recherche ont évalué ce marqueur dans un contexte environnemental.

Tableau 6. Évaluation des critères de sélection des marqueurs pour le poulet. Les valeurs apparaissant en rouge représentent celles ne répondant pas aux critères de sélection prédéfinis.

Nom du marqueur, amorces et sonde	Référence	Longueur des amorces (pb)	Température de fusion des amorces (°C)	Contenu en G et C (%)	Auto-complémentarité	Auto-complémentarité 3'
Chicken/Duck-Bac qCD326F-HU qCD464-HU qBac394 MGB-HU	Kobayashi et al., 2013	22 24	58,52 60,14	45,45 45,83	6.00 4.00	0.00 2.00
Brevibacterium La35F La35R La35P	Weidhaas et Lipscomb, 2013	19 20	59,26 61,76	57,89 60,00	4.00 5.00	2.00 3.00

Le choix de marqueurs ciblant le poulet et développés en qPCR avec des sondes Taqman® est restreint. Bien que développé au Japon et ciblant aussi le canard, le marqueur Chicken/Duck-Bac a d'abord été évalué. Suite à des résultats d'abord peu convaincants sur sa sensibilité, l'analyse d'un marqueur ciblant les *Brevibacterium*, un autre genre bactérien, a été effectuée. Par le passé, ce marqueur a été utilisé par l'équipe du Dr Topp à Agriculture et Agroalimentaire Canada, mais en association avec la technologie SYBR® Green.

Tableau 7. Évaluation des critères de sélection des marqueurs porcins. Les valeurs apparaissant en rouge représentent celles ne répondant pas aux critères de sélection prédéfinis.

Nom du marqueur, amorces et sonde	Référence	Longueur des amorces (pb)	Température de fusion des amorces (°C)	Contenu en G et C (%)	Auto-complémentarité	Auto-complémentarité 3'
Pig-1-Bac Pig-1-Bac32Fm Pig-1-Bac108R Pig-1-Bac44P	Mieszkin et al., 2009	21 21	58,11 59,72	47,62 57,14	6.00 4.00	3.00 0.00
Pig-2-Bac Pig-2-Bac41Fm Pig-2-Bac163Rm Pig-2-Bac113MGB	Mieszkin et al., 2009	27 22	58,18 57,82	29,63 45,45	14.00 8.00	12.00 6.00

À la lumière des critères exposés au Tableau 7, le marqueur Pig-1-Bac semble davantage prometteur et a été évalué.

3.2 PROTOCOLES UTILISÉS

3.2.1 Échantillonnage et extraction d'ADN

Les échantillons de lisier et de fumier ont été prélevés de façon à avoir du matériel le plus frais possible avec le moins d'interférence avec l'environnement, que ce soit l'extérieur ou la litière, par exemple. Ainsi, les lisiers de porc ont été prélevés aseptiquement dans les pré-fosses intérieures, dans un pot de 100 ml stérile. Deux élevages étaient des porcs à l'engraissement et l'autre une pouponnière. Ces élevages sont gérés par des intégrateurs et l'alimentation des porcs se fait par de la moulée cubée dont le contenu n'est pas connu. Il est cependant hautement probable que plusieurs grains soient inclus dans les préparations, et non pas seulement maïs-soya vs céréales. En effet, il a été rapporté que les populations de *Bacteroidetes* étaient plus importantes chez les individus alimentés de blé et d'orge comparativement à une alimentation en maïs et en soya (voir section 2.2.4).

Les fumiers de bovin solides ont été prélevés au sol, directement dans les bouses, sans que la litière, la nourriture ou le sol ne soient touchés dans la mesure du possible, à raison de 5 prélèvements effectués dans l'étable avec une truelle stérile. Deux élevages étaient des bovins laitiers entravés installés sur litière de paille. L'autre élevage était des bovins de boucherie élevés en parcs intérieurs sur rîpe de bois, les animaux étant alimentés par des grains de maïs entiers et du supplément au contenu inconnu.

Les lisiers de bovins ont été prélevés aseptiquement dans le dalot, avant la sortie dans la fosse extérieure, dans un pot stérile. Les trois élevages étaient des vaches laitières en stabulation libre sans litière, d'où la nature liquide des effluents. Tous les bovins laitiers étaient alimentés par un mélange de grains, de fourrages et de suppléments dont la recette n'est pas connue.

Les fumiers de poulet ont été pris aseptiquement au sol, à raison de 5 prélèvements avec une truelle stérile. En raison de la nature de ces élevages, il était impossible de dissocier la litière de rîpe de bois des matières fécales. Comme dans le cas des porcs, les poulets étaient nourris avec de la moulée cubée au contenu inconnu. Le lisier de poules pondeuses a été prélevé sur le convoyeur situé sous les cages des animaux, avant la sortie du bâtiment d'élevage.

Les échantillons d'eaux usées brutes et traitées ont respectivement été prélevés dans des bouteilles stériles de 100 et 250 ml dans une station d'épuration située en Montérégie. Les échantillons bruts étaient prélevés après le dégrilleur et les échantillons traités à la suite de trois bassins aérés, avant le rejet dans l'environnement.

Les échantillons d'eau souterraine provenaient de puits résidentiels situés en Montérégie, dans la région de St-Hyacinthe. Ils ont été prélevés au robinet, après avoir laissé couler l'eau environ trois minutes. Les échantillons d'eau de surface provenaient également de la Montérégie, dont un prélevé dans la Rivière Noire, un dans le Ruisseau des Aulnages, un affluent de la Rivière Noire, et un cours d'eau situé près des locaux de l'IRDA à St-Bruno-de-Montarville. Tous ces échantillons ont été prélevés dans des bouteilles stériles de 500 ml. Les sites de prélèvement d'eau de surface ont été sélectionnés en fonction des sources potentielles de contamination bovine, humaine, porcine, aviaire et faunique.

Les échantillons de sol ont été prélevés avec des tarières stériles dans six champs différents, où l'historique récent d'épandage était connu. Ainsi, des sols loameux et sableux présentant des contextes différents de contamination potentielle porcine, équine, bovine et aviaire ont été sélectionnés. Chaque échantillon de sol de surface était constitué de cinq prélèvements de la strate 0-15 cm.

Quelques mois plus tard, d'autres échantillons de lisiers et fumiers ont été échantillonnés afin de poursuivre les tests de spécificité et de mise au point qPCR avec les marqueurs. De plus, trois échantillons de matières fécales fraîches d'oies blanches ont été prélevées sur les rives du réservoir Beaudet à Victoriaville, lors de leur migration automnale le 30 octobre 2020. Le matériel a été ramassé au sol avec une truelle en polypropylène stérile et mis dans un pot stérile de 100 ml, suite au décollage des oiseaux se trouvant sur la rive. Bien que le nombre d'individus à l'origine des matières fécales ne puisse pas être précisé, chaque échantillon comportait 5 sous-échantillons différents. Pour les bernaches, le même protocole d'échantillonnage a été suivi, mis à part le site qui a différé. Les échantillons ont effectivement été pris à la ferme expérimentale de l'IRDA à St-Bruno-de-Montarville, à deux moments différents, soit le 4 août et le 2 novembre 2020. Chaque échantillon composite comportait aussi 5 sous-échantillons différents.

Tous les échantillons ont été maintenus entre 2 et 8 °C avant l'analyse au laboratoire.

L'ADN génomique total dans les échantillons de matières fécales, fumiers et lisiers a été extrait à partir du kit d'extraction *Fast DNA SPIN Kit for Feces™* en combinaison avec le système FastPrep® de la compagnie MP Biomedicals (protocole détaillé à l'annexe 3). Le matériel génétique des échantillons d'eau a été concentré sur une membrane en ester de cellulose mixte (MicroCheck II), puis l'ADN a été extrait à l'aide du kit d'extraction *Fast DNA SPIN Kit for Soil™* en combinaison avec le système FastPrep® de la compagnie MP Biomedicals (protocole adapté détaillé à l'annexe 4).

3.2.2 PCR en temps réel

Bien que plusieurs réactifs qPCR existent sur le marché, seulement le SsoAdvanced Universal Probes Supermix de la compagnie Bio-Rad a été testé avec le thermocycleur CFX 96 de la même compagnie. Pour chacun des marqueurs, la température d'hybridation a été déterminée suite à la préparation des amorces, de la sonde et du standard. Les standards sont des fragments d'ADN synthétique dont la séquence contient le marqueur cible. Ils sont commandés d'une compagnie spécialisée et acheminés en solution ou lyophilisés. La description des différents standards utilisés pour chaque marqueur se trouve au Tableau 8. Pour le test d'hybridation, trois concentrations de standard ont été testées à huit températures différentes sous forme de gradient. La température donnant la meilleure hybridation des amorces a été sélectionnée pour la suite des essais avec le marqueur. Le protocole détaillé de détermination de la température d'hybridation des amorces est présenté à l'Annexe 5.

Tableau 8. Liste des standards utilisés pour chaque marqueur.

Marqueur	Nom du standard	Numéro d'accèsion GenBank ou NCBI Reference Sequence	Longueur (Positions)
BacGen	général <i>Bacteroidetes</i>	NR_148821.1	440 pb (283 à 722)
BacHum et HF183	Bact Humain	NR_041351.1	536 pb (161 à 696)
HumM2	HumM2 - USEPA	aucun	129 pb (⁴)
Pig-1-Bac	Pig-1-Bac	KJ422232.1	252 pb (1 à 252) ²
BacBov1	Bact Bovin	LC473848.1	367 pb (108 à 474)
BacR	Bact ruminant	LC028711.1	362 pb (1 à 362) ³
Chicken/Duck-Bac	Bact poucan	AB666125.1	368 pb (171 à 539)
<i>Brevibacterium</i>	Brevi-poulet ⁵	FJ462358	580 pb (6 à 576)

¹Deux thymines ont été ajoutées en 5' et 3' pour plus de stabilité, le fragment final étant de 444 pb.

²Deux thymines ont été ajoutées en 5', le fragment final étant de 254 pb.

³Une adénine a été ajoutée en 5', le fragment final étant de 363 pb.

⁴Le standard utilisé est de 105 pb dont la séquence provient directement de la méthode officielle du USEPA (2019). Des bases ont été ajoutées en 5' et en 3' pour dépasser le minimum recommandé par le fournisseur (125 pb).

⁵Nom donné par notre laboratoire.

Par la suite, les limites de quantification et de détection ont été déterminées à l'aide de douze dilutions du standard dans le but de produire une droite d'étalonnage. Une première dilution 1 : 10 est effectuée à partir de la solution-mère contenant le fragment synthétique, suivie de 10 dilutions 1 : 5, toutes effectuées dans l'eau pure de qualité PCR. Afin de trouver la limite de détection, au moins 60 réplicats sont requis pour obtenir un pourcentage significatif de réactions détectées (95 %) et non détectées (5 %). Ainsi, les dilutions standards à plus faible concentration (dilutions 9 à 12) ont été testées en plus grand nombre. La limite de quantification correspondait à la dernière concentration pour laquelle le degré de confiance que le résultat obtenu soit juste et précis est élevé, c'est-à-dire que l'écart-type soit inférieur à 0,3 et que la droite d'étalonnage ait un R^2 supérieur à 0,975 et une efficacité comprise entre 90 % et 110 %. Le protocole détaillé pour les limites de détection et de quantification est présenté à l'Annexe 6 et les conditions d'amplification de chaque marqueur est présenté au Tableau 9. Noter que la concentration finale de la sonde était de 200 nM pour tous les marqueurs.

Tableau 9. Conditions d'amplification qPCR des marqueurs évalués.

Nom du marqueur	Fluorophore	Concentrations des amorces (nM)	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation des amorces et élongation	Élongation finale
BacGen	VIC	400	95 °C, 2 min	95 °C, 10 s	59 °C, 10 s	72 °C, 1 min
BacR	FAM	500	95 °C, 2 min	95 °C, 15 s	53 °C, 30 s	72 °C, 1 min
BacHum	FAM	500	95 °C, 2 min	95 °C, 15 s	59 °C, 30 s	72 °C, 1 min
HF183						
HumM2						
BacBov1						
Pig-1-Bac						
Chicken/Duck-Bac						
<i>Brevibacterium</i>						

Ensuite, la spécificité de chaque marqueur a été déterminée à l'aide de 31 échantillons provenant de fumiers, de lisiers et de matières fécales fraîches (n=13), de deux types de sol (n=6) et d'eaux de surface (n=3), souterraines (n=3), usées brutes (n=3) et usées traitées (n=3), dont l'ADN a été extrait tel que décrit aux Annexes 3 et 4. Les marqueurs ont été testés avec chacun de ces échantillons auxquels un contrôle d'amplification interne (IAC) a été ajouté afin de déterminer l'interférence des différentes matrices sur la réaction qPCR. En cas d'interférence ou d'inhibition trop élevée (signal de l'IAC obtenu après la limite de quantification), les échantillons ont été dilués afin de diminuer la concentration des inhibiteurs (ex. matière organique) et de pouvoir quantifier l'ADN dans l'échantillon correctement. La procédure complète pour le test de spécificité se trouve également à l'Annexe 6. La détection des marqueurs a aussi été réalisée dans un contrôle négatif, constitué de l'ADN extrait de souches contrôles d'*E. coli* et de *Salmonella* mises en cultures pures. En effet, les marqueurs génétiques ciblés ne doivent pas être détectés dans des genres bactériens autres que les *Bacteroidales*, en l'occurrence des entérobactéries dans ce cas-ci.

3.3 RÉSULTATS

Les résultats des amplifications sont présentés dans les sections suivantes par marqueur génétique. Il faut préciser que pour les échantillons de matières fécales, les résultats sont rapportés par gramme en base humide, et sont accompagnés lorsque possible d'une estimation en base sèche. Cette estimation a été calculée en se basant sur les teneurs en matières sèches présentées dans le guide du Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ) intitulé *Valeurs références pour les volumes et les concentrations d'éléments fertilisants dans les effluents d'élevage* (CRAAQ, 2020). Le tableau 10 résume les valeurs utilisées selon la matrice.

Tableau 10. Résumé des teneurs en matières sèches utilisées pour rapporter les résultats qPCR en base sèche selon la matrice.

Type d'échantillon	Type d'élevage	Détails	Teneur en matière sèche de référence (%)
Fumier de bovin	Bovins laitiers	Gestion solide	21,2
Fumier de bovin	Bovins de boucherie	Gestion solide	21,2
Lisier de bovin	Bovins laitiers	Gestion liquide	7,2
Fumier de poulet	Poulets à griller	Gestion solide	74,4
Lisier de porc	Engraissement	Avec trémies abreuvoirs	4,9
Lisier de porc	Pouponnière	Porcelets sevrés	2,3

(Adapté de CRAAQ, 2020)

3.3.1 Marqueur universel BacGen

En premier lieu, la température optimale d'hybridation du marqueur universel BacGen a été vérifiée grâce au test d'hybridation décrit précédemment. Le gradient de température allait de 56 à 66 °C. Les températures de 59 et 60 °C donnaient les meilleurs résultats qPCR et une température de 60 °C a été choisie au départ, puisque la température optimale recensée dans littérature était aussi de 60 °C. Par contre, le contrôle d'amplification interne avait une meilleure hybridation à 59 qu'à 60 °C. De ce fait, la température d'hybridation de BacGen a été changée à 59 °C pour la suite des analyses.

Ensuite, pour trouver les limites de quantification et de détection, 12 dilutions de standard ont été préparées tel que décrit précédemment (voir Annexe 6). Chaque réaction qPCR avec les standards contenait 20 µl de réactifs (amorces, sonde, et *Master mix*) et 5 µl de dilution de standard pour un total de 25 µl par réaction. La limite de quantification de BacGen équivalait à la dilution 10 du standard, correspondant à 141 copies/réaction ou 28,1 copies/µl d'ADN. Pour ce qui est de la limite de détection, une valeur de 28,1 copies/réaction (5,62 copie/µl d'ADN) a été calculée.

Pour le test de spécificité, 3 µl de contrôle d'amplification interne (IAC) concentré à $9,77 \times 10^6$ copies/réaction ou $1,17 \times 10^6$ copies/µl d'ADN et 2 µl d'échantillon ont été ajoutés à 20 µl de réactifs (amorces, sonde et *Master mix*) pour un total de 25 µl par réaction. Les échantillons testés sont des matières fécales et des eaux usées (n=13), ainsi que des échantillons de sol (n=6) et d'eau (n=7). Les échantillons de matières fécales ont été dilués 1/100 et les échantillons de sol et d'eau n'ont pas été dilués. En effet, pendant les premières analyses, les échantillons d'eau et de sol étaient aussi dilués 1/100 et les résultats ont montré que la quantité d'ADN était beaucoup moins élevée pour ces échantillons. Ces conditions ont prévalu pour tous les marqueurs, et ne seront pas répétées dans les sections suivantes.

Afin de pouvoir évaluer la contribution relative de chaque marqueur spécifique, BacGen devait être en mesure de détecter tous les échantillons contenant de l'ADN de *Bacteroidales*, notamment les échantillons d'origine fécale. Après l'analyse des résultats, le marqueur BacGen a montré une excellente efficacité, tel que souhaité. En effet, le contenu de tous les échantillons de matières fécales, de lisiers, de fumiers ainsi que d'eaux usées a pu être quantifié. Tous les échantillons analysés contenaient le marqueur BacGen. Les concentrations exactes pour

chaque échantillon se trouvent aux Tableaux 11 et 12. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que le contenu des échantillons de fumier de poulet est plus faible que celui des autres sources, confirmant le fait que les intestins des oiseaux contiennent généralement moins de *Bacteroidales* que les mammifères. Le contrôle d'amplification interne n'a montré aucune inhibition qPCR pour les matières fécales animales et les eaux usées traitées. Par contre, le contrôle IAC a été inhibé dans le cas des eaux usées brutes, malgré l'amplification de ces échantillons à un niveau important (Tableau 11). L'analyse sur gel d'agarose n'a montré aucune non-spécificité.

Pour chacun des échantillons de sol et d'eau, des sources potentielles de contamination leur ont été attribuées en fonction des points de prélèvement, notamment en observant les types d'élevage dans les alentours. Ces dernières sont subjectives et ne garantissent pas la présence d'ADN de *Bacteroidales*. Deux échantillons d'eau souterraine (n=3), deux d'eau de puits (n=3) ainsi que six échantillons d'eau de surface (n=6) ont eu un signal au-delà de la LOQ (Tableau 12). Par contre, tous les échantillons de sols étaient négatifs (n=12). Il est possible qu'il y ait une inhibition qPCR importante dans les échantillons de sol puisque le contrôle d'amplification interne n'a effectivement pas été amplifié. La mise au point de la méthode dans les échantillons de sol fera l'objet du livrable 3, prévu en 2021-2022. L'analyse sur gel n'a montré aucune non-spécificité.

Tableau 11. Concentrations du marqueur universel BacGen mesurées dans les échantillons de matières fécales, lisiers, fumiers et eaux usées (n=19).

Type d'échantillon	Type d'élevage	Copies par μl d'ADN	Copies /g _h	Copies estimées /g _s	Copies par 100 ml
Lisier de porc	Engraissement	$9,61 \times 10^5$	$2,40 \times 10^{10}$	$4,90 \times 10^{11}$	N/A
Lisier de porc	Engraissement	$8,64 \times 10^5$	$2,16 \times 10^{10}$	$4,41 \times 10^{11}$	N/A
Lisier de porc	Pouponnière	$6,96 \times 10^4$	$1,74 \times 10^9$	$7,57 \times 10^{10}$	N/A
Fumier de bovin	Bovins laitiers	$8,54 \times 10^5$	$2,13 \times 10^{10}$	$1,01 \times 10^{11}$	N/A
Fumier de bovin	Bovins laitiers	$1,03 \times 10^6$	$2,58 \times 10^{10}$	$1,21 \times 10^{11}$	N/A
Fumier de bovin	Bovins de boucherie	$1,95 \times 10^5$	$4,88 \times 10^9$	$2,30 \times 10^{10}$	N/A
Lisier de bovin	Bovins laitiers	$8,20 \times 10^5$	$2,05 \times 10^{10}$	$2,85 \times 10^{11}$	N/A
Lisier de bovin	Bovins laitiers	$9,39 \times 10^5$	$2,35 \times 10^{10}$	$3,26 \times 10^{11}$	N/A
Lisier de bovin	Bovins laitiers	$5,85 \times 10^5$	$1,46 \times 10^{10}$	$2,03 \times 10^{11}$	N/A
Fumier de poulet	Poulets à griller	$1,84 \times 10^4$	$4,60 \times 10^8$	$6,18 \times 10^8$	N/A
Fumier de poulet	Poulets à griller	$2,88 \times 10^5$	$7,19 \times 10^9$	$9,67 \times 10^9$	N/A
Fumier de poulet	Poulets à griller	$1,36 \times 10^4$	$3,40 \times 10^8$	$4,58 \times 10^8$	N/A
Fèces de chevreuil	Faune	$7,39 \times 10^5$	$1,80 \times 10^{10}$	N/A	N/A
Eaux usées traitées	N/A	$5,50 \times 10^5$	N/A	N/A	$2,20 \times 10^7$
Eaux usées traitées	N/A	$5,00 \times 10^5$	N/A	N/A	$2,00 \times 10^7$
Eaux usées traitées	N/A	$5,61 \times 10^5$	N/A	N/A	$2,24 \times 10^7$
Eaux usées brutes	N/A	$3,67 \times 10^7$	N/A	N/A	$7,19 \times 10^9$
Eaux usées brutes	N/A	$4,87 \times 10^7$	N/A	N/A	$7,15 \times 10^9$
Eaux usées brutes	N/A	$4,02 \times 10^7$	N/A	N/A	$7,31 \times 10^9$

*N/A : non applicable ou non disponible

Tableau 12. Concentrations du marqueur universel BacGen mesurées dans les échantillons d'eau (n=12).

Type d'échantillon	Copies / μl d'ADN	Copies /100 ml
Eau souterraine	$4,24 \times 10^3$	$9,43 \times 10^4$
Eau souterraine	$5,21 \times 10^1$	$1,16 \times 10^3$
Eau souterraine	$1,68 \times 10^1$	$3,73 \times 10^2$
Eau souterraine	$2,34 \times 10^0$	$4,69 \times 10^1$
Eau souterraine	$1,71 \times 10^2$	$3,41 \times 10^3$
Eau souterraine	$4,01 \times 10^3$	$8,01 \times 10^4$
Eau de surface	$1,35 \times 10^5$	$3,01 \times 10^6$
Eau de surface	$2,54 \times 10^4$	$5,64 \times 10^5$
Eau de surface	$1,74 \times 10^4$	$3,86 \times 10^5$
Eau de surface	$2,41 \times 10^4$	$8,05 \times 10^5$
Eau de surface	$5,20 \times 10^3$	$1,73 \times 10^5$
Eau de surface	$1,67 \times 10^4$	$3,33 \times 10^5$

3.3.2 Marqueurs humains BacHum, HF183 et HumM2

Les analyses ont d'abord été réalisées en ciblant le marqueur BacHum. Lors des tests d'hybridation, trois concentrations de standard ont été testées à des températures comprises entre 56 °C et 66 °C. Les résultats ont

montré que la température d'hybridation optimale pour le marqueur BacHum était de 60 °C. Par contre, cette température a ensuite été abaissée à 59°C à cause du contrôle d'amplification interne. Il est important de noter que la différence entre l'hybridation des amorces de BacHum à 60 °C et 59 °C était négligeable. Sur gel d'agarose, aucune non-spécificité n'a été observée, que ce soit à 60 °C ou à 59 °C.

Par la suite, les limites de quantification et de détection ont été déterminées par la méthode de dilution limite (voir Annexe 6). La limite de quantification a été déterminée à la dilution 10 du standard, c'est-à-dire 116 copies/réaction (23,3 copies/ μ l d'ADN), et la limite de détection a été établie à 23,3 copies/réaction ou 4,66 copie/ μ l d'ADN.

Lors des tests de spécificité de BacHum, aucun échantillon provenant de matières fécales animales n'aurait dû être positif. Cependant, des échantillons de fumier de bovin (n=1), de lisier de porc (n=1), de fumier de poulet (n=2) et de fèces de poulet (n=1) ont été trouvés positifs au-delà de la limite de quantification. Les matières fécales et fumiers de poulet ont été détectés entre 23,7 et 26,3 cycles de quantification (C_q), révélant l'aspect non spécifique du marqueur. Bien que les échantillons aient été prélevés dans l'environnement et non pas directement dans les intestins et qu'il est donc possible qu'il y ait eu des contaminants d'origine humaine dans les échantillons, l'analyse d'autres marqueurs a été tentée. Le marqueur BacHum a cependant bien été quantifié dans des échantillons d'origine humaine (eaux usées brutes et traitées, matières fécales fraîches) dont les niveaux variaient en fonction de l'échantillon. Le contrôle d'amplification interne n'a montré aucune inhibition qPCR avec les échantillons de matières fécales.

Ensuite, les échantillons d'eau et de sol ont été testés pour BacHum. Ces échantillons étant des échantillons environnementaux, il était impossible de prédire si le marqueur humain allait être présent. Le marqueur BacHum a été détecté au-delà de la LOQ dans un échantillon d'eau de surface. Le contrôle d'amplification interne n'a pas montré d'inhibition avec les échantillons d'eau, mais n'a pas été testé avec les échantillons de sol puisque l'analyse d'autres marqueurs a été réalisée. Pour finir, la migration sur gel d'agarose a montré qu'il y avait de la non-spécificité chez les échantillons amplifiés, renforçant l'idée d'envisager d'autres marqueurs, soit HF183 et HumM2.

Ainsi, les analyses se sont poursuivies avec le marqueur HF183 (Seurinck *et al.*, 2005). Les concentrations mesurées dans les trois échantillons d'eaux usées brutes étaient plus élevées que pour les autres marqueurs humains évalués, variant entre $2,50$ et $3,06 \times 10^8$ copies /100 mL. La non-spécificité avec le poulet s'est cependant révélée importante. Pour cette raison, en plus du fait que ce marqueur cible principalement le genre bactérien *Bacteroides*, les essais avec ce marqueur ont été abandonnés. Le choix s'est alors porté sur le marqueur HumM2, développé en 2009 par Shanks *et al.* et faisant partie intégrante de la méthode officielle 1697 de la USEPA pour caractériser la contamination fécale humaine dans l'environnement. Les résultats ont été concluants puisque le marqueur a été détecté dans peu d'échantillons provenant d'une autre source que l'humain. En effet, quelques échantillons de fumier et lisier de poulet ont montré des résultats positifs, sous la limite de quantification. HumM2 a aussi été détecté dans un échantillon de lisier de porc à $3,46 \times 10^6$ copies/g_h, mais n'a pas été retrouvé dans les autres échantillons d'origines porcines. Cet échantillon positif provenait de la pouponnière, et il a été découvert par la suite qu'une contamination fécale d'origine humaine était fréquente au sein des installations. Les concentrations de HumM2 mesurées dans les trois échantillons d'eaux usées brutes ont varié entre $1,25$ et $1,68 \times 10^4$ copies /100 mL. Le marqueur HumM2 a été faiblement détecté dans les eaux usées traitées, les résultats étant tous sous la limite de quantification de la méthode qPCR. Malgré des tests supplémentaires de mise au point du marqueur HumM2, qui visaient à vérifier la sensibilité et la spécificité avec plusieurs types d'échantillons porcins, humains, bovins, chevreuils et poulet, il s'est avéré que la méthode qPCR HumM2 était déjà optimisée. Les prochaines étapes du projet ont donc été réalisées avec le marqueur HumM2, puisqu'il a été plus spécifique que les marqueurs BacHum et HF183.

3.3.3 Marqueur porcin Pig-1-Bac

Le gradient de température utilisé pour trouver la température d'hybridation optimale de Pig-1-Bac allait de 55 à 65 °C. Suite à ce test d'hybridation, une température de 59 °C a été retenue pour la suite des analyses. La migration sur gel d'agarose n'a pas montré de non-spécificité.

La limite de quantification a été trouvée à la dilution 11 du standard, soit à une concentration de 49,2 copies/réaction (9,83 copie/ μ l d'ADN). La limite de détection correspond à la 12^e dilution du standard, soit 9,83 copie/réaction (1,97 copie/ μ l d'ADN).

Pour le test de spécificité, trois échantillons provenaient de porc et le marqueur Pig-1-Bac ne devait reconnaître que ceux-ci pour être considéré comme spécifique. Les trois échantillons de lisier de porc testés contenaient tous le marqueur Pig-1-Bac. La concentration du marqueur dans l'échantillon provenant de porcs en pouponnière était très faible (46,3 copies/réaction). Il est donc possible que l'âge des porcs ait une influence sur les résultats qui peuvent survenir. Cependant, la revue de littérature avait plutôt indiqué que les populations de *Bacteroidaceae* diminuaient dans le temps chez les porcs (voir section 2.2.4). D'autres hypothèses, par exemple la présence de produits de nettoyage et de désinfection dans la pré-fosse, pourraient expliquer les faibles populations bactériennes qui y sont retrouvées. Le marqueur a cependant été détecté dans d'autres échantillons non désirés. Un seul échantillon de bovins de boucherie (n=1) contenait le marqueur porcin à des concentrations comparables à celles des lisiers de porc (Tableau 13). Ceux de fumiers de poulets à griller (n=3) ont cependant sortis après $37,26$ C_q, ce qui représentait des concentrations négligeables du marqueur. De plus, la migration sur gel a montré que

la longueur des fragments amplifiés ne correspondaient à Pig-1-Bac. Il est important de noter qu'il est possible que ces échantillons aient été contaminés puisqu'ils ont été prélevés au sol. Le contrôle d'amplification interne n'a montré aucune inhibition qPCR pour les échantillons de matières fécales. Le marqueur porcin n'a pas été détecté dans les eaux usées brutes et traitées, ni dans les fèces de chevreuil.

Parmi les échantillons environnementaux, deux échantillons d'eau de surface ont été trouvés positifs au qPCR à des concentrations de $5,83$ et $8,24 \times 10^2$ copies/ μ l ($1,30 \times 10^2$ et $1,83 \times 10^4$ copies/100 ml d'eau). Le porc était effectivement une source potentielle de contamination de l'environnement où les échantillons ont été prélevés. Au total, huit échantillons ont donc été trouvés positifs, soit 25 %, dont trois qui n'étaient pas souhaités (bovin, poulet) et un qui aurait dû être détecté avec un niveau plus élevé (porcs en pouponnière). Les résultats sont résumés au Tableau 13.

La vérification sur gel d'agarose a montré une amplification de certains échantillons non porcins et qui n'étaient pas positifs au qPCR. Les fragments amplifiés avaient pourtant la même longueur que le marqueur cible. Afin de connaître pourquoi ces fragments n'avaient pas été détectés, ils ont été séquencés. La séquence a montré que les fragments amplifiés étaient presque identiques à la séquence du marqueur à l'exception de neuf nucléotides tous présents dans la région habituellement reconnue par la sonde. De ce fait, les amorces pouvaient se fixer et amplifier le fragment, mais la sonde ne pouvait pas s'y fixer et émettre une longueur d'onde détectée par l'appareil. Il est impossible de savoir quelle est la source de ce fragment, car un Primer-BLAST de cette séquence a été associé à de l'ARN environnemental non cultivé. Dans le contexte des analyses réalisées, il est souhaitable que ce fragment ne soit pas reconnu, car il n'apparaît pas spécifique au porc. De ce fait, aucune modification au protocole n'a été effectuée pour contrer cette amplification.

Tableau 13. Concentrations du marqueur porcin Pig-1-Bac mesurées dans les échantillons trouvés positifs (n=9).

Type d'échantillon	Type d'élevage	Copies par μ l d'ADN	Copies /g _n	Copies estimées /g _s	Copies par 100 ml
Lisier de porc	Engraissement	$1,42 \times 10^4$	$3,56 \times 10^8$	$7,27 \times 10^9$	N/A
Lisier de porc	Engraissement	$1,45 \times 10^5$	$3,63 \times 10^9$	$7,41 \times 10^{10}$	N/A
Lisier de porc	Pouponnière	$4,63 \times 10^1$	$1,16 \times 10^6$	$5,04 \times 10^7$	N/A
Fumier de bovin	Bovins de boucherie	$3,31 \times 10^4$	$8,27 \times 10^8$	$3,90 \times 10^9$	N/A
Fumier de poulet	Poulet à griller	$2,23 \times 10^0$	$5,58 \times 10^4$	$7,50 \times 10^4$	N/A
Fumier de poulet	Poulet à griller	$5,27 \times 10^0$	$1,32 \times 10^5$	$1,77 \times 10^5$	N/A
Fumier de poulet	Poulet à griller	$1,02 \times 10^1$	$2,56 \times 10^5$	$3,44 \times 10^5$	N/A
Eau de surface	N/A	$5,83 \times 10^0$	N/A	N/A	$1,30 \times 10^2$
Eau de surface	N/A	$8,24 \times 10^2$	N/A	N/A	$1,83 \times 10^4$

*N/A : non applicable

3.3.4 Marqueur bovin BacBov1

La température optimale de BacBov1 a été déterminée à 59 °C. Le gradient de température allait de 56,2 °C à 62,2 °C et la migration sur gel d'agarose n'a montré aucune non-spécificité.

La limite de quantification correspondait à la dilution 10 du standard, soit 34,0 copies/μl d'ADN ou 170 copies/réaction d'ADN. La limite de détection a été trouvée à la dilution 11, soit à une concentration de 6,80 copies/μl d'ADN ou 34,0 copies/réaction.

Pour les tests de spécificité, il était souhaité que le marqueur bovin reconnaisse les échantillons provenant des bovins d'élevage seulement et ce, afin de distinguer cette source de contamination de celle d'origine faunique par le chevreuil. La revue de littérature a toutefois indiqué que ce marqueur avait été détecté dans des fèces de chevreuil. Afin de voir la différence entre la spécificité de BacBov1 et le marqueur ruminant BacR, il serait intéressant d'évaluer d'autres échantillons de ruminants différents de la vache et du chevreuil. Cela dit, BacBov1 a été détecté dans tous les échantillons de ruminants, incluant le chevreuil (Tableau 14). D'autres échantillons, incluant des eaux usées et des lisiers de porc, ont présenté des courbes extrêmement aplaties. Bien qu'elles se distinguent facilement des échantillons issus de bovins et du chevreuil, il ne serait tout de même pas possible de les distinguer dans un échantillon d'eau dont l'origine de la contamination fécale est inconnue. Une courbe qPCR aplatie peut être causée par plusieurs facteurs, dont une moins bonne spécificité des amorces et la sonde, la présence d'inhibiteurs qPCR (souvent retrouvés dans des échantillons environnementaux) ainsi que des fragments amplifiés de longueur différente de celle attendue (non spécifique). Ainsi, les échantillons qui obtiennent des courbes aplaties doivent tout de même être considérés positifs. Le contrôle d'amplification interne n'a montré aucune inhibition qPCR dans les échantillons de matières fécales.

Le marqueur a été détecté dans plusieurs échantillons environnementaux (eau et sol) (n=11). Toutefois, plusieurs échantillons étaient sous la limite de quantification. Au total, vingt-quatre échantillons ont été trouvés positifs au marqueur, soit 52 % de tous les échantillons évalués. Les concentrations sont présentées au Tableau 14.

Tableau 14. Concentrations du marqueur bovin BacBov1 mesurées dans les échantillons trouvés positifs (n=24).

Type d'échantillon	Type d'élevage	Copies / μ l d'ADN	Copies /g _h	Copies estimées /g _s	Copies par 100 ml
Fumier de bovin	Bovins laitiers	2,42 x 10 ⁵	6,21 x 10 ⁹	2,93 x 10 ¹⁰	N/A
Fumier de bovin	Bovins de boucherie	7,90 x 10 ³	2,21 x 10 ⁸	1,04 x 10 ⁹	N/A
Fumier de bovin	Bovins laitiers	1,54 x 10 ⁵	3,85 x 10 ⁹	1,12 x 10 ¹⁰	N/A
Lisier de bovin	Bovins laitiers	2,37 x 10 ⁵	6,47 x 10 ⁹	8,99 x 10 ¹⁰	N/A
Lisier de bovin	Bovins laitiers	2,26 x 10 ⁵	5,66 x 10 ⁹	7,86 x 10 ¹⁰	N/A
Lisier de bovin	Bovins laitiers	1,90 x 10 ⁵	4,75 x 10 ⁹	6,60 x 10 ¹⁰	N/A
Lisier de porc	Engraissement	2,80 x 10 ²	7,01 x 10 ⁶	1,43 x 10 ⁸	N/A
Lisier de porc	Engraissement	4,98 x 10 ²	1,28 x 10 ⁶	2,61 x 10 ⁷	N/A
Lisier de porc	Pouponnière	6,57 x 10 ²	1,80 x 10 ⁷	8,57 x 10 ⁸	N/A
Fèces de chevreuil	Faune	2,43 x 10 ⁵	5,94 x 10 ⁹	N/A	N/A
Eaux usées brutes	N/A	6,35 x 10 ⁵	N/A	N/A	1,24 x 10 ⁸
Eaux usées brutes	N/A	9,78 x 10 ⁵	N/A	N/A	1,44 x 10 ⁸
Eaux usées brutes	N/A	7,62 x 10 ⁵	N/A	N/A	1,39 x 10 ⁸
Eau souterraine	N/A	1,13 x 10 ³	N/A	N/A	2,16 x 10 ⁴
Eau de surface	N/A	9,56 x 10 ¹	N/A	N/A	2,12 x 10 ³
Eau de surface	N/A	7,70 x 10 ⁰	N/A	N/A	1,71 x 10 ²
Eau de surface	N/A	8,67 x 10 ⁰	N/A	N/A	1,93 x 10 ²
Eau de surface	N/A	2,15 x 10 ¹	N/A	N/A	7,15 x 10
Eau de surface	N/A	2,57 x 10 ¹	N/A	N/A	5,14 x 10 ²
Eau souterraine	N/A	1,16 x 10 ²	N/A	N/A	2,58 x 10 ³
Eau souterraine	N/A	8,58 x 10 ⁰	N/A	N/A	1,91 x 10 ²
Loam	N/A	2,19 x 10 ¹	4,22 x 10 ³	N/A	N/A
Sable	N/A	4,02 x 10 ¹	8,05 x 10 ³	N/A	N/A
Sable	N/A	2,02 x 10 ²	4,04 x 10 ⁴	N/A	N/A

*N/A : non applicable ou non disponible

3.3.5 Marqueur ruminant BacR

Pour déterminer la température optimale d'hybridation de BacR, trois dilutions de standard ont été soumises à un gradient de température allant de 52,0 °C à 60,0 °C. Après cette analyse, la température d'hybridation optimale pour BacR a été déterminée à 53 °C.

Les limites de quantification et de détection ont été déterminées à l'aide de la méthode décrite à l'Annexe 6. La dilution 10 du standard a donné la limite de quantification du marqueur BacR, équivalente à une concentration de 172 copies/réaction (34,4 copies/ μ l d'ADN). Par la suite, la limite de détection a été trouvée à la 11^e dilution du standard à une concentration de 34,4 copies/réaction (6,88 copie/ μ l d'ADN).

Pour le test de spécificité, le marqueur ruminant BacR devait être détecté dans tous les échantillons de matières fécales provenant de ruminants (bovins et chevreuil, n=7). Après l'analyse qPCR, le marqueur a été détecté dans 6 des 7 échantillons de ruminants (Tableau 15). Le marqueur n'a pas été détecté dans les autres échantillons de matières fécales, incluant un échantillon provenant de ruminants. Ce dernier est un échantillon de bovins de boucherie. Le marqueur ruminant n'a pas été détecté dans les eaux usées brutes et traitées. Le contrôle d'amplification interne n'a pas montré d'inhibition qPCR causée par ce type de matrice.

Le marqueur BacR n'a été détecté dans aucun échantillon de sol et d'eau alors que BacBov1 l'a été dans plusieurs échantillons. Puisque BacR cible les ruminants, il aurait dû être détecté dans les mêmes échantillons que BacBov1. Cependant, le marqueur BacR semble être beaucoup plus spécifique que BacBov1 puisqu'il n'a été détecté que dans des échantillons provenant de ruminants. Il est aussi possible que BacBov1 soit plus sensible que BacR, ce qui pourrait expliquer la détection dans des échantillons environnementaux. Le contrôle d'amplification interne n'a pas montré d'inhibition dans les échantillons d'eau, mais n'a pas été amplifié dans les échantillons de sol, révélant une inhibition qPCR ou une dégradation de l'ADN. La mise au point dans ce type de matrice devra être effectuée dans les prochaines étapes du mandat. Au total, six échantillons ont été positifs au marqueur, soit 12 % des échantillons évalués. Les concentrations sont présentées au Tableau 15.

Tableau 15. Concentrations du marqueur ruminant BacR mesurées dans les échantillons trouvés positifs (n=6).

Type d'échantillon	Type d'élevage	Copies / μ l d'ADN	Copies /g _h	Copies estimées /g _s
Fumier de bovin	Bovins laitiers	1,67 x 10 ⁵	4,17 x 10 ⁹	1,97 x 10 ¹⁰
Fumier de bovin	Bovins laitiers	1,04 x 10 ⁵	2,60 x 10 ⁹	1,22 x 10 ¹⁰
Lisier de bovin	Bovins laitiers	1,67 x 10 ⁵	4,17 x 10 ⁹	5,79 x 10 ¹⁰
Lisier de bovin	Bovins laitiers	1,63 x 10 ⁵	4,07 x 10 ⁹	5,65 x 10 ¹⁰
Lisier de bovin	Bovins laitiers	1,37 x 10 ⁵	3,41 x 10 ⁹	4,74 x 10 ¹⁰
Fèces de chevreuil	Faune	1,82 x 10 ⁵	4,43 x 10 ⁹	N/A

*N/A : non disponible

3.3.6 Marqueurs poulets Chicken/Duck-Bac et *Brevibacterium*

Afin de déterminer la température d'hybridation, un gradient de température allant de 56,2 °C à 63,2 °C a d'abord été évalué pour le marqueur Chicken/Duck-Bac. Après le test, une température de 59 °C a été choisie pour la suite des analyses. La limite de quantification a été établie à la dilution 11 du standard, correspondant à une concentration de 33,9 copies/réaction, soit 6,78 copies/μl d'ADN. La limite de détection, à la dilution 12, a été déterminée à 6,78 copies par réaction, soit 1,36 copies/μl d'ADN.

Parmi les 21 échantillons de fumier, de lisier et de fèces servant à effectuer les tests de spécificité, plusieurs échantillons venant du poulet, de bovins, de porcs, de la Bernache et d'oies blanches contenaient le marqueur Chicken/Duck-Bac (Tableau 16). Le marqueur aurait dû être détecté uniquement dans des échantillons provenant du poulet, ce qui n'a pas été le cas. Cependant, les concentrations étaient sous la limite de quantification dans les lisiers de bovins, le lisier de porc en pouponnière, les fèces de chevreuil ainsi que les fèces d'oies blanches et de bernaches. Le marqueur n'a été détecté dans aucun échantillon de fumier de poulet (n=5). Le lisier de poules ainsi que les lisiers de porc en engraissement contenaient davantage de marqueur que les autres échantillons testés positifs. Chicken/Duck-Bac n'a pas été détecté dans les eaux usées traitées, mais a été détecté en faibles concentrations dans les eaux usées brutes. Le contrôle d'amplification interne n'a montré aucune inhibition qPCR dans les matrices. Aucun des échantillons environnementaux d'eau et de sol n'a présenté de signal positif au marqueur. Le contrôle d'amplification interne a montré une inhibition complète de tous les échantillons de sol et aucune inhibition des échantillons d'eau. Au total, 14 échantillons ont été trouvés positifs au marqueur Chicken/Duck-Bac, soit 30% de tous les échantillons évalués.

Plusieurs tentatives ont été réalisées pour optimiser la méthode, dont l'ajout de MgCl₂ à différentes concentrations afin d'augmenter la spécificité, sans succès. Des essais d'amplification ciblant le genre *Brevibacterium* (gène LA35 - 16s rRNA) ont aussi été réalisés avec les amorces LA35F et LA35R. Deux échantillons de fumiers de poulet ont été détectés à moins de 30 C_q. Un essai a aussi été effectué avec un échantillon frais de fientes de poules pondeuses, prélevé sur le convoyeur situé sous les cages. Aucune litière n'était utilisée dans l'élevage. Le marqueur Chicken/Duck-Bac a alors été quantifié (détection avant les 29 C_q), alors que *Brevibacterium* n'a toujours pas été détecté. Il est possible que le type de matrice, notamment la présence de copeaux de bois asséchant le fumier, réduise la persistance de certaines bactéries, particulièrement celles étant anaérobies tels que les *Bacteroidales*. En effet, le taux de matières sèches mesuré dans le lisier de poule était d'environ 25 %, alors que celui du fumier de poulet atteignait 70 %. Le marqueur *Brevibacterium* a alors été abandonné, et le choix s'est finalement porté sur Chicken/Duck-Bac.

Tableau 16. Concentrations du marqueur ruminant Chicken/Duck-Bac mesurées dans les échantillons trouvés positifs (n=14)

Type d'échantillon	Type d'élevage	Copies / μ l d'ADN	Copies /g _h	Copies estimées /g _s	Copies par 100 ml
Fumier de bovin	Bovins de boucherie	4,54 x 10 ¹	1,14 x 10 ⁶	5,38 x 10 ⁶	N/A
Lisier de bovin	Bovins laitier	6,49 x 10 ⁰	1,62 x 10 ⁵	2,25 x 10 ⁶	N/A
Lisier de bovin	Bovins laitier	7,79 x 10 ⁰	1,95 x 10 ⁵	2,71 x 10 ⁶	N/A
Lisier de porc	Engraissement	2,06 x 10 ²	5,16 x 10 ⁶	1,05 x 10 ⁸	N/A
Lisier de porc	Engraissement	1,94 x 10 ²	4,84 x 10 ⁶	3,96 x 10 ⁷	N/A
Lisier de porc	Pouponnière	1,50 x 10 ¹	3,76 x 10 ⁵	1,79 x 10 ⁷	N/A
Lisier de poules	Poules pondeuses	1,46 x 10 ³	3,38 x 10 ⁷	1,36 x 10 ⁸	N/A
Fèces de chevreuil	Faune	1,08 x 10 ¹	2,77 x 10 ⁵	N/A	N/A
Fèces de Bernache	Faune	2,86 x 10 ⁰	5,47 x 10 ²	3,00 x 10 ³	N/A
Fèces d'oies blanches	Faune	2,87 x 10 ¹	2,54 x 10 ⁴	1,24 x 10 ⁵	N/A
Fèces d'oies banches	Faune	3,71 x 10 ⁰	7,18 x 10 ²	3,52 x 10 ³	N/A
Eaux usées brutes	N/A	5,29 x 10 ¹	N/A	N/A	5,18 x 10 ³
Eaux usées brutes	N/A	8,99 x 10 ¹	N/A	N/A	6,61 x 10 ³
Eaux usées brutes	N/A	9,52 x 10 ¹	N/A	N/A	8,65 x 10 ³

*N/A : non disponible

3.3.7 Bilan

En résumé, les limites de détection et de quantification de la méthode, mesurées à partir des brins d'ADN cibles achetés commercialement et nommés « standards », ont été conséquentes avec la littérature. Le résumé des résultats est présenté au Tableau 17. Tel que mentionné au début de la revue de littérature, il faut considérer 3,5 ± 1,5 séquences d'ADN cible par cellule bactérienne de *Bacteroidales*. Les limites de détection et de quantification mesurées se retrouvent donc entre 2 et 10 bactéries par μ l d'ADN. Les prochaines étapes du mandat permettront également de faire des liens entre les populations d'*E. coli* et les marqueurs génétiques quantifiés, notamment dans les fumiers et lisiers, ainsi que dans l'eau et le sol (Livrable 3 – 2021-2022).

Tableau 17. Limites de détection et de quantification des marqueurs ciblés, calculées à partir des séquences standards diluées.

Cible	Nom du marqueur	Limite de quantification ¹ (copies/μL d'ADN)	Limite de détection ¹ (copies/μL d'ADN)
Universel	BacGen	5,62	1,12
Humains	HumM2	19,4	3,87
Porcs	Pig-1-Bac	9,83	1,97
Bovins	BacBov1	34,0	6,80
Ruminants	BacR	34,4	6,88
Poulets	Chicken/Duck-Bac	6,78	1,36

¹Les limites ont été calculées à partir des séquences d'ADN synthétique des standards dilués.

Les lignes suivantes résument les séquences des amorces et de la sonde utilisées pour les marqueurs analysés, de même que l'IAC. Toutes les séquences sont présentées en 5'-3'.

BacGen

Amorce sens : BacGen-F, CTGAGAGGAAGGTCCCCAC

Amorce antisens : BacGen-R, CACGCTACTTGGCTGGTTTCAG

Sonde : BacGen-TP, VIC-AGCAGTGAGGAATATT-MGB-NFQ

Référence : Lee *et al.*, 2010

HumM2

Amorce sens : HumM2F, CGTCAGGTTTGTTCGGTATTG

Amorce antisens : HumM2R, TCATCAGTAACTTATTTATATGCATTAGC

Sonde : HumM2P, FAM-TATCGAAAATCTCACGGATTAACCTTGTGTACGC- MGB-NFQ

Référence : Shanks *et al.*, 2009 et méthode 1697 de la USEPA

HF183

Amorce sens : HF183f, ATCATGAGTTCACATGTCCG

Amorce antisens : HF183r, TACCCGCCTACTATCTAATG

Sonde : BacHum-193p, 6-FAM-TCCGGTAGACGATGGGGATGCGTT-TAMRA

Référence : Seurinck *et al.*, 2005

BacHum

Amorce sens : BacHum-160f, TGAGTTCACATGTCCGCATGA

Amorce antisens : BacHum-241r, CGTTACCCGCCTACTATCTAATG

Sonde : BacHum-193p, 6-FAM-TCCGGTAGACGATGGGGATGCGTT-TAMRA

Référence : Kildare *et al.*, 2007

BacBov1

Amorce sens : BacBov-F1, AAGGATGAAGGTTCTATGGATTGTAAG

Amorce antisens : BacBov-R1, GAGTTAGCCGATGCTTATTCATACG

Sonde : BacBov-TP1, 6-FAM-ATACGGGAATAAAACC-MGB-NFQ

Référence : Lee *et al.*, 2010

Pig-1-Bac**Amorce sens : Pig-1-Bac32Fm**, AACGCTAGCTACAGGCTTAAC**Amorce antisens : Pig-1-Bac108R**, CGGGCTATTCCTGACTATGGG**Sonde : Pig-1-Bac44P**, 6-FAM-ATCGAAGCTTGCTTTGATAGATGGCG-BHQ1**Référence : Mieszkin *et al.*, 2009****Chicken/Duck-Bac****Amorce sens : qCD362F-HU**, AATATTGGTCAATGGGCGAGAG**Amorce antisens : qcD464R-HU**, CACGTAGTGTCCGTTATCCCTTA**Sonde : qBac394 MGB-HU**, 6-FAM-TCCTTCACGCTACTTGG-MGB-NFQ**Référence : Kobayashi *et al.*, 2013****Brevibacterium****Amorce sens : LA35F**, ACCGGATACGACCATCTGC**Amorce antisens : LA35R**, TCCCCAGTGTCTAGTCACAGC**Sonde : LA35P**, FAM-CAG CAG GGA AGA AGCCTT CGG GTG ACG GTA-BHQ1**Référence : Weidhaas et Lipscomb, 2013****BacR****Amorce sens : BacR-F**, GCGTATCCAACCTTCCCG**Amorce antisens : BacR-R**, CATCCCCATCCGTTACCG**Sonde : BacR-Probe**, 6-FAM-CTTCCGAAAGGGAGATT-MGB-NFQ**Référence : Reischer *et al.*, 2006****IAC****Amorce sens : SEIPCF**, CTGAGTAGCCACGTTATTATC**Amorce antisens : SEIPCR**, GCGAACAATAACTTGATTG**Sonde : SEIPCP**, Cy5-CGCACTTGTCTACACCCTTCATAC-IAbRQSp**Référence : mis au point à l'IRDA**

4 IMPACT DE L'ENTREPOSAGE DES FUMIERS ET LISIERS

Les conditions d'entreposage des fumiers telles que la durée et la température peuvent avoir un effet sur le devenir des marqueurs génétiques. Par conséquent, il est probable que les épandages printaniers et automnaux aient des impacts différents sur la charge de marqueurs émise dans l'environnement. L'objectif de cette section était d'évaluer la persistance des marqueurs et d'*E. coli* dans les lisiers et fumiers durant l'entreposage à différentes températures sur plusieurs semaines. Les résultats obtenus permettront de documenter ce phénomène afin de fournir aux utilisateurs de la méthode des outils d'interprétation des résultats. Les concentrations de marqueurs ont été comparées aux populations d'*E. coli*. Ce dernier indicateur est largement documenté en tant que microorganisme indicateur de contamination fécale, ce qui facilitera l'interprétation des résultats et permettra d'apprécier la persistance relative des marqueurs.

Afin de documenter l'effet des conditions d'entreposage des fumiers/lisiers (température et durée) sur les marqueurs génétiques, ces derniers ont été quantifiés dans des échantillons de lisier et de fumier entreposés en conditions contrôlées. Les quatre types d'échantillons suivants ont été utilisés : lisier de porc, fumier de bovin, lisier de bovin et fumier de poulet.

4.1 MÉTHODOLOGIE

Les lisiers de bovin et de porc ont été prélevés dans les trois fermes où les échantillons frais avaient été pris pour la mise au point de la qPCR. Pour ce faire, environ 2,5 L de lisier ont été prélevés dans la préfosse intérieure de chaque entreprise, et un composite de 3 L a été formé à partir des trois sous-échantillons. Les échantillons de fumier de poulet et de bovin ont été prélevés dans deux des trois fermes visitées jusqu'à présent, soit deux fermes de bovins laitiers sur paille et deux élevages de poulets à griller sur ripe. Lors des échantillonnages, environ 2 kg ont été prélevés dans le dalot final (bovin) ou l'amas extérieur (poulet) dans chaque ferme, et un composite de 3 kg a été formé à partir des sous-échantillons. Après homogénéisation des échantillons composites, 30 g ont été pesés dans 48 pots de 100 ml stériles et dans 48 pots de 100 ml non stériles et ce, par type de fumier. Le nombre d'unités expérimentales était de 12 (4 types de lisier/fumier x 3 répétitions) pour chaque température d'entreposage et chaque moment d'analyse. Le protocole détaillé est présenté à l'Annexe 7. La moitié des pots ont été entreposés à une température de 4 °C simulant des conditions hivernales d'entreposage, alors que l'autre moitié a été entreposée à une température de 12 °C reproduisant des conditions plutôt estivales. Ces températures ont été choisies en fonction de travaux réalisés antérieurement à l'IRDA où des mesures étaient prises en conditions réelles d'entreposage (Stéphane Godbout, communication personnelle). L'entreposage a été effectué dans des incubateurs à l'obscurité dont la température ne varie pas plus de $\pm 0,5$ °C.

Le lendemain de la mise en pot, ainsi qu'à 7 moments durant les huit semaines qui ont suivi, les variables suivantes ont été mesurées dans chaque échantillon :

- Populations d'*E. coli* selon la méthode utilisant les Pétrifilms™ (méthodologie en Annexe 8);
- Marqueurs génétiques de toutes espèces et des espèces ciblées (méthodologie en Annexe 6);
- Taux de matières sèches (méthodologie en Annexe 7).

Les masses volumiques des fumiers et lisiers bruts ont également été mesurées en triplicata au début des essais. Afin de vérifier l'impact de la température sur la décroissance des bactéries et des marqueurs génétiques, une analyse de variance a été réalisée en ajustant un modèle linéaire mixte en utilisant la fonction PROC MIXED de SAS, version 9.4. Les corrélations entre les mesures répétées (observations faites tous les 7 jours) ont été modélisées avec une structure autorégressive hétérogène d'ordre 1 (ARH(1)). Les effets fixes du modèle étaient les jours, la température, de même que l'interaction entre les jours et la température. Quand l'interaction jours*température était significative, un test de F pour chaque valeur de jours a permis d'établir si la température avait un effet. Les constantes de décroissance des populations d'*E. coli* ont été déterminées en appliquant un modèle non-linéaire aux données en utilisant la fonction PROC NLIN de SAS. Les modèles ont été réalisés par type de fumier et par température, afin de permettre la comparaison entre les conditions d'entreposage. Pour les marqueurs génétiques, aucun modèle n'a été en mesure de bien s'ajuster aux données, transformées ou non. En effet, des modèles tels de régression linéaire ou de décroissance exponentielle n'ont pas bien représenté le phénomène, les marqueurs présentant plutôt des hausses et des baisses dans le temps qui sont difficilement modélisables.

4.2 RÉSULTATS

Les sous-sections suivantes présentent les résultats selon les variables mesurées. Il est à noter que ceux-ci sont présentés en base humide, afin de faciliter la présentation des résultats et de représenter les conditions de champ pour ainsi permettre d'estimer la charge réelle d'*E. coli* et de marqueurs génétiques lors d'épandages. Pour les lecteurs intéressés, les graphiques présentés en base sèche sont disponibles à l'Annexe 9.

4.2.1 Matières sèches et masse volumique

Le taux de matières sèches mesuré dans les quatre matrices a généralement été stable durant tout l'essai, mais différent selon le type de matrice. En moyenne, le lisier de porc, le lisier de bovin, le fumier de bovin et le fumier de poulet avaient un contenu en matières sèches de 1,88, 11,05, 16,16 et 70,69 %, respectivement. Outre le lisier de porc, les matrices entreposées à 12 °C se sont légèrement humidifiées (perte de matières sèches) (Figures 2 et 3). Effectivement, le taux de matière sèches à 12 °C est statistiquement plus faible qu'à 4 °C en ce qui concerne le lisier de bovin et le lisier de porc, mais avec des différences moyennes négligeables de 0,5 et 0,06 %, respectivement. Pour le fumier et le lisier de bovin, la différence significative entre les deux températures s'accroît avec le temps, le taux de matières sèches à 12 °C devenant statistiquement différent à partir des jours 42 et 14, respectivement. Le Tableau 18 présente l'ensemble des résultats de l'analyse de variance. Les masses volumiques des deux types de lisiers étaient de 0,96 g/cm³, le fumier de bovin de 0,81 g/cm³ et le fumier de poulet de 0,30 g/cm³.

Tableau 18. Analyse de variance du taux de matières sèches (%) des quatre matrices évaluées selon la température et la durée d'entreposage.

Matrice	Effet fixe analysé	Degrés de liberté	Pr > F ¹
Lisier de bovin	Température	1	< 0.0001
	Durée d'entreposage	7	< 0.0001
	Température*Durée	7	0.0019
Fumier de bovin	Température	1	0.2622
	Durée d'entreposage	7	< 0.0001
	Température*Durée	7	0.0216
Lisier de porc	Température	1	0.0447
	Durée d'entreposage	7	0.0030
	Température*Durée	7	0.5022
Fumier de poulet	Température	1	0.2461
	Durée d'entreposage	7	0.6285
	Température*Durée	7	0.3705

¹ Les valeurs en rouge représentent une différence statistiquement significative à $p < 0.05$.

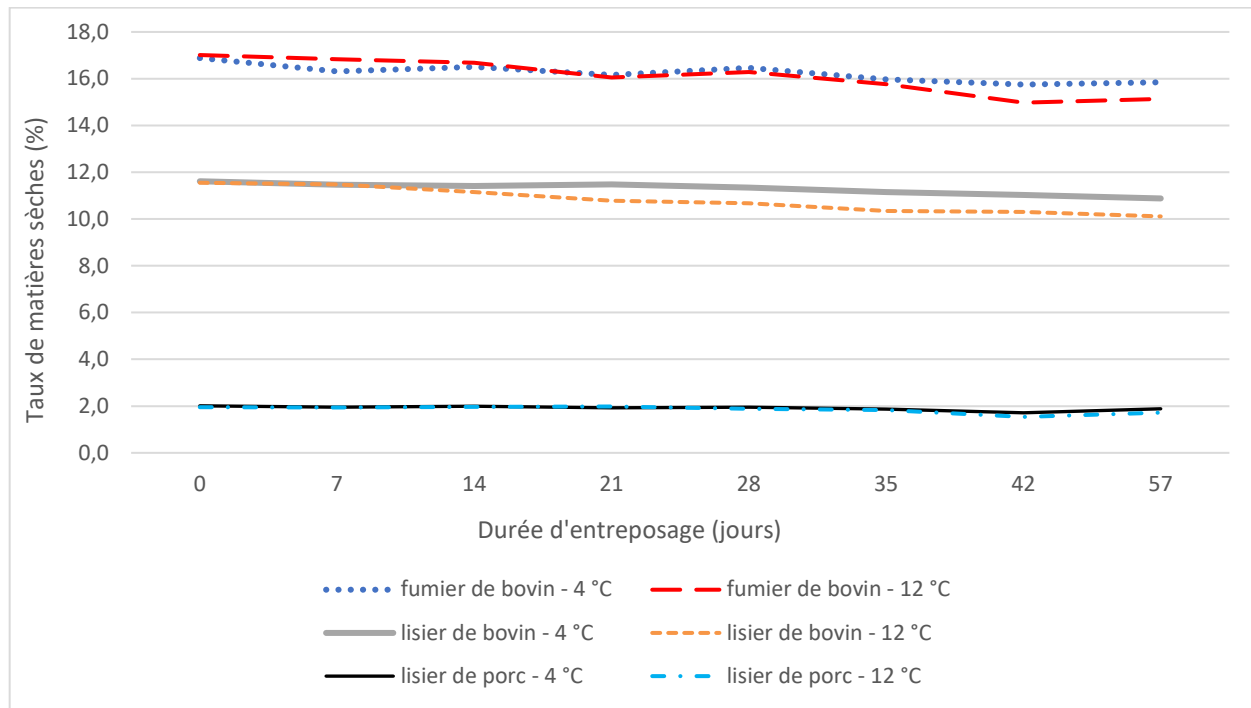


Figure 2. Teneur en matières sèches du lisier de porc, du fumier de bovin et du lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.

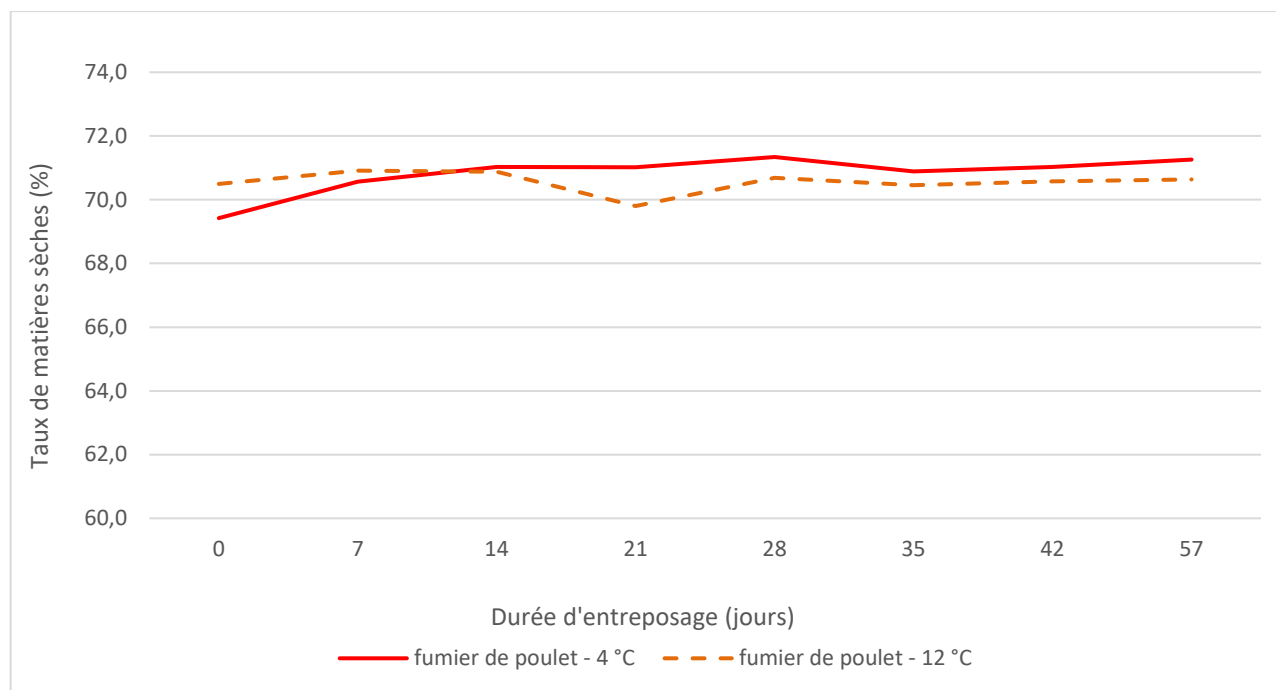


Figure 3. Teneur en matières sèches du fumier de poulet selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.

4.2.2 Populations d'*E. coli*

De façon générale, les populations d'*E. coli* ont diminué progressivement dans les quatre types d'intrants. La baisse des populations a été plus rapide à 12 °C qu'à 4 °C et ce, dans tous les cas. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce phénomène, notamment la microflore de compétition qui prolifère avec une température plus élevée, rendant moins accessibles les nutriments pour les entérobactéries peu adaptées à cet environnement. En ce qui concerne le lisier de porc, les populations ont cependant atteint des niveaux similaires après 57 jours d'entreposage, soit la limite de détection (<10 UFC/g) (Figure 4). Dans les trois autres matrices, les niveaux atteints en fin d'essai étaient moindres à 12 °C qu'à 4 °C (Figures 5 à 7). En considérant toute la durée de l'essai, les populations moyennes d'*E. coli* étaient significativement moindres à 12 °C qu'à 4 °C et ce, pour les quatre matrices. Le Tableau 19 présente l'ensemble de l'analyse de variance.

Tableau 19. Analyse de variance des populations d'*E. coli* (UFC/g_h) des quatre matrices évaluées selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.

Matrice	Effet fixe analysé	Degrés de liberté	Pr > F ¹
Lisier de bovin	Température	1	< 0.0001
	Durée d'entreposage	7	< 0.0001
	Température*Durée	7	< 0.0001
Fumier de bovin	Température	1	0.0001
	Durée d'entreposage	7	< 0.0001
	Température*Durée	7	0.0136
Lisier de porc	Température	1	< 0.0001
	Durée d'entreposage	7	< 0.0001
	Température*Durée	7	0.0002
Fumier de poulet	Température	1	0.0002
	Durée d'entreposage	7	< 0.0001
	Température*Durée	7	< 0.0001

¹ Les valeurs en rouge représentent une différence statistiquement significative à $p < 0.05$.

Mis à part le cas du lisier de bovin, la variabilité entre les répétitions s'est généralement accrue avec la durée de l'entreposage, notamment à partir du 28^e jour, avec des écarts-types qui sont plus élevés. Quelques hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce phénomène. Il est possible que certains types de microorganismes aient proliféré durant l'entreposage, rendant la lecture difficile lors du dénombrement. D'ailleurs, la présence élevée de coliformes totaux sur les géloses a été rapportée. Aussi, la présence de moisissures et de champignons supérieurs a été relevée dans le fumier de bovin et le lisier de porc au cours de l'essai. Aussi, il est intéressant de remarquer que les écarts-types sont plus élevés lorsque les niveaux d'*E. coli* sont près de la limite de détection (<10 UFC/g).

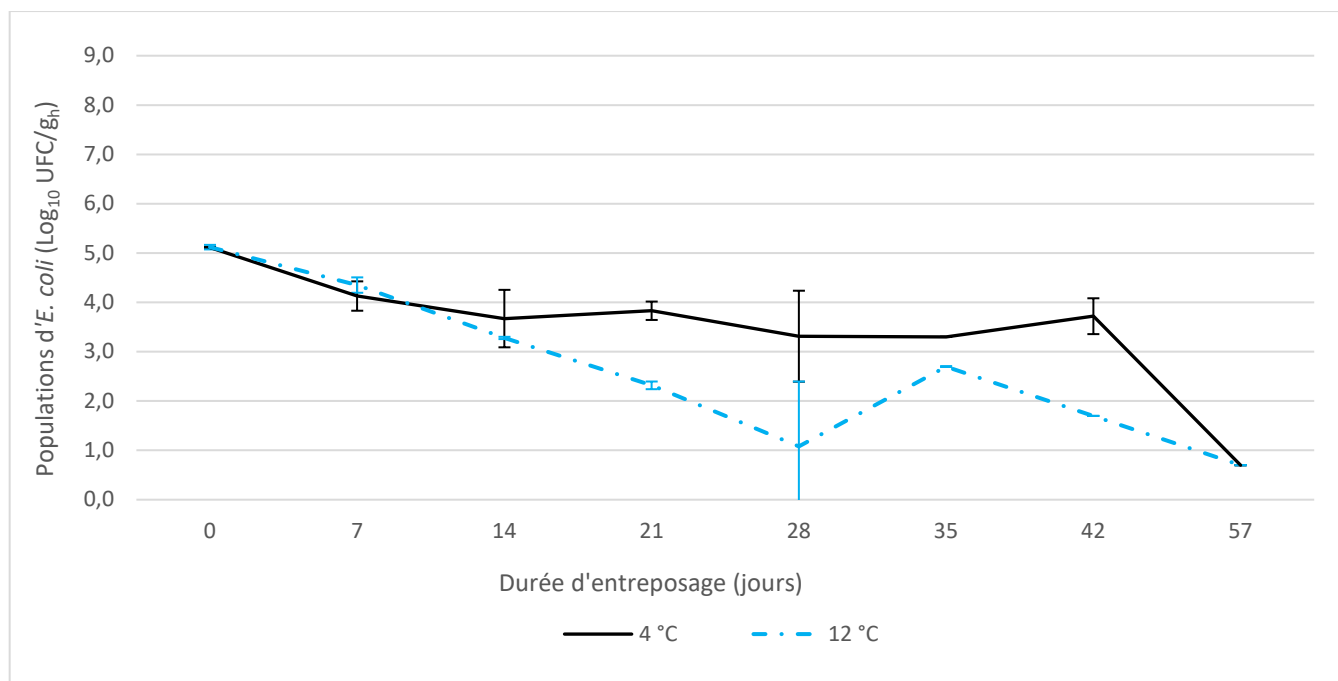


Figure 4. Populations d'*E. coli* dans le lisier de porc selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

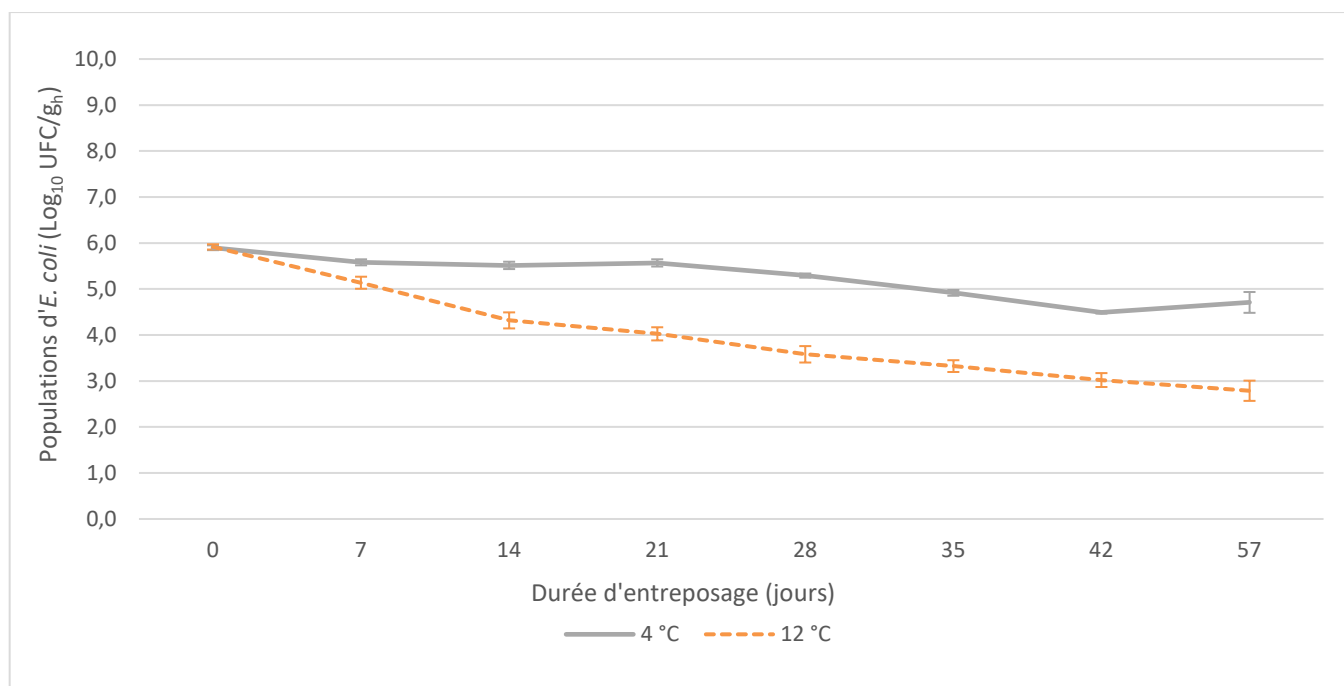


Figure 5. Populations d'*E. coli* dans le lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

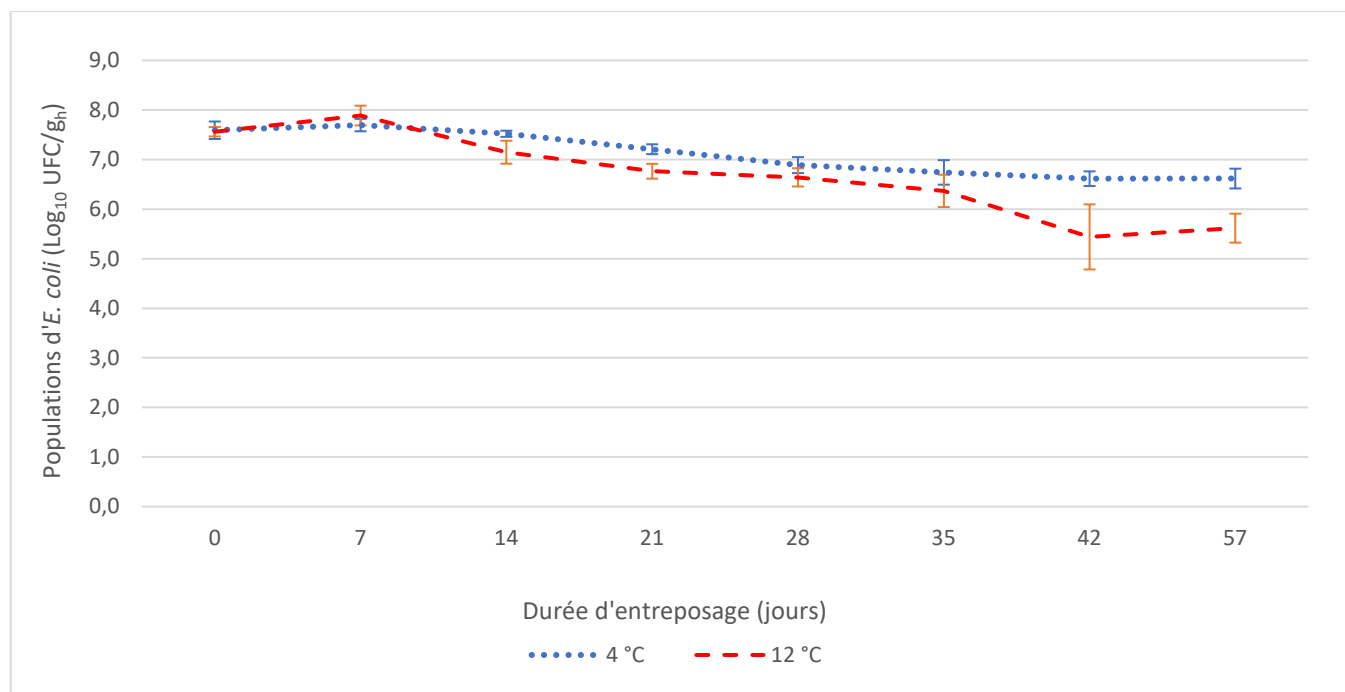


Figure 6. Populations d'*E. coli* dans le fumier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

Étant donné la présence de ripes de bois, il était attendu que les niveaux initiaux d'*E. coli* soient plutôt faibles dans le fumier de poulet, ce qui n'a pas particulièrement été le cas. Les fumiers de poulet étaient relativement frais, sortis des poulaillers depuis environ une semaine, ce qui peut expliquer les niveaux élevés en *E. coli*. En effet, les populations initiales étaient similaires à celles du lisier de porc. La sécheresse possède un pouvoir assainissant sur certains types de microorganismes, notamment ceux d'origine fécale, mises à part les salmonelles qui sont reconnues comme étant plus résistantes à la dessiccation que d'autres entérobactéries (Gruzdev *et al.*, 2011). La nature hétéroclite du fumier de poulet, par la présence de matériaux de diverses grosseurs, rend difficile l'homogénéisation de la matrice avant la pesée pour les analyses. Il s'agit encore là d'une hypothèse pouvant, entre autres, expliquer la variabilité entre les répétitions d'une même date d'analyse.

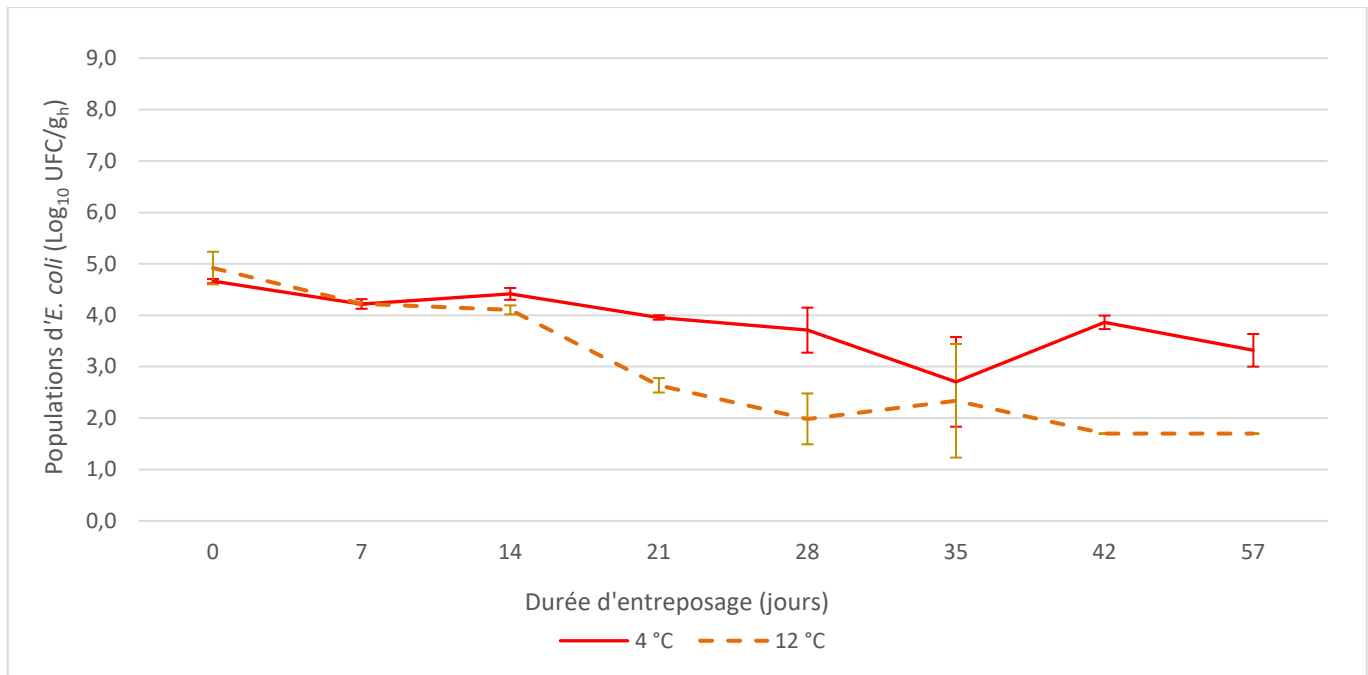


Figure 7. Populations d'*E. coli* dans le fumier de poulet selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

L'application d'un modèle de décroissance exponentielle aux données a permis d'établir des constantes de décroissance selon la température. Il est important de noter que malgré que les populations moyennes d'*E. coli* aient été statistiquement différentes lors de l'analyse de variance, ceci ne signifie pas que les constantes de décroissance le sont aussi. Les valeurs obtenues permettent de donner une idée de la tendance observée entre les matrices.

Le modèle élaboré se veut donc une décroissance exponentielle suivant l'équation suivante :

$$N_t = N_0 * 10^{-k * \text{temps}}$$

où

N_0 : populations initiales en UFC/g

N_t : populations au temps t en UFC/g

k : constante de décroissance

t : durée d'entreposage en jours

Le Tableau 20 présente les constantes de décroissance selon la matrice et la température d'entreposage. Les valeurs négatives renseignent bien sur la décroissance des populations. De plus, l'effet de la température sur la constante de décroissance semble moins important pour le fumier de bovin et le lisier de porc, comparativement au fumier de poulet et au lisier de bovin.

Tableau 20. Constantes de décroissance des populations d'*E. coli* selon le type de fumier et la température.

Matrice	Température (°C)	Constante de décroissance k	Intervalle de confiance à 95 %
Lisier de bovin	4	-0.0230	[-0.0268 ; -0.0192]
	12	-0.1098	[-0.1424 ; -0.0772]
Fumier de bovin	4	-0.0198	[-0.0323 ; -0.0073]
	12	-0.0250	[-0.0396 ; -0.0105]
Lisier de porc	4	-0.1234	[-0.1497 ; -0.0971]
	12	-0.1095	[-0.1297 ; -0.0894]
Fumier de poulet	4	-0.0283	[-0.0508 ; -0.0058]
	12	-0.0992	[-0.1590 ; -0.0395]

4.2.3 Marqueurs génétiques

Lisier et fumier de bovin

Les niveaux de marqueurs universels BacGen dans le fumier et le lisier de bovin étaient semblables en début d'essai, et se sont relativement maintenus durant l'entreposage et ce, peu importe la température (Figure 8). Il est intéressant de noter que les quantités du marqueur spécifique BacR étaient également similaires à BacGen en début d'essai, suggérant le fait que la majorité des marqueurs présents dans les échantillons provenaient de ruminants. La décroissance de ces deux marqueurs a différé selon la température, diminuant de façon plus importante à 12 °C qu'à 4 °C (Figures 9 et 10). La variabilité entre les réplicats a cependant augmenté à chaque semaine, à mesure de l'entreposage.

Dans ces deux matrices, seule l'interaction Température*Durée dans le lisier de bovin n'a pas été statistiquement significative ($P=0.1339$), tous les autres paramètres étant significativement différents ($P<0.05$). La quantité de BacGen, BacBov1 et BacR étaient effectivement significativement moindres à 12 °C qu'à 4 °C et ce, en moyenne sur tout l'essai. Pour les températures prises séparément, les quantités mesurées à chaque date étaient également significativement différentes. Les marqueurs Pig-1-Bac et HumM2 n'ont pas été quantifiés dans les échantillons puisqu'ils étaient sous la limite de détection de la méthode qPCR. Le marqueur poulet a, pour sa part, été quantifié au-delà de 35 C_q dans tous les cas.

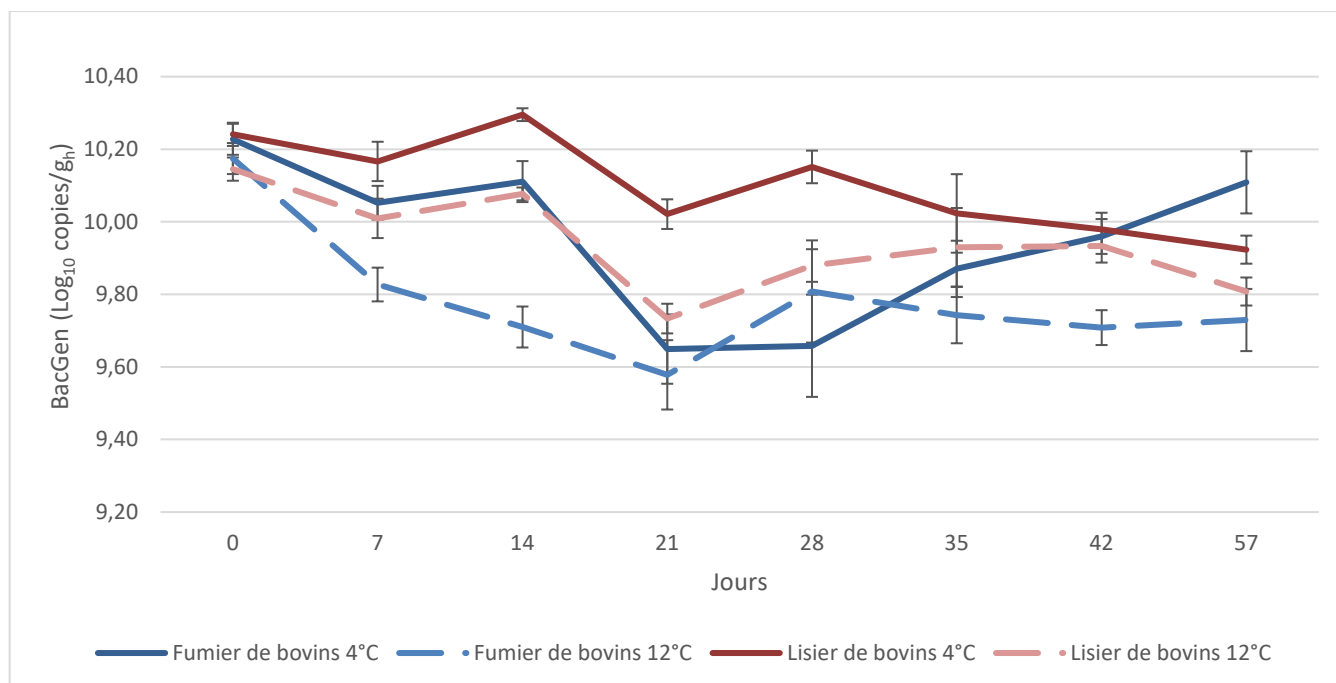


Figure 8. Marqueurs universels BacGen quantifiés dans le fumier et le lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur-type du modèle statistique.

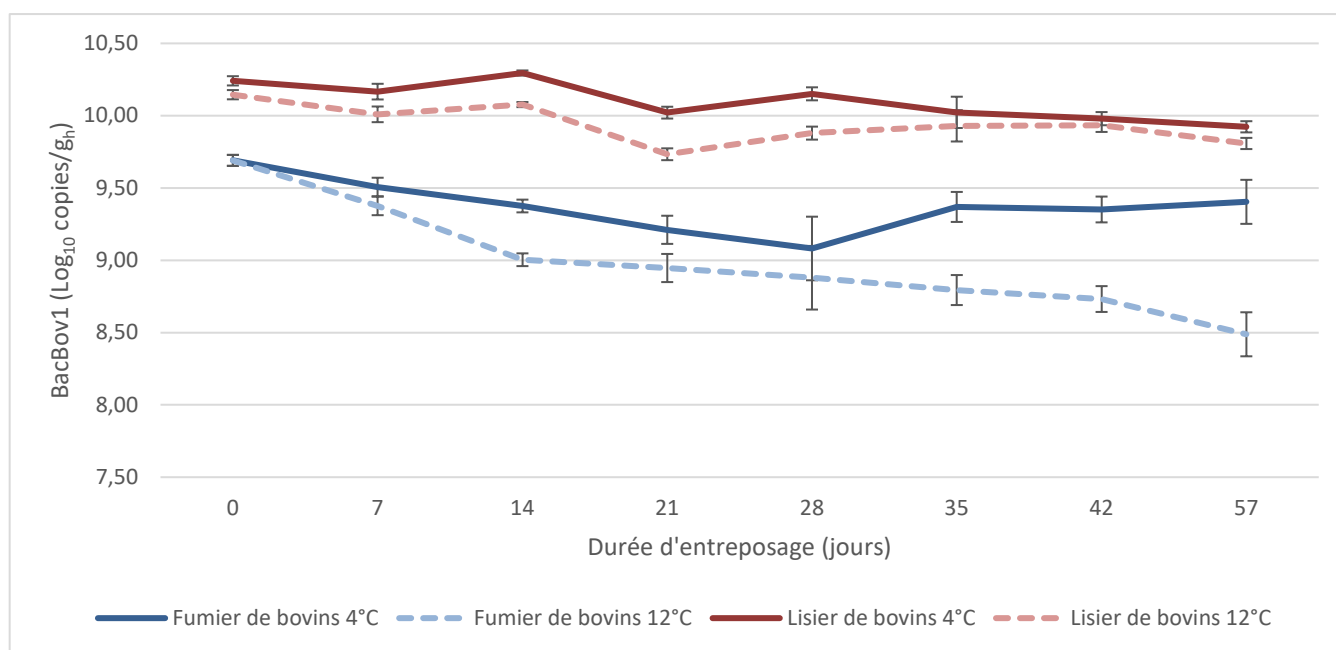


Figure 9. Marqueurs bovins BacBov1 quantifiés dans le fumier et le lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur-type du modèle statistique.

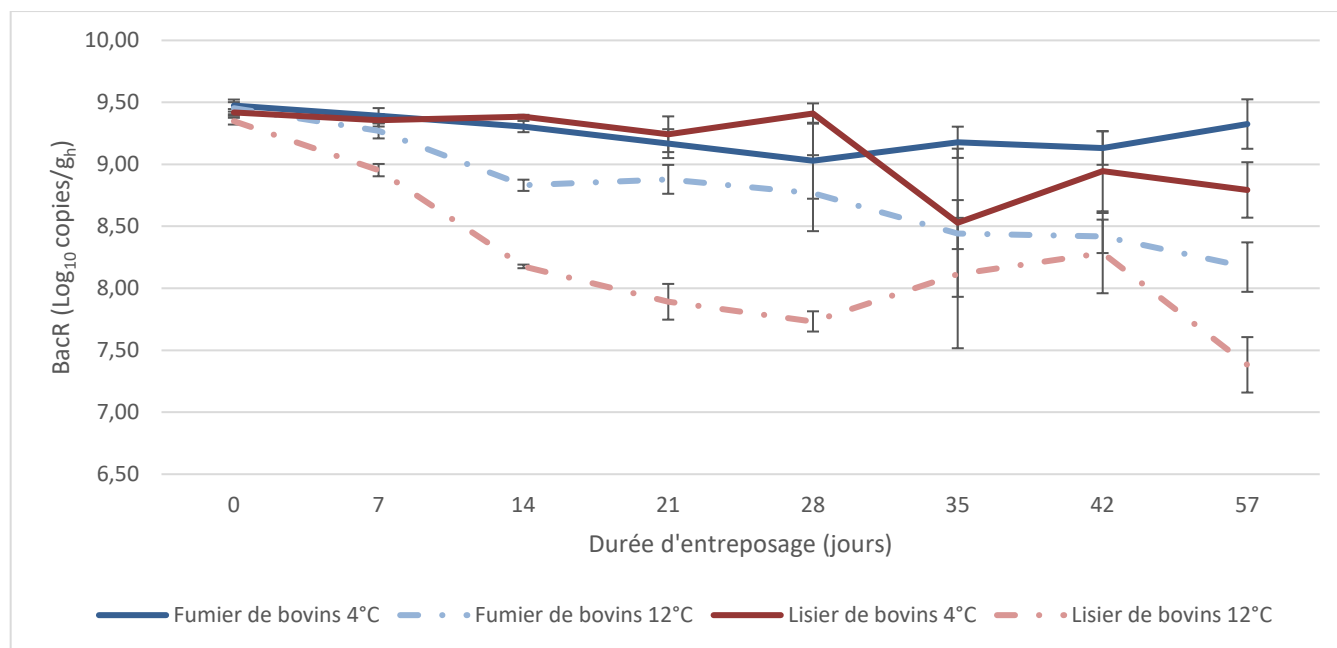


Figure 10. Marqueurs ruminants BacR quantifiés dans le fumier et le lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur-type du modèle statistique.

Les Figures 11 et 12 présentent la séquence dans le temps des ratios mesurés entre les marqueurs spécifiques et le marqueur général selon la température. Les ratios ont varié de 0,02 à 2,04, rappelant ainsi l'aspect semi-quantitatif de la méthode qPCR pouvant mener jusqu'à un écart de mesure acceptable de $\pm 0,7 \text{ Log}_{10} \text{ copies } / \mu\text{l}$ d'ADN. À l'aide de ces figures, il est possible de visualiser que les marqueurs spécifiques ont diminué de façon plus importante dans le temps comparativement aux marqueurs universels. De plus, il est possible de constater qu'à 12 °C, les ratios BacR/BacGen diminuent de façon plus importante que BacBov/BacGen. Aussi, en supposant que tous les marqueurs universels présents dans ces matrices sont d'origine bovine, il est possible de constater au début de l'entreposage que le marqueur BacR représente une proportion plus grande de toutes les *Bacteroidales* ($\geq 134 \%$) comparativement à BacBov1 ($\leq 29 \%$). À 4 °C, les ratios demeurent semblables dans le temps, suggérant la persistance de tous les marqueurs à cette température.

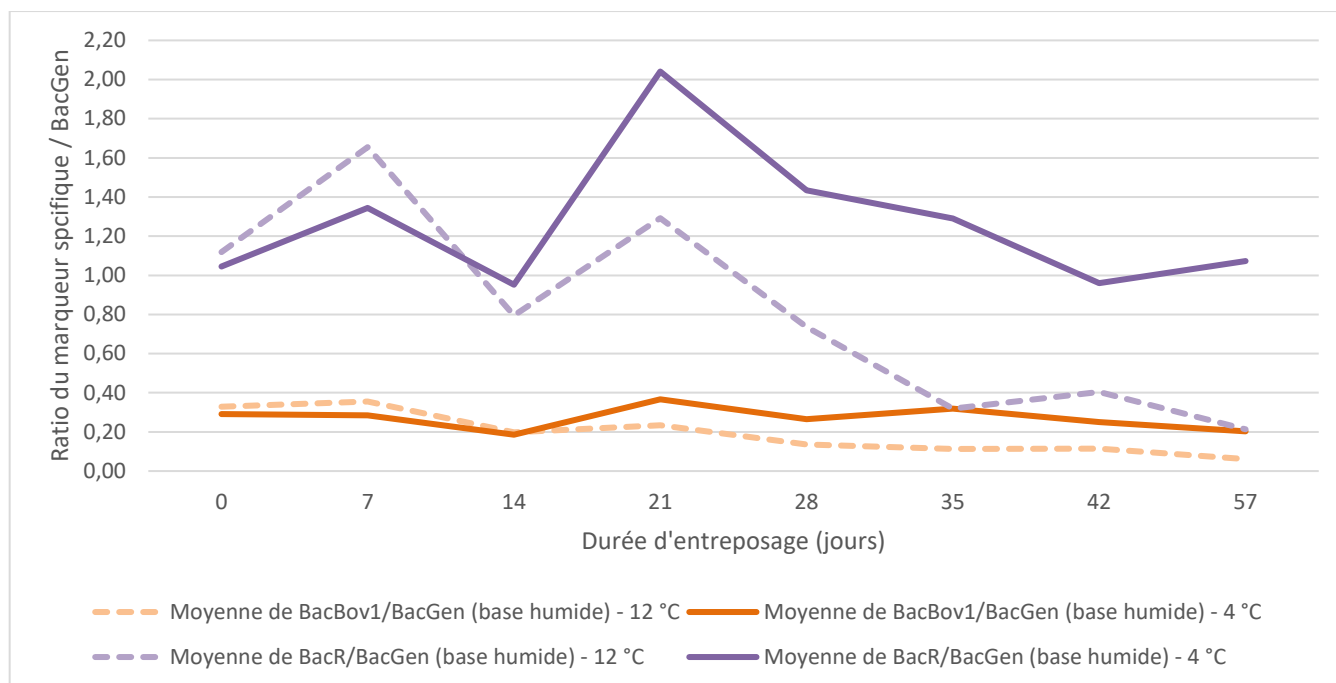


Figure 11. Ratios entre les quantités de marqueurs spécifiques et les marqueurs universels mesurés dans le fumier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.

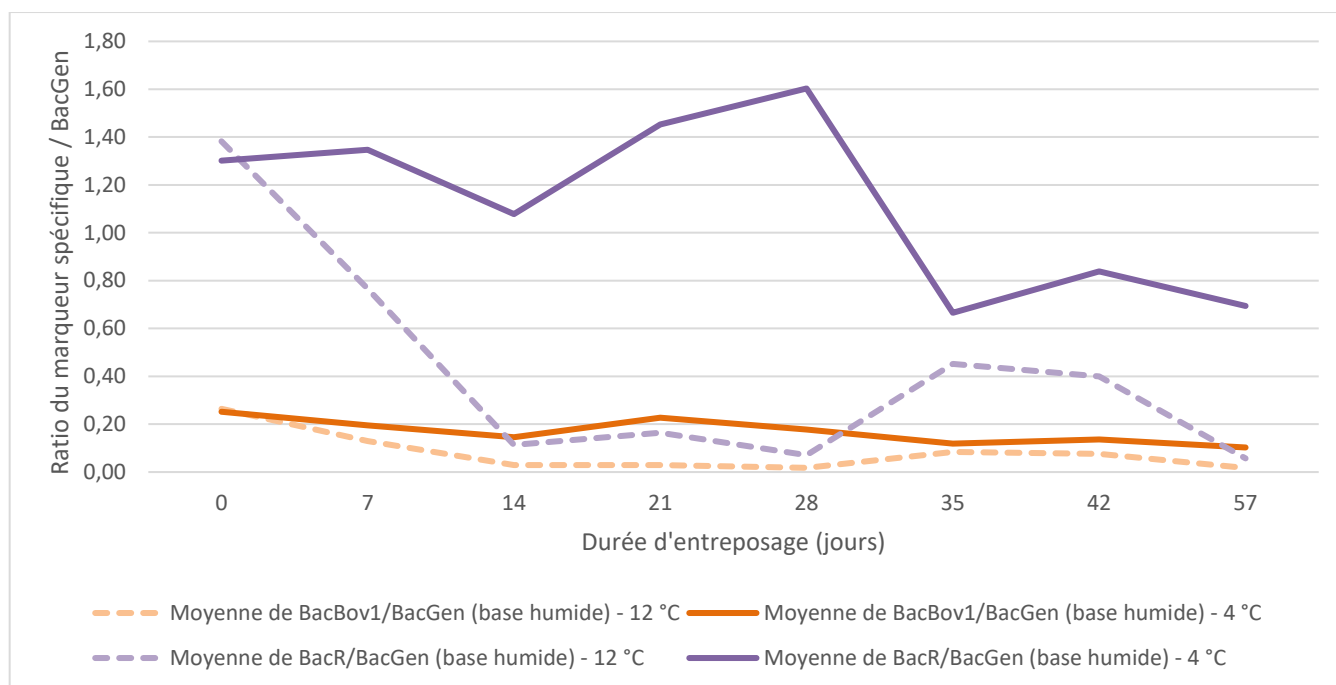


Figure 12. Ratios entre les quantités de marqueurs spécifiques et les marqueurs universels mesurés dans le lisier de bovin selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.

Lisier de porc

À l'instar des fumiers et lisiers de bovin, les quantités de marqueurs universels BacGen se sont relativement maintenues durant tout l'essai dans le lisier de porc (Figure 13). La différence entre les quantités mesurées en moyennes aux deux températures n'était effectivement pas statistiquement significative (Tableau 21). Aux deux températures confondues, la différence entre les dates a cependant été significative, sans toutefois suivre une décroissance dans le temps.

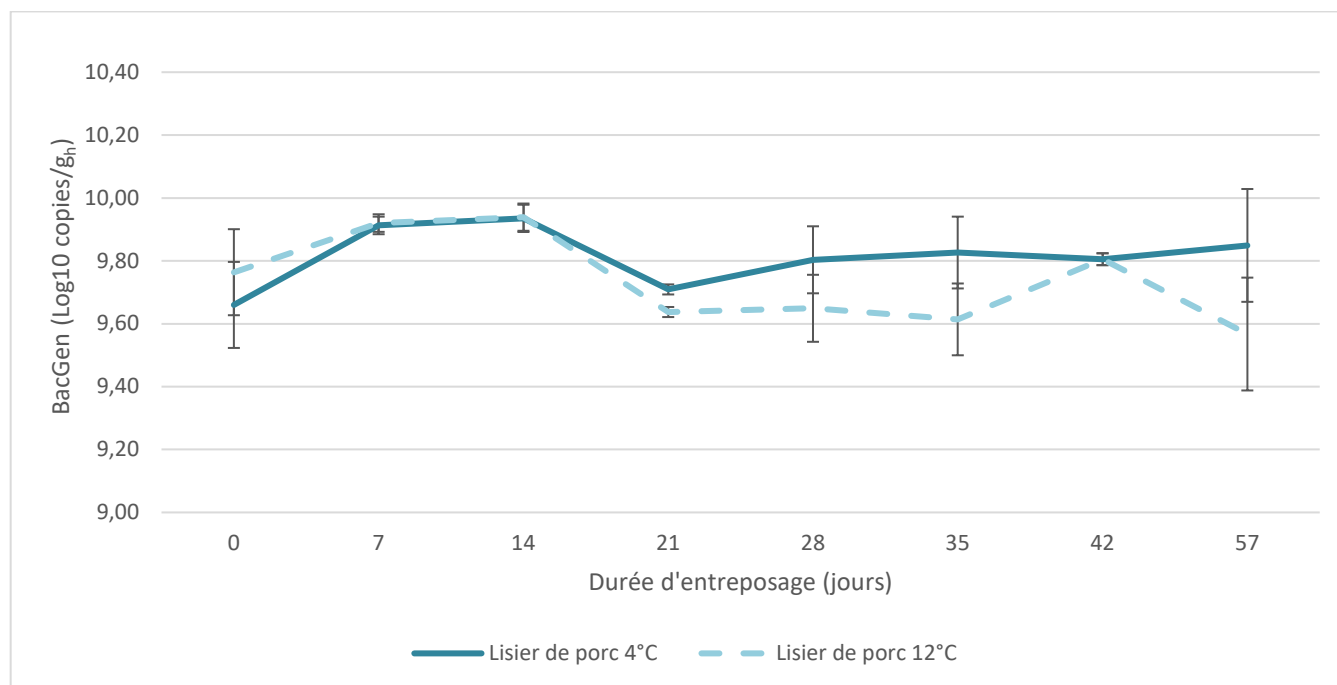


Figure 13. Marqueurs universels BacGen quantifiés dans le lisier de porc selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur-type du modèle statistique.

Le marqueur spécifique Pig-1-bac a présenté la même tendance que les marqueurs spécifiques bovins et ruminants, c'est-à-dire que la décroissance a été plus importante à 12 °C qu'à 4 °C (Figure 14), différence qui a été statistiquement significative. L'analyse de variance a aussi démontré que la différence entre les dates était significative pour les deux températures confondues et qu'à partir du jour 14, la différence entre les températures était toujours statistiquement significative (Tableau 21). Il est intéressant de noter que dans cette matrice, les ratios entre le marqueur Pig-1-Bac et le marqueur général BacGen étaient beaucoup plus faibles durant toute la durée de l'entreposage que ceux mesurés dans les matrices d'origine bovine avec les marqueurs BacBov1 et BacR (Figure 15). Ceci peut avoir une incidence importante sur l'interprétation des résultats dans un échantillon environnemental par exemple.

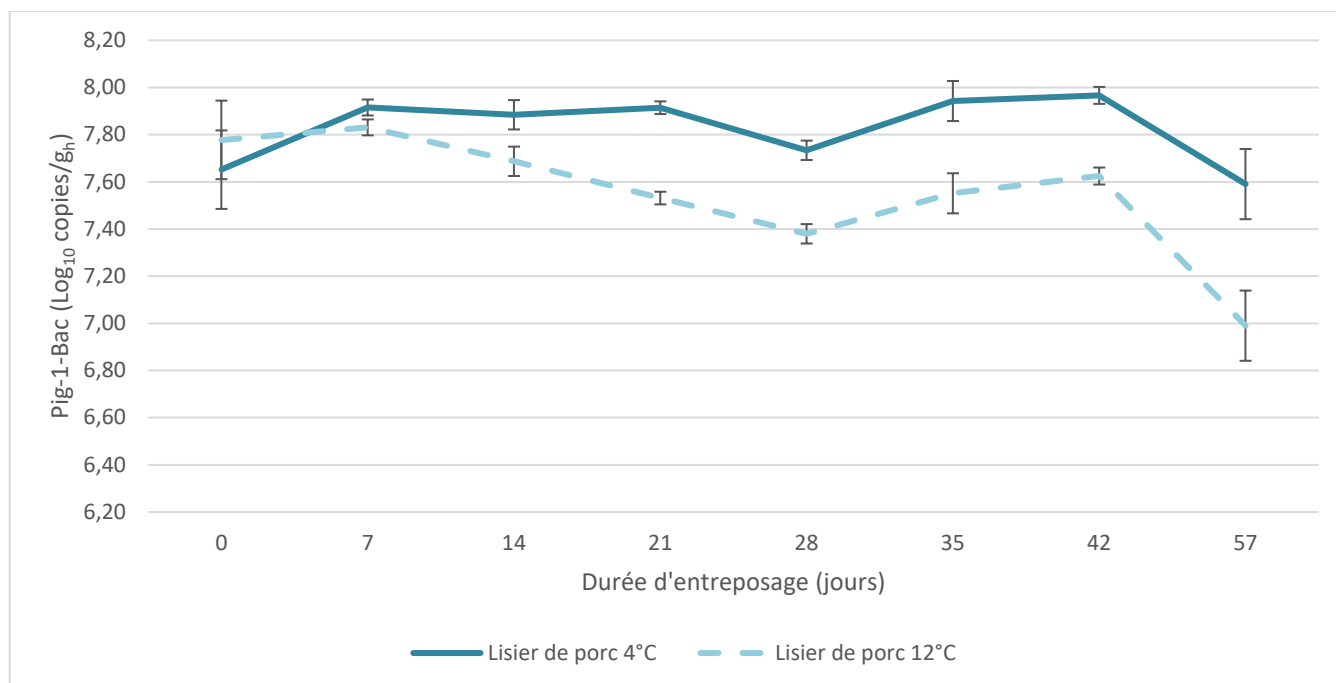


Figure 14. Marqueurs porcins Pig-1-Bac quantifiés dans le lisier de porc selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur-type du modèle statistique.

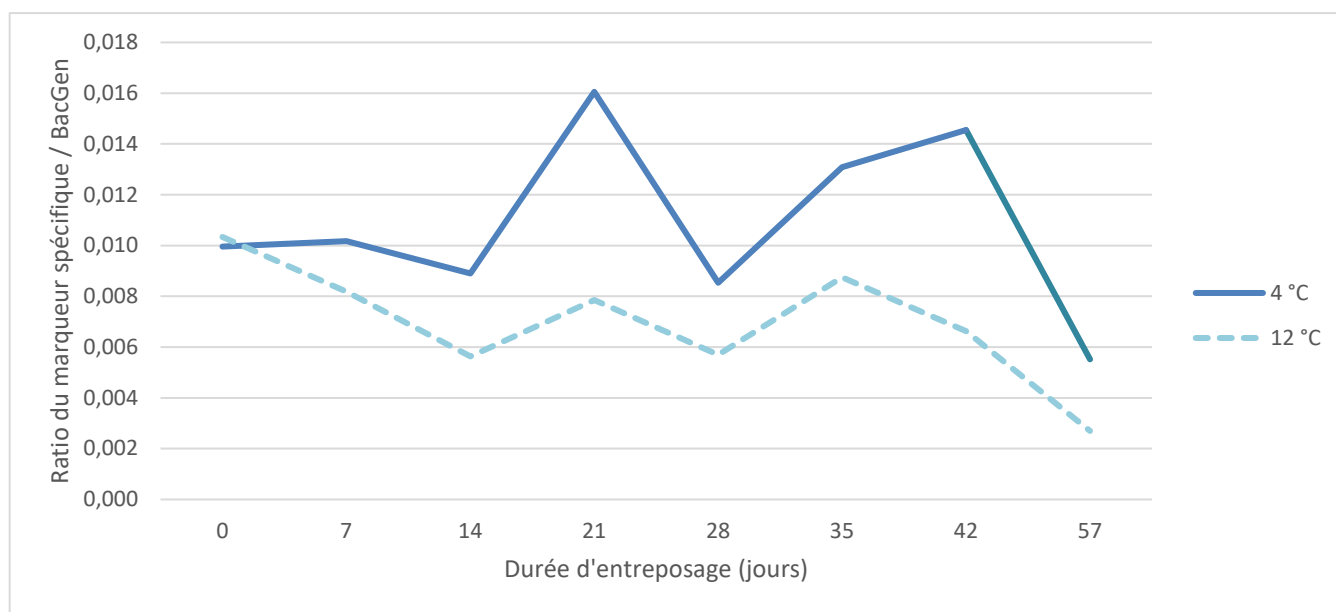


Figure 15. Ratios entre les quantités de marqueurs spécifiques et les marqueurs universels mesurés dans le lisier de porc selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.

Tableau 21. Analyse de variance de la quantité de marqueurs (Log_{10} nb copies/ g_h) dans le lisier de porc selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.

Marqueur	Effet fixe analysé	Degrés de liberté	Pr > F ¹
BacGen	Température	1	0.1433
	Durée d'entreposage	7	0.0008
	Température*Durée	7	0.3790
Pig-1-Bac	Température	1	0.0001
	Durée d'entreposage	7	0.0031
	Température*Durée	7	0.0489

¹ Les valeurs en rouge représentent une différence statistiquement significative à $p < 0.05$.

Le marqueur BacBov1 a été quantifié dans les échantillons de lisier de porc à des valeurs de C_q variant entre 32 et 34. Les marqueurs HumM2 et Chicken/Duck-Bac n'ont pas été quantifiés dans les échantillons, le premier étant sous la limite de détection et le second ne présentant pas de phase exponentielle ni une valeur de C_q inférieure à 35.

Fumier de poulet

À l'instar de ce qui avait été remarqué dans la mise au point de la méthode, seul le marqueur universel BacGen a été quantifié dans les échantillons entreposés de fumier de poulet, avec des niveaux plus faibles que les autres intrants et une variabilité très élevée entre les réplicats (Figure 15). La nature hétérogène de la matrice, tel que présenté pour les populations d'*E. coli*, peut expliquer ces résultats. Malgré cela, les comptes étaient plutôt stables dans le temps. Seule la durée de l'entreposage a eu un effet significatif sur la quantité de marqueurs BacGen quantifiés (Tableau 22). Ainsi, pour les deux températures confondues, la différence entre les dates était significative, sans toutefois présenter de hausse ou de baisse dans le temps.

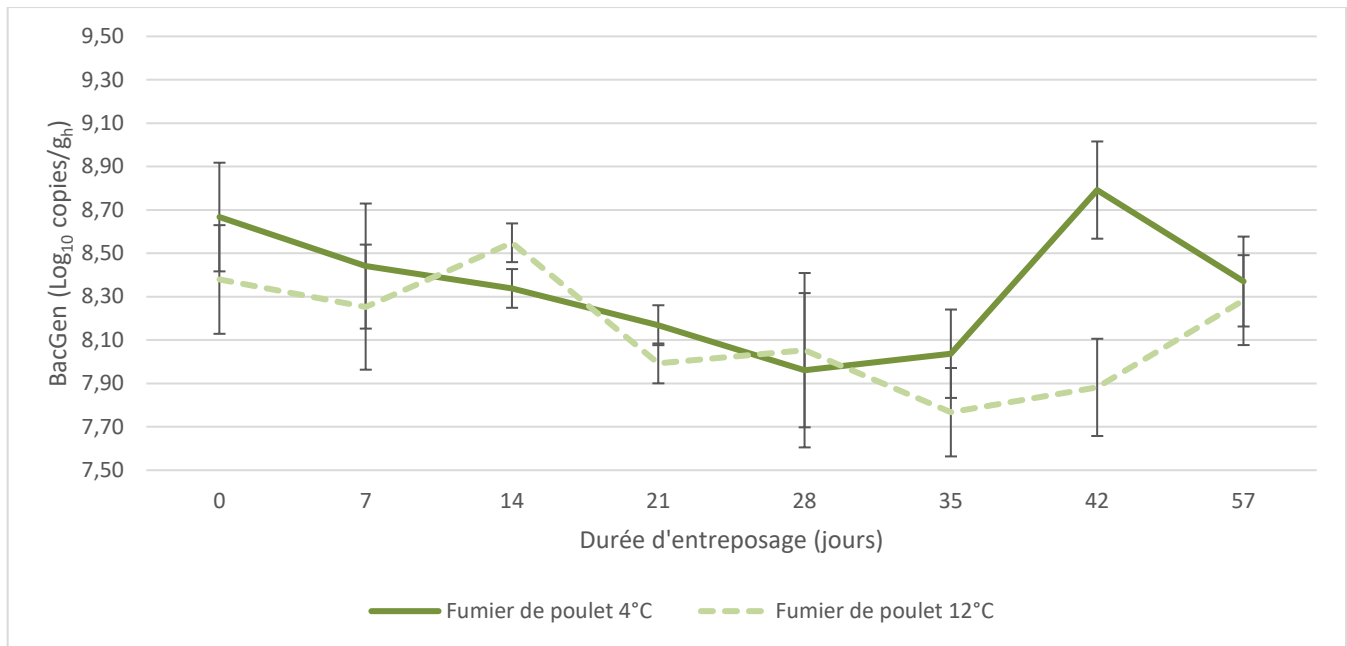


Figure 16. Marqueurs universels BacGen quantifiés dans le fumier de poulet selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur-type du modèle statistique.

Tableau 22. Analyse de variance du marqueur BacGen (Log₁₀ nb copies/g_h) dans le fumier de poulet selon la température et la durée d'entreposage en pots en conditions contrôlées.

Marqueur	Effet fixe analysé	Degrés de liberté	Pr > F ¹
BacGen	Température	1	0.1791
	Durée d'entreposage	7	0.0255
	Température*Durée	7	0.1307

¹ Les valeurs en rouge représentent une différence statistiquement significative à $p < 0.05$.

Les marqueurs HumM2, Pig-1-Bac, BacBov1 et BacR étaient sous la limite de détection. Le marqueur Chicken/Duck-Bac n'a pas présenté les conditions permettant de valider les résultats d'amplification qPCR, soit la phase exponentielle et une valeur de C_q inférieure à 35, bien que ce marqueur ait été détecté dans les échantillons.

4.2.4 Bilan

Les essais d'entreposage de quatre types de fumiers ont permis de constater l'impact de la température sur le devenir des bactéries *E. coli* et des marqueurs génétiques. Pour *E. coli*, les populations moyennes mesurées à 12 °C étaient, dans tous les cas, significativement plus faibles qu'à 4 °C. Les populations bactériennes ont suivi une décroissance exponentielle, avec des constantes variables entre les matrices et les températures. L'ensemble des constantes de décroissance sont résumées au Tableau 23.

En général, les marqueurs spécifiques ont été plus influencés par la température que les marqueurs universels, les premiers étant toujours significativement moindres à 12 qu'à 4 °C. En effet, les marqueurs universels ont été mesurés à des niveaux similaires dans le lisier de porc et le fumier de poulet, alors que les quantités moyennes étaient plus faibles à 12 qu'à 4 °C dans les matrices provenant du bovin. Aucun modèle de décroissance ou de régression n'a pu s'appliquer aux données de marqueurs génétiques, que celles-ci soient transformées ou non, empêchant la détermination d'une constante de décroissance. Cependant, les moyennes des concentrations en marqueurs ont été résumées dans le Tableau 24 au début et à la fin de l'entreposage. La diminution la plus importante se remarque dans le lisier et fumier de bovin. En effet, le marqueur Chicken/Duck-Bac n'est plus détecté à la fin de l'entreposage, renforçant l'idée que le marqueur amplifie dans fragments non spécifiques dans ces matrices.

Tableau 23. Constantes de décroissance (k) et intervalles de confiance à 95 % des *E. coli* définies par type de matrice selon la température d'entreposage.

Matrice	Température d'entreposage	
	4 °C	12 °C
Lisier de porc	-0.1234 [-0.1497 ; -0.0971]	-0.1095 [-0.1297 ; -0.0894]
Fumier de bovin	-0.0198 [-0.0323 ; -0.0073]	-0.0250 [-0.0396 ; -0.0105]
Lisier de bovin	-0.0230 [-0.0268 ; -0.0192]	-0.1098 [-0.1424 ; -0.0772]
Fumier de poulet	-0.0283 [-0.0508 ; -0.0058]	-0.0992 [-0.1590 ; -0.0395]

Tableau 24. Comparaison entre les concentrations des marqueurs au début et à la fin de l'entreposage par type de matrice selon la température d'entreposage.

Matrice	Durée d'entreposage	Temp.	BacGen	BacBov1	BacR	Pig-1-Bac	HumM2	CDB*
	(jours)	(°C)	Moyenne copies/g _h					
Fumier de bovin	0	4	1,70 x 10 ¹⁰	4,94 x 10 ⁹	3,01 x 10 ⁹	<LOD	<LOD	1,27 x 10 ⁴
		12	1,51 x 10 ¹⁰	4,95 x 10 ⁹	2,88 x 10 ⁹	<LOD	<LOD	2,54 x 10 ⁴
	57	4	1,29 x 10 ¹⁰	2,66 x 10 ⁹	2,22 x 10 ⁹	<LOD	<LOD	<LOD
		12	5,66 x 10 ⁹	3,84 x 10 ⁸	2,17 x 10 ⁸	<LOD	<LOD	<LOD
Fumier de poulet	0	4	5,05 x 10 ⁸	<LOD**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
		12	4,03 x 10 ⁸	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	57	4	3,43 x 10 ⁸	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
		12	2,01 x 10 ⁸	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
lisier de bovin	0	4	1,75 x 10 ¹⁰	4,37 x 10 ⁹	2,62 x 10 ⁹	<LOD	<LOD	9,49 x 10 ⁴
		12	1,41 x 10 ¹⁰	3,70 x 10 ⁹	2,25 x 10 ⁹	<LOD	<LOD	8,36 x 10 ⁴
	57	4	8,40 x 10 ⁹	8,61 x 10 ⁸	6,35 x 10 ⁸	<LOD	<LOD	<LOD
		12	6,51 x 10 ⁹	1,26 x 10 ⁸	4,31 x 10 ⁷	<LOD	<LOD	<LOD
lisier de porc	0	4	5,24 x 10 ⁹	1,89 x 10 ⁶	<LOD	5,47 x 10 ⁷	<LOD	3,22 x 10 ⁵
		12	6,09 x 10 ⁹	2,24 x 10 ⁶	<LOD	6,27 x 10 ⁷	<LOD	3,80 x 10 ⁵
	57	4	7,07 x 10 ⁹	3,29 x 10 ⁶	<LOD	3,90 x 10 ⁷	<LOD	2,10 x 10 ⁵
		12	4,84 x 10 ⁹	1,06 x 10 ⁶	<LOD	1,18 x 10 ⁷	<LOD	1,23 x 10 ⁵

*CDB = Chicken/Duck-Bac

**Non détecté puisque sous la limite de détection (LOD) de la méthode qPCR.

5 CONTRIBUTIONS RELATIVES DES SOURCES DE CONTAMINATION FÉCALE DE L'EAU

Dans le cadre de ce projet, il est pertinent de connaître l'impact des différentes sources de contamination fécale de l'eau sur la présence des marqueurs génétiques d'intérêt. En effet, les contributions relatives des marqueurs pourraient varier en fonction de l'origine et de la composition de l'eau. Cette partie du projet consiste ainsi à déterminer ces contributions relatives en quantifiant les populations d'*E. coli* et les six marqueurs dans différents échantillons d'eau contaminés volontairement dans des conditions contrôlées. Du lisier de porc, du lisier de bovin, du lisier de poule et de l'eau usée non-traitée (brute) ont été utilisés comme intrants pour la contamination des échantillons d'eau de surface et de puits.

5.1 MÉTHODOLOGIE

Cinq échantillons différents d'eau souterraine et de surface ont été prélevés avec des bouteilles stériles de quatre litres (total de 10 échantillons d'eau). Les échantillons d'eau de surface ont été prélevés à partir de la berge de quatre cours d'eau de la Montérégie, soit le fleuve St-Laurent à Longueuil, la rivière Yamaska à St-Césaire et à St-Hyacinthe, le ruisseau des Aulnages à St-Dominique, ainsi qu'un ruisseau non identifié de St-Bruno-de-Montarville. Les échantillons d'eau souterraine provenaient de puits privés et ont été prélevés au robinet des résidences correspondantes après avoir laissé couler l'eau durant trois minutes.

Pour la contamination de l'eau, des échantillons de lisier de porc à l'engraissement, lisier de bovin laitier en stabulation libre et lisier de poules pondeuses sans ripe ont été prélevés dans des fermes différentes de façon aseptique, dans des bouteilles stériles de 1 litre. De plus, 4 litres d'eau usée non-traitée ont été prélevés dans une station d'épuration en Montérégie. Les échantillons ont été conservés entre 2 et 8 °C jusqu'aux analyses pendant maximum 72 h. La méthode détaillée utilisée pour l'évaluation des contributions relatives dans l'eau est décrite à l'annexe 10. Les variables mesurées étaient les populations des bactéries *E. coli* ainsi que la concentration des six marqueurs à l'étude. Les taux en matières sèches ainsi que la masse volumique ont aussi été déterminés dans les lisiers.

Les populations en *E. coli* ont été déterminées dans tous les échantillons d'eau selon une méthode de filtration sur membrane utilisant le milieu de culture mFC-BCIG décrite à l'Annexe 11. Le dénombrement des *E. coli* dans les lisiers a été réalisé selon la méthode utilisant les Pétrifilms™ décrite à l'Annexe 8.

Afin de viser une contamination fécale qui peut être rencontrée dans des échantillons d'eau environnementaux, la contamination a été faite à partir des populations mesurées d'*E. coli* dans les intrants. De ce fait, la contamination par les intrants a été réalisée en visant une concentration finale dans l'eau de 4 000 UFC/100 ml dans des proportions équivalentes de chaque intrant. Une fois la contamination effectuée, les échantillons d'eau de puits et de surface ont été divisés en trois réplicats faisant un total de 30 unités expérimentales (10 échantillons x 3 rep).

L'ADN génomique total des échantillons de lisier a été extrait à partir du kit d'extraction *Fast DNA SPIN Kit for Feces™* en combinaison avec le système FastPrep® de la compagnie MP Biomedicals (protocole détaillé à l'Annexe 3). L'ADN contenu dans les échantillons d'eau a été extrait à l'aide du kit d'extraction *Fast DNA SPIN Kit for Soil™* en combinaison avec le système FastPrep® de la compagnie MP Biomedicals (protocole détaillé à l'Annexe 4). Ensuite, la concentration des marqueurs BacGen, HumM2, BacR, BacBov-1, Pig-1-Bac et ChickenDuck-Bac a été déterminée en suivant le protocole détaillé à l'Annexe 6. La limite de détection de chaque marqueur dans les échantillons d'eau a été déterminée en considérant la limite de détection de la méthode qPCR décrite dans les sections précédentes du rapport et en rapportant le résultat dans un volume d'eau de 100 ml.

Les résultats obtenus ont été, entre autres, présentés en contributions relatives de chaque marqueur spécifique par rapport à la somme des autres marqueurs spécifiques analysés de chaque espèce pour laquelle un marqueur est disponible. Le taux de recouvrement des bactéries et des marqueurs a aussi été déterminé (mesure après contamination / mesure attendue x 100).

5.2 RÉSULTATS

La présentation des résultats a été réalisée comme suit :

1. Détermination des matières sèches et masses volumiques d'échantillons de lisier
2. Populations des bactéries *E. coli*
3. Concentrations et contributions relatives des marqueurs génétiques à l'étude
4. Taux de recouvrements

5.2.1 Matières sèches et masse volumique

Le taux de matières sèches mesuré dans le lisier de porc, bovin et poules était respectivement de 4,52 %, 15,97 % et 27,37 %. La masse volumique du lisier de porc était de $1,02 \pm 0,01$ g/ml tandis que celle du lisier de bovin et de poule était de $1,06 \pm 0,01$ g/ml.

5.2.2 Populations de bactéries *E. coli*

Intrants : Lisiers et eau usée non traitée

Les populations en *E. coli* déterminées dans les intrants sont résumées dans le Tableau 25. Les populations étaient plus élevées dans les lisiers de poule et de bovin, mais il y en avait davantage dans le lisier de poule. Les populations les plus faibles ont été associées aux eaux usées non traitées (1 190 909 UFC/100 ml ou 11 909 UFC/g_h).

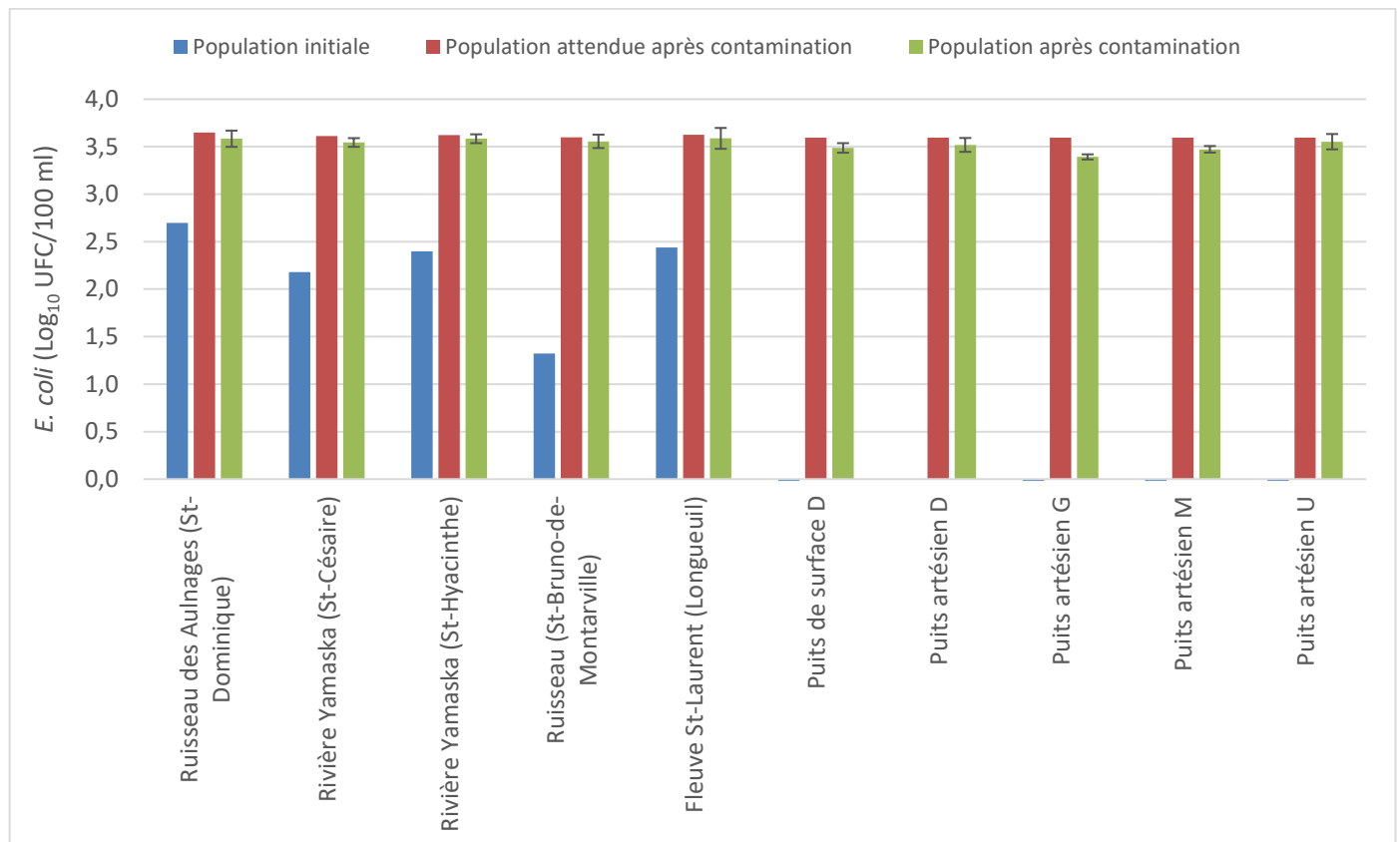
Tableau 25. Population d'*E. coli* dans les intrants.

Type d'échantillon	Type d'élevage	UFC/g _h	UFC/g _s
Lisier de porc	Porcs à l'engraissement	23 000	508 875
Lisier de bovin	Bovins laitiers en stabulation libre	490 000	3 067 761
Lisier de poules	Poules pondeuses sans ripe	52 000 000	190 000 000
Eaux usées non traitées	N/A*	11 909	N/A

*Non applicable

Eau de puits et de surface

Les échantillons d'eau de surface contenaient des populations en *E. coli* entre 1,3 et 2,7 Log₁₀ UFC/100 ml (bandes bleues de la Figure 17). Les bactéries *E. coli* n'ont pas été détectées dans les échantillons d'eau de puits. Les résultats des populations obtenues dans les intrants ainsi que dans l'eau avant la contamination ont permis de calculer une population théorique attendue en bactéries après la contamination qui s'élevait à 3,6 Log₁₀ UFC/100 ml (bandes rouges) (voir détails annexe 12). Enfin, les bactéries retrouvées après la contamination étaient entre 3,4 et 3,6 Log₁₀ UFC/100 ml (bandes vertes).

**Figure 17. Population de bactéries *E. coli* dans les échantillons d'eau.**

5.2.3 Marqueurs génétiques dans les intrants

La concentration et la pureté de l'ADN dans les intrants sont présentées au Tableau 26. L'échantillon de lisier de poule avait une concentration d'ADN beaucoup plus faible que les autres intrants. La pureté des extraits d'ADN était dans l'intervalle acceptable de 1,7 et 2,0 (ratio 260/280). Afin de réduire l'interférence des inhibiteurs avec la réaction qPCR dans les intrants, les extraits d'ADN des lisiers ont été dilués 100 fois avec de l'eau stérile (grade biologie moléculaire) tandis que celui de l'eau usée non traitée a été dilué 10 fois. Les concentrations obtenues en marqueur BacGen indiquent qu'il y avait davantage de *Bacteroidales* dans les échantillons de lisier de porc et de bovin que dans le lisier de poule et les eaux usées (Figure 18). Les concentrations obtenues des marqueurs BacBov1 ($3,69 \times 10^9$ copies/g_h) et BacR ($2,17 \times 10^9$ copies/g_h) dans le lisier de bovin sont assez près de celles de BacGen ($1,14 \times 10^{10}$ copies/g_h). En fait, 48,7 % de l'ADN détecté par BacGen dans le lisier de bovin proviendrait de *Bacteroidales* d'origine inconnue et/ou d'autres espèces non détectées par les cinq marqueurs spécifiques à l'étude (Tableau 27). Il y avait davantage d'ADN de *Bacteroidales* non ciblé par les marqueurs spécifiques dans le lisier de porc (98,0 %), le lisier de poules (97,3 %) et les eaux usées (98,7 %).

Tableau 26. Concentration et pureté de l'ADN dans les intrants.

Type d'échantillon	Type d'élevage	Concentration d'ADN (ng/μl)	Pureté (260/280)
Lisier de porc	Porcs à l'engraissement	145,60	1,95
Lisier de bovin	Bovins laitiers en stabulation libre	127,60	1,955
Lisier de poule	Poules pondeuses sans ripe	30,75	1,825
Eaux usées non traitées	N/A*	168,65	1,895

*Non applicable

Le marqueur BacBov1 a été détecté dans tous les intrants à des concentrations de plus de $6,06 \times 10^5$ copies/g_h ($5,78 \log_{10}$ copies/g_h) (Figure 18). Cependant, le marqueur avait une concentration beaucoup plus élevée dans le lisier de bovin ($9,57 \log_{10}$ copies/g_h) que dans les autres intrants, représentant une contribution relative de 100 % (Figure 19). Les marqueurs Pig-1-Bac, HumM2 et BacR démontrent une bonne spécificité puisqu'ils ont été détectés uniquement dans les échantillons associés à l'hôte recherché. En ne considérant pas le marqueur BacBov1 dans les graphiques sectoriels, il est possible de remarquer cette spécificité à la Figure 20 et au Tableau 27. Des marqueurs *Bacteroidales* associés au poulet ont été détectés dans l'eau usée, mais ce n'est pas impossible de retrouver des matières fécales d'animaux dans ce type d'échantillon, le système d'égout municipal étudié étant mixte, c'est-à-dire qu'il combine les eaux usées sanitaires et pluviales. Le marqueur Chicken/Duck-Bac a aussi été détecté dans les lisiers de porc et de bovin à des concentrations plus faibles que dans le lisier de poule. Tel que rapporté dans les sections précédentes, ce marqueur n'est pas absolument spécifique au poulet et au dindon. D'autres étapes de mise au point sont envisagées et seront discutées lors du prochain livrable déposé au début de 2022. Cependant, les proportions du marqueur Chicken/Duck-Bac détecté dans les intrants de lisier de porc, bovin et eaux usées sont faibles et sa contribution ne serait probablement pas importante par rapport aux marqueurs spécifiques associés à la matrice (Ex. BacR vs Chicken/Duck-Bac dans le lisier de bovin).

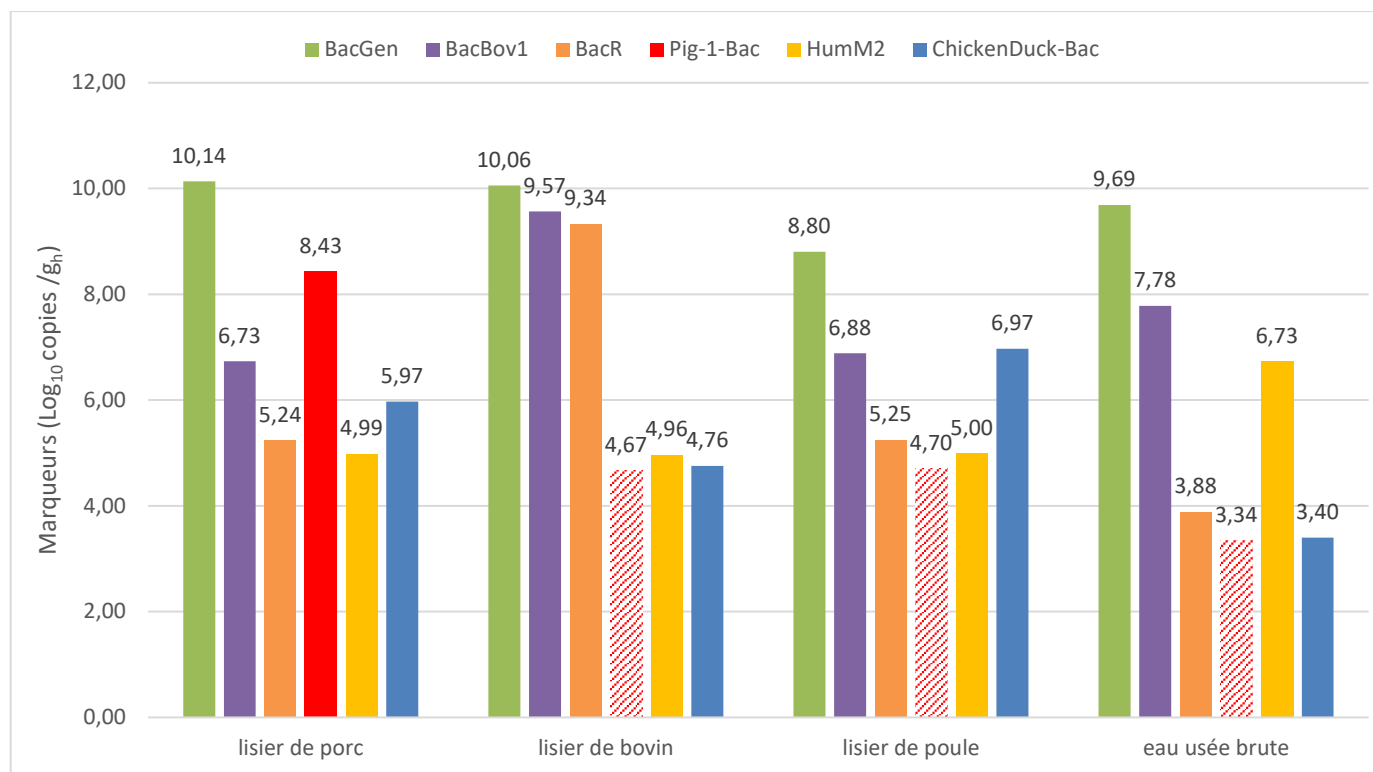


Figure 18. Concentration des marqueurs dans les intrants. Les bandes hachurées correspondent à la valeur de la limite de détection. Ces bandes doivent être interprétées comme étant sous la limite de détection avec la méthode qPCR.

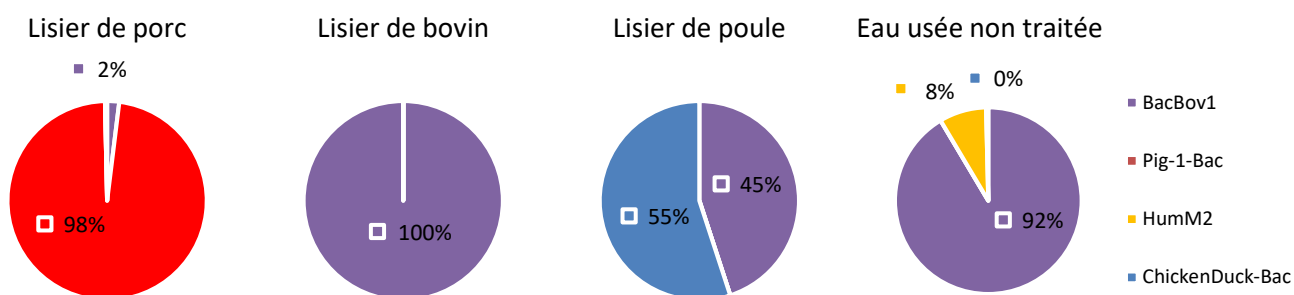


Figure 19. Contribution relative des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans les intrants en ne considérant pas BacR et BacGen.

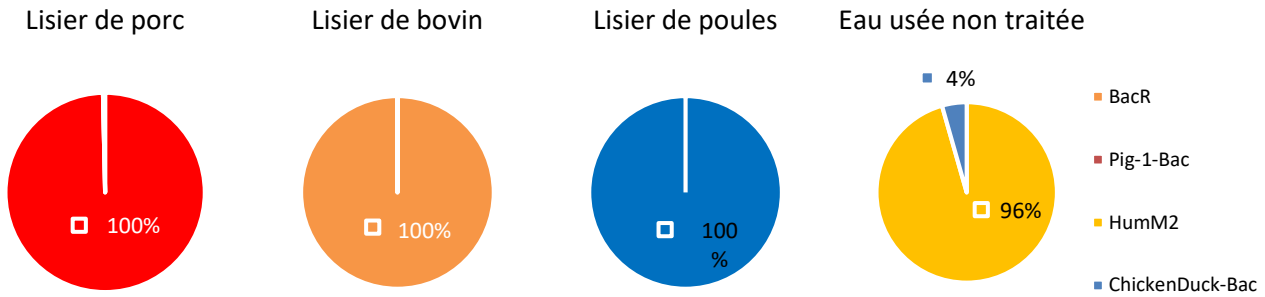


Figure 20. Contribution relative des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans les intrants en ne considérant pas BacBov1 et BacGen.

Tableau 27. Contribution relative des marqueurs spécifiques par rapport au marqueur général BacGen dans les intrants.

Type d'échantillon	%					
	BacR /BacGen	BacBov1 /BacGen	Pig-1-Bac /BacGen	HumM2 /BacGen	Chicken/Duck-Bac /BacGen	Autres <i>Bacteroidales</i> non ciblés par les marqueurs spécifiques
Lisier de porc	0,00	0,04	1,98	0,00	0,01	97,98
Lisier de bovin	19,04	32,37	0,00	0,00	0,00	48,60
Lisier de poule	0,00	1,20	0,00	0,00	1,47	97,33
Eau usée non traitée	0,00	1,24	0,00	0,11	0,01	98,65

5.2.4 Marqueurs génétiques dans les échantillons d'eau

Limites de détection

Les concentrations d'ADN des échantillons d'eau de puits contaminés par les intrants ont varié entre 33,50 et 57,00 ng/μl avec une pureté (260/280) se situant entre 1,88 et 2,055. Les concentrations d'ADN des échantillons d'eau de surface étaient plus élevées et se situaient entre 57,85 et 135,05 ng/μl avec une pureté de 1,74 à 2,06. Tous les marqueurs ont pu être quantifiés dans les échantillons d'eau sans diluer les extraits d'ADN. Les limites de détection des marqueurs sont présentées en fonction du volume filtré de l'échantillon utilisé pour l'extraction d'ADN (Tableau 28). Les limites de détection les plus basses sont associées aux marqueurs BacGen et Chicken/Duck-Bac tandis qu'elles sont environ 6 fois plus élevées avec BacR et BacBov1. La limite de détection du marqueur par réaction qPCR ainsi que le volume d'eau filtré pour l'extraction d'ADN influencent grandement cette limite dans l'eau (nombre de copies/100 ml).

Tableau 28. Limites de détection des marqueurs dans les échantillons d'eau contaminés.

Site de l'échantillon d'eau	Moyenne copies/100 ml \pm écart-type					
	BacGen	BacR	BacBov1	Pig-1-Bac	HumM2	Chicken/Duck-Bac
Ruisseau des Aulnages (St-Dominique)	41 \pm 4	251 \pm 25	248 \pm 25	72 \pm 7	141 \pm 14	50 \pm 5
Rivière Yamaska (St-Césaire)	45 \pm 0	275 \pm 0	272 \pm 0	79 \pm 0	155 \pm 0	54 \pm 0
Rivière Yamaska (St-Hyacinthe)	51 \pm 5	314 \pm 29	311 \pm 28	90 \pm 8	177 \pm 16	62 \pm 6
Ruisseau (St-Bruno-de-Montarville)	56 \pm 0	344 \pm 0	340 \pm 0	99 \pm 0	194 \pm 0	68 \pm 0
Fleuve St-Laurent (Longueuil)	41 \pm 6	254 \pm 39	251 \pm 39	73 \pm 11	143 \pm 22	50 \pm 8
Puits de surface D	45 \pm 0	275 \pm 0	272 \pm 0	79 \pm 0	155 \pm 0	54 \pm 0
Puits artésien D	37 \pm 0	229 \pm 0	227 \pm 0	66 \pm 0	129 \pm 0	45 \pm 0
Puits artésien G	32 \pm 0	197 \pm 0	194 \pm 0	56 \pm 0	111 \pm 0	39 \pm 0
Puits artésien M	32 \pm 0	197 \pm 0	194 \pm 0	56 \pm 0	111 \pm 0	39 \pm 0
Puits artésien U	34 \pm 3	207 \pm 19	205 \pm 19	59 \pm 5	117 \pm 11	41 \pm 4

Concentrations théoriques attendues des marqueurs

Les concentrations théoriques attendues en marqueurs génétiques dans les échantillons d'eau ont été calculées en fonction des concentrations obtenues dans l'eau avant la contamination et celles ajoutées par les intrants (Tableau 29) (voir détails annexe 12). Les concentrations attendues en HumM2 et en Chicken/Duck-Bac dans l'eau après la contamination par les intrants étaient plus faibles ($\times 10^4$) que les autres marqueurs ($> \times 10^6$).

Tableau 29. Concentrations attendues des marqueurs dans les échantillons d'eau contaminés.

Site de l'échantillon d'eau	Copies/100 ml					
	BacGen	BacR	BacBov1	Pig-1-Bac	HumM2	Chicken/Duck-Bac
Ruisseau des Aulnages (St-Dominique)	$5,81 \times 10^8$	$4,33 \times 10^6$	$7,67 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,54 \times 10^4$	$3,79 \times 10^4$
Rivière Yamaska (St-Césaire)	$5,77 \times 10^8$	$4,33 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,54 \times 10^4$	$3,79 \times 10^4$
Rivière Yamaska (St-Hyacinthe)	$5,83 \times 10^8$	$4,33 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,54 \times 10^4$	$3,79 \times 10^4$
Ruisseau (St-Bruno-de-Montarville)	$5,76 \times 10^8$	$4,33 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,54 \times 10^4$	$3,79 \times 10^4$
Fleuve St-Laurent (Longueuil)	$5,77 \times 10^8$	$4,33 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,54 \times 10^4$	$3,79 \times 10^4$
Puits de surface D	$5,74 \times 10^8$	$4,33 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,54 \times 10^4$	$3,79 \times 10^4$
Puits artésien D	$5,74 \times 10^8$	$4,33 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,54 \times 10^4$	$3,79 \times 10^4$
Puits artésien G	$5,74 \times 10^8$	$4,33 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,54 \times 10^4$	$3,79 \times 10^4$
Puits artésien M	$5,74 \times 10^8$	$4,33 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,54 \times 10^4$	$3,79 \times 10^4$
Puits artésien U	$5,74 \times 10^8$	$4,33 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,54 \times 10^4$	$3,79 \times 10^4$

Concentration des marqueurs dans l'eau contaminée

Les marqueurs ciblant l'ADN de *Bacteroidales* humains et poulets dans les échantillons d'eau de surface ont montré des concentrations beaucoup plus faibles que les autres marqueurs (Figures 21 et 22). Les concentrations du marqueur HumM2 variaient entre 0 et 2,19 Log₁₀ copies/100 ml dans les eaux de surface tandis qu'elles ont moins varié dans les échantillons d'eau de puits (2,69 à 2,96 Log₁₀ copies/100 ml). Les concentrations du marqueur Chicken/Duck-Bac ont aussi varié davantage dans les eaux de surface (0,00 à 4,14 Log₁₀ copies/100 ml) que dans les eaux de puits (3,75 à 3,87 Log₁₀ copies/100 ml). Les marqueurs BacGen, BacBov1 et Pig-1-Bac ont tous obtenu des concentrations dans la même valeur logarithmique que celles théoriquement attendues.

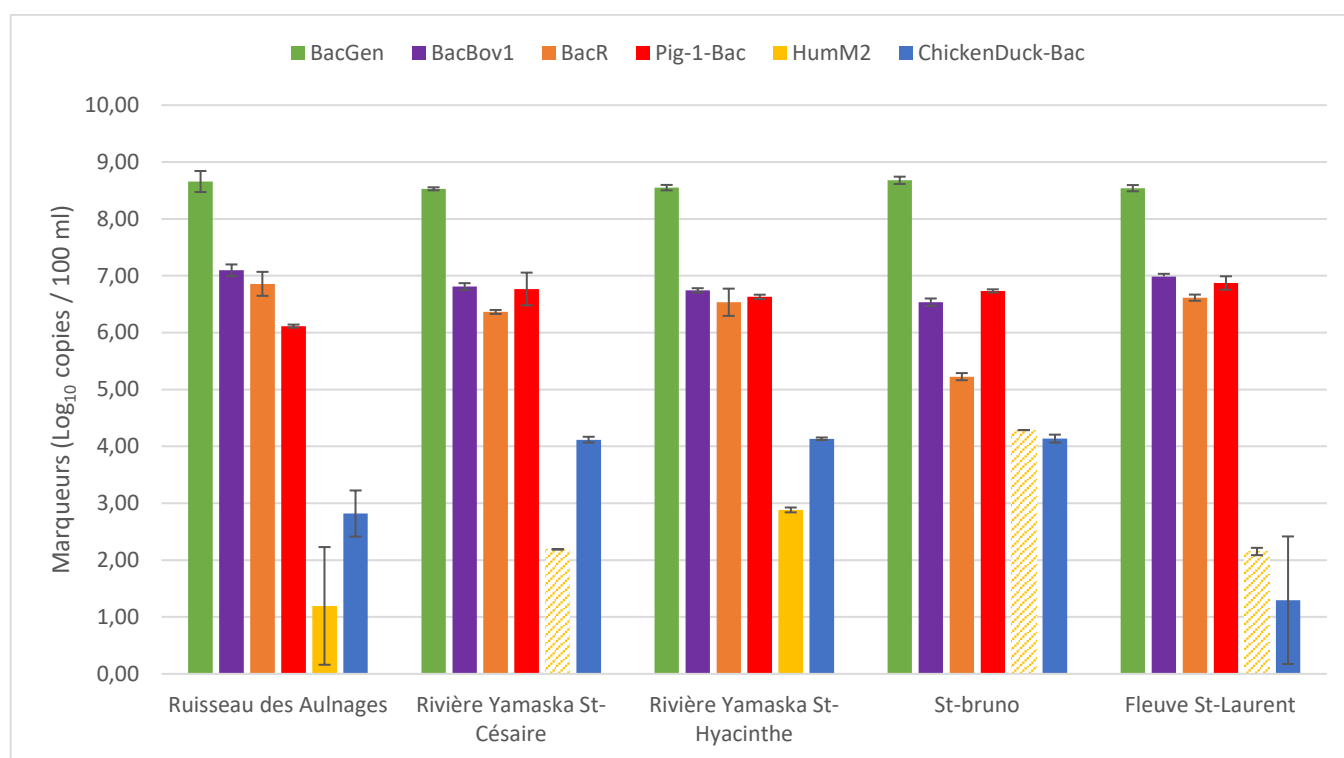


Figure 21. Concentration des marqueurs dans l'eau de surface après la contamination par les intrants. Les bandes hachurées correspondent à la valeur de la limite de détection. Ces bandes doivent être interprétées comme étant sous la limite de détection de la méthode qPCR. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des 3 répétitions.

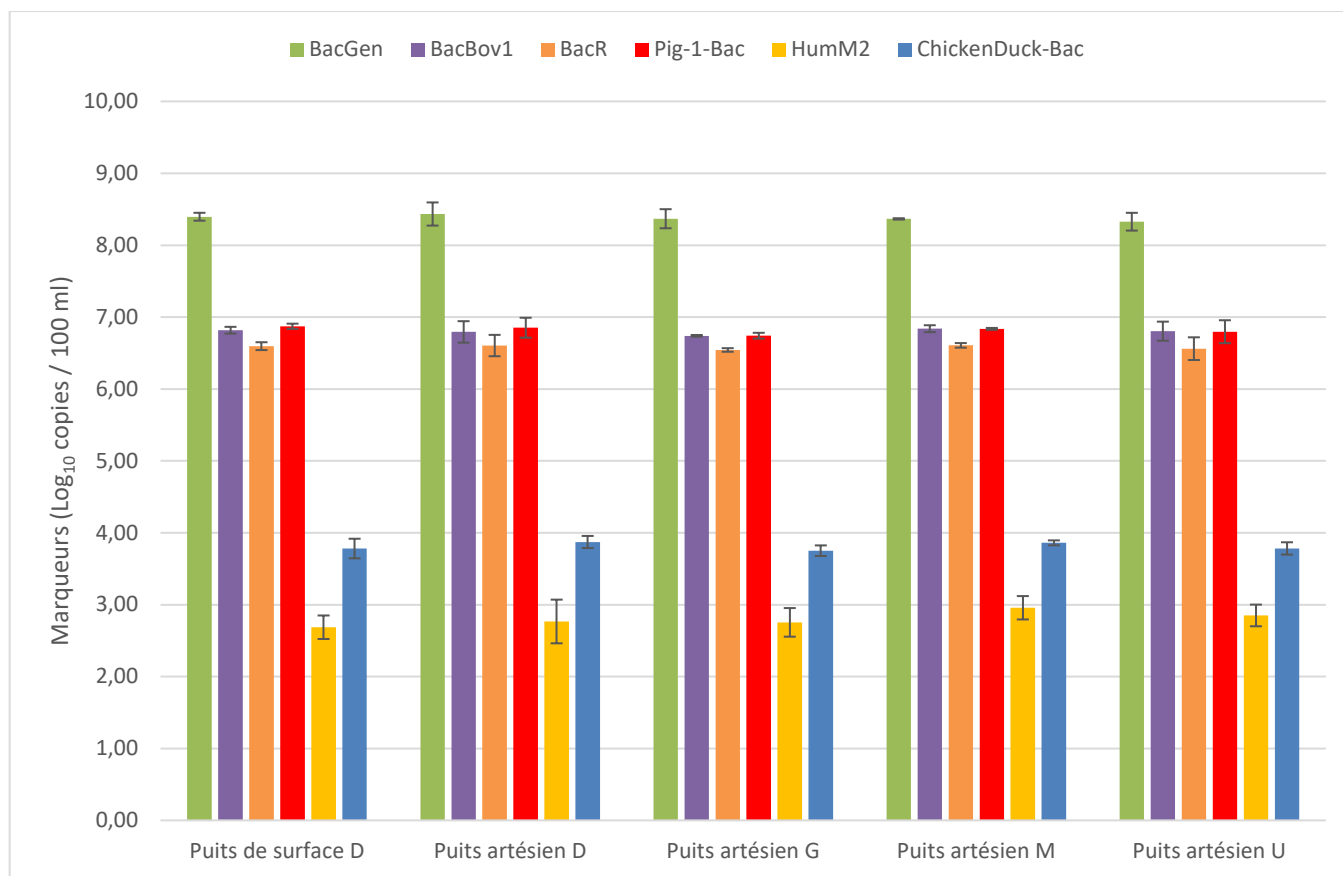


Figure 22. Concentration des marqueurs dans l'eau de puits après la contamination par les intrants. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des 3 répétitions.

D'après les quantités de marqueurs ajoutés aux échantillons d'eau par les intrants (voir détails annexe 12), les graphiques sectoriels devraient, en théorie, donner des parts équivalentes à 59 % de Pig-1-Bac et 45 % de BacBov1. Si BacR est considéré au lieu de BacBov1 dans les graphiques, les parts devraient être de 71 % de Pig-1-Bac et 29 % de BacR. Les graphiques sectoriels montrent cependant que ces parts sont très variables en fonction de l'échantillon d'eau de surface (Figures 23 et 24). Le fait que ce soit seulement Pig-1-Bac et BacBov1 ou BacR qui soient représentés s'explique par les faibles concentrations ajoutées et retrouvées des autres marqueurs spécifiques dans les échantillons d'eau. Contrairement aux échantillons d'eau de surface, les contributions relatives des marqueurs dans l'eau de puits étaient constantes et s'approchaient des pourcentages attendus, bien que Pig-1-Bac semble avoir été moins représenté (Figures 25 et 26). Les proportions des marqueurs par rapport au marqueur général *Bacteroidales* sont présentées au Tableau 30. BacR a représenté jusqu'à 1,74 % des *Bacteroidales* détectés, BacBov1 jusqu'à 3,01% et Pig-1-Bac jusqu'à 3,00 %. Les marqueurs HumM2 et Chicken/Duck-Bac ont été très peu retrouvés dans les échantillons d'eau, expliquant aussi leur faible représentativité par rapport à BacGen.

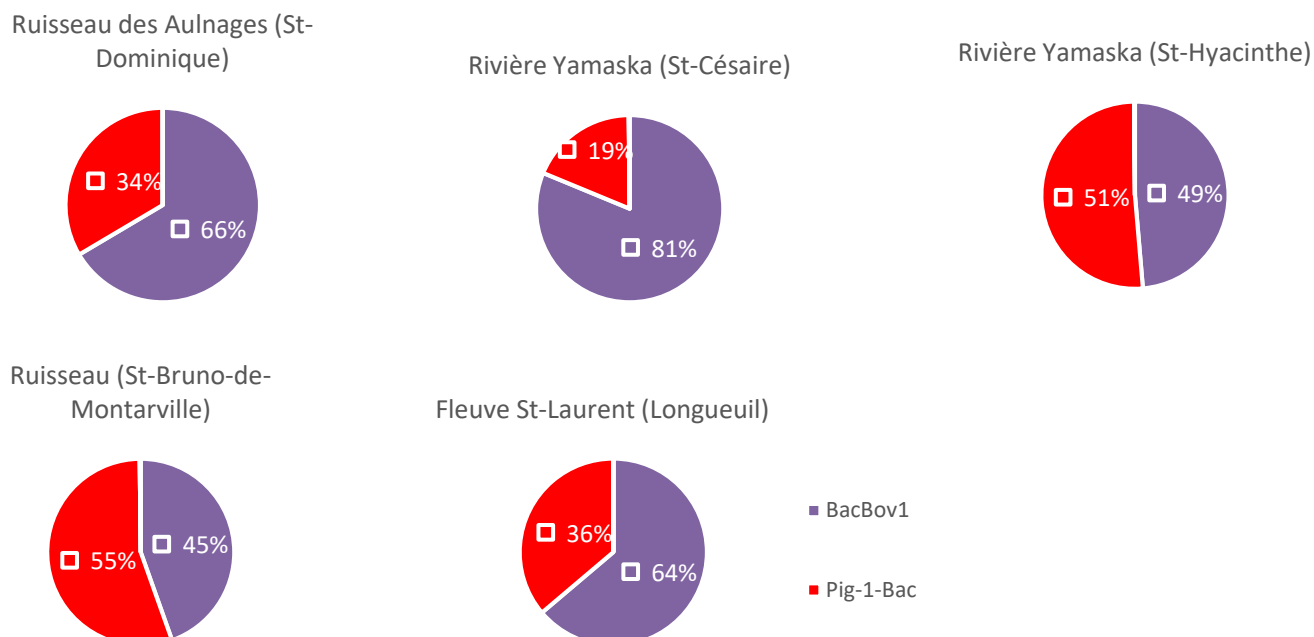


Figure 23. Contributions relatives des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans l'eau de surface après la contamination par les intrants en ne considérant pas BacR et BacGen.

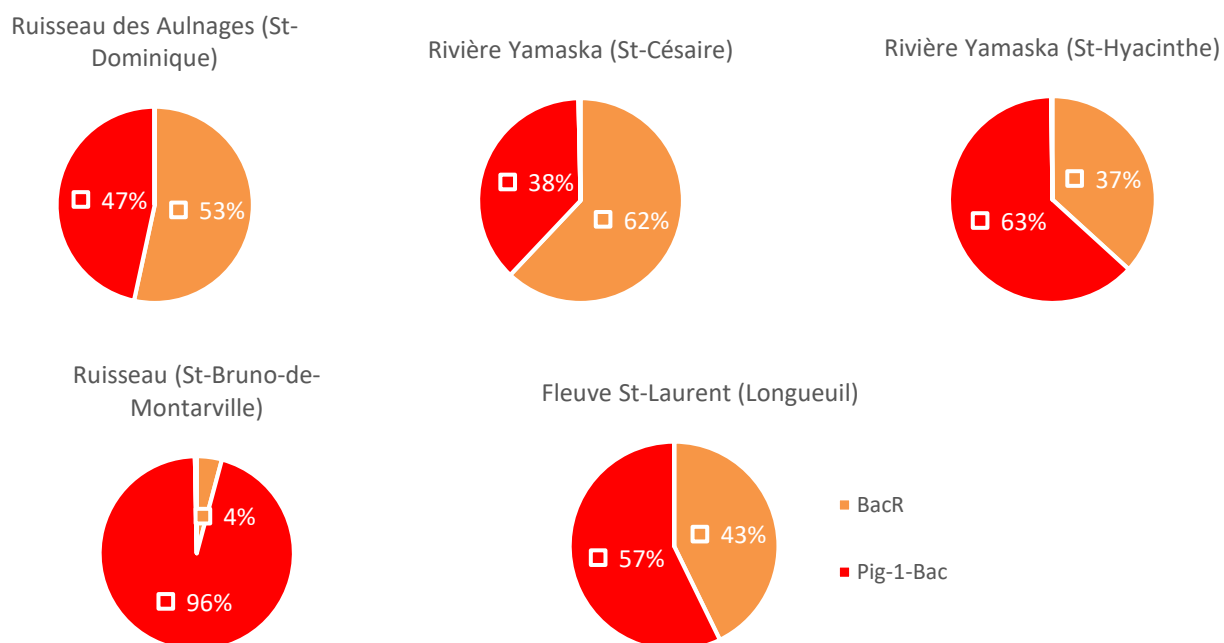


Figure 24. Contributions relatives des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans l'eau de surface après la contamination par les intrants en ne considérant pas BacBov1 et BacGen.

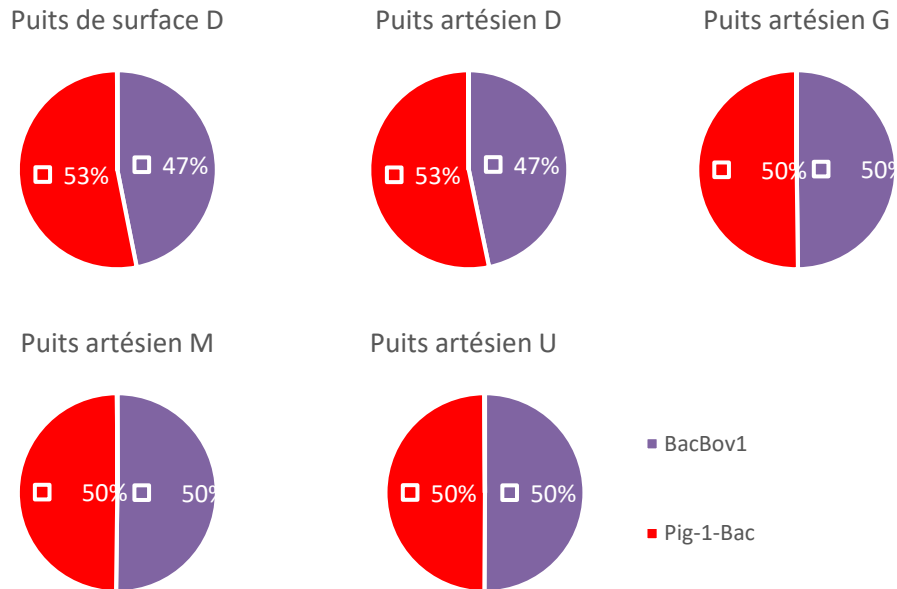


Figure 25. Contributions relatives des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans l'eau de puits après la contamination par les intrants en ne considérant pas BacR et BacGen.

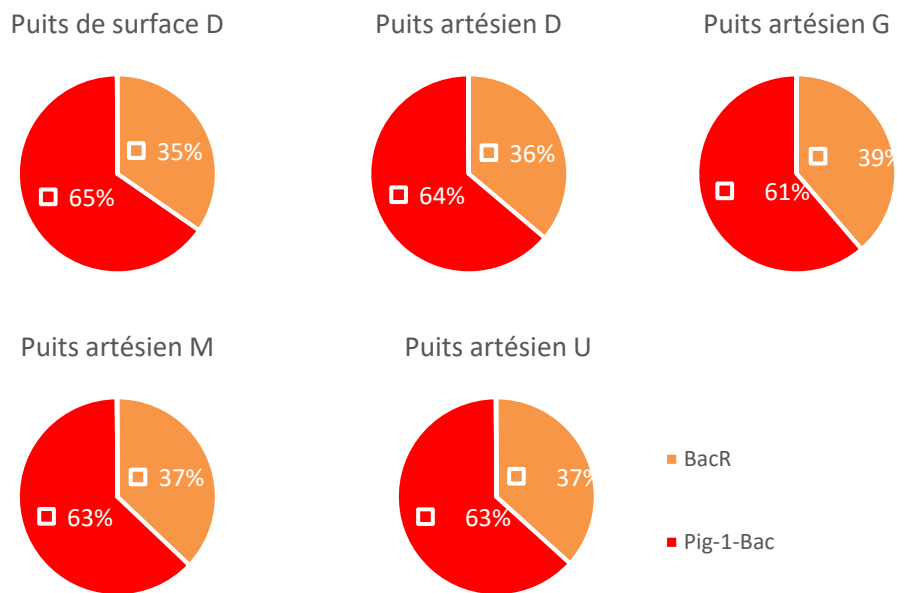


Figure 26. Contributions relatives des marqueurs spécifiques par rapport à la somme de tous les marqueurs dans l'eau de puits après la contamination par les intrants en ne considérant pas BacBov1 et BacGen.

Tableau 30. Contribution relative des marqueurs spécifiques par rapport au marqueur général BacGen dans les échantillons d'eau contaminés.

Site de l'échantillon d'eau	%				
	BacR /BacGen	BacBov1 /BacGen	Pig-1-Bac /BacGen	HumM2 /BacGen	Chicken/Duck-Bac /BacGen
Ruisseau des Aulnages (St-Dominique)	1,60	2,76	1,39	0,00	0,00
Rivière Yamaska (St-Césaire)	0,70	1,85	0,42	0,00	0,00
Rivière Yamaska (St-Hyacinthe)	0,97	1,57	1,66	0,00	0,00
Ruisseau (St-Bruno-de-Montarville)	0,04	0,72	0,89	0,00	0,00
Fleuve St-Laurent (Longueuil)	1,19	2,80	1,59	0,00	0,00
Puits de surface D	1,58	2,64	2,99	0,00	0,00
Puits artésien D	1,47	2,28	2,59	0,00	0,00
Puits artésien G	1,45	2,28	2,29	0,00	0,00
Puits artésien M	1,74	2,98	2,95	0,00	0,00
Puits artésien U	1,74	3,01	3,00	0,00	0,00

5.2.5 Taux de recouvrement

Les taux de recouvrement des marqueurs ont généralement varié davantage dans les eaux de surface que dans les eaux de puits (Tableau 31). Les taux de recouvrement des marqueurs ciblant les poulets et l'humain sont nettement plus faibles que ceux des quatre autres marqueurs. Certains taux de recouvrement sont au-dessus de 100 % pour certains échantillons avec les marqueurs BacR et BacBov1. Il s'agit d'un résultat possible étant donné la nature exponentielle de l'amplification PCR et de l'écart-type acceptable entre les réplicats de 0,3 Log₁₀ copies/μl d'ADN. Les résultats attendus et obtenus sont en fait dans le même Log, ce qui ne représente pas un écart important. Par exemple, il s'agit d'un écart de 0,22 Log₁₀ copies du marqueur BacR/100 ml d'eau de surface dans le Ruisseau des Aulnages. L'intervalle des résultats acceptables au qPCR peut aussi expliquer la variation observée des différentes proportions des marqueurs dans les graphiques sectoriels présentés précédemment. Cependant, cela n'explique pas entièrement les faibles valeurs de taux de recouvrement pour les marqueurs HumM2 et Chicken/Duck-Bac, les résultats n'étant pas tous dans la même valeur logarithmique. D'ailleurs, HumM2 n'a pas été détecté dans trois échantillons d'eau de surface. En somme, les résultats indiquent que les analyses qPCR sont plus stables dans les échantillons d'eau de puits, suggérant que la composition de l'eau de surface a un impact sur la détection des marqueurs.

Tableau 31. Taux de recouvrement (%) des bactéries *E. coli* et des marqueurs dans les échantillons d'eau de surface et de puits.

Site de l'échantillon d'eau	<i>E. coli</i>	BacGen	BacR	BacBov1	Pig-1-Bac	HumM2	Chicken/Duck-Bac
Ruisseau des Aulnages (St-Dominique)	86,3	78,3	167,5	163,9	58,5	0,9	2,3
Rivière Yamaska (St-Césaire)	85,5	62,0	57,5	86,5	14,0	ND*	34,8
Rivière Yamaska (St-Hyacinthe)	91,5	61,0	79,2	73,2	54,4	16,9	35,6
Ruisseau (St-Bruno-de-Montarville)	90,9	83,1	4,3	45,1	39,5	ND	36,5
Fleuve St-Laurent (Longueuil)	91,7	60,6	95,8	128,2	51,3	ND	0,2
Puits de surface D	77,8	43,6	91,5	86,5	69,1	11,2	16,5
Puits artésien D	83,7	49,4	96,2	84,6	67,9	14,8	19,9
Puits artésien G	62,6	42,0	80,7	71,9	51,1	13,4	15,0
Puits artésien M	75,3	40,5	93,5	90,7	63,4	20,9	19,2
Puits artésien U	90,5	38,0	87,8	86,2	60,5	16,3	16,2

*ND : Non détecté avant et après la contamination, donc le taux de recouvrement n'a pas pu être calculé pour ces échantillons.

5.2.6 Bilan

Le marqueur BacBov1 n'a pas été spécifique qu'aux bovins tandis que Chicken/Duck-Bac ne l'a pas été seulement aux poulets. Le marqueur BacR a été beaucoup plus spécifique que BacBov1 et serait un meilleur choix à l'avenir pour distinguer les ruminants des porcs, poules et autres. Cependant, le marqueur BacR ne permet toujours pas de distinguer les animaux sauvages (ex. chevreuil) des animaux d'élevage, ce qui peut causer un problème lors de la recherche de l'origine d'une contamination environnementale. Les *Bacteroidales* d'origine bovine ou de ruminants qui ont été quantifiées dans le lisier de bovin représentent une contribution relative importante de l'échantillon par rapport aux autres marqueurs, suggérant le fait que ces marqueurs ciblent une proportion importante de l'ADN de *Bacteroidales* associés aux bovins, ce qui n'est pas le cas des autres marqueurs à l'étude associés à un hôte spécifique.

Il semble y avoir davantage de variation de concentrations de marqueurs mesurés au qPCR ainsi que des taux de recouvrement dans les échantillons d'eau de surface comparé à l'eau de puits. L'intégrité de l'ADN peut avoir été affecté par le type d'eau et ses composants, malgré le fait que la filtration de l'eau pour l'extraction d'ADN ait été réalisée le même jour que la contamination par les intrants. D'ailleurs, les contributions relatives des marqueurs dans les échantillons d'eau de surface variaient d'un échantillon à l'autre, ce qui n'a pas été le cas dans les échantillons d'eau de puits. Tel qu'attendu, ce sont principalement les marqueurs Pig-1-Bac et BacBov1 ou BacR qui ont été représentés dans les graphiques sectoriels. Les concentrations théoriques attendues ainsi que les taux

de recouvrement des marqueurs ont permis d'expliquer en partie ces résultats. En effet, les marqueurs HumM2 et Chicken/Duck-Bac avaient des concentrations attendues et des taux de recouvrement très faibles comparés aux marqueurs ciblant les *Bacteroidales* de porcs, de bovins ou de ruminants. Cela suggère que la détection des marqueurs est aussi affectée par la quantité ajoutée et par l'origine de la contamination. Plus il y a d'ADN, mieux les marqueurs seront détectés et quantifiés.

La variabilité des résultats de nature exponentielle associée à la méthode qPCR rend encore plus importante la normalisation de la procédure pour des fins de traçage des sources de contamination fécale dans l'eau. En effet, le volume d'eau filtré pour l'extraction d'ADN, la méthode d'extraction d'ADN réalisée, le volume d'extrait d'ADN utilisé pour le qPCR ainsi que le nombre de réplicats techniques sont des facteurs importants qui peuvent grandement affecter les limites de détection et les résultats dans les échantillons d'eau.

6 ÉVALUATION DU DEVENIR ENVIRONNEMENTAL DES MARQUEURS GÉNÉTIQUES *BACTEROIDALES*

Le transport des contaminants d'origine fécale vers les eaux de surface et souterraine a été évalué afin de faciliter l'interprétation des résultats obtenus dans les échantillons d'eau par les utilisateurs de la méthode. Le déplacement de ces contaminants dépend de plusieurs mécanismes de survie et de transport, particulièrement dans le sol. Cette étape du projet avait comme objectif de caractériser la persistance des marqueurs génétiques dans l'environnement en suivant des parcelles expérimentales ayant reçu du lisier de porc ou du fumier de bovin.

6.1 DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX

À Saint-Bruno-de-Montarville, douze parcelles principales de 15 x 3,25 mètres en loam argileux ont été mises en place avec un système où la totalité de l'eau de ruissellement issue de chaque parcelle était collectée de façon indépendante au bas de la pente (1 à 3 %) (Figure 27). Ce site expérimental a été divisé en 3 blocs de 4 traitements, dont trois recevaient du lisier de porc à des dates différentes dans l'année (mai, septembre ou octobre), ainsi qu'un traitement témoin sans lisier. Des piézomètres ont été installés à la même profondeur que les drains au centre de chaque parcelle afin de recueillir l'eau qui se dirigerait vers ceux-ci. L'installation des piézomètres a été réalisée en minimisant le travail du sol et en installant un entonnoir à la base hors sol du piézomètre afin de réduire le transport de l'eau par des voies préférentielles.

Deux autres sites instrumentés en piézomètres ont été mis en place en loam sableux et argile lourde (Figure 28). Chaque site se composait de 2 parcelles de 20 x 6,1 mètres et 2 parcelles de 20 x 6,5 mètres dont la moitié était en maïs-grain ou en blé, recevant soit du lisier de porc ou du fumier de bovin au printemps. Aucun épandage récent n'avait été effectué dans les sites expérimentaux. En effet, le site en loam argileux n'a pas reçu d'intrants organiques depuis au moins 12 ans. Le site en loam sableux a reçu du fumier de bovin composté à l'automne 2018, et le site en argile lourde a reçu du fumier de poulet au printemps 2019. Les données climatiques (température de l'air et pluviométrie) ont été prises à partir d'une station météo du Réseau Pommier présente à moins d'un kilomètre des sites expérimentaux. Les données ont pu être extraites du site web Agrométéo Québec.

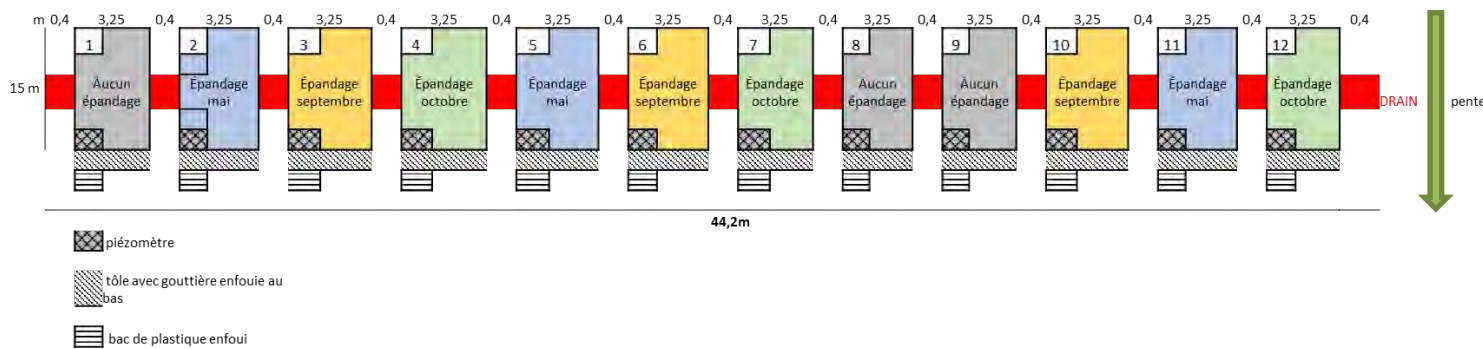


Figure 27. Plan du site expérimental principal en sol de type loam argileux. Les piézomètres ont été installés au centre de chaque parcelle.

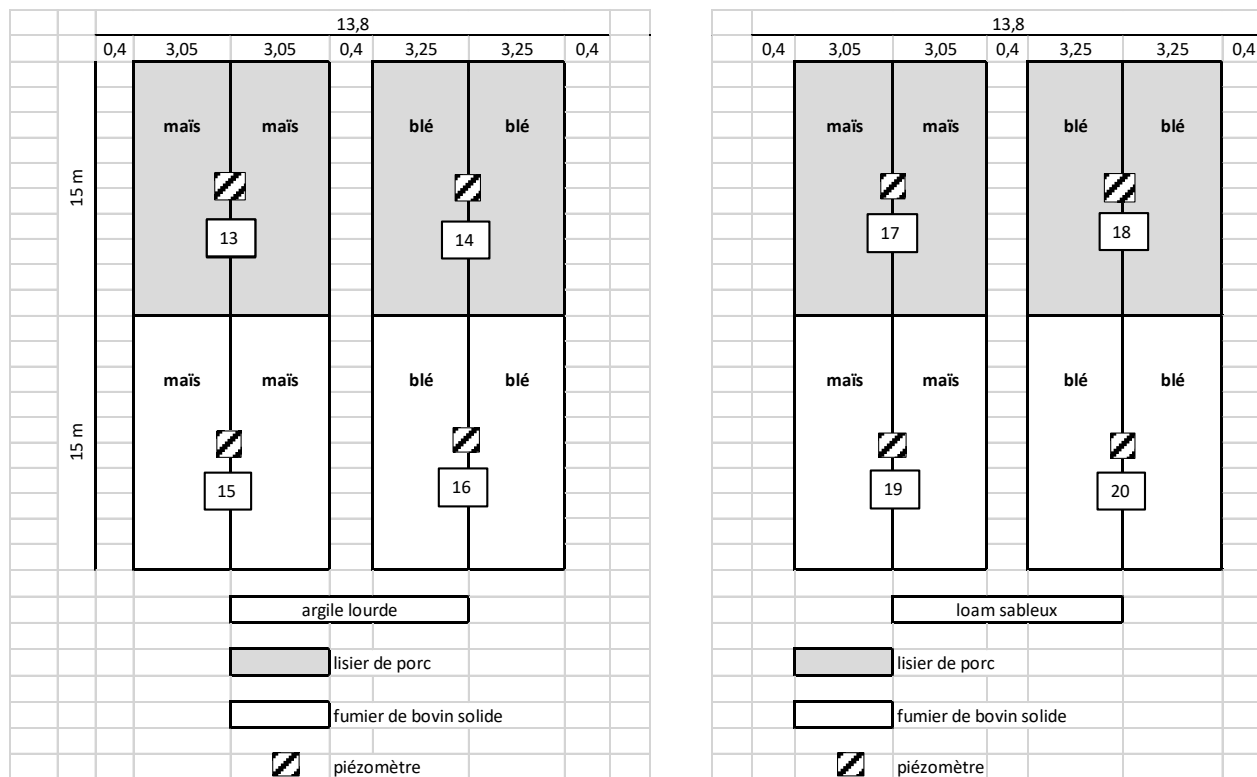


Figure 28. Plans des sites expérimentaux en sol de type argile lourde et loam sableux.

6.2 MÉTHODOLOGIE

Lors de chaque événement de pluie, des échantillons d'eau de drainage ont été récoltés de façon aseptique à l'aide d'une pompe manuelle, dans des bouteilles stériles de 500 à 1000 ml, selon le volume d'eau à récolter. Des échantillons d'eau de ruissellement ont aussi été prélevés dans des bouteilles stériles de 500 ml. Pour ce faire, les

bacs de plastique installés en bas de pente étaient retirés de leur emplacement et la hauteur d'eau, correspondante à un volume connu, était notée. L'eau était homogénéisée avant le prélèvement avec la bouteille stérile. Les prélèvements d'eau de ruissellement étaient toujours faits dans la journée suivant les précipitations et ce, afin d'éviter que l'eau demeure stagnante dans les bacs en ayant ainsi un impact sur les populations bactériennes. Lorsqu'il était possible de recueillir minimalement 250 ml d'eau, les sols associés à ces parcelles ont aussi été échantillonnés en prélevant 5 sous-échantillons combinés dans un sac stérile. Tous les échantillons ont été conservés entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière jusqu'aux analyses pendant maximum 72 h.

Les populations en *E. coli* ont été déterminées dans tous les échantillons d'eau selon une méthode de filtration sur membrane utilisant le milieu de culture mFC-BCIG décrite à l'Annexe 11. Le dénombrement des *E. coli* a été réalisé dans le sol, le lisier de porc et le fumier de bovin selon une méthode utilisant les Pétrifilms™ décrite à l'Annexe 8.

L'ADN génomique total des échantillons de lisier de porc et de fumier de bovin a été extrait à partir du kit d'extraction *Fast DNA SPIN Kit for Feces™* en combinaison avec le système FastPrep® de la compagnie MP Biomedicals (protocole détaillé à l'Annexe 3). L'ADN contenu dans les échantillons d'eau et de sol a été extrait à l'aide du kit d'extraction *Fast DNA SPIN Kit for Soil™* en combinaison avec le système FastPrep® de la compagnie MP Biomedicals (protocoles détaillés aux Annexes 4 et 13). Ensuite, la concentration des marqueurs BacGen, HumM2, BacR, Pig-1-Bac et ChickenDuck-Bac dans les échantillons a été déterminée en suivant le protocole détaillé à l'Annexe 6. La limite de détection de chaque marqueur dans les échantillons d'eau a été déterminée en considérant la limite de détection de la méthode qPCR décrite dans les sections précédentes du rapport et en rapportant le résultat dans un volume d'eau de 100 ml. Les résultats obtenus ont été regroupés par traitement et les moyennes ont été présentées dans des tableaux et des graphiques afin de montrer les effets et tendances observées.

6.3 RÉSULTATS

La présentation des résultats a été réalisée dans l'ordre suivant :

1. Travaux agricoles réalisés sur les sites expérimentaux
2. Échantillons de lisier de porc utilisés lors des épandages sur les parcelles principales en sol de type loam argileux
3. Échantillons de sol et d'eau provenant du site expérimental principal en loam argileux
4. Échantillons de lisier de porc et de fumier de bovin utilisés pour les épandages dans les parcelles en loam sableux et argile lourde
5. Échantillons de sol et d'eau provenant des parcelles en loam sableux et argile lourde

6.3.1 Épandages et échantillonnages réalisés

Les calendriers des opérations réalisées dans les parcelles expérimentales sont présentés aux Tableaux 32 et 33 pour les dispositifs en loam argileux, ainsi qu'en argile et en loam sableux, respectivement. Le lisier provenait d'un élevage de porcs en engraissement, prélevé dans la pré-fosse intérieure. Le fumier de bovin provenait d'un élevage laitier biologique élevé sur paille et sur ripe de bois. Le fumier a été prélevé dans l'amas extérieur, sous un abri annexé à l'étable, et était frais. Ces deux élevages sont représentatifs de ce qui est retrouvé au Québec en ce qui a trait à l'engraissement de porcs et aux élevages laitiers en stabulation entravée. Puisque les travaux se sont déroulés au sein d'un site détenant une certification biologique, il était nécessaire de trouver des engrais organiques qui répondaient aux exigences. Aucun élevage de porc biologique ne se trouvant à proximité du site expérimental, un élevage conventionnel de porcs à l'engraissement convenait. Puisqu'un élevage de bovins laitiers certifié biologique est situé à proximité de St-Bruno-de-Montarville, il était approprié de s'y approvisionner. Afin d'éviter les pertes en nutriments par volatilisation et pour réduire le ruissellement de surface, les lisiers et fumiers ont été incorporés à l'aide d'un vibroculteur dans l'heure suivant l'épandage à la surface du sol. La dose de lisier épandue dans le dispositif en loam argileux (25 m³/ha) est représentative des doses de lisier de porc couramment appliquées pour répondre aux besoins en azote des cultures telles le blé et le maïs. Dans le dispositif en argile lourde, une dose de 50 m³/ha a été appliquée afin de représenter un cas différent et plus important de fertilisation, l'objectif n'étant pas de comparer entre les dispositifs. Dans le cas du loam sableux, une dose équivalente de fumier de bovin et de lisier de porc a été appliquée, soit 25 m³/ha chacun.

Tableau 32. Calendrier des principales opérations au champ réalisées dans le dispositif en loam argileux.

Date 2021	Opération au champ
27 avril	Travaux primaires du sol (herse rotative et vibroculteur)
20 mai	Épandage de lisier de porc (25 m ³ /ha) dans les 3 parcelles correspondantes et incorporation au vibroculteur
20 mai	Semis du blé de printemps
25 août	Fauche du blé
1 ^{er} septembre	Épandage de lisier de porc (25 m ³ /ha) dans les 3 parcelles correspondantes et incorporation au vibroculteur; Semis de trèfle égyptien à la volée comme culture de couverture
20 octobre	Épandage de lisier de porc (25 m ³ /ha) dans les 3 parcelles correspondantes et incorporation au vibroculteur

Tableau 33. Calendrier des principales opérations au champ réalisées dans les dispositifs en loam sableux et en argile.

Date 2021	Opération au champ
27 avril	Travaux primaires du sol (herse rotative et vibroculteur)
26 mai	Épandage de lisier de porc (2 parcelles par site) et incorporation au vibroculteur
1 ^{er} juin	Semis du blé de printemps ou du maïs dans les parcelles correspondantes sous lisier de porc
7 juin	Épandage de fumier de bovin (2 parcelles par site) et incorporation au vibroculteur
7 et 8 juin	Semis du blé de printemps ou du maïs dans les parcelles correspondantes sous lisier de porc
7 septembre	Fauche du blé
2 novembre	Récolte du maïs

Sur le site expérimental principal en loam argileux, un total de 96 échantillons de sol (8 événements), 84 échantillons d'eau de ruissellement (7 événements) et 36 échantillons d'eau des piézomètres (3 événements) ont été recueillis (Tableau 34). Vingt échantillons de sol ont été pris dans les parcelles en argile lourde ainsi que cinq échantillons d'eau des piézomètres (Tableau 35). Finalement, dix-huit échantillons de sol de type loam sableux et un échantillon d'eau de piézomètre ont été recueillis (Tableau 36).

Tableau 34. Dates d'échantillonnages de sol et d'eau sur le site expérimental en loam argileux.

Type d'échantillon*	Dates d'échantillonnages 2021
sol	17 mai
eau de ruissellement	3 juin
sol	4 juin
sol	15 juin
eau de ruissellement	16 juin
eau des piézomètres	
sol	09 juillet
eau de ruissellement	
eau des piézomètres	
eau de ruissellement	7 septembre
sol	
eau de ruissellement	27 septembre
sol	
sol	22-oct
eau de ruissellement	
sol	01-nov
eau de ruissellement	
eau des piézomètres	

*Il y avait 12 échantillons par type à chaque date.

Le nombre de jours après l'épandage dépendait de la date d'épandage en fonction de chaque traitement (épandage mai, septembre, octobre ou aucun épandage) ainsi que la date d'échantillonnage.

Tableau 35. Échantillonnages de sol et d'eau sur le site expérimental en argile lourde.

Type d'échantillon*	Dates d'échantillonnages 2021	Nombre d'échantillons
sol	17 mai	4
sol	15 juin	4
sol	28 juin	4
sol	9 juillet	2
eau des piézomètres		2
sol	30 août	2
sol	2 novembre	4
eau des piézomètres		3

Tableau 36. Échantillonnages de sol et d'eau sur le site expérimental en loam sableux.

Type d'échantillon*	Dates d'échantillonnages 2021	Nombre d'échantillons
sol	17 mai	4
sol	15 juin	4
sol	28 juin	4
sol	30 août	2
sol	2 novembre	4
eau des piézomètres		1

6.3.2 Échantillons de lisier de porc utilisés lors des épandages sur les parcelles principales en loam argileux

Le taux de matières sèches mesuré dans l'échantillon de lisier de porc du printemps (14,03 %) était plus élevé que ceux mesurés dans les échantillons de septembre et d'octobre (3,15 et 7,58 % respectivement) (Tableau 37). La masse volumique du lisier de porc a varié entre 1,02 et 1,18 g/ml. Les populations en bactéries *E. coli* ont été présentées sur une base humide et sèche. Celles-ci étaient plus faibles dans le lisier de porc épandu le 1^{er} septembre (5,92 Log₁₀ UFC/g_s) comparé aux lisiers épandus les 20 mai et 20 octobre (6,49 et 6,58 Log₁₀ UFC/g_s respectivement).

Tableau 37. Populations en bactéries *E. coli* dans les échantillons de lisier de porc épandu sur le loam argileux.

Date d'échantillonnage 2021	Matières sèches	Masse volumique	<i>E. coli</i>			
	%	g/ml	UFC /g _h	Log ₁₀ UFC /g _h	UFC /g _s	Log ₁₀ UFC /g _s
20 mai	14,03	1,18	430 000	5,63	3 065 741	6,49
1^{er} septembre	3,15	ND*	26 000	4,41	824 909	5,92
20 octobre	7,58	1,02	290 000	5,46	3 826 863	6,58

*ND : donnée non disponible

La concentration du marqueur général BacGen et du marqueur spécifique Pig-1-Bac dans les échantillons de lisier de porc était similaire à chaque date d'épandage (Figure 29). Tel qu'attendu, le marqueur spécifique aux ruminants BacR n'a pas été retrouvé dans ces échantillons. Pour sa part, le marqueur spécifique humain (HumM2) a été détecté dans le lisier de porc du 20 mai, mais ne l'a pas été dans les deux autres échantillons de septembre et d'octobre. Ce marqueur n'est pas censé être retrouvé dans le lisier de porc, mais il avait tout de même démontré de la non-spécificité dans un échantillon de lisier de porc en octobre 2019 (livrable 1, section 3.3.2). Cependant, tel que mentionné précédemment, de la contamination par des matières fécales humaines avait été confirmée dans cet élevage. Il faut cependant noter que celui-ci n'a pas servi de source de lisier de porc pour l'épandage au champ. Enfin, le marqueur Chicken/Duck-Bac a été détecté dans tous les échantillons de lisier de porc alors qu'il n'était pas attendu de le retrouver. Ce marqueur a par ailleurs démontré de la non-spécificité dans ce type de matrice durant le projet (résultats variant entre 5,16 et 6,71 Log₁₀ copies/g_h).

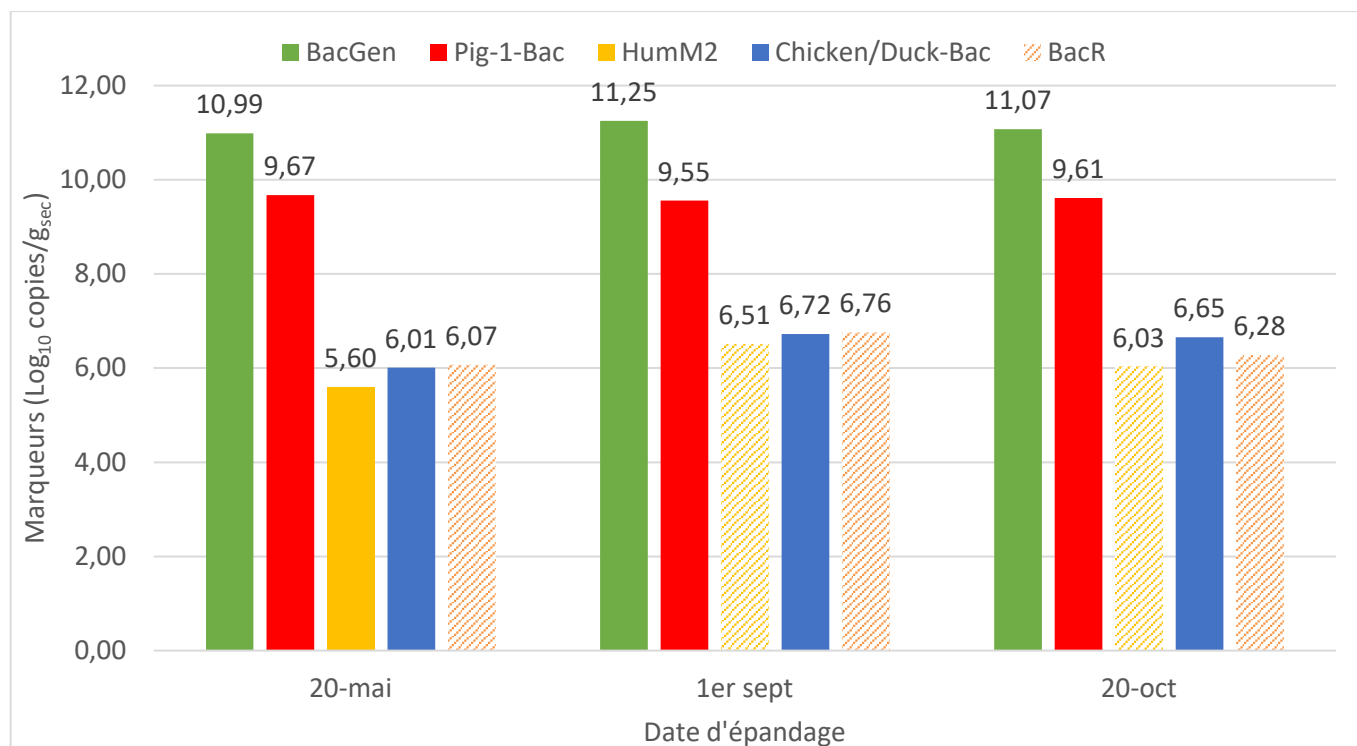


Figure 29. Concentration du marqueur général BacGen et des marqueurs spécifiques dans les échantillons de lisier de porc. Les bandes hachurées correspondent à la valeur de la limite de détection. Ces bandes doivent être interprétées comme étant sous la limite de détection de la méthode qPCR.

6.3.3 Échantillons de sol et d'eau provenant du site expérimental principal en loam argileux

Les populations en bactéries *E. coli* dans les échantillons de sol ont augmenté dans les parcelles ayant reçu du lisier de porc (Figure 30). En effet, des pics des concentrations de bactéries ont été obtenus à la suite des épandages du 20 mai, 1^{er} septembre et 20 octobre. Les parcelles n'ayant pas reçu de lisier de porc avaient des populations en *E. coli* très faibles et près de la limite de détection de la méthode (<10 UFC/g de sol).

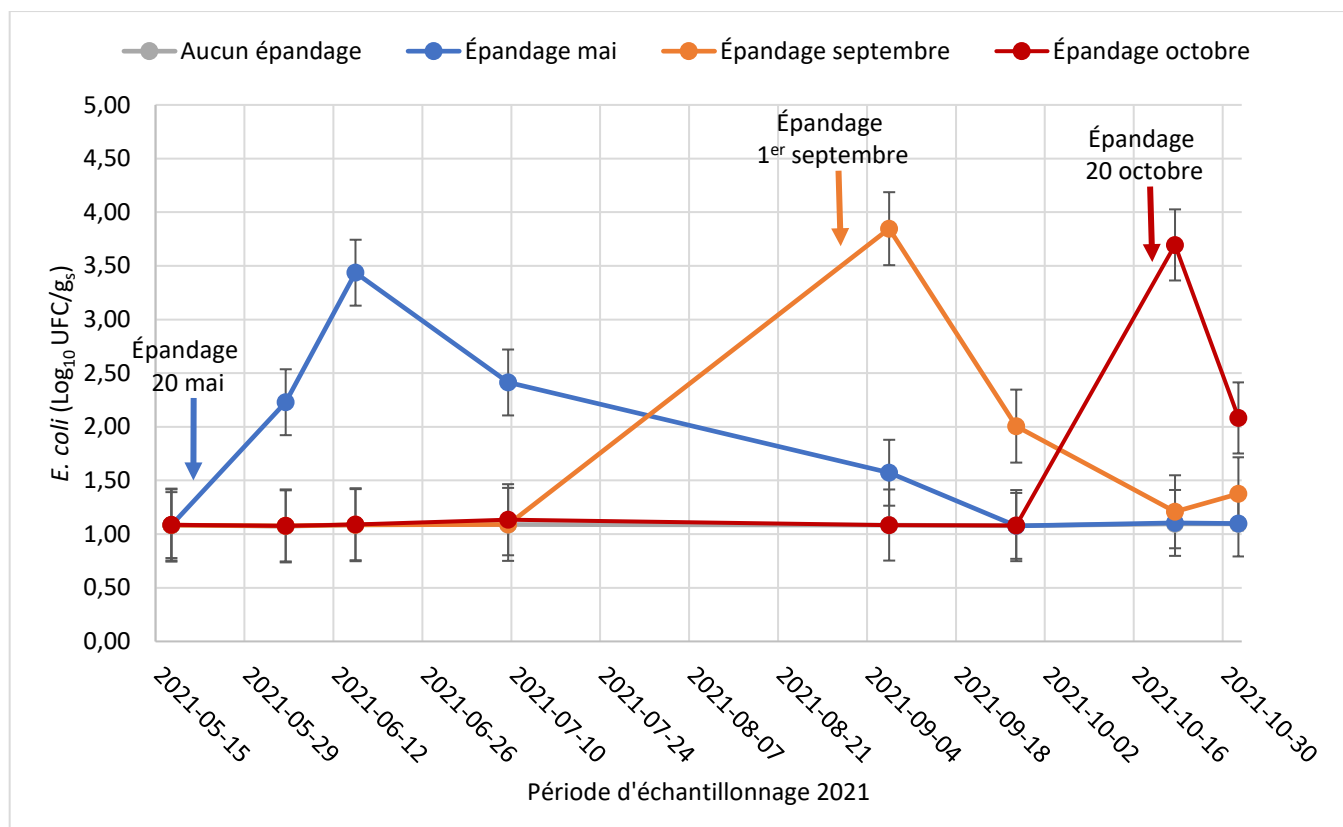


Figure 30. Population d'*E. coli* dans le sol de type loam argileux des 12 parcelles principales. La limite de détection des bactéries *E. coli* avec la méthode utilisant les Petrifilms est de 10 UFC/g_h. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard.

Les concentrations du marqueur BacGen dans les échantillons de sol étaient similaires au début de la saison (17 mai au 15 juin), même après l'épandage du 20 mai. En général, les concentrations en BacGen étaient plus élevées dans les parcelles ayant reçu du lisier de porc que dans celles qui n'en avaient pas reçu (Figure 31). Les concentrations les plus élevées en marqueur BacGen sont survenues aux mêmes dates que pour les populations d'*E. coli*, soit les 15 juin, 7 septembre et 22 octobre. Contrairement aux parcelles ayant reçu du lisier de porc en septembre et octobre, celles qui ont reçu du lisier de porc au printemps avaient des concentrations plus élevées en marqueur BacGen pendant plusieurs semaines. En effet, il y a eu une diminution d'au moins 2 Log₁₀ copies/g_s de sol observé le 9 juillet dans les autres parcelles qui n'avaient pas reçu de lisier de porc encore dans la saison, alors que le sol des parcelles qui en avaient reçu contenait environ 0,5 Log₁₀ copies/g_s de sol de moins qu'à l'échantillonnage précédent du 15 juin.

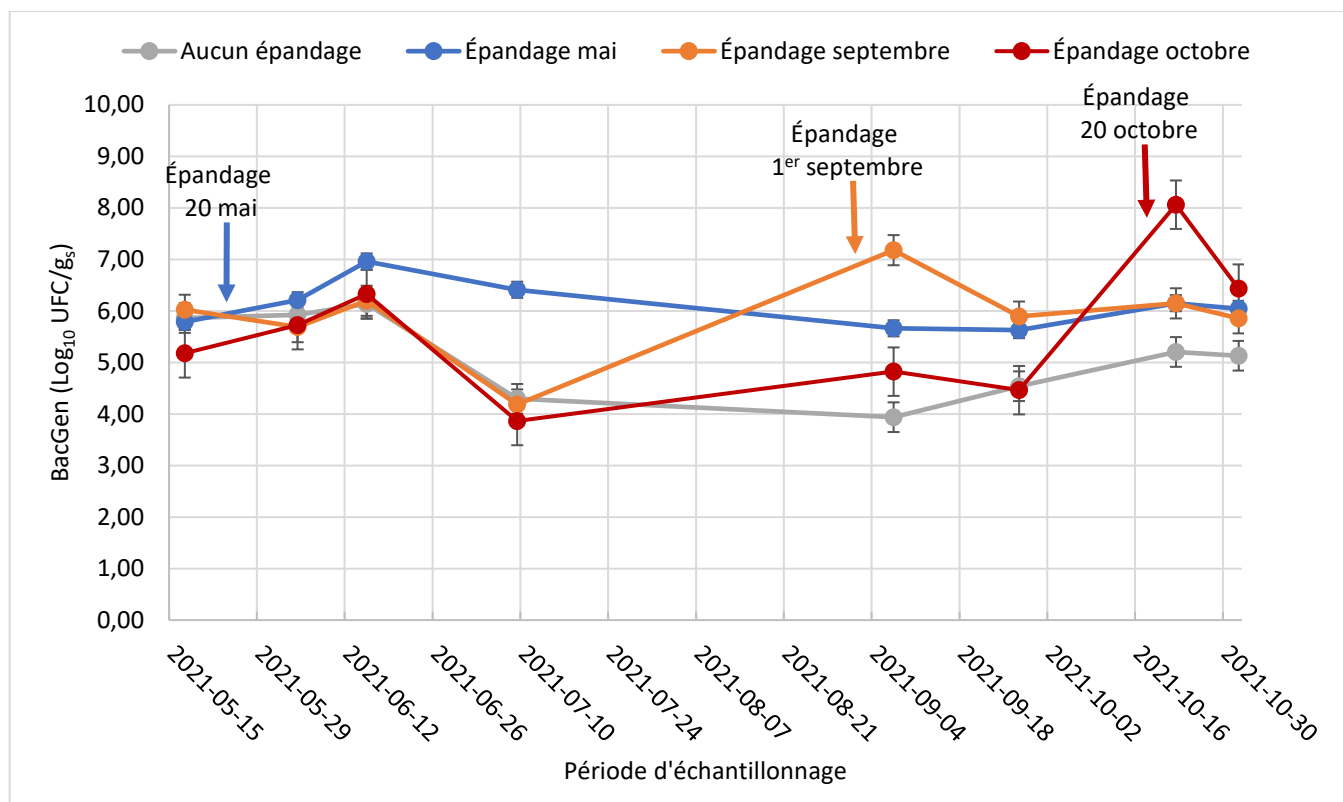


Figure 31. Concentration moyenne du marqueur général BacGen dans le sol loam argileux. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard.

Le marqueur spécifique porcin Pig-1-Bac n'a généralement pas été retrouvé dans les échantillons de sol loam argileux. Cependant, il a été détecté dans quelques échantillons à la suite des épandages du 20 mai, du 1^{er} septembre et du 20 octobre (Tableau 38). L'épandage du printemps n'a pas permis la détection du marqueur porcin dans toutes les parcelles qui venaient d'être fertilisées. Par contre, les 3 échantillons de sol provenant des parcelles visées par les épandages de septembre et d'octobre contenaient le marqueur Pig-1-Bac par la suite. Les concentrations étaient plus élevées après l'épandage du 20 octobre que dans les autres échantillons de sol contenant le marqueur. Pig-1-Bac a aussi été retrouvé 12 jours après l'épandage d'octobre, mais avait diminué environ de moitié. HumM2 a été détecté dans un seul échantillon de sol le 15 juin (parcelle 11) à une concentration de 4,43 Log₁₀ copies/g_h (4,52 Log₁₀ copies/g_s). Le marqueur Chicken/Duck-Bac a aussi été détecté dans un seul échantillon de sol, celui du 22 octobre (parcelle 4), à une concentration de 4,06 Log₁₀ copies/g_h (4,19 Log₁₀ copies/g_s). Tel qu'attendu, puisqu'il s'agit d'un marqueur ciblant les ruminants, BacR n'a pas été retrouvé dans les échantillons de sol durant toute la saison.

Tableau 38. Concentration du marqueur Pig-1-Bac dans les échantillons de sol de type loam argileux trouvés positifs (n=12).

Date d'échantillonnage 2021	Date d'épandage 2021	Parcelle	Pig-1-Bac		
			copies/g _h	copies/g _s	Log ₁₀ copies/g _s
4 juin	20 mai	2	1,64E+03	1,96E+03	3,29
4 juin	20 mai	5	2,85E+03	3,33E+03	3,52
15 juin	20 mai	11	2,67E+03	3,31E+03	3,52
7 septembre	1 ^{er} septembre	3	5,28E+03	6,42E+03	3,81
7 septembre	1 ^{er} septembre	6	9,34E+03	1,13E+04	4,05
7 septembre	1 ^{er} septembre	10	2,11E+04	2,59E+04	4,41
22 octobre	20 octobre	7	9,18E+05	1,26E+06	6,10
22 octobre	20 octobre	12	1,55E+06	2,13E+06	6,33
22 octobre	20 octobre	4	3,02E+06	4,10E+06	6,61
1 ^{er} novembre	20 octobre	12	7,59E+03	9,77E+03	3,99
1 ^{er} novembre	20 octobre	7	1,40E+04	1,71E+04	4,23
1 ^{er} novembre	20 octobre	4	1,66E+04	2,06E+04	4,31

Malgré le fait que l'épandage ait eu lieu le 20 mai 2021, les populations des bactéries *E. coli* mesurées dans l'eau des piézomètres le 16 juin étaient toutes sous la limite de détection (<2 UFC/100 ml) (Figure 32). Lors des échantillonnages du 9 juillet et du 1^{er} novembre, les populations moyennes les plus élevées ont été retrouvées dans les parcelles qui avaient été le plus récemment fertilisées avec du lisier de porc, soit suite aux épandages du 20 mai et du 20 octobre, respectivement.

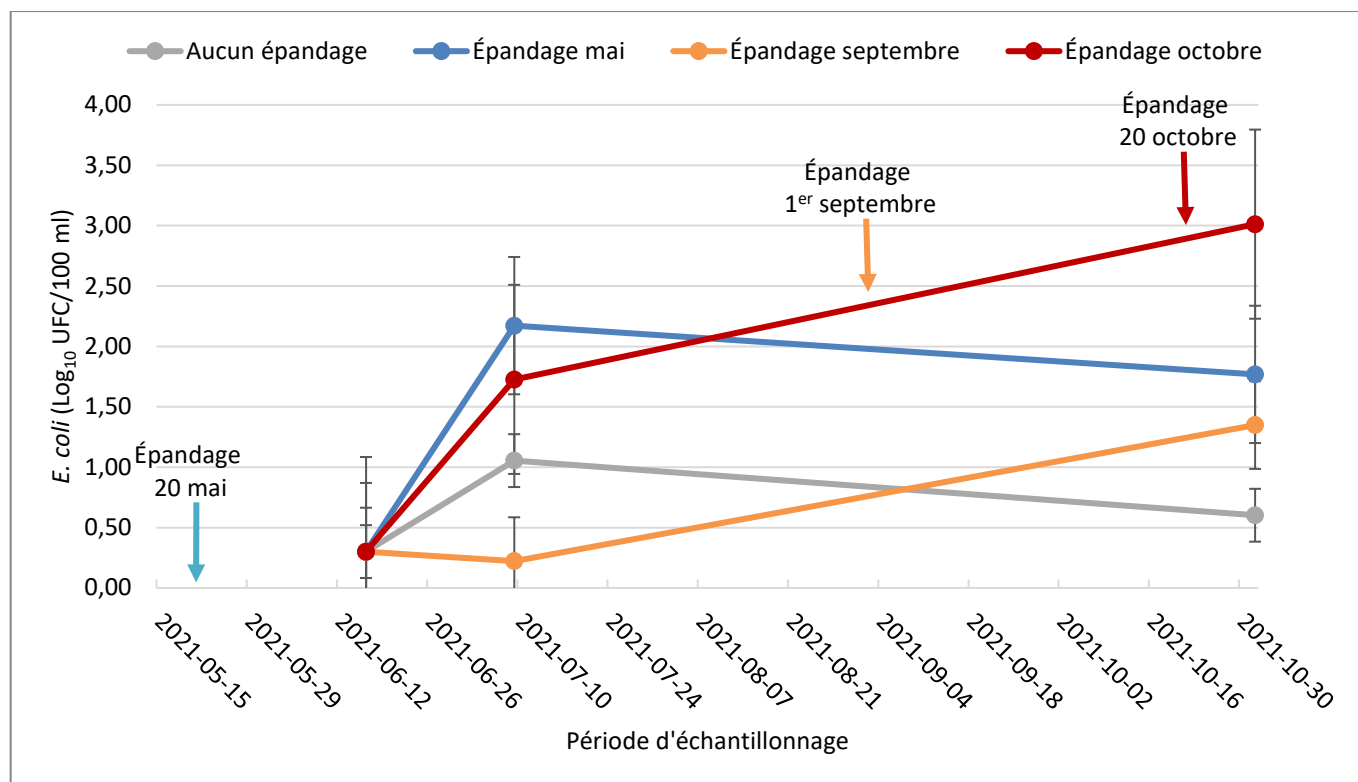


Figure 32. Population d'*E. coli* dans l'eau des piézomètres du champ principal en sol loam argileux. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard.

La concentration de l'ADN dans l'eau des piézomètres a varié entre 17,25 et 101,00 ng/μl (incluant tous les échantillons d'eau des piézomètres de l'été 2021). La pureté de l'ADN (DO mesurée à 260/280) s'est située entre 1,640 à 2,470. Le volume d'eau filtré pour l'extraction d'ADN a varié entre 50 et 170 ml. Le maximum d'eau des piézomètres a été filtré en une heure lorsque le volume d'eau de l'échantillon était suffisant. Les concentrations d'ADN n'étaient pas plus élevées lorsque le volume d'eau filtré était plus grand.

Le marqueur BacGen a eu une limite de détection qui variait entre 66 et 273 copies/100 ml d'eau des piézomètres. Les concentrations en marqueur BacGen dans l'eau des piézomètres n'ont pas été influencées par les épandages (Figure 33). En effet, les concentrations mesurées dans les échantillons d'eau ont été similaires entre les traitements durant toute la saison. Cependant, les échantillons de sol des parcelles ayant reçu du lisier de porc le 20 octobre avaient des concentrations moyennes en BacGen un peu plus élevées que les autres parcelles en date du 1^{er} novembre. Les marqueurs spécifiques HumM2, BacR et Chicken/Duck-Bac n'ont pas été détectés dans les échantillons d'eau des piézomètres de la saison. Le marqueur Pig-1-Bac a été retrouvé dans quatre échantillons du 1^{er} novembre dont les concentrations se situaient entre 4,24 et 6,22 Log₁₀ copies/100 ml d'eau. L'eau provenait des trois parcelles fertilisées 12 jours avant (parcelles 4, 7 et 12), le 20 octobre, et aussi dans une parcelle qui avait reçu du lisier de porc en mai (parcelle 5). Pour sa part, le marqueur Pig-1-Bac avait une limite de détection se situant entre 116 et 657 copies/100 ml d'eau des piézomètres, la limite de détection augmentant lorsque le volume d'eau filtré diminue.

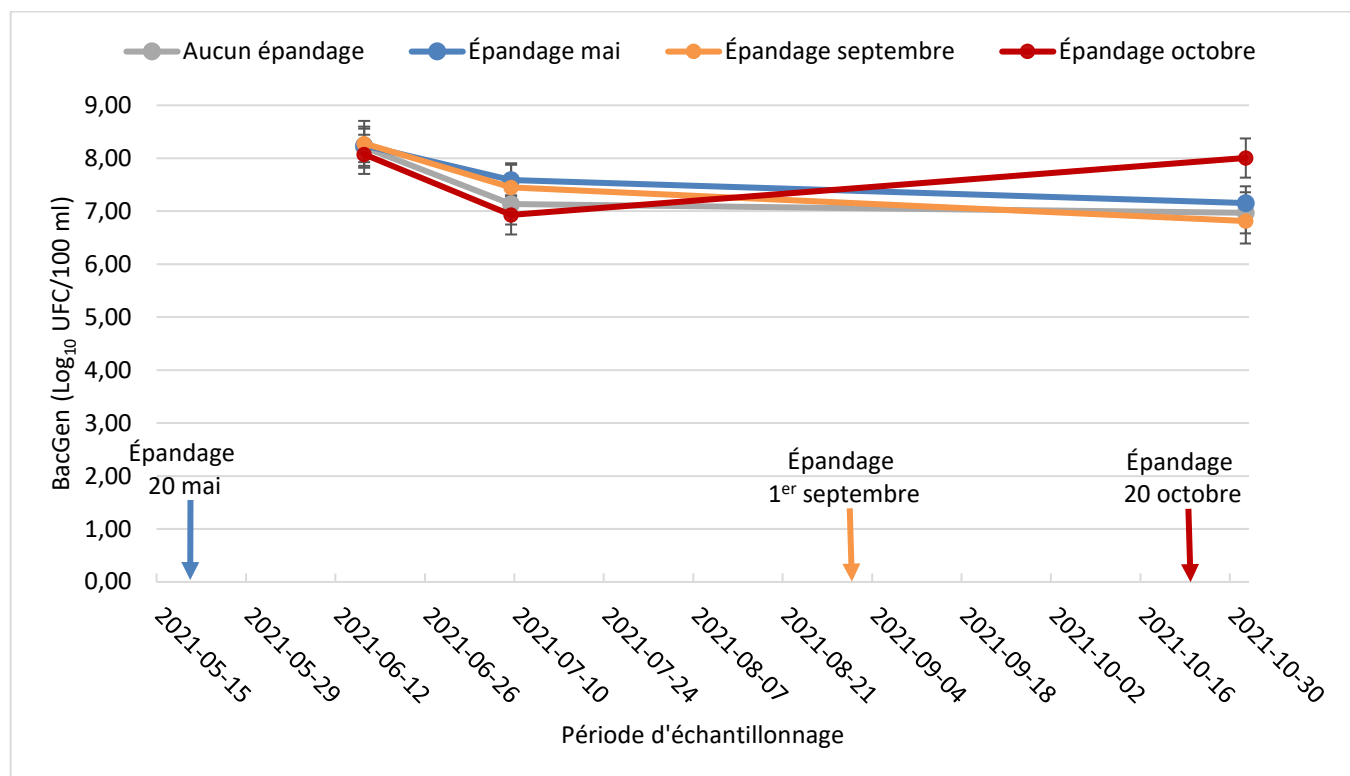


Figure 33. Concentration moyenne du marqueur général BacGen dans l'eau des piézomètres du champ principal en sol loam argileux. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard.

Les populations d'*E. coli* mesurées dans l'eau de ruissellement provenant des échantillons du 7 septembre ont été influencées à la hausse par l'épandage de lisier de porc du 1^{er} septembre (Figure 34). En effet, les concentrations en bactéries *E. coli* étaient plus élevées à cette date que pour les autres échantillonnages de la saison. Contrairement aux autres dates d'épandage, des précipitations importantes ont eu lieu dans les jours suivant l'épandage du 20 octobre. Les bacs de plastique ont d'ailleurs débordé dans trois parcelles lors de l'échantillonnage du 1^{er} novembre. Des échantillons ont tout de même été prélevés dans les bacs, mais ne représentent pas l'ensemble de l'eau ruisselée durant l'événement pluvial. Il se peut que l'effet de l'épandage ait été atténué par ces précipitations pour les échantillonnages du 22 octobre et du 1^{er} novembre.

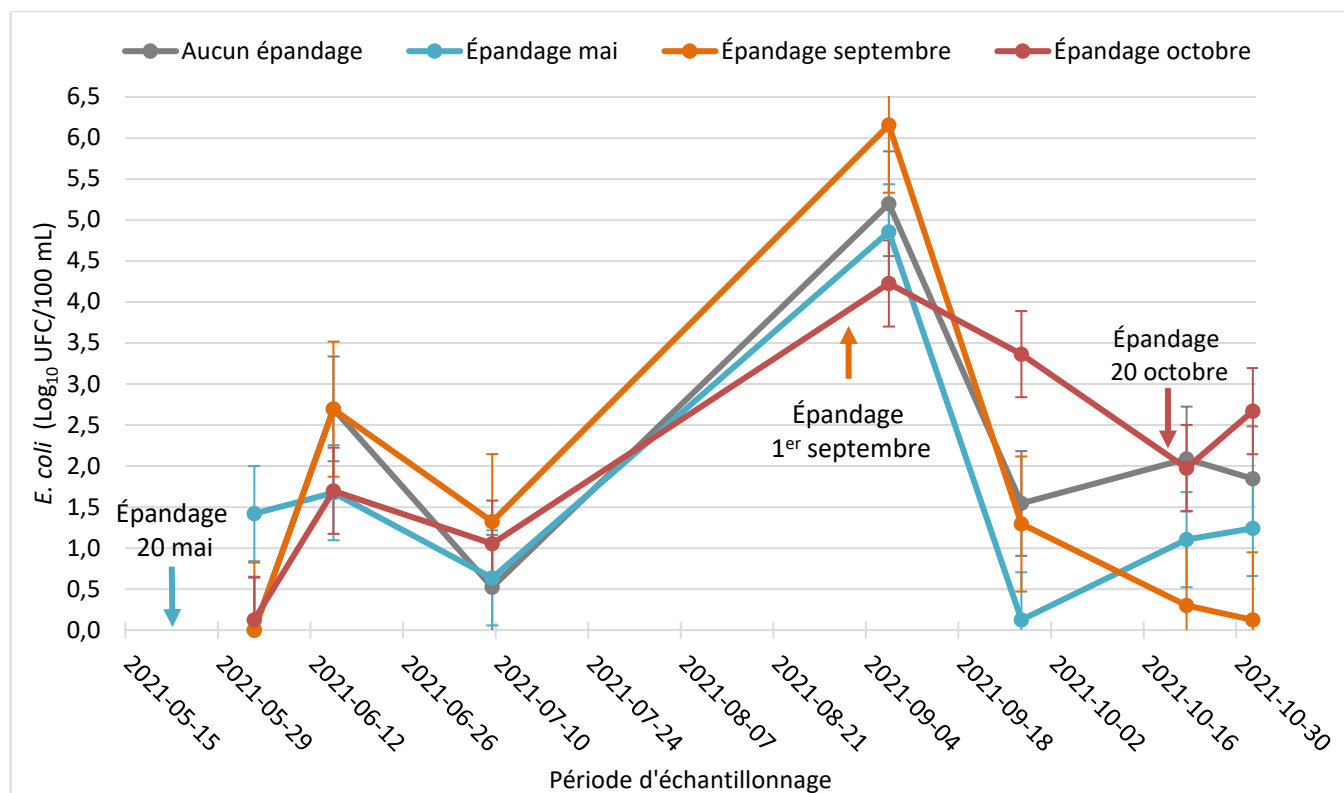


Figure 34. Population d'*E. coli* dans l'eau de ruissellement du champ principal loam argileux. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard.

La concentration de l'ADN dans l'eau de ruissellement a varié entre 18,45 et 375,75 ng/μl et la pureté (DO mesurée à 260/280) entre 1,795 et 2,260. Les volumes d'eau filtrés pour l'extraction d'ADN ont varié entre 50 et 250 ml. Le maximum d'eau de ruissellement a été filtré dans un délai maximal d'une heure et la quantité d'eau recueillie n'a jamais été un facteur limitant, tel qu'observé avec l'eau des piézomètres. La concentration d'ADN obtenue n'a pas varié en fonction du volume d'eau filtré.

Le marqueur BacGen a eu une limite de détection qui variait entre 44 et 224 copies/100 ml d'eau de ruissellement. Les concentrations en marqueur BacGen dans l'eau de ruissellement ont varié durant toute la saison, mais elles étaient similaires entre elles à chaque date d'échantillonnage (Figure 35). Dans les échantillons d'eau du 22 octobre, il est possible de constater que la moyenne des concentrations en BacGen était plus élevée dans les parcelles n'ayant pas reçu de fertilisant (aucun épandage) et celles ayant été fertilisées depuis 154 jours (épandage mai). Ceci pourrait s'expliquer, entre autres, par les précipitations élevées survenues dans les jours précédents cet échantillonnage. Les résultats de chaque parcelle étaient d'ailleurs variables pour un même traitement (entre $4,9 \times 10^6$ et $6,52 \times 10^8$ copies/100 ml dans les parcelles avec aucun épandage).

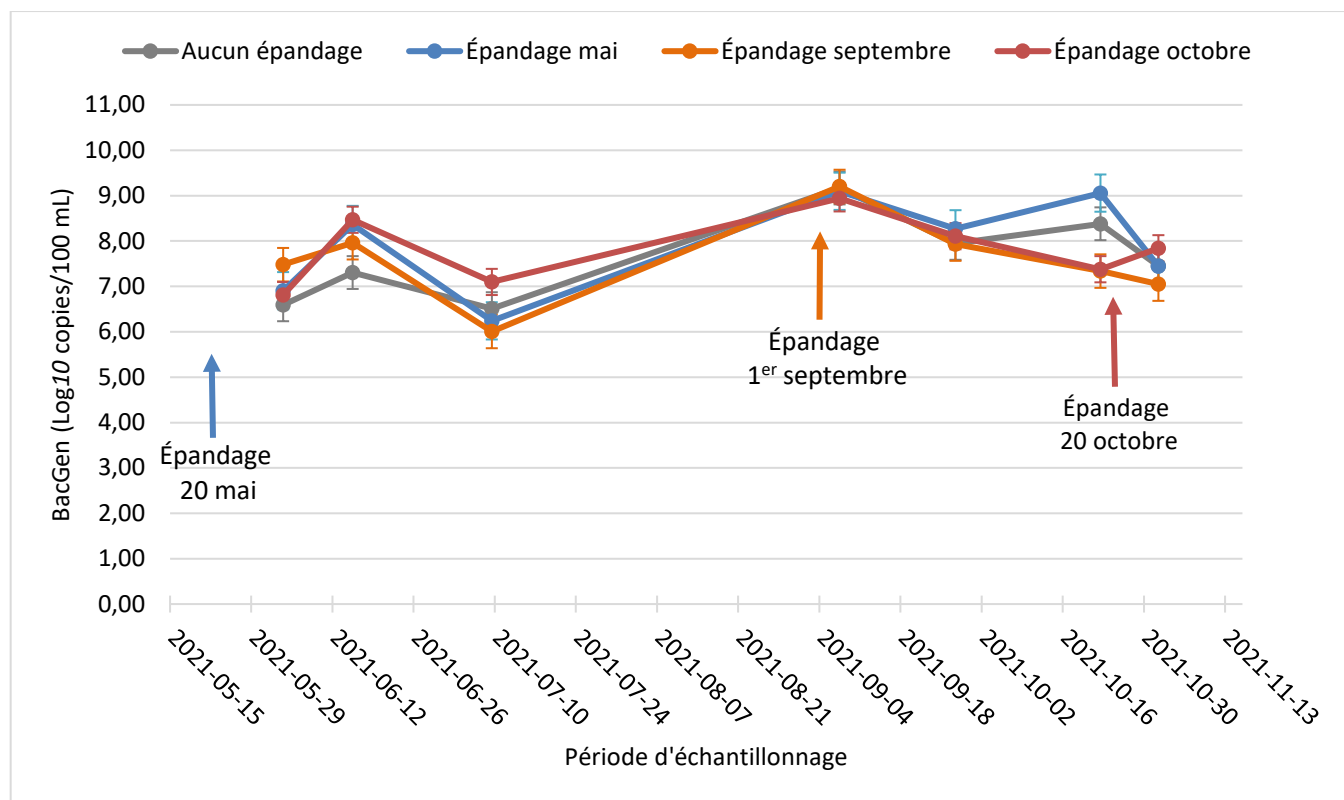


Figure 35. Concentration moyenne du marqueur général BacGen dans l'eau de ruissellement du champ principal en loam argileux. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard.

Le marqueur Pig-1-Bac a été retrouvé dans huit échantillons d'eau de ruissellement (Tableau 39). La présence du marqueur porcin ne variait pas selon les traitements. Cependant, Pig-1-Bac a été détecté dans six échantillons d'eau du 22 octobre, 2 jours après un épandage de lisier de porc dans les parcelles 4, 7 et 12. L'échantillon du 1^{er} novembre avait une concentration en marqueur porcin plus élevée (6,39 Log₁₀ copies/100 ml d'eau) que dans les autres échantillons trouvés positifs de la saison. Pour sa part, le marqueur Pig-1-Bac avait une limite de détection se situant entre 77 et 394 copies/100 ml d'eau de ruissellement. Le marqueur spécifique Chicken/Duck-Bac a été retrouvé dans 4 échantillons d'eau de ruissellement lors de l'échantillonnage du 7 septembre. La concentration de celui-ci variait entre 3,47 et 3,88 Log₁₀ copies/100 ml dans les échantillons d'eau provenant des parcelles fertilisées en mai (parcelles 2, 5 et 11; 109 jours après l'épandage) tandis qu'elle était de 4,70 Log₁₀ copies/100 ml dans l'échantillon d'eau provenant de la parcelle 6 fertilisée le 1^{er} septembre (6 jours après l'épandage).

Tableau 39. Concentration du marqueur Pig-1-Bac dans les échantillons trouvés positifs d'eau de ruissellement provenant des parcelles en loam argileux (n=8).

Date d'échantillonnage 2021	Date d'épandage 2021	Parcelle	Pig-1-Bac	
			Copies /100 ml	Log ₁₀ copies /100 ml
27 septembre	20 mai	2	1,31 x 10 ³	3,12
22 octobre	Aucun	1	1,82 x 10 ³	3,26
22 octobre	20 octobre	4	1,00 x 10 ⁴	4,00
22 octobre	20 octobre	7	1,58 x 10 ³	3,20
22 octobre	Aucun	9	8,93 x 10 ²	2,95
22 octobre	20 mai	11	6,67 x 10 ²	2,82
22 octobre	20 octobre	12	1,85 x 10 ⁴	4,27
1 ^{er} novembre	20 octobre	4	2,46 x 10 ⁶	6,39

6.3.4 Échantillons de lisier de porc et de fumier de bovin utilisés pour les épandages dans les parcelles en loam sableux et argile lourde

Le taux de matières sèches mesuré dans le lisier de porc et le fumier de bovin était respectivement de 16,62% et 28,95% (Tableau 40). La masse volumique du lisier de porc était de 1,05 g/ml. Celle du fumier de bovin était de 0,33 g/ml. D'ailleurs, il a été noté que le fumier de bovin contenait plusieurs morceaux de ripe et de paille, ce qui peut expliquer sa faible masse volumique et son taux en matières sèches plus élevé. Les populations en bactéries *E. coli* dans les échantillons de lisier de porc et de fumier de bovin ont été présentées sur une base humide et sèche. Les bactéries *E. coli* avaient une concentration de 6,27 Log₁₀UFC/g_s dans le lisier de porc, tandis qu'elles n'ont pas été retrouvées dans l'échantillon de fumier de bovin (sous la LOD de la méthode). La nature sèche de l'échantillon pourrait expliquer ce résultat en affectant la survie des bactéries *E. coli*.

Tableau 40. Populations en bactéries *E. coli* dans les échantillons de fumier de bovin et de lisier de porc utilisés lors des épandages sur les sols de type argile lourde et loam sableux.

Échantillon	Date d'échantillonnage 2021	Matières sèches	Masse volumique	<i>E. coli</i>			
		%	g/ml	UFC /g _h	Log ₁₀ UFC /g _h	UFC /g _s	Log ₁₀ UFC /g _s
Lisier de porc	25 mai	16,62	1,05	310 000	5,49	1 865 138	6,27
Fumier de bovin	7 juin	28,95	0,33	10*	1,00	17	1,24

*Correspond à la limite de détection de la méthode de dénombrement des *E. coli* sur Petrifilms qui est de 10 UFC/g_h.

Les concentrations en marqueur BacGen mesurées dans le fumier de bovin étaient plus petites que celles mesurées dans le lisier de porc (Figure 36). Une différence de 1,45 Log₁₀ copies de BacGen/g_s a été mesurée entre les deux fertilisants alors qu'elle a été de 5,03 Log₁₀ UFC/g_s pour les populations d'*E. coli*. Le marqueur porcin Pig-1-Bac a été mesuré dans le lisier de porc à 9,57 Log₁₀ copies/g_s. Le marqueur ciblant les canards et les poulets, Chicken/Duck-Bac, avait une concentration de 6,01 Log₁₀ copies/g_s de lisier de porc. Aucun marqueur spécifique n'a été détecté dans le fumier de bovin.

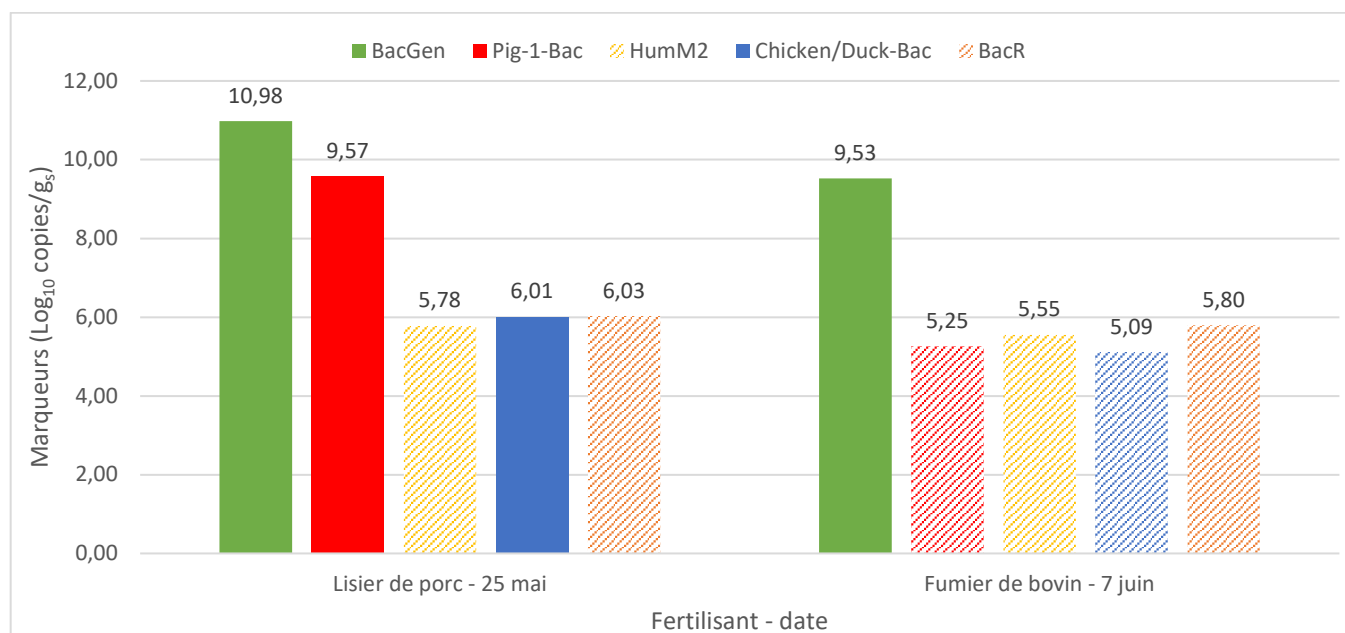


Figure 36. Concentration du marqueur général BacGen et des marqueurs spécifiques dans le lisier de porc et le fumier de bovin. Les bandes hachurées correspondent à des résultats qui sont sous la limite de détection et n'ont pas été détectés au qPCR.

6.3.5 Échantillons de sol et d'eau provenant des parcelles de sol de type loam sableux et argile lourde

Les populations en bactéries *E. coli* ont augmenté à la suite des épandages de lisier de porc et de fumier de bovin dans les échantillons de sol en argile lourde (Figure 37). Les populations ont été plus élevées le 28 juin dans la parcelle de maïs-grain fertilisée avec du lisier de porc que les autres parcelles. Elles ont d'ailleurs persisté plus longtemps dans la saison avant de rediminuer après le 9 juillet. La dose élevée de lisier de porc appliquée, soit 50 m³/ha, pourrait expliquer une partie de ce phénomène. Les populations semblent avoir diminué plus rapidement durant la saison dans les parcelles fertilisées avec du fumier de bovin que dans celles ayant reçu du lisier de porc, le contenu initial faible du fumier en *E. coli* (10 UFC/g_h correspondant à la LOD) pouvant expliquer la situation. Cependant, une augmentation des populations d'*E. coli* a été observée dans le sol échantillonné à l'automne, le 2 novembre, dans la parcelle de maïs-grain fertilisée avec du fumier de bovin ainsi que dans celle cultivée en blé et fertilisée avec du lisier de porc.

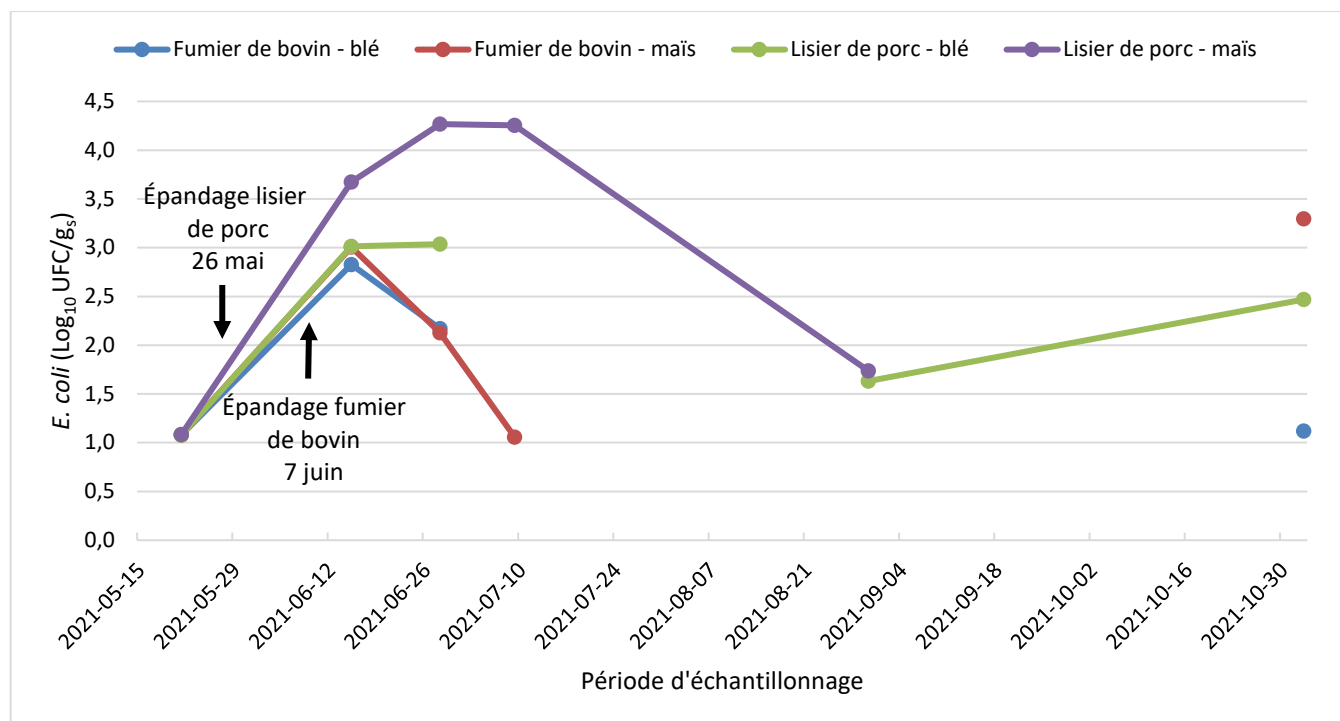


Figure 37. Population d'*E. coli* dans le sol en argile lourde. La limite de détection des bactéries *E. coli* par la méthode des Petrifilms est de 10 UFC/g_h (1 Log₁₀ UFC/g_h). Il y a des dates où il n'y avait pas d'échantillon, ce qui explique qu'il n'y ait parfois pas de liaison entre deux points.

Les concentrations en marqueur BacGen dans les parcelles en sol de type argile lourde ont aussi augmenté à la suite des épandages de lisier de porc et de fumier de bovin (Figure 38). Elles ont été plus élevées à l'automne, le 2 novembre, dans les parcelles fertilisées avec du lisier de porc.

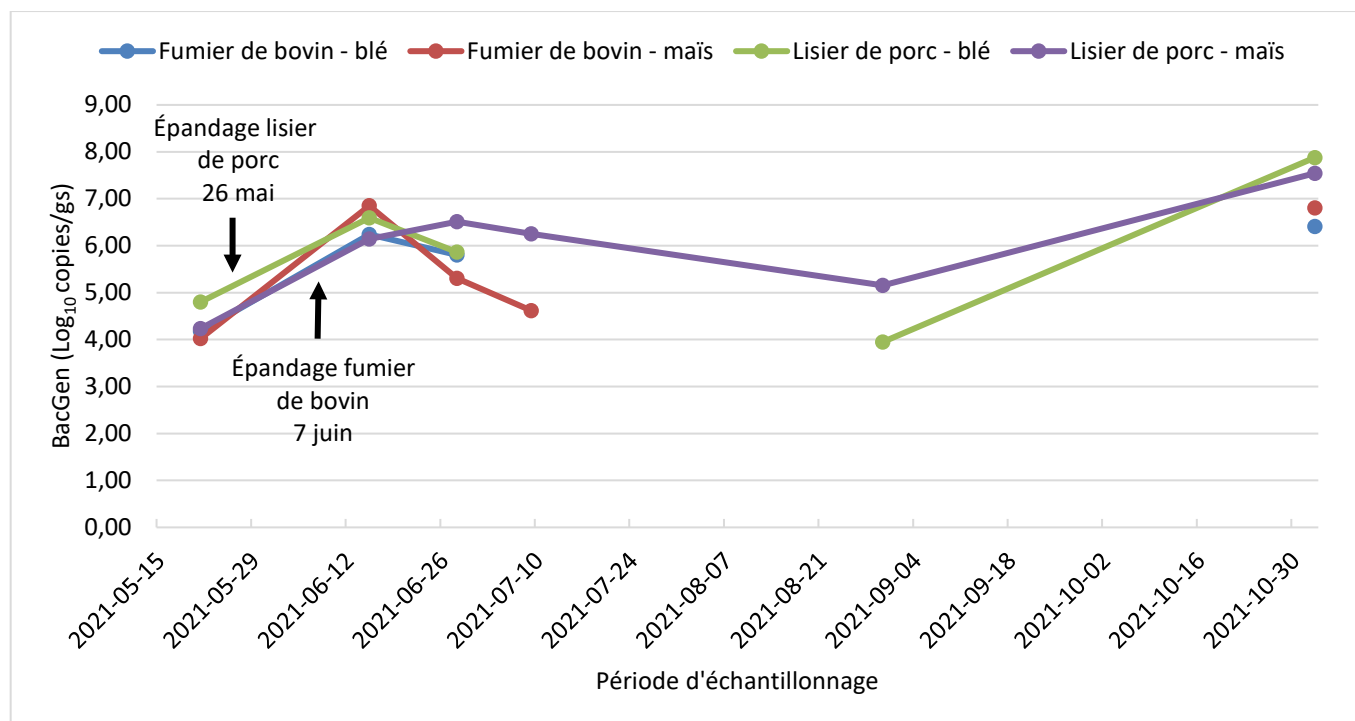


Figure 38. Concentration du marqueur général BacGen dans le sol de type argile lourde. Il y a des dates où il n'y avait pas d'échantillon, ce qui explique qu'il n'y ait parfois pas de liaison entre deux points.

Les populations de bactéries *E. coli* dans le sol de type loam sableux n'ont pas augmenté dans toutes les parcelles à la suite des épandages (Figure 39), tel qu'observé dans le sol en argile lourde. En effet, ce sont principalement les deux parcelles fertilisées avec du lisier de porc qui ont eu une augmentation importante des concentrations d'*E. coli*. Elles ont cependant diminué durant la saison pour atteindre des concentrations en bactéries similaires entre les parcelles, sauf pour la parcelle fertilisée avec du fumier bovin et cultivée en blé dont les bactéries *E. coli* étaient sous la limite de détection de la méthode durant toute la saison.

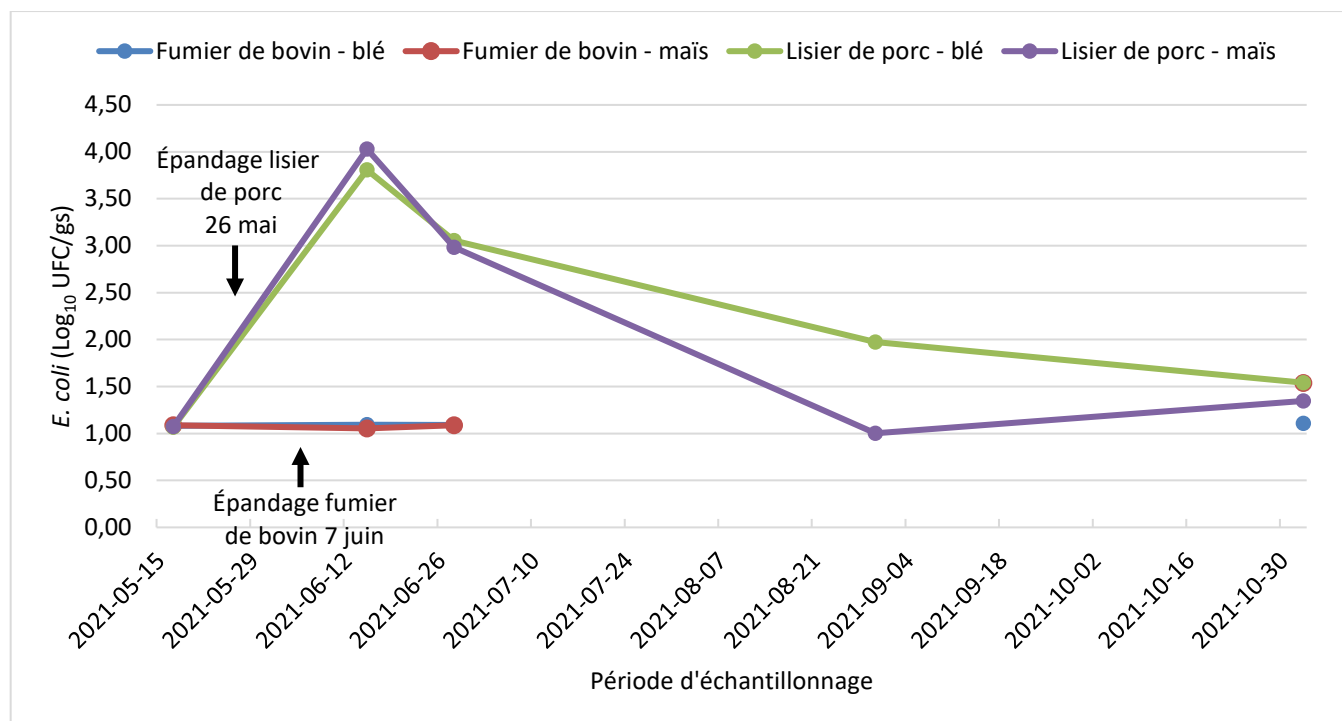


Figure 39. Population d'*E. coli* dans le sol loam sableux. La limite de détection des bactéries *E. coli* par la méthode des Petrifilms est de 10 UFC/g_h (1 Log₁₀ UFC/g_h). Il y a des dates où il n'y avait pas d'échantillon, ce qui explique qu'il n'y ait parfois pas de liaison entre deux points.

Le marqueur BacGen mesuré dans les échantillons de sol loam sableux avait des concentrations entre 4,35 et 5,88 Log₁₀ copies/g_s au début de la saison et elles ont légèrement augmenté à la suite des épandages (Figure 40). Contrairement aux échantillons de sol en argile lourde, les concentrations ont diminué par la suite sous la limite de détection de la méthode qPCR de juin à août, pour finalement remonter à l'automne à des concentrations similaires à celles observées au début de la saison.

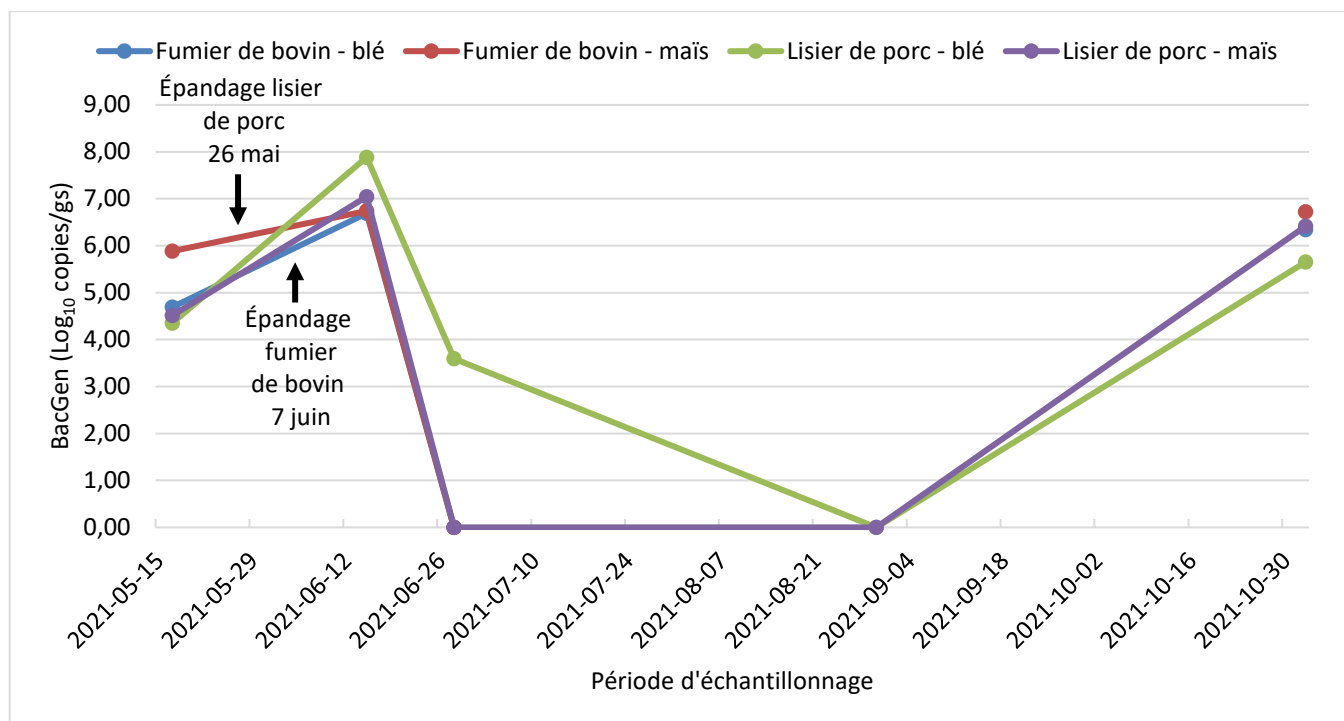


Figure 40. Concentration du marqueur général BacGen dans le sol loam sableux. Les valeurs à 0 correspondent à des valeurs sous la limite de détection variant entre 50,25 et 54,75 copies/g_s (1,70 à 1,73 Log₁₀ copies/g_s). Il y a des dates où il n'y avait pas d'échantillon, ce qui explique qu'il n'y ait parfois pas de liaison entre deux points.

Les populations en bactéries *E. coli* dans les six échantillons d'eau des piézomètres recueillis ont varié entre 0,00 et 3,91 Log₁₀ UFC/100 ml (Tableau 41). Étant donné que les volumes d'eau qui étaient souvent insuffisants pour la réalisation de l'extraction d'ADN génomique, la présence des marqueurs a pu être analysée dans seulement deux échantillons d'eau des piézomètres du 9 juillet. L'eau provenant de la parcelle 13 (maïs-grain; fumier de bovin) ne contenait aucun marqueur tandis que celle de la parcelle 14 (maïs-grain; lisier de porc) contenait le marqueur BacGen à une concentration de $3,98 \times 10^6$ copies/100 ml (6,60 Log₁₀ copies/100 ml).

Tableau 41. Populations des bactéries *E. coli* dans les échantillons d'eau des piézomètres provenant des parcelles de sol en argile lourde et loam sableux (n=6).

Date d'échantillonnage 2021	Type de sol	Culture	Fertilisant	Parcelle	Populations d' <i>E. coli</i>	
					UFC /100 ml	Log ₁₀ UFC /100 ml)
9 juillet	Argile lourde	Maïs-grain	Fumier de bovin	13	13	1,11
9 juillet	Argile lourde	Maïs-grain	Lisier de porc	14	660	2,82
2 novembre	Argile lourde	Maïs-grain	Lisier de porc	14	8148	3,91
2 novembre	Argile lourde	Blé	Fumier de bovin	15	296	2,47
2 novembre	Argile lourde	Blé	Lisier de porc	16	2*	0,00
2 novembre	Loam-sableux	Maïs-grain	Fumier de bovin	17	2*	0,00

*Sous la limite de détection de la méthode.

6.4 BILAN

Dans le cadre des essais réalisés, les épandages de lisier de porc et de fumier de bovin ont généralement fait augmenter les populations de bactéries *E. coli* et les concentrations du marqueur BacGen dans le sol. Cependant, cela n'a pas été observé après tous les épandages dans les échantillons d'eau de ruissellement et des piézomètres. Ces résultats supposent donc que le transport des *Bacteroidetes* et leur ADN dans l'eau ne survient pas systématiquement à la suite d'une contamination du sol par un épandage. En effet, les voies préférentielles d'écoulement de l'eau dans le sol, le niveau de saturation du sol en eau ainsi que les conditions météorologiques sont des exemples de facteurs qui peuvent influencer le transport (Jamieson *et al.*, 2002). Le délai entre l'épandage et l'événement de ruissellement peut aussi affecter la survie et le transport des bactéries et les marqueurs *Bacteroidetes* (Larouche *et al.*, 2020). Il est important de noter que les essais ont été réalisés avec un nombre limité de types de fumiers. Bien que ceux-ci soient un exemple de ce qui peut être épandu au Québec, d'autres essais sont nécessaires afin d'évaluer l'impact de la gestion des fumiers à la ferme sur la présence des marqueurs génétiques. Le but des essais réalisés était de développer une méthode de détection de la source de contamination fécale et non pas de dresser le portrait des conditions rencontrées dans l'ensemble du Québec.

Selon les résultats obtenus, il est possible de retrouver le marqueur général BacGen à des concentrations élevées dans le sol, peu importe si ces derniers ont été récemment contaminés ou non. En effet, BacGen était généralement présent à des concentrations élevées dès le début de la saison au printemps, avant le premier épandage. Ce marqueur a persisté à des concentrations similaires durant toute la saison dans le sol de type argile lourde contrairement aux concentrations mesurées dans les échantillons de sol de type loam sableux. La saison où l'échantillonnage est entrepris pourrait aussi augmenter les populations de bactéries *E. coli* et les concentrations du marqueur BacGen. Il a été observé que les populations d'*E. coli* et les concentrations de BacGen augmentaient à la fin octobre dans les parcelles en sol de type argile lourde et loam sableux, même si elles n'avaient pas reçu de lisier de porc ou de fumier de bovin dans les dernières semaines. Il est possible que les températures plus fraîches à cette période de l'année aient favorisé la survie des bactéries d'origine fécale dans le sol, étant donné qu'il y a naturellement moins de compétition avec la microflore indigène (Jamieson *et al.*,

2002). Les températures enregistrées aux mois d'octobre et de novembre étaient effectivement plus basses qu'en mai. Des rongeurs, des dindons sauvages, ainsi que des Bernaches du Canada ont aussi été aperçus dans ces parcelles durant la période d'échantillonnage, ce qui pourrait expliquer, en partie, l'augmentation du marqueur BacGen en octobre. Il a aussi été observé que les concentrations du marqueur BacGen dans le sol des parcelles non fertilisées diminuaient aux mois de juillet et août, lorsque les températures moyennes augmentent et que les précipitations diminuent. Dans la même optique, une hausse des températures favorise la microflore du sol et ainsi la compétition avec les microorganismes d'origine fécale qui ne sont pas adaptés à un tel milieu. La sécheresse peut également avoir eu un impact négatif sur la survie des populations bactériennes (Cruz-Paredes *et al.*, 2021).

Le marqueur Pig-1-Bac a pu être retrouvé dans des échantillons de loam argileux, d'eau des piézomètres et de ruissellement à la suite de l'épandage d'automne. Le même effet des températures fraîches est une hypothèse. Aussi, les quantités de pluie suivant l'épandage du 20 octobre étaient plus grandes que lors des épandages précédents. Le maintien d'une humidité élevée dans le sol a effectivement pu favoriser la survie des microorganismes.

Les populations de bactéries *E. coli* étaient sous la limite de détection de la méthode dans le fumier de bovin utilisé pour l'épandage des parcelles en sol de type loam sableux et argile lourde. Malgré cela, les concentrations en marqueur BacGen étaient similaires à celles mesurées dans le lisier de porc (environ 1 Log₁₀ copies/g sec de moins). La présence d'ADN provenant de *Bacteroidetes* n'a cependant pas été suffisante pour détecter le marqueur BacR dans le fumier de bovin, le sol et l'eau. Le fait que ce marqueur ne cible pas une grande variété de séquences de bactéries différentes pourrait justement expliquer ces résultats.

Finalement, le marqueur Chicken/Duck-Bac a montré de la non-spécificité dans les échantillons de lisier de porc. Malgré cela, ce marqueur n'a pas été retrouvé dans tous les échantillons de sol et d'eau à la suite des épandages. Ainsi, il est probable que cette non-spécificité ne soit pas détectée en tout temps dans l'eau d'un bassin versant ou que la concentration du marqueur soit sous les limites de détection qPCR lorsque celle-ci est reliée à une contamination fécale d'origine porcine. Il faudra se questionner sur l'importance de la contamination mesurée par ce marqueur dans l'eau d'un bassin versant lorsque le résultat sera près de la limite de détection de la méthode, en comparant le résultat avec celui des autres marqueurs tels que BacGen et Pig-1-Bac.

7 VALIDATION DE LA PROCÉDURE DÉVELOPPÉE SUR LE TERRAIN

La prochaine étape de ce projet d'envergure était de valider la méthode développée en conditions réelles de terrain. Ainsi, le principal objectif visé était d'appliquer la procédure de détermination des sources de contamination fécale en bassins versants. L'objectif ultime du mandat, soit de faire des recommandations sur les données et observations terrain à acquérir pour faciliter l'interprétation des résultats, est présenté à la section 8.

7.1 MÉTHODOLOGIE

Trois bassins versants présentant des occupations du territoire variées ont été ciblés pour les fins de l'étude, soit le bassin versant du Lac Boivin (Montérégie), de la rivière du Chicot (Laurentides) et du ruisseau au Castor (Montérégie). Entre mars et novembre 2022, des échantillons d'eau de surface ont été pris à chaque semaine et envoyés au laboratoire de l'IRDA à St-Bruno-de-Montarville afin de mesurer les populations d'*E. coli* (méthode CEAEQ MA. 700 – Ec.BCIG 1.0) et de quantifier les cinq marqueurs présentés précédemment (BacGen, HumM2, Pig-1-Bac, BacR et Chicken/Duck-Bac). L'eau était prélevée dans des bouteilles de polypropylène stériles et conservées au frais à l'abri de la lumière jusqu'à la filtration sur membrane réalisée généralement dans les 24 heures, mais parfois dans les 48 heures en raison des délais causés par les envois par messagerie. Selon la turbidité des échantillons, le plus grand volume possible était filtré pour quantifier les *E. coli* et pour l'extraction d'ADN, jusqu'à un maximum de 250 ml et 1 litre, respectivement.

L'ADN contenu dans ces échantillons a été extrait dans un délai de 72 heures ou congelés jusqu'à l'extraction d'ADN à l'aide du kit d'extraction *Fast DNA SPIN Kit for Soil™* en combinaison avec le système FastPrep® de la compagnie MP Biomedicals (protocoles détaillés aux Annexes 4 et 13). Ensuite, la concentration des marqueurs *Bacteroidetes* dans les échantillons a été déterminée en suivant le protocole détaillé à l'Annexe 6. La limite de détection (LOD) de chaque marqueur dans les échantillons d'eau a été rapportée sur un volume d'eau de 100 ml (nb copies/100 ml). L'ADN génomique total des échantillons de lisier de porc, des lisiers et fumiers de bovin a été extrait à partir du kit d'extraction *Fast DNA SPIN Kit for Feces™* en combinaison avec le système FastPrep® de la compagnie MP Biomedicals (protocole détaillé à l'Annexe 3).

7.1.1 Amélioration de la sensibilité du marqueur BacR avec la méthode qPCR

Bien que BacR soit un marqueur ciblant les ruminants, il était parfois non détecté dans des échantillons de fumier et de lisier de bovins. Il était aussi rarement détecté dans des échantillons d'eau. Ainsi, afin d'améliorer la sensibilité du marqueur BacR, des essais qPCR ont été réalisés en augmentant la température de dénaturation et d'hybridation des amorces, ainsi que le protocole d'amplification en retirant l'élongation finale de 1 minute réalisée à 72°C. L'augmentation de la température de dénaturation a pour objectif d'aider l'ADN surenroulé à mieux se dénaturer, tandis que l'augmentation de la température d'hybridation peut permettre d'augmenter la sensibilité de détection du marqueur, mais la spécificité peut diminuer ou rester la même. Aussi, la plupart des

études ont réalisé l'hybridation des amorces BacR à 60 °C (Linke *et al.*, 2021 ; Mieszkin *et al.*, 2009 ; Piorkowski *et al.*, 2014 ; Reischer *et al.*, 2006). Un gradient de température a été refait avec le standard BacR en évaluant huit températures entre 53 et 63°C. La concentration des réactifs tels que les amorces et la sonde n'ont pas été modifiés. Cette fois-ci, des échantillons de lisiers et de fumiers de bovins ont aussi été analysés avec le standard BacR sur la plaque qPCR du gradient. Cela visait à comparer l'effet de la température d'hybridation sur la détection du marqueur BacR dans des échantillons environnementaux censés le contenir. De plus, des échantillons de fumier (n=7) et de lisier (n=3) de bovins, des échantillons de lisier de poules (n=1), de fumier de poulets (n=1), de fèces humaines (n=1), ainsi que des fèces de chevreuil (n=1) ont été testés sur une autre plaque qPCR afin de valider la spécificité de la méthode avec les nouvelles conditions d'amplification.

7.1.2 Bassin versant du Lac Boivin

Le site a été choisi en collaboration avec l'organisme de bassin versant de la rivière Yamaska (OBV Yamaska). L'équipe de l'OBV était également responsable de l'échantillonnage hebdomadaire et de l'envoi à l'IRDA.

Voici les principales caractéristiques d'intérêt du bassin versant du Lac Boivin :

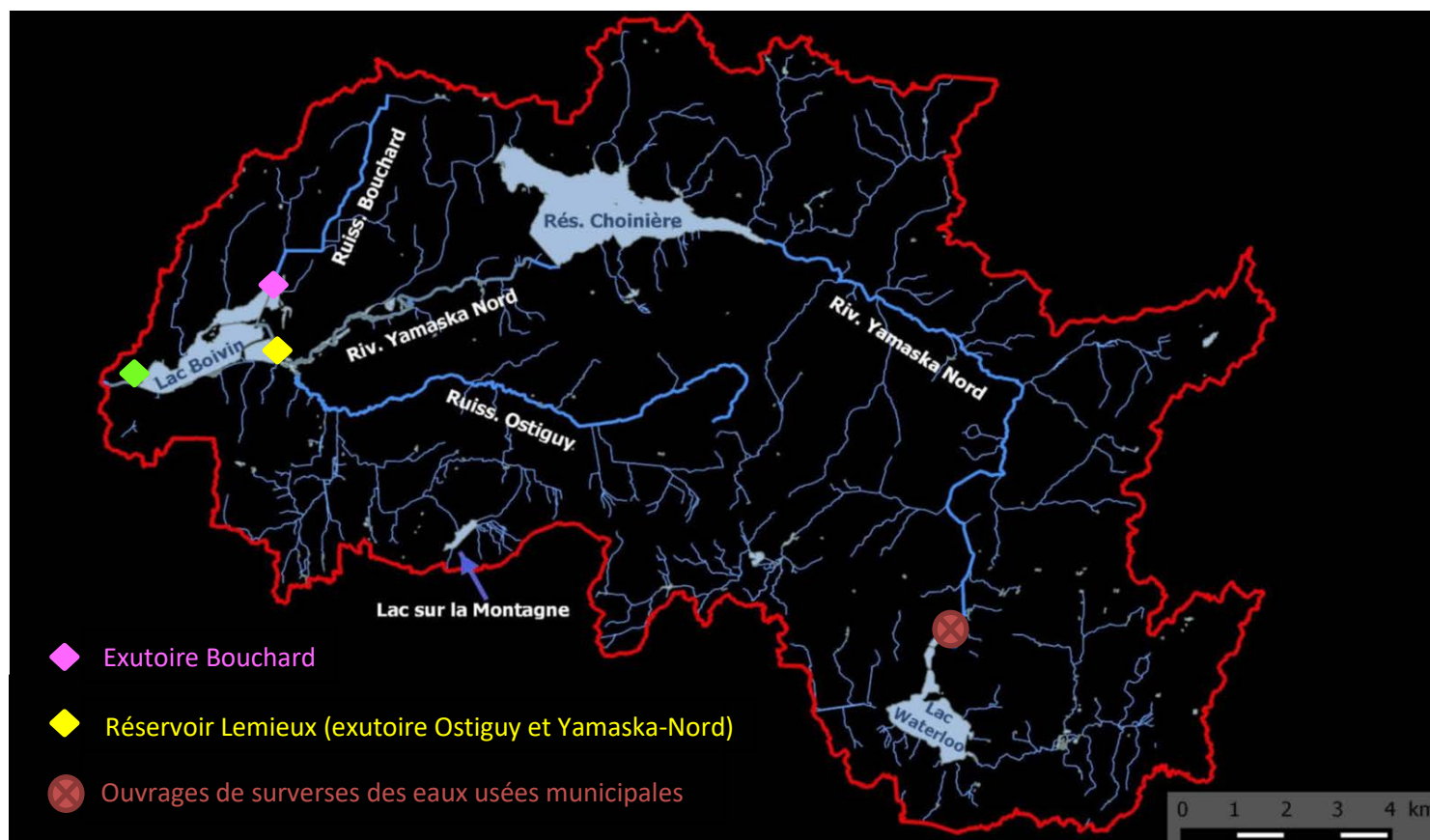
- Villes concernées : plusieurs, dont les principales sont Waterloo et Granby
- 212 km²;
- 21 375 habitants (101 habitants/ km²);
- 8 380 unités animales (validation des données en cours au MAPAQ lors de la rédaction du rapport de l'OBV Yamaska en 2018)
 - o Les données déclarées au MAPAQ avant 2018 faisaient état de 6 549 unités animales (2 520 bovins laitiers > 2 176 porcs > 729 bovins de boucherie > 802 veaux lourds > 285 volailles > 37 chevaux);
- Occupation du territoire :
 - o 56 km² agricole cultivé;
 - o 122 km² boisé;
 - o 25 km² urbain;
 - o 15 km² milieux humides (chevauchement avec milieux urbains et boisés);
- Six ouvrages de surverses des eaux usées municipales (ville de Waterloo);
- 11 000 habitations hors réseau.

En amont du lac, le bassin versant peut être divisé en trois sous-bassins, dont voici les caractéristiques :

- Rivière Yamaska-Nord :
 - o 185 km²
 - o débit moyen de 5 m³/s
 - o Occupation du territoire : forestier (61 %), agricole (24 %), urbanisé (9 %)
- Ruisseau Ostiguy :
 - o 37 km²
 - o débit moyen de 2.11 m³/s
 - o Occupation du territoire : forestier (55 %), agricole (27 %), urbanisé (15 %)
- Ruisseau Bouchard :
 - o 10 km²
 - o débit moyen de 0.77 m³/s

- Occupation du territoire : forestier (54 %), agricole (43 %), urbanisé (3 %)

Deux points d'échantillonnage ont été ciblés, soit le réservoir Lemieux, qui représente l'exutoire des bassins Yamaska-Nord et Ostiguy, ainsi que l'exutoire du sous-bassin du ruisseau Bouchard, près de l'entrée du Lac Boivin. La prise d'échantillons au réservoir Lemieux a été assurée par les gens de la Ville de Granby, à la station de traitement de l'eau potable. La Figure 41 montre l'ensemble du bassin versant, ainsi que les points d'échantillonnage. Un total de 62 échantillons d'eau ont été recueillis. La Figure 42 présente des photos du site d'échantillonnage au ruisseau Bouchard.



Adapté de OBV Yamaska, 2018³.

Figure 41. Bassin versant du Lac Boivin, points d'échantillonnage de l'eau en 2022 et sites de surverses.

³ OBV Yamaska, 2018. Caractérisation, portrait agricole et plan d'Action pour le bassin versant du Lac Boivin – Rapport final phase I réalisé dans le cadre du Programme Prime-Vert volet 2.1. 87 pages.



Figure 42. Photos du site d'échantillonnage à l'exutoire du Ruisseau Bouchard prises à différentes dates en 2022.

7.1.3 Bassin versant de la rivière du Chicot

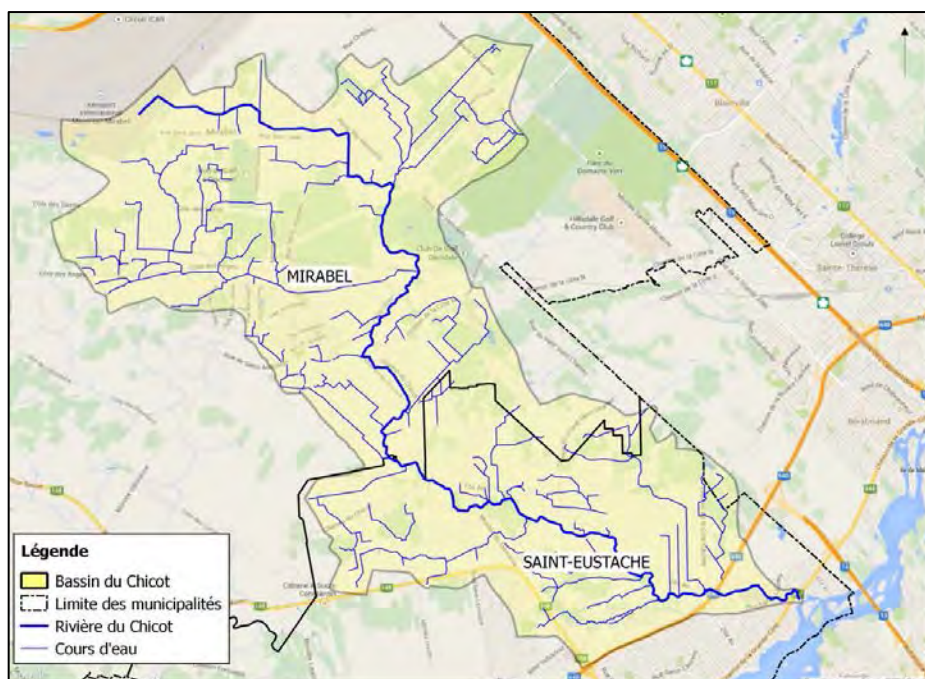
Le bassin versant de la rivière du Chicot, un des tributaires de la Rivière des Mille Îles dans les Laurentides, a été choisi en collaboration avec le MELCCFP, puisque ce site fait partie d'une étude en cours au sein du Ministère. Ce sont les gens du club Profit-eau-sol qui s'occupaient des échantillonnages et de l'envoi des échantillons.

Voici les principales caractéristiques d'intérêt du bassin versant (données de caractérisation 2015) :

- Villes concernées : St-Eustache, Mirabel, Boisbriand (petite superficie)
- 77 km²
- Longueur totale du cours d'eau principal et ses tributaires : 156 km
- 22 000 personnes (taux de 285 habitants/ km²)
- 96 entreprises agricoles
- 1 101,3 unités animales (données MAPAQ 2010 : 745,5 bovins laitiers > 179,5 bovins de boucherie > 81 chevaux > 76 volailles > 10,64 ovins > 8,66 porcs)
- Probablement davantage de chevaux que ce qui est enregistré, car plusieurs propriétaires avec 1-2 chevaux
- Occupation du territoire :
 - o 31,1 km² agricole cultivé (40 %)
 - o 16,1 km² forêts (21 %)
 - o 14,4 km² résidentiel et routes (19 %)
 - o 13 km² friches et superficie non cultivée (17 %)
 - o 2,7 km² milieux humides (3 %)
- Sept (7) ouvrages de surverses des eaux usées municipales, dont 6 à Mirabel (amont de la Rivière)
- Au moins 3 200 habitations hors réseau (Mirabel) (info manquante pour St-Eustache)

La Figure 43 présente le territoire couvert par le bassin versant de la rivière.

Un total de 61 échantillons d'eau ont été recueillis dans ce bassin versant.

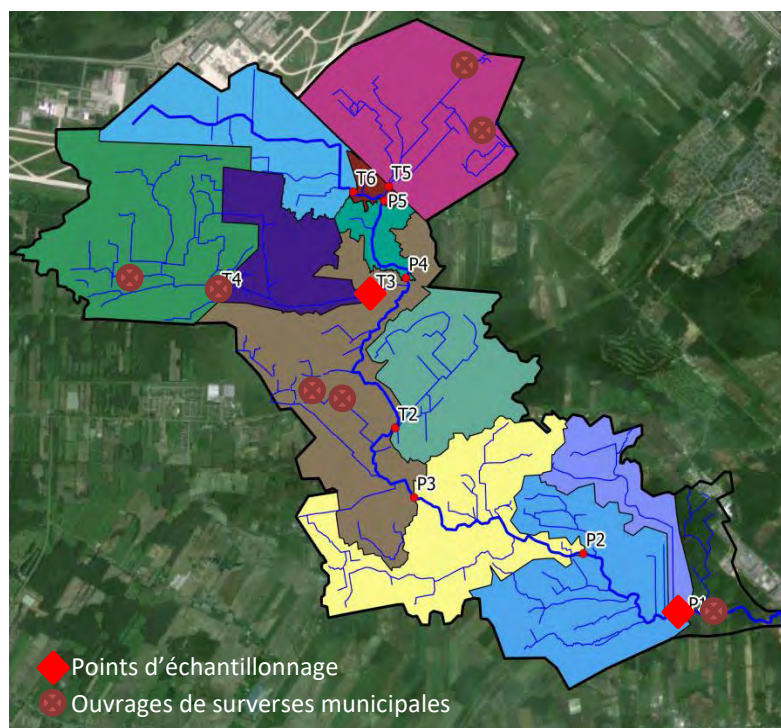


Tiré de Club Profit-eau-sol, 2015⁴.

Figure 43. Schéma du bassin versant de la rivière du Chicot.

Le bassin versant peut être divisé en neuf sous-bassins liés aux principaux tributaires de la rivière du Chicot (Figure 44). Deux points d'échantillonnage de l'eau ont été ciblés et ce, en fonction du risque accru de contamination fécale présent à ces sites. Le premier point est l'exutoire général de la rivière du Chicot vers la rivière des Mille-Îles, associé à la station P1 du projet du ministère de l'environnement. Le second point, à l'exutoire du ruisseau des Anges vers la rivière, est associé à la station T3 du projet gouvernemental. Ce sous-bassin a été choisi en raison de sa vocation plutôt agricole et de la présence d'un ouvrage de surverse des eaux usées sanitaires en amont de la station d'échantillonnage. Les Figures 45 et 46 montrent des photos du site à station P1 (exutoire), et à la station T3 (ruisseau des Anges), respectivement.

⁴ Club Profit-eau-sol, 2015. Rapport de caractérisation – Projet de gestion intégrée de l'eau par bassin versant en milieu agricole : Bassin versant de la Rivière du Chicot.



Adapté de Club Profit-eau-sol, 2015.

Figure 44. Sous-bassins versants de la rivière du Chicot, points d'échantillonnage ciblés en 2022 et ouvrages de surverses.



Figure 45. Sous-bassins versants de la rivière du Chicot et points d'échantillonnage ciblés en 2022.



Figure 46. Photos du site d'échantillonnage situé à l'exutoire du ruisseau des Anges vers la rivière du Chicot (station T3) à deux dates en 2022.

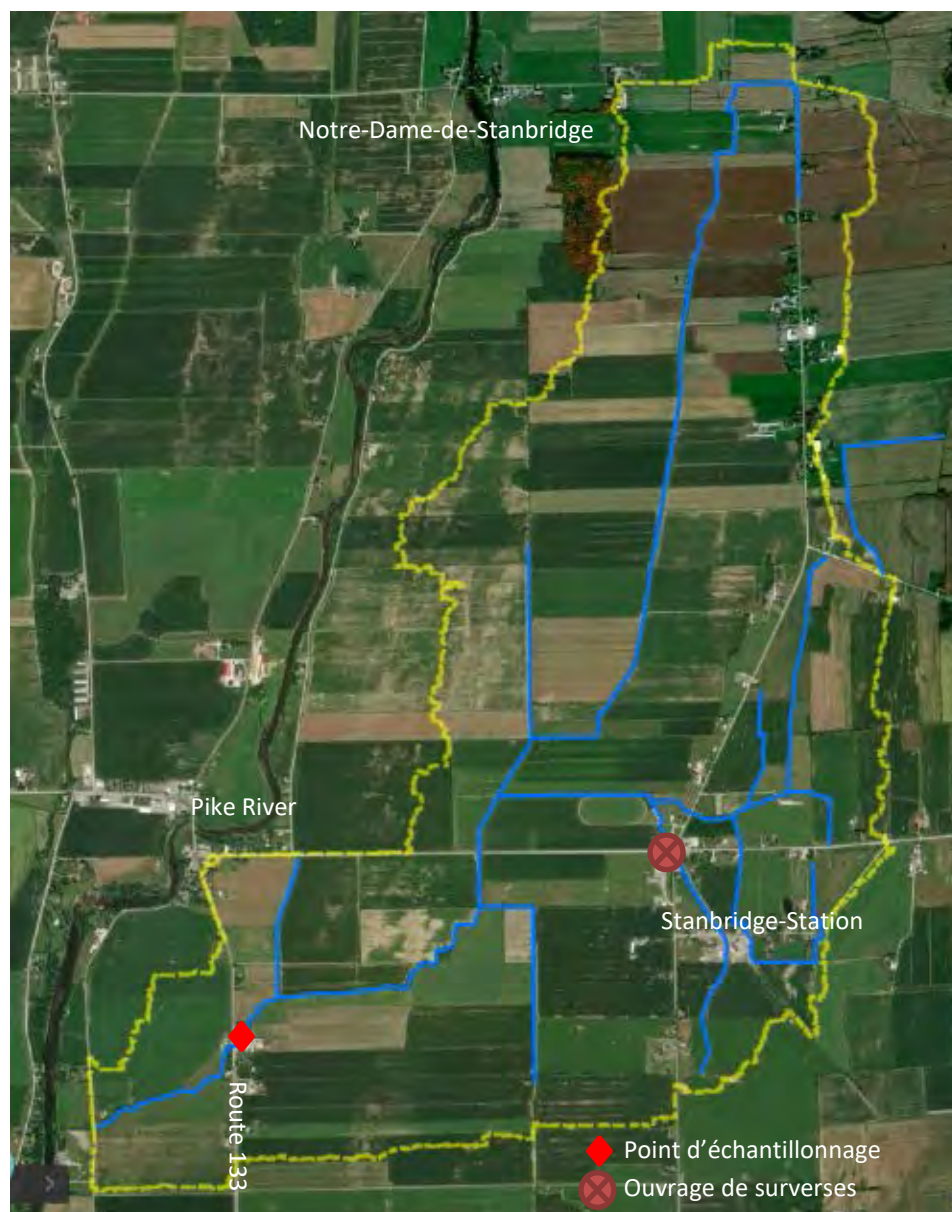
7.1.4 Bassin versant du Ruisseau au Castor

Le bassin versant du Ruisseau au Castor, un des tributaires de la Rivière-aux-Brochets en Montérégie, est un petit bassin versant à forte vocation agricole où un suivi de la qualité de l'eau et de nombreux projets de recherche ont été menés depuis 30 ans par l'IRDA et le MELCCFP. Le suivi actuel est chapeauté par l'INRS. C'est l'équipe de l'IRDA qui procédait à chaque semaine à l'échantillonnage.

Voici les principales caractéristiques d'intérêt du bassin versant :

- Villes concernées : Notre-Dame-de-Stanbridge, Pike River, Stanbridge Station
- 12,3 km² (1 223,7 ha)
- 163 résidences = 375 personnes (taux d'occupation moyen à 2,3)
- 120 493 têtes (volaille (473 unités animales (u.a.) > porcs (320 u.a.) > bovins (772 u.a.) > chevaux (12 u.a.))
- Occupation du territoire :
 - 1 191 ha agricole cultivé (97,3 %)
 - 4,8 ha forêts et friches (0,39 %)
 - 26,2 ha résidentiel et routes (2,14 %)
 - 1,2 ha milieux humides (0,10 %)
 - 0,1 ha cours d'eau (< 0,01 %)
- Un ouvrage de surverses des eaux usées municipales

Étant donné la faible superficie du bassin versant, un seul point d'échantillonnage a été ciblé pour le projet. Il s'agit du même site où est placée la station de suivi de l'IRDA, soit à 1,2 km de l'exutoire du ruisseau dans la Rivière-aux-Brochets. La Figure 47 présente un schéma du bassin versant, de même que le point d'échantillonnage. La Figure 48 qui suit présente des photos du site.



Adapté de la carte interactive en ligne de l'INRS.

Figure 47. Schéma du bassin versant du Ruisseau au Castor et point d'échantillonnage en 2022.



Figure 48. Photos du site d'échantillonnage situé près de l'exutoire du ruisseau au Castor à deux dates en 2022.

Au total, trente échantillons d'eau ont été recueillis dans ce bassin versant. En plus de l'échantillonnage d'eau hebdomadaire, des échantillons de fumiers et de lisiers ont été prélevés dans les jours précédant leur épandage au champ et ont été analysés pour leur contenu en marqueurs génétiques. Ces analyses ont été rendues possibles grâce la collaboration de l'équipe du centre de recherche Agrinova.

Le Tableau 42 résume les trois bassins versants étudiés en 2022.

Tableau 42. Résumé des principales caractéristiques des trois bassins versants à l'étude.

	Ruisseau au Castor	Rivière du Chicot	Lac Boivin
Région	Montréal	Laurentides	Montréal
Superficie (km²)	12,3	77	212
Superficie agricole cultivée (%)	97.3	40	26
Habitants (nb)	375	22 000	21 375
Élevages (nb)	23	inconnu	66
Unités animales	1 577	1 101	8 380
Espèces majoritaires	Bovin, poulet	Humain, bovin	Bovin, porc
Ouvrages de surverse (nb)	1	7	4
Points d'échantillonnage	Exutoire du bassin versant	Exutoire du bassin versant (station P1) Exutoire d'un tributaire (station T3)	Exutoire d'un tributaire (station Bouchard) Prise d'eau potable de Granby (réservoir Lemieux)

7.2 RÉSULTATS

7.2.1 Résultats de l'amélioration de la sensibilité du marqueur BacR avec la méthode qPCR

L'objectif de cette mise au point tardive était d'améliorer la sensibilité du marqueur BacR en testant de nouvelles conditions d'amplification qPCR. Bien que les études n'aient pas documenté de problèmes de sensibilité dans les lisiers et fumiers de bovins (Linke *et al.*, 2021 ; Marti *et al.*, 2014 ; Mieszkina *et al.*, 2009 ; Piorkowski *et al.*, 2014 ; Reischer *et al.*, 2006), des nouvelles conditions d'amplification qPCR ont été testées et ont apporté les résultats escomptés. Seulement une plaque qPCR avec un gradient de température ainsi qu'une autre avec des échantillons ont été réalisées afin de documenter l'efficacité des modifications. En résumé, les essais effectués au qPCR ont permis de détecter le marqueur dans deux autres échantillons de lisier de bovin, améliorant ainsi la sensibilité du marqueur. Aussi, BacR a été plus souvent utilisé avec une température d'hybridation de 60 °C dans la communauté scientifique (Mieszkina *et al.*, 2009 ; Piorkowski *et al.*, 2014 ; Reischer *et al.*, 2006). Il est donc intéressant d'évaluer la sensibilité à cette température. Le gradient de température effectué ciblait, entre autres, 59,4 °C (Annexe 14). La concentration du marqueur était plus élevée à une température d'hybridation de 63 °C au lieu de 53 °C combinée à une élongation à 72 °C. En effet, la concentration du marqueur a augmenté dans deux échantillons de fumier de bovin et dans un de lisier de bovin de 0,21 à 1,28 Log₁₀ copies/g_{humus} (Tableau 43). Les résultats obtenus avec BacR dans ces échantillons de fumiers et lisiers indiquent qu'il serait possible de détecter le marqueur dans les échantillons des années précédentes au projet. La nécessité d'améliorer la sensibilité a cependant été évidente avec les échantillons de l'année 2022 dans les bassins versants. C'est entre autres pour cette raison que des essais supplémentaires de mise au point du marqueur ont été réalisés, alors que toutes les étapes de mise au point avaient été réalisées en 2019-2020. De ce fait, certains échantillons des années précédentes pourraient contenir le marqueur BacR, mais il n'avait pas été détecté avec la méthode qPCR à 53°C. Le marqueur n'a pas été détecté dans les échantillons de lisier de poules et de fumier de poulets, fèces humaines et de chevreuils, validant ainsi le choix de la nouvelle température d'hybridation à 63°C.

La limite de détection ainsi que la limite de quantification n'ont pas été changées, puisque les concentrations du standard BacR utilisées pour la courbe standard sont restées les mêmes. Le changement de température d'hybridation a eu un impact mineur sur le décalage de la courbe standard. En effet, avec une concentration de $2,69 \times 10^6$ copies/μl d'ADN, le standard sortait à 18,88 cycles à 53 °C avec élongation à 72 °C et à 19,03 cycles à 63 °C, représentant un décalage de 0,15 cycle. Par exemple, la pente était de -3,457 et l'intercepté à 39,110 lorsque la température était de 53 °C, tandis que la pente était de -3,294 et l'intercepté de 38,230 avec la température d'hybridation à 63 °C.

Le fait que le changement des températures de dénaturation et d'hybridation ait mené à des écarts de résultats minimes avec le standard et significativement différent avec les échantillons peut s'expliquer par la nature des échantillons. En effet, ce sont des échantillons environnementaux variés dont le contenu moléculaire exact est inconnu. L'augmentation de la température a eu un impact significatif sur les réactions d'amplification qPCR avec le marqueur BacR réalisés dans ces échantillons.

Tableau 43. Comparaison des résultats obtenus avant et après l'amélioration de la sensibilité du marqueur ruminant BacR.

Date d'échantillonnage 2022	Type d'échantillon	copies/g _h	copies/g _s	copies/g _h	copies/g _s
		Hybridation à 53 °C et élongation à 72°C		Hybridation à 63 °C	
11 août	Fumier bovin	<1,76E+05*	<6,70E+05	<1,76E+05	<6,70E+05
11 août	Fumier bovin	DM	DM	<1,68E+05	<8,72E+05
19 sept	Fumier bovin	<1,72E+05	<3,25E+05	<1,72E+05	<3,25E+05
19 sept	Fumier bovin	6,94E+07	2,10E+09	1,12E+08	3,39E+09
19 sept	Fumier bovin	<1,64E+05	<9,66E+05	<1,64E+05	<9,66E+05
19 sept	Fumier bovin	7,46E+06	2,33E+08	6,59E+07	2,06E+09
21 juil	Lisier bovin	<1,64E+05	<8,67E+06	2,20E+06	1,17E+08
10 oct	Lisier bovin	<1,81E+05	<4,43E+06	5,64E+06	1,38E+08
17 oct	Lisier bovin	2,40E+06	3,83E+07	4,53E+07	7,22E+08
31 août	Lisier porc	DM	DM	<1,68E+05	<2,83E+06
31 août	Lisier porc	<1,72E+05	<2,89E+06	<1,72E+05	<2,89E+06

*Sous la LOD, en rouge

DM = donnée manquante

7.2.2 Bassin versant du Lac Boivin

Les populations d'*E. coli* ont varié entre la limite de détection (1 UFC/100 ml) et 8 320 UFC/100 ml entre le 5 avril et le 13 novembre 2022. Le sous-bassin du ruisseau Bouchard a présenté des pics d'*E. coli* plus importants que le réservoir Lemieux, ce qui est d'une part une bonne nouvelle puisqu'il s'agit de la réserve d'eau potable de la ville de Granby et d'autre part, puisque le ruisseau Bouchard a une vocation agricole importante. Les résultats sont présentés à la Figure 49. Il est possible de voir les résultats des populations d'*E. coli* et des marqueurs séparément des LOD à l'annexe 15.

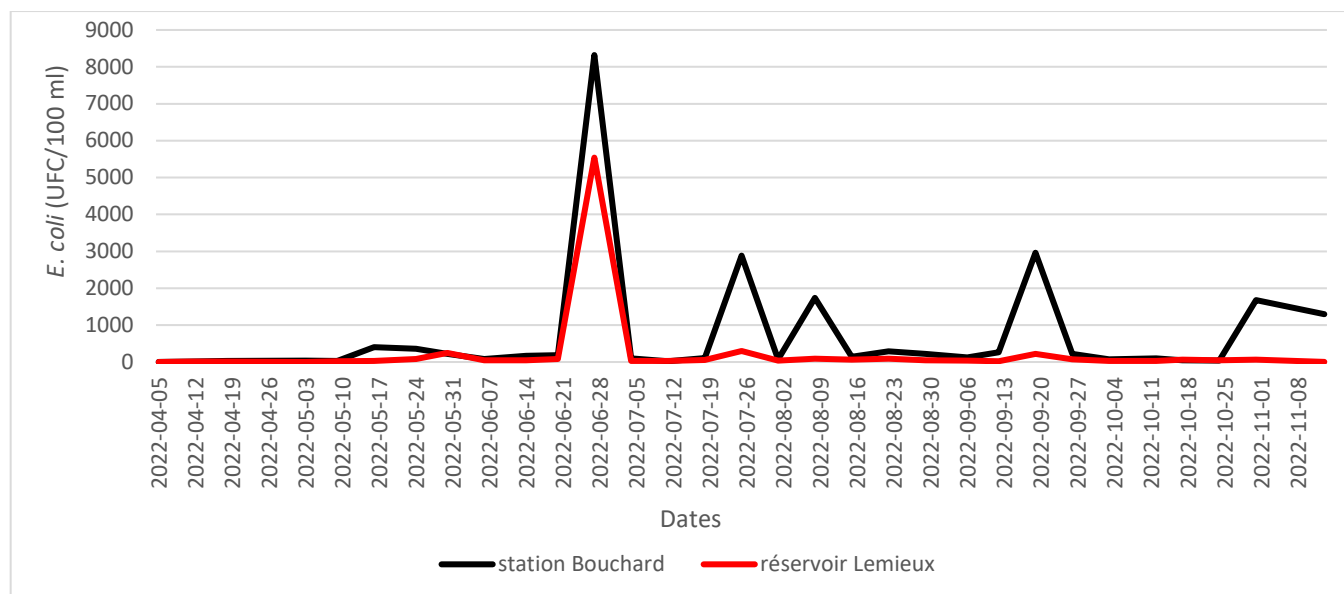


Figure 49. Populations d'*E. coli* au cours de la saison 2022 aux deux stations d'échantillonnage du bassin versant du Lac Boivin.

La relation entre les marqueurs et les populations d'*E. coli* à la station Bouchard et au réservoir Lemieux sont présentées aux Figures 50 et 51. BacGen a été détecté à toutes les dates d'échantillonnage et a varié entre 5,11 et 8,46 Log₁₀ copies/100 ml d'eau à la station Bouchard et entre 5,76 et 7,81 Log₁₀ copies/100 ml d'eau au réservoir Lemieux. L'importante contamination fécale observée lors de l'échantillonnage du 27 juin 2022 peut être expliquée par les précipitations importantes ayant eu lieu durant la semaine précédente. Le jour de l'échantillonnage, 28,2 mm s'étaient accumulés et plus de 28 mm quatre jours auparavant. L'analyse des marqueurs génétiques a permis de déterminer la présence de trois marqueurs spécifiques (BacR, Pig-1-Bac, CDB) et ce, tant à la station Bouchard qu'au réservoir Lemieux, avec une majorité de marqueurs ruminant. Outre cette date, le marqueur porcin et le marqueur poulet (Chicken/Duck-Bac – CDB) ont aussi été quantifiés à quelques reprises.

Tous les échantillons ont été analysés dans des délais ne dépassant pas les trois mois suivants l'extraction d'ADN, sauf pour le marqueur BacR où des reprises ont été réalisées entre 5 et 10 mois plus tard. Il a été démontré de nombreuses fois, dans le cadre de projets antérieurs réalisés à l'IRDA, que les extraits d'ADN (kit MP BioMedicals) se conservaient jusqu'à deux ans suivant l'extraction d'ADN sans avoir un impact majeur sur les résultats (1 Log₁₀ d'écart toléré). Cependant, la détection des marqueurs dans des échantillons où ceux-ci se retrouvent en quantités similaires aux limites de détection peut avoir été affectée. Il se peut donc que certains marqueurs n'aient pas été retrouvés dans les extraits d'ADN s'ils ont été analysés dans des délais plus longs, comme pour le marqueur BacR.

Lorsqu'aucun marqueur spécifique n'est quantifié et que BacGen est présent, quelques hypothèses peuvent être émises :

- 1- la contamination fécale est due à d'autres espèces animales que celles ciblées par les marqueurs;

- 2- la turbidité de l'eau était très élevée et peu de volume a pu être filtré. Ainsi, la sensibilité de la méthode était amoindrie, ce qui est particulièrement nuisible à la détection des marqueurs spécifiques, dont les séquences d'ADN peuvent se retrouver en moins grande quantité;
- 3- la contamination microbienne de l'eau est très élevée, et l'extrait d'ADN contient une grande variabilité d'ADN provenant de plusieurs types de microorganismes ou de brins d'ADN libres qui sont détectés par qPCR. Ceci affecte donc la sensibilité de la méthode de détection des marqueurs spécifiques et ce, malgré un bon volume d'eau filtré et une quantité d'ADN adéquate retrouvée dans l'échantillon puisqu'ils doivent être dilués afin de réduire les interférences.

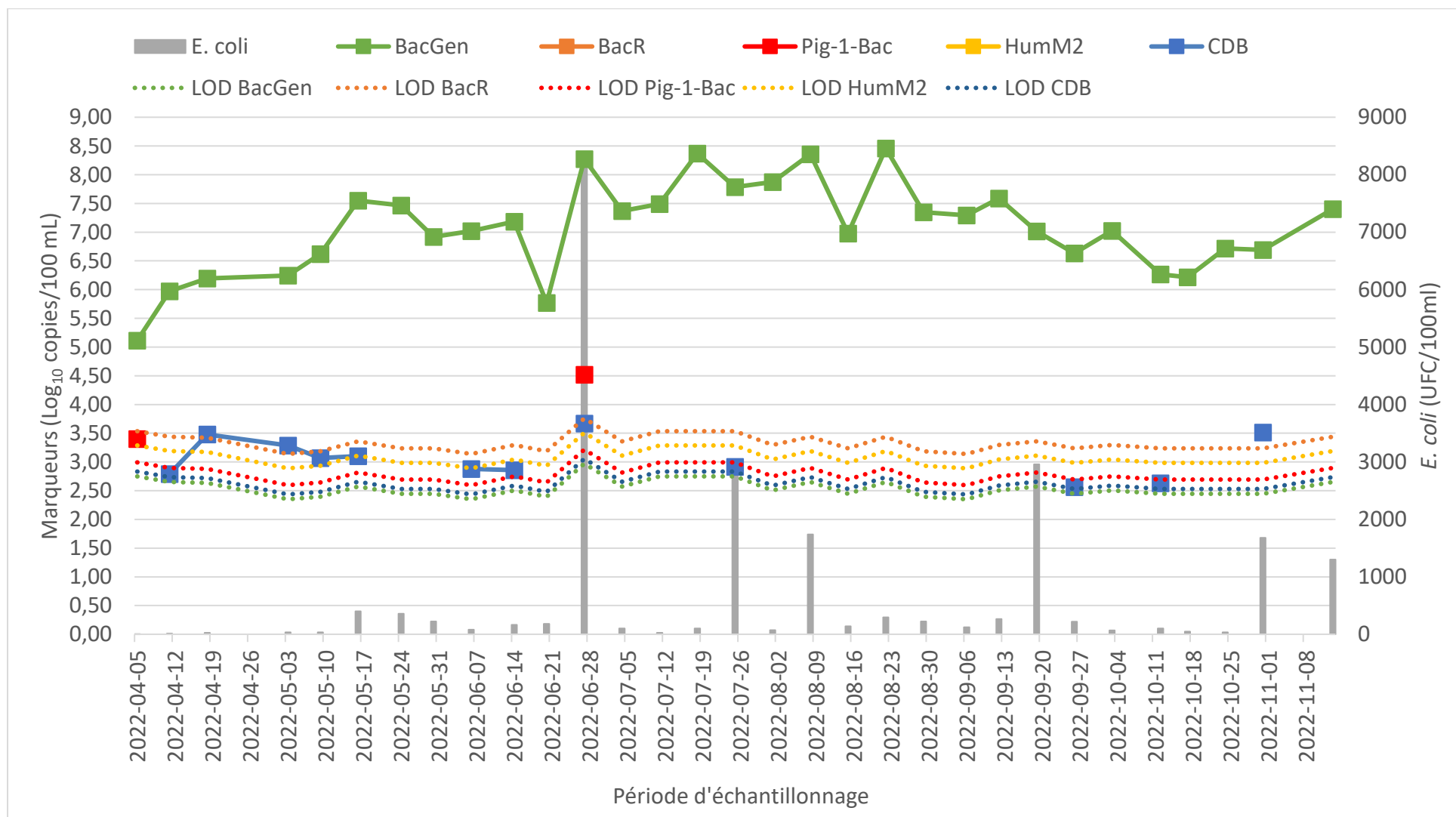


Figure 50. Relation entre les marqueurs et les populations d'*E. coli* à la station Bouchard du bassin versant du Lac Boivin d'avril à novembre 2022. La limite de détection (LOD) des marqueurs dans l'échantillon d'eau est présentée par les courbes pointillées. Les résultats positifs au qPCR (>LOD) sont représentés par les points carrés. Lorsqu'un marqueur n'a pas été détecté au qPCR, le résultat se rapporte à une concentration sous la LOD.

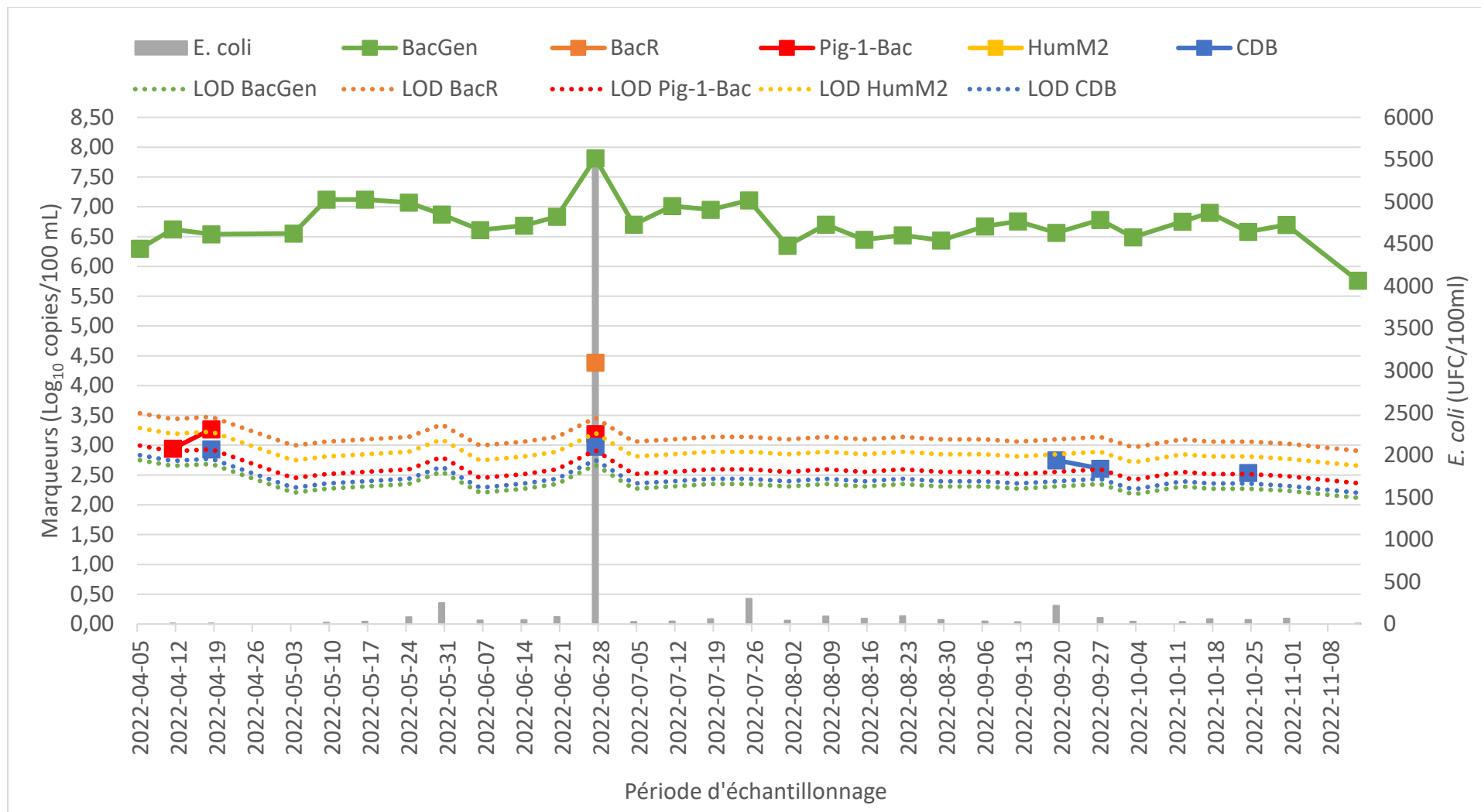


Figure 51. Relation entre les marqueurs et les populations d'*E. coli* au réservoir Lemieux du bassin versant du Lac Boivin d'avril à juin 2022. La limite de détection (LOD) des marqueurs dans l'échantillon d'eau est présentée par les courbes pointillées. Les résultats positifs au qPCR (>LOD) sont représentés par les points carrés. Lorsqu'un marqueur n'a pas été détecté au qPCR, le résultat se rapporte à une concentration sous la LOD.

7.2.3 Bassin versant de la Rivière du Chicot

Dans le bassin de la rivière du Chicot, la contamination fécale a été importante ($> 5\,000$ UFC/100 ml) à quelques reprises et ce, aux deux stations suivies (Figure 52). La station T3, l'exutoire d'un sous-bassin plutôt agricole du bassin versant, a présenté un maximum de 20 200 UFC/100 ml lors de l'échantillonnage du 19 septembre 2022. À l'instar du lac Boivin où la contamination maximale a eu lieu suivant des pluies importantes, cette contamination à la station T3 de la rivière du Chicot a eu lieu alors que 95,4 mm de pluie étaient tombés dans la semaine précédant l'échantillonnage (voir Annexe 16). La présence du marqueur spécifique BacR ciblant les ruminants a été observée à cette date. Ce bassin versant a finalement été le seul où une contamination humaine a été détectée. Les figures 53 (station P1) et 54 (station T3) présentent les résultats des populations de bactéries *E. coli* mis en relation avec les marqueurs ciblés à chaque point d'échantillonnage. BacGen a été détecté à toutes les dates d'échantillonnage et a varié entre 5,54 et 7,89 Log_{10} copies/100 ml d'eau à la station P1 et entre 5,38 et 7,61 Log_{10} copies/100 ml d'eau à la station T3. Il est possible de remarquer la quantification des marqueurs Pig-1-Bac et Chicken/Duck-Bac qui sont du même ordre de grandeur (10^3 copies/100 ml) à la station T3 le 11 avril 2022 (Figure 54). On peut donc supposer que la contamination était surtout associée aux porcs plutôt qu'aux oiseaux. Cependant, aux autres dates où le marqueur CDB sort seul, il est possible de confirmer une contamination de source aviaire. Il est intéressant de constater une source de contamination fécale de ruminants (BacR) le 20 septembre 2022 aux 2 stations d'échantillonnage. En effet, aucun autre marqueur spécifique n'est sorti à cette date.

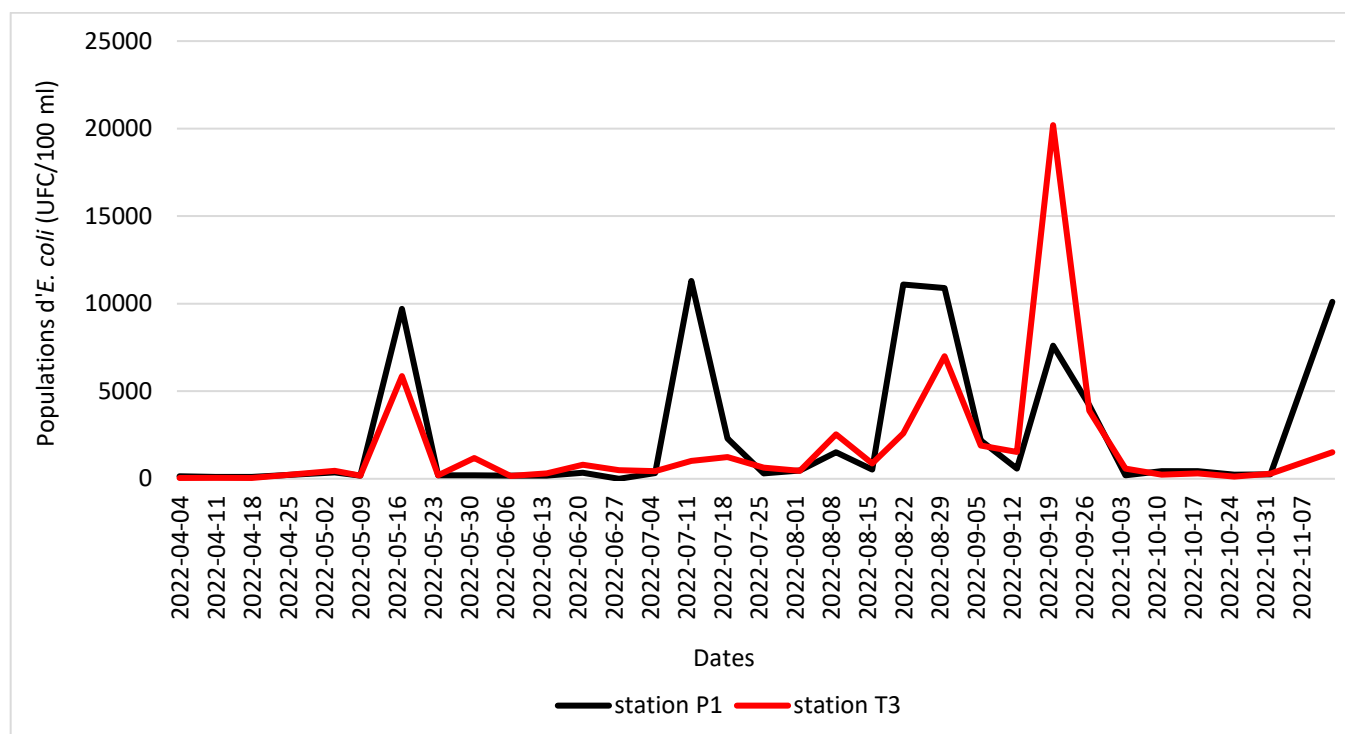


Figure 52. Populations d'*E. coli* au cours de la saison 2022 aux deux stations d'échantillonnage du bassin versant de la Rivière du Chicot.

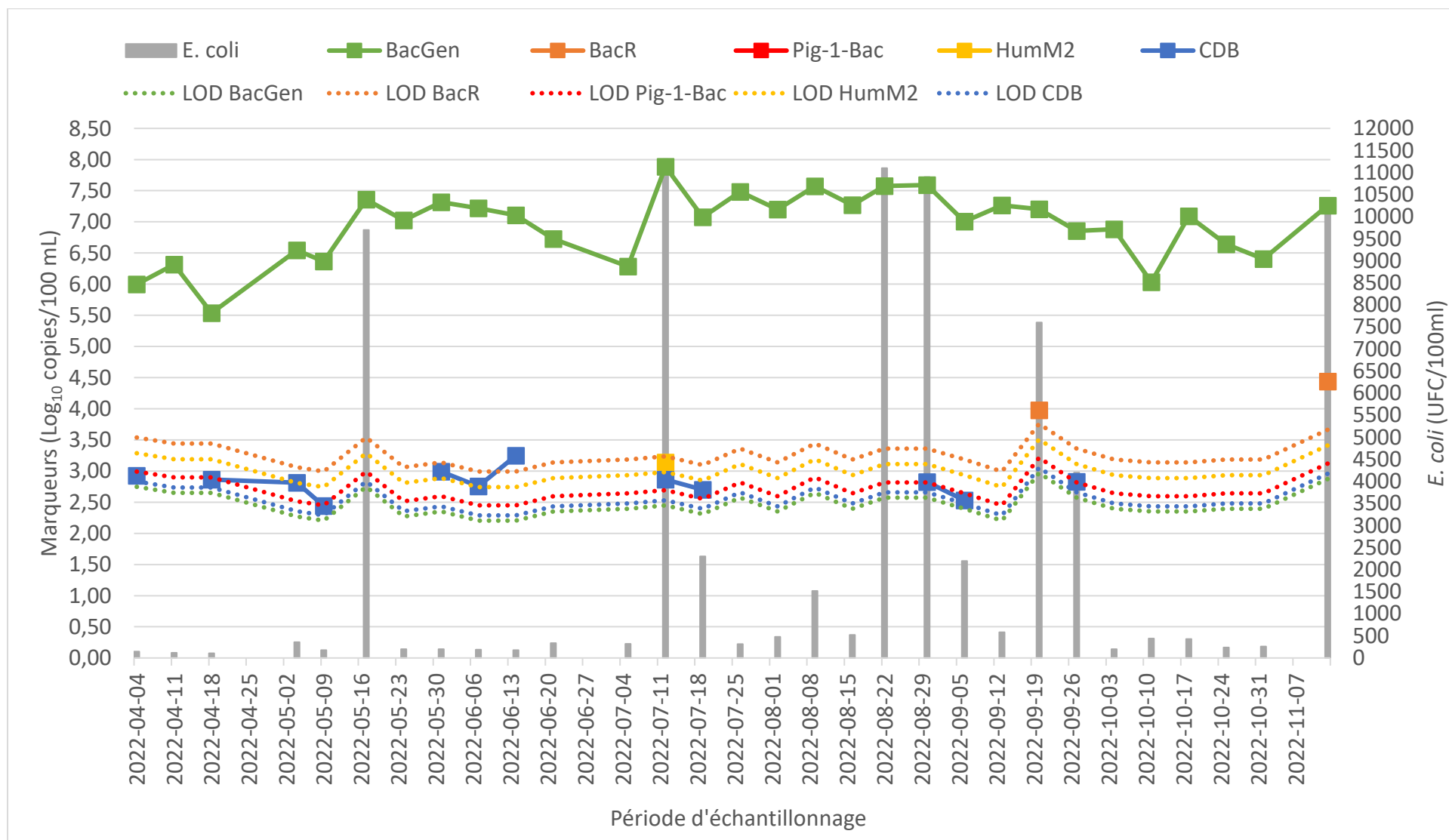


Figure 53. Relation entre les marqueurs et les populations d'*E. coli* à la station P1 du bassin versant de la Rivière du Chicot d'avril à novembre 2022. La limite de détection (LOD) des marqueurs dans l'échantillon d'eau est présentée par les courbes pointillées. Les résultats positifs au qPCR (>LOD) sont représentés par les points carrés. Lorsqu'un marqueur n'a pas été détecté au qPCR, le résultat se rapporte à une concentration sous la LOD.

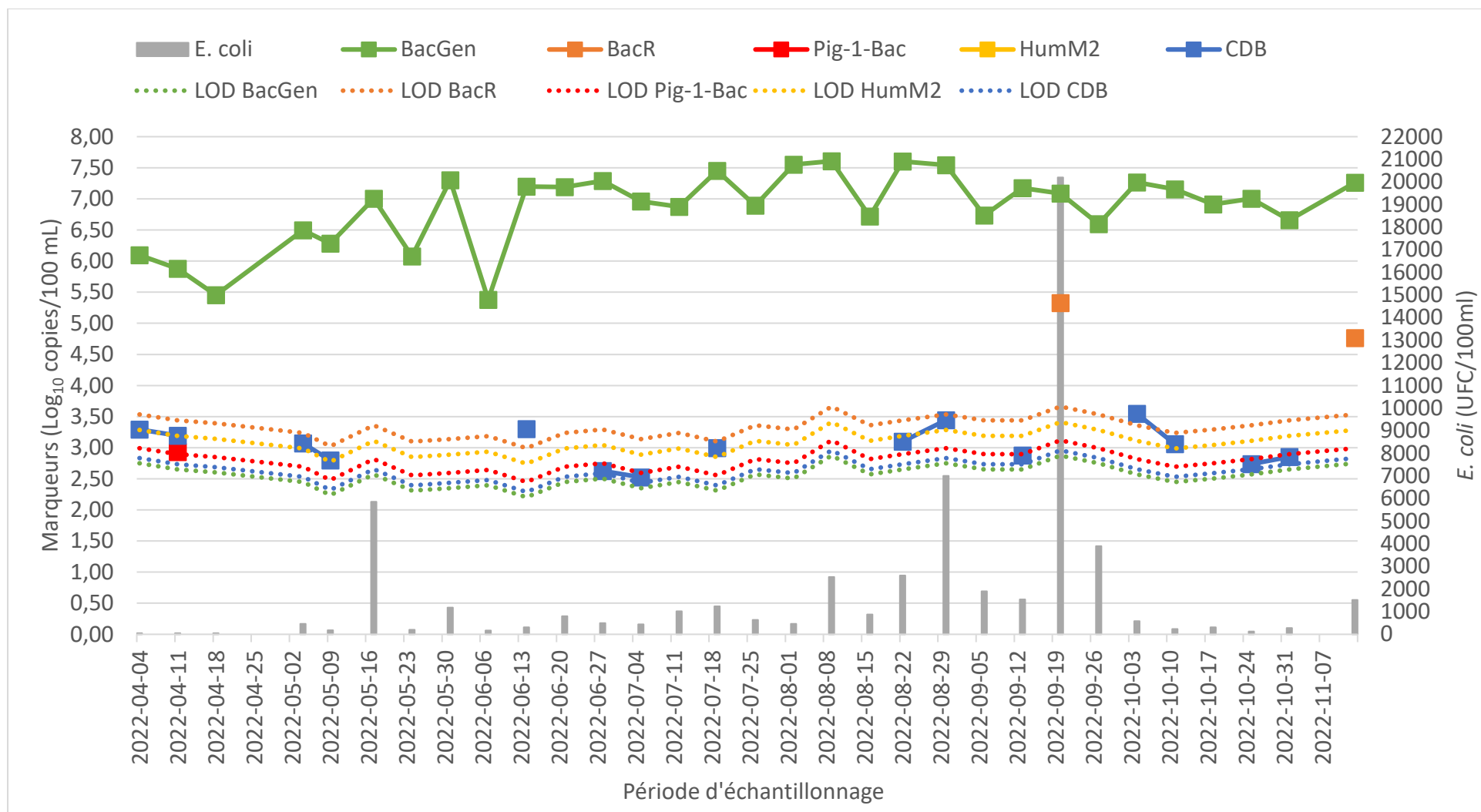


Figure 54. Relation entre les marqueurs et les populations d'*E. coli* au à la station T3 du bassin versant de la Rivière du Chicot d'avril à novembre 2022. La limite de détection (LOD) des marqueurs dans l'échantillon d'eau est présentée par les courbes pointillées. Les résultats positifs au qPCR (>LOD) sont représentés par les points carrés. Lorsqu'un marqueur n'a pas été détecté au qPCR, le résultat se rapporte à une concentration sous la LOD.

7.2.4 Bassin versant du Ruisseau au Castor

Les populations d'*E. coli* dans le bassin versant du ruisseau au Castor ont varié entre la limite de détection (1 UFC/100 ml) et 8 000 UFC/100 ml (Figure 55). Encore une fois, ce maximum atteint a été associé à des précipitations importantes dans la semaine précédant l'échantillonnage (Annexe 16). En effet, 92,4 mm ont été répertoriés, dont 88,4 mm en un seul événement.

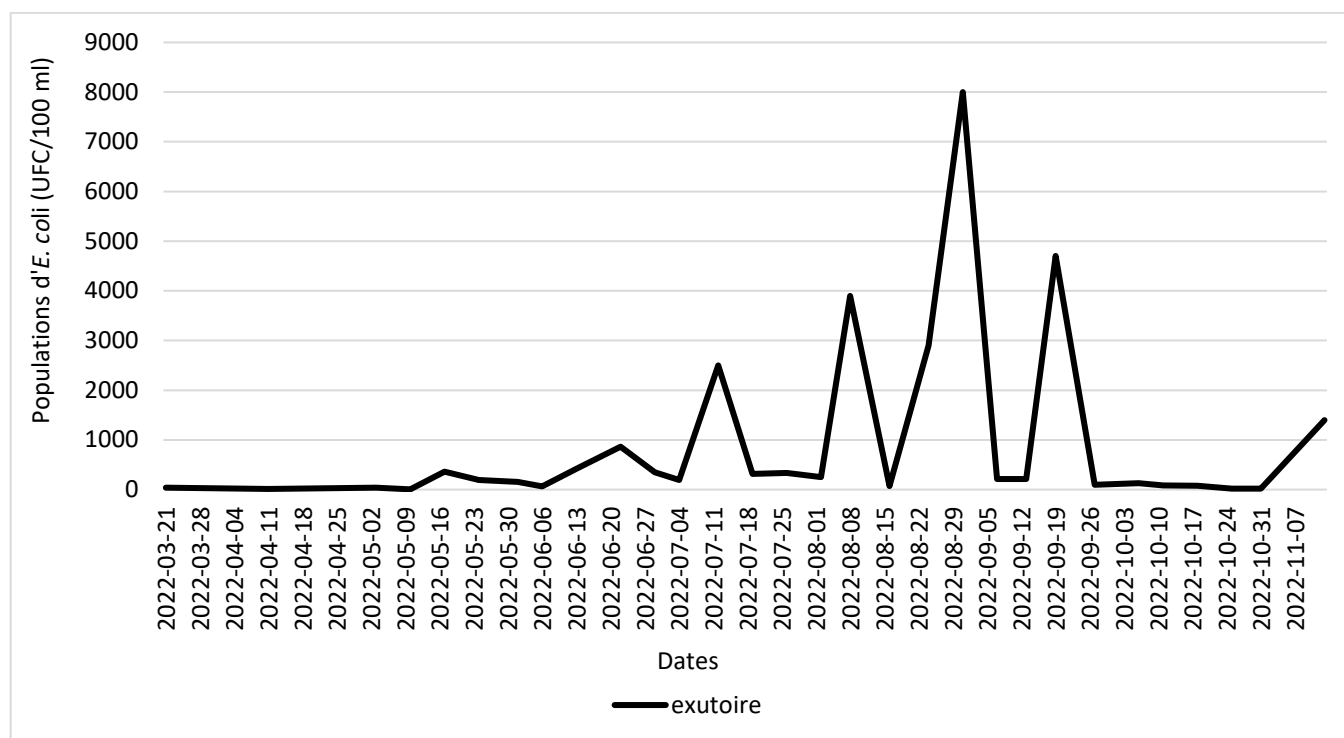


Figure 55. Populations d'*E. coli* au cours de la saison 2022 à la station d'échantillonnage du bassin versant du Ruisseau au Castor.

La figure 56 présente les résultats des populations de bactéries *E. coli* mis en relation avec les marqueurs ciblés à chaque point d'échantillonnage. BacGen a été détecté à toutes les dates d'échantillonnage et a varié entre 5,26 et 8,38 Log₁₀ copies/100 ml d'eau. L'épisode de forte contamination en *E. coli* du 31 août 2022 n'a pas pu être associé à la présence de marqueurs spécifiques (Figure 56). Dans ce cas, seulement 100 ml d'eau ont pu être filtrés en raison de la forte turbidité, réduisant la sensibilité de la méthode. Le marqueur porcine a été quantifié alors que les populations d'*E. coli* étaient faibles (40 UFC/100 ml), soit en tout début de saison le 21 mars 2022. Le mois de mars 2022 a été relativement clément, et il est possible que les épandages aient débuté avant de semer des céréales de printemps, par exemple. La collaboration avec Agrinova n'avait pas encore officiellement débuté à cette période et aucun échantillon de lisier n'a donc été reçu.

Il est possible de constater que seul le marqueur spécifique CDB (poulet/canard) a été détecté (3,22 Log₁₀ copies/100 ml d'eau) dans l'échantillon du 19 septembre 2022 (Figure 56). Il y a une partie de la contamination

fécale qui s'explique par une source aviaire, bien que le marqueur BacR ait une LOD de 3,54 Log₁₀ copies/100 ml d'eau et HumM2 de 3,29 Log₁₀ copies/100 ml d'eau à cette date. La concentration en CDB est plutôt faible, ce qui laisse penser à d'autres sources de contamination fécale non évaluées dans le cadre de ce projet, où à une source de contamination fécale qui était sous la limite de détection. La proportion de la contamination par des sources porcines, humaines ou de ruminants est moins élevée que pour la source aviaire.

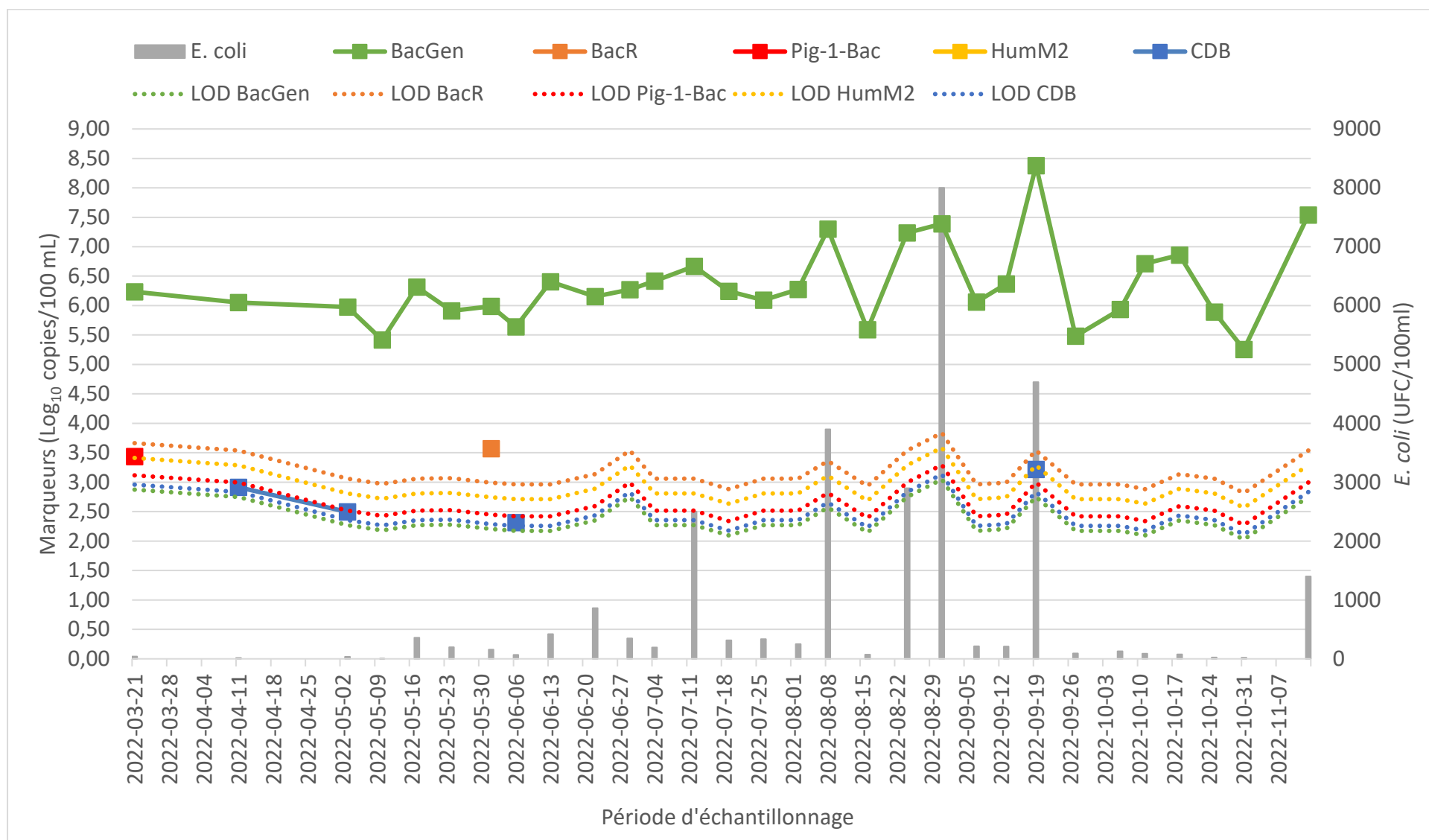


Figure 56. Relation entre les marqueurs *Bacteroidetes* et les populations d'*E. coli* au bassin versant du Ruisseau au Castor de mars à novembre 2022. La limite de détection (LOD) des marqueurs dans l'échantillon d'eau est présentée par les courbes pointillées. Les résultats positifs au qPCR ($>\text{LOD}$) sont représentés par les points carrés. Lorsqu'un marqueur n'a pas été détecté au qPCR, le résultat se rapporte à une concentration sous la LOD.

Analyse des fumiers

En somme, onze échantillons de fumiers et de lisiers ont été analysés pour leur contenu en marqueurs génétiques. Le Tableau 44 présente ces résultats. Cette analyse a permis de confirmer la spécificité du marqueur porcin, puisque celui-ci a été détecté seulement dans les lisiers de porc. Par contre, le marqueur Chicken/Duck-Bac a été détecté dans des échantillons provenant de bovin et de porc, comme il avait été remarqué dans les livrables précédents. La présence d'un autre marqueur spécifique (porcin ou bovin) à des concentrations plus élevées permet par contre de renseigner sur la source de l'espèce animale. Tel que mentionné précédemment, dans un échantillon d'eau de surface, la seule présence du marqueur CDB sans autre marqueur spécifique permet de confirmer une source aviaire. Il est aussi intéressant de noter que les niveaux de marqueurs spécifiques sont sous la limite de détection dans les échantillons dont le taux de matières sèches dépasse 7 % et ce, bien que les concentrations de marqueurs généraux soient dans la majorité des cas semblables. Cela peut s'expliquer, entre autres, par le caractère anaérobie des *Bacteroidetes* puisque l'apport en air dans l'échantillon peut augmenter lorsque le taux d'humidité diminue. Ceci pourrait être mieux caractérisé dans le futur avec l'acquisition de données.

Tableau 44. Contenu en marqueurs génétiques des échantillons de lisier et de fumiers analysés dans le bassin versant du ruisseau au Castor.

Date d'échantillonnage 2022	Type d'échantillon	Matières sèches	BacGen	BacR	Pig-1-Bac	HumM2	Chicken/Duck-Bac
		%	copies/g _h				
21 juillet	Lisier bovin	1,89	9,21E+08	2,20E+06	<4,69E+04	<9,21E+04	<3,24E+04
11 août	Fumier bovin	26,33	1,92E+08	<1,76E+05*	<5,05E+04	<9,92E+04	<3,49E+04
11 août	Fumier bovin	19,24	6,38E+09	<1,68E+05	<4,80E+04	<9,44E+04	<3,32E+04
31 août	Lisier porc	5,94	4,97E+09	<1,68E+05	1,62E+07	<9,44E+04	5,53E+04
31 août	Lisier porc	5,96	1,69E+09	<1,72E+05	3,48E+06	<9,68E+04	<3,40E+04
19 septembre	Fumier bovin	52,86	1,64E+07	<1,72E+05	<4,93E+04	<9,68E+04	<3,40E+04
19 septembre	Fumier bovin	3,31	5,27E+09	1,12E+08	<4,69E+04	<9,21E+04	7,68E+04
19 septembre	Fumier bovin	16,96	5,02E+08	<1,64E+05	<4,69E+04	<9,21E+04	<3,24E+04
19 septembre	Fumier bovin	3,20	2,21E+09	6,59E+07	<4,80E+04	<9,44E+04	1,25E+05
10 octobre	Lisier bovin	4,09	1,78E+09	5,64E+06	<5,18E+04	<1,02E+05	<3,58E+04
17 octobre	Lisier bovin	6,27	3,54E+09	4,53E+07	<4,93E+04	<9,68E+04	<3,40E+04

*Les concentrations mises en rouge correspondent à la LOD associée à l'échantillon.

7.2.5 Analyse statistique – corrélation entre *E. coli* et marqueurs BacGen

La façon de présenter les résultats en combinant les populations d'*E. coli* avec les marqueurs généraux et spécifiques séparément a permis de noter que la plupart du temps, les marqueurs universels BacGen ont suivi la même tendance que les *E. coli*. Une analyse statistique a été réalisée pour vérifier de façon très préliminaire si cette association observée dans les graphiques était avérée.

Deux approches différentes ont été prises:

- corrélation linéaire simple (Pearson)
- corrélation normalisée après avoir retiré les tendances

La première approche est très exploratoire et compare directement les deux mesures, soit les populations d'*E. coli* vs la quantification de marqueurs BacGen. Dans ce type de corrélation, des données complètement indépendantes apparaîtront corrélées si elles sont toutes les deux influencées par les mêmes processus (ex. agriculture, température, différences hydrologiques entre sites, etc.), ce qui est le cas pour les *E. coli* et les *Bacteroidales*. Cette mesure peut cependant être appropriée si le but est purement prédictif et donc de pouvoir prédire les changements d'une mesure dans la saison avec l'autre mesure.

La deuxième approche cherche l'association entre les deux mesures indépendamment des processus qui pourraient les influencer. Ainsi, on retire l'autocorrélation et on standardise les valeurs pour enlever les différences entre les sites de prélèvement et pour retirer les tendances à long terme et ce, pour atteindre une série temporelle dite stationnaire. Les tendances liées au temps ont été retirées, puisqu'il est possible, par exemple, que les concentrations des deux types de micro-organismes augmentent au fil d'une saison pour des raisons différentes. Ainsi, la corrélation aurait été positive, mais n'aurait pas pu être expliquée.

L'analyse a été faite avec le logiciel R version 4.2.1 (2022-06-23 ucrt) et les libraires suivantes:

- tidyverse version 1.3.1
- magrittr version 2.0.3
- ggplot2 version 3.4.0
- ggbeeswarm version 0.6.0
- GGally version 2.1.2
- mgcv version 1.8.40
- DHARMA version 0.4.5

La Figure 57 présente les distributions des résultats d'*E. coli* et de marqueurs BacGen dans les cinq sites de prélèvement durant toute la saison 2022. Ces graphiques permettent notamment de constater que la station de pompage (réservoir Lemieux) du Lac Boivin présente une moins grande variabilité dans les comptes d'*E. coli* et de BacGen, ce qui peut être expliqué par le fait que le réservoir a justement été conçu pour réduire les effets de la rivière Yamaska-Nord.

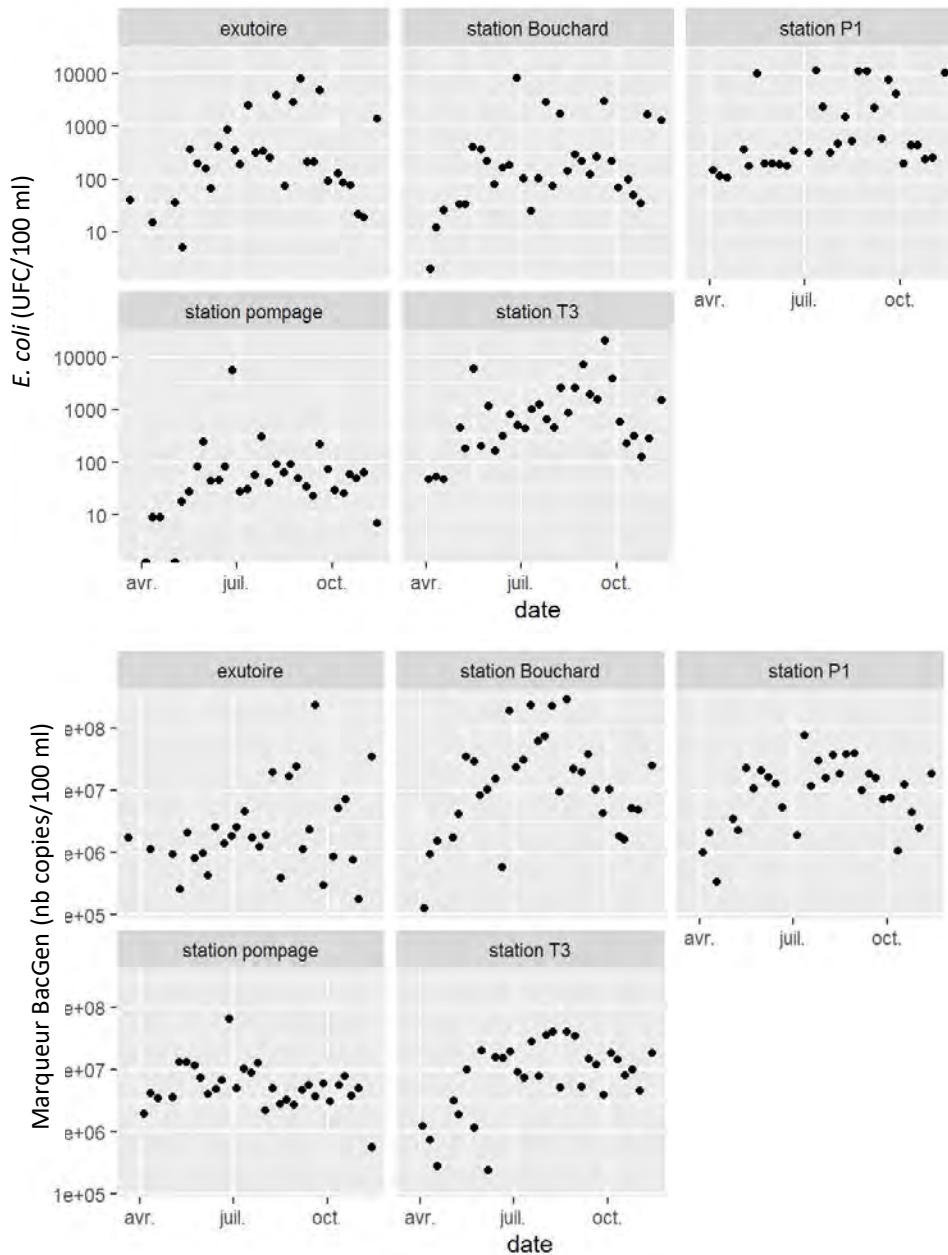


Figure 57. Distribution des données d'*E. coli* (haut) et BacGen (bas) en fonction de la date et selon le site de prélèvement.

La Figure 58 présente les données brutes d'*E. coli* en fonction de BacGen et ce, en fonction de la date et du site de prélèvement. Encore une fois, la moins grande variabilité des données prises à la station de pompage du Lac Boivin (réservoir Lemieux) est visible.

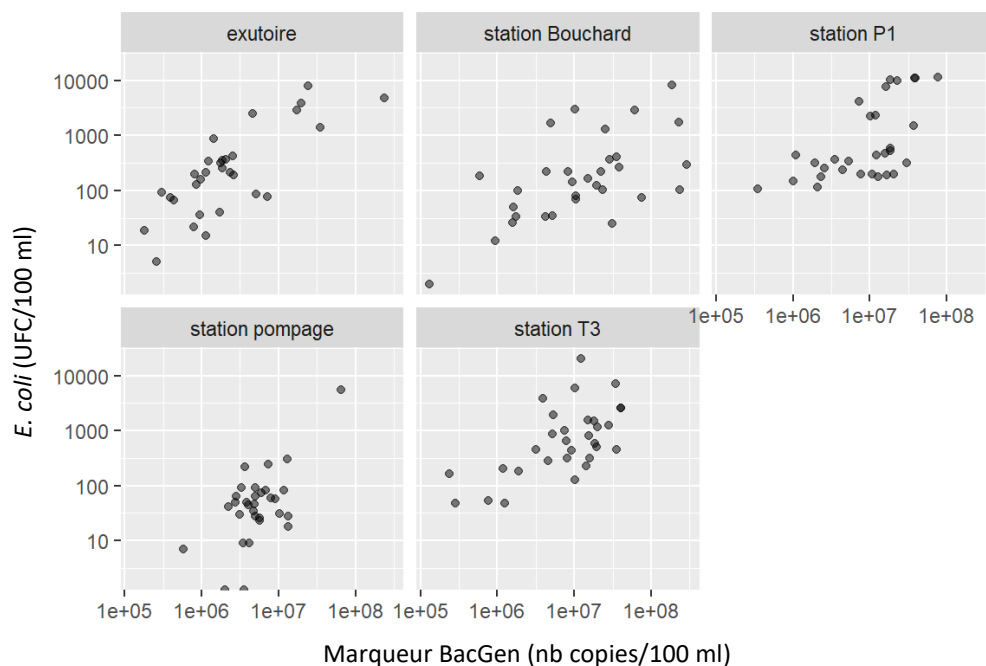


Figure 58. Distribution des données d'*E. coli* en fonction de BacGen selon la date et le site de prélèvement.

Les résultats de l'analyse de corrélation sont présentés aux Figures 59 et 60 pour la corrélation simple de Pearson et l'analyse normalisée, respectivement. Les deux méthodes d'analyse ont révélé une corrélation positive entre les mesures d'*E. coli* et de BacGen et donc que plus les niveaux d'*E. coli* augmentent, plus les marqueurs BacGen augmentent, ce qui était attendu. Des niveaux de corrélation de 0.5429653 (IC95% = [0.4205176 - 0.6459873]) et 0.6104161 (IC95% = [0.5001858 - 0.7011783]) ont été déterminés pour les deux méthodes, respectivement. Bien que la corrélation soit considérée modérée, le résultat est robuste même s'il reste beaucoup de variabilité ($r = 0.55 \sim 30\%$ de la variance). Il serait intéressant de poursuivre la comparaison de ces deux types de données dans le futur, afin de préciser la relation entre les deux. À terme, ceci pourrait permettre d'associer une concentration de marqueurs BacGen à un niveau de contamination fécale de l'eau, tel qu'il est fait présentement avec les *E. coli*. Le fait d'avoir plus de données permettrait peut-être aussi de déterminer un facteur de conversion entre les deux types de microorganismes. Il serait alors sûrement nécessaire d'introduire d'autres variables explicatives dans le modèle, notamment le potentiel de survie des microorganismes.

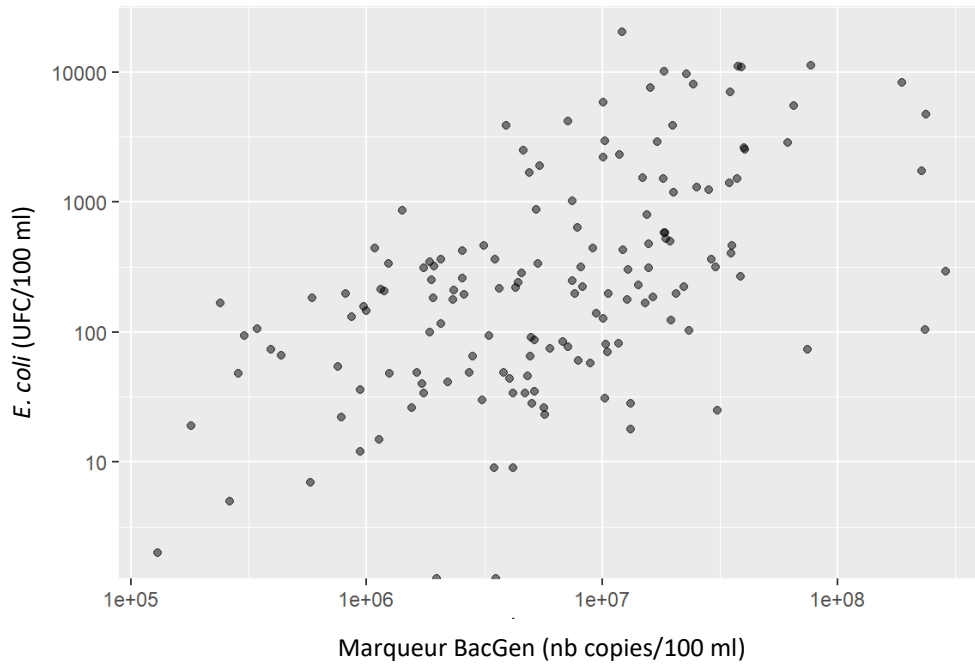


Figure 59. Distribution des données d'*E. coli* en fonction de BacGen, toutes dates et sites de prélèvement confondus.

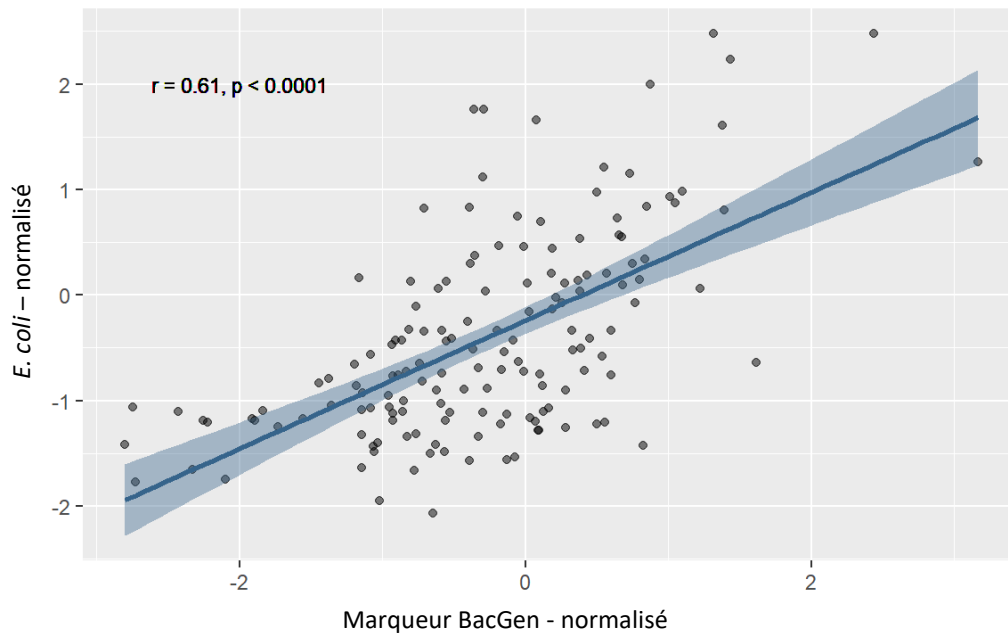


Figure 60. Distribution des données normalisées d'*E. coli* en fonction de BacGen, toutes dates et sites de prélèvement confondus.

8 PROCÉDURE GLOBALE ET RECOMMANDATIONS POUR LA DÉTERMINATION DES SOURCES DE CONTAMINATION FÉCALE DE L'EAU

Le livrable 4 sur la validation de la méthode en bassins versants avait aussi comme objectif de faire des recommandations sur les données et observations terrain à acquérir pour faciliter l'interprétation des résultats. Ainsi, en guise de synthèse du projet, les objectifs suivants ont été poursuivis :

- Établir une procédure d'échantillonnage et de conservation des échantillons
- Identifier les données qui devraient être collectées – Formulaire d'observation terrain
- Établir une procédure de conservation de l'ADN
- Élaborer une méthode d'analyse en laboratoire
- Suggérer un mode de présentation des résultats – Rapport d'analyse

Les informations rapportées dans les paragraphes ci-dessous seront utilisées pour la fabrication de deux feuillets techniques destinés, entre autres, aux intervenants du MELCCFP. Le premier feuillet fera la synthèse de la procédure d'échantillonnage tandis que le deuxième résumera la procédure globale pour la détermination des sources de contamination fécale dans l'eau.

8.1 PROCÉDURE D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

La procédure d'échantillonnage pour identifier la source de contamination fécale d'un plan d'eau varie selon plusieurs facteurs, particulièrement de l'objectif visé. Il est donc impossible de définir une méthode universelle, mais voici une liste des paramètres dont il faut tenir compte.

1. Identifier l'objectif visé, par exemple :
 - a) Connaître l'origine animale d'une contamination fécale connue. Un échantillon ponctuel peut s'avérer adéquat.
 - b) Connaître la provenance d'une source de contamination fécale : Un échantillonnage à plus grande échelle dans le bassin versant peut s'avérer nécessaire.
2. Connaître le territoire à caractériser à l'échelle du bassin versant, particulièrement les zones potentiellement à risque de contamination fécale, par exemple :
 - a) Les zones agricoles, notamment les lieux d'élevage et les zones d'épandage d'engrais organiques
 - b) Les lieux de surverses d'eaux usées municipales
 - c) Les zones où les installations sanitaires sont hors réseau
 - d) La prévalence d'animaux de la faune

3. Connaître les périodes à risque selon la source de contamination, soit :
 - a) Zones agricoles : risque plutôt diffus lié aux périodes d'épandage, qui dépendent du type de culture
 - b) Surverses municipales : risque ponctuel accru suivant des pluies importantes
 - c) Installations sanitaires hors réseau : risque diffus à l'échelle de la zone visée
 - d) Faune : risque plutôt ponctuel lors des migrations d'oiseaux, et diffus le reste du temps

La prise d'un échantillon d'eau ponctuel à un moment X et son analyse ne sert qu'à illustrer le niveau de contamination et la source animale à ce moment précis. Si on veut caractériser une source d'eau potable ou un plan d'eau servant de source pour l'irrigation des cultures, un échantillon pris de façon ponctuelle peut suffire à informer sur le niveau de contamination et l'espèce animale à l'origine de la contamination. Par contre, dans un cas de contamination de l'eau d'une plage confirmée par des concentrations élevées en bactéries *E. coli* empêchant la baignade ou les activités nautiques, il pourrait être pertinent de prendre plus qu'un échantillon d'eau afin de mieux retracer la source de contamination fécale. Un échantillon ponctuel peut donner le portrait global des différentes proportions des sources de contamination fécales humaines, porcines, ruminants ou aviaires, mais pas nécessairement d'où peut provenir cette contamination. Des échantillons pourraient être pris en amont du lieu de contamination ou à différents sites critiques tels que décrits plus haut. Les tributaires du plan d'eau contaminé pourraient aussi être échantillonnés de façon indépendante, de façon à cibler la provenance de la contamination. C'est pourquoi il est important de mettre en contexte l'échantillonnage en fonction de ce qu'on cherche à savoir.

Un exemple de procédure est présenté à l'Annexe 17. Celle-ci présente les sections suivantes :

1- Procédure d'échantillonnage

- a. Précautions à prendre
- b. Volumes à prélever
- c. Conservation des échantillons
- d. Délais d'analyse
- e. Information à prendre sur le territoire

2- Procédure pour remplir le formulaire terrain

3- Données à acquérir sur le web

- a. Emplacement des ouvrages de surverses (Atlas de l'eau – thème municipalités)
- b. Cultures principales (base de données de la FADQ)
- c. Élevages (base de données MAPAQ)
- d. Conditions climatiques dans les jours précédents (Agrométéo Québec)
- e. Historique de qualité microbiologique (Atlas de l'eau – thème cours d'eau – suivi bactériologique coliformes fécaux)

8.2 DONNÉES À COLLECTER PAR LES INTERVENANTS DU MELCCFP LORS D'UN ÉCHANTILLONNAGE

Les données qui devraient être collectées lors de l'échantillonnage ont été intégrées dans un fichier de type formulaire à remplir sur le terrain (Annexe 18).

En bref, les données suivantes pourraient être saisies lors des visites sur le terrain :

1. Identification de l'observateur
 - a. Nom
 - b. Numéro de téléphone/courriel
2. Données sur le site d'échantillonnage
 - a. Numéro de référence de l'échantillon
 - b. Date
 - c. Nom du cours d'eau
 - d. Ville/Région
 - e. Point GPS
 - f. Cote de turbidité
 - g. Prise de photo
3. Observations prises en amont du site
 - a. Travaux d'épandage en cours (type de fumier (espèce animale/liquide/solide), présence d'épandeurs au champ, incorporation, odeurs)
 - b. Présence d'animaux de la faune (castors, rats musqués, oiseaux migrateurs, chevreuils, etc.)

8.3 PROCÉDURE D'EXTRACTION ET DE CONSERVATION DE L'ADN

Avant même d'extraire l'ADN d'un échantillon d'eau, une étape importante doit être réalisée : la filtration de l'eau sur une membrane stérile de porosité de 0,45 µm. Cette étape permet de concentrer les microorganismes et le matériel génétique sur une petite surface, facilitant ainsi l'extraction d'ADN et augmentant la récupération du matériel génétique. Pour récupérer le maximum de matériel, il faut filtrer le plus d'eau possible en respectant un délai maximal d'une heure afin d'éviter d'endommager la membrane. Bien que plusieurs compositions de membranes différentes existent sur le marché, des membranes d'ester de cellulose modifiée (MicroCheck™ II Beverage Monitors, Cytiva) ont été utilisées dans le cadre de ce mandat.

L'extraction de l'ADN génomique contenu dans l'échantillon d'eau doit être réalisée en suivant une procédure qui permet d'obtenir un extrait d'ADN concentré et pur (peut être vérifié au Qubit, par exemple). En effet, pour augmenter les chances de détecter les marqueurs génétiques *Bacteroidetes*, voici trois paramètres recommandés :

- ✓ avoir une concentration de plus de 50 ng d'ADN double brin / µl d'extrait;

- ✓ obtenir un ratio d'absorbance mesurée à 260 et 280 nm entre 1,8 et 2,0, indiquant ainsi s'il y a contamination de l'extrait par des protéines ou de l'ARN (ou autres substances qui absorbent à 260 ou 280 nm);
- ✓ avoir de l'ADN génomique double brin non dégradé.

Dans le cadre de ce mandat, le kit d'extraction *Fast DNA SPIN Kit for Soil™* en combinaison avec le système FastPrep® de la compagnie MP Biomedicals (protocole détaillé à l'Annexe 4) a été utilisé pour extraire l'ADN génomique. En résumé, l'extraction d'ADN se déroule comme suit :

1. La membrane est roulée puis insérée dans un microtube vissé contenant le *Lysing Matrix E* consistant en un mélange de microbilles de silice et de céramique;
2. Pour compléter la lyse cellulaire, du tampon phosphate ainsi que du tampon MT sont ajoutés au microtube vissé, puis le tout est homogénéisé par l'utilisation de l'instrument *FastPrep*;
3. Les protéines sont précipitées avec la solution de précipitation des protéines (PPS);
4. L'ADN est isolé avec la solution Binding Matrix;
5. Du BSA à une concentration de 10 µg/µl (concentration finale visée de 1 µg/µl) est ajouté comme agent stabilisant afin d'obtenir un meilleur rendement d'extraction d'ADN;
6. La solution est finalement mise sur membrane filtrante puis l'ADN génomique est élué avec 100 µl d'eau stérile.

Bien que ce ne soit pas obligatoire, il est possible de vérifier le taux de récupération de l'ADN extrait avec un contrôle d'extraction d'ADN (DEC). Cela permet, entre autres, de s'assurer que l'extrait DNA est bel et bien représentatif du contenu en matériel génétique dans l'échantillon. L'ADN peut être conservé jusqu'à 48 h au réfrigérateur avant d'être congelé. Pour un usage plus fréquent de l'extrait d'ADN, il est idéal de séparer l'extrait dans plusieurs microtubes. Un seul microtube pourra ainsi être décongelé et les autres resteront intacts en cas de problèmes ou d'analyses multiples. Bien qu'il soit préférable d'analyser les échantillons rapidement après l'extraction d'ADN, il est possible de conserver pendant au maximum 2 ans les extraits d'ADN au congélateur à - 20 °C si le volume d'extrait congelé est d'au moins 10 µl et que des microtubes vissés adéquats ont été utilisés. Il n'est pas recommandé de décongeler un extrait d'ADN plus de six fois, puisque cela pourrait affecter l'intégrité des molécules.

8.4 MÉTHODE D'ANALYSE DES ÉCHANTILLONS

Les résultats obtenus lors de la validation de la procédure en bassins versants ont permis de constater l'avantage de dénombrer les bactéries *E. coli* en plus de quantifier les marqueurs *Bacteroidales* ciblés dans les échantillons d'eau. Ils permettent, ensemble, d'avoir un aperçu de la contamination au point d'échantillonnage à une date donnée. Ainsi, en même temps que la filtration de l'eau pour la récupération du matériel génétique sur une membrane, nous recommandons de dénombrer les bactéries *E. coli* avec la méthode de filtration sur membrane du CEAQ MA. 700 – Ec.BCIG 1.0 utilisant le milieu de culture mFC-BCIG ainsi qu'une membrane en ester de cellulose modifiée.

Les marqueurs génétiques sont quantifiés par une méthode d'amplification de PCR en temps réel (qPCR) utilisant la technologie Taqman et le SsoAdvanced Universal Probes Supermix de Bio-Rad. Les Tableaux 44 et 45 résument les conditions d'amplification qPCR de chaque marqueur *Bacteroidales* et le contrôle interne d'amplification (IAC) utilisé pour vérifier la présence d'inhibiteurs qPCR. Chaque puits qPCR contient 2 µl d'extrait d'ADN génomique, 3 µl d'IAC ainsi que 20 µl de réactifs comprenant le Supermix, les amorces et les sondes selon les concentrations indiquées au Tableau 45, pour un volume total de 25 µl par puits. Étant donné le faible nombre de réplicats biologiques qui peuvent être échantillonnés et parce que les marqueurs peuvent être en quantités très faibles dans l'eau (se situant à des concentrations près de la limite de détection), les échantillons ont toujours été analysés en triplicata technique au qPCR.

Tableau 45. Conditions d'amplification qPCR du marqueur général BacGen, des marqueurs spécifiques ainsi que l'IAC.

Marqueurs	Cible	# accession de référence ¹	Séquences amorces	Séquences sondes	Temp. hyb. (°C)	Longueur du fragment amplifié (pb)	Conc. amorces (nM)	Conc. sondes (nM)
BacGen	<i>Bacteroidales</i>	NR_148821.1	F : CTGAGAGGAAGGTCCCCAC R : CACGCTACTTGGCTGGTTCAG	VIC -AGCAGTGAGGAATATT-NFQ-MGB	59	112	400	200
HumM2	Humains	Aucun	F : CGTCAGGTTTGTTCGGTATTG R : TCATCACGTAACCTATTTATATGCATTAGC	6-FAM -TATCGAAAATCTCACGGATTAACCTTGTGTACGC- MGB-NFQ	59	101	500	200
BacR	Ruminants	LC028711.1	F : GCGTATCCAACCTTCCCG R : CATCCCCATCCGTTACCG	6-FAM -CTTCCGAAAGGGAGATT- MGB-NFQ	63	117 à 123, principalement 118 ³	500	200
Pig-1-Bac	Porcs	KJ422232.1	F : AACGCTAGCTACAGGCTTAAC R : CGGGCTATTCTGACTATGGG	6-FAM -ATCGAAGCTTGCTTTGATAGATGGCG- BHQ1	59	129	500	200
Chicken/Duck-Bac	Poulets /canards	AB666125.1	F : AATATTGGTCAATGGGCGAGAG R : CACGTAGTGTCCGTTATTCCTTA	6-FAM -TCCTTCACGCTACTTGG- MGB-NFQ	59	200	500	200
IAC	N.A.	Aucun	F : CTGAGTAGCCACGTTATTATC R : GCGAACAACCTAAGTTGATTG	Cy5 -CGCACTTGCTCTACACCCTTCATAC- IAbRQSp	59/63 ²	87	500	200

¹Numéro d'accèsion de référence pour le choix du fragment d'ADN utilisé pour la courbe standard et la vérification de l'alignement des amorces et de la sonde.

²En fonction du marqueur avec lequel il est associé en duplex qPCR.

³Le marqueur BacR cible différentes longueurs de fragment d'ADN, selon l'analyse BLAST réalisée sur NCBI en décembre 2019.

N.A. = Non applicable Temp. = température Conc. = concentration F : amorce sens (forward) R : amorce anti-sens (Reverse)

Tableau 46. Protocole d'amplification qPCR du marqueur général BacGen et des marqueurs spécifiques.

Marqueurs	Dénaturation initiale		40 cycles				Élongation finale	
	(°C)	Durée	Dénaturation		Hybridation des amorces et élongation		(°C)	Durée
BacGen	95	2 mins	95	10 sec	59	10 sec	72	1 min
BacR	98	2 mins	98*	15 sec	63	30	Aucune	Aucune
HumM2	95	2 mins	95	15 sec	59	30 sec	72	1 min
Pig-1-Bac								
Chicken/Duck-Bac								

* La température de dénaturation a été modifiée à 98°C au lieu de 95°C pour BacR lors des essais visant à améliorer la sensibilité.

8.5 MÉTHODE DE PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

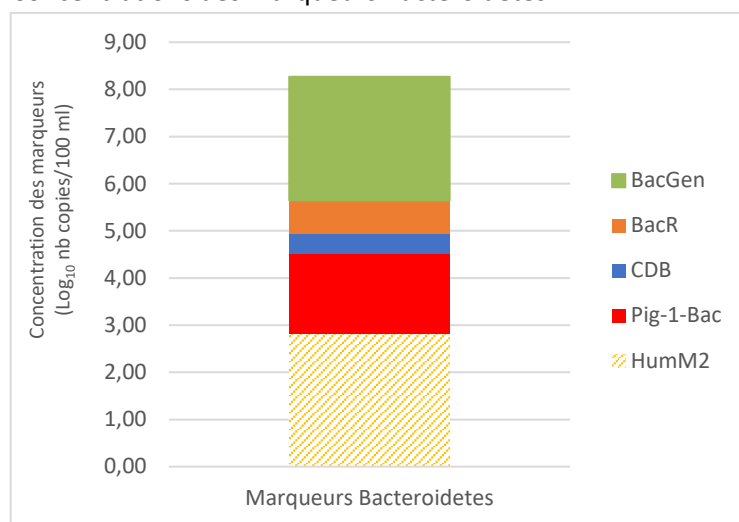
Dans l'éventualité où un suivi dans le temps est réalisé pour un même site, il est intéressant de présenter les résultats tels que ce qui a été fait pour les bassins versants de l'étude, c'est-à-dire en combinant les concentrations de marqueurs avec les populations d'*E. coli* sur le même graphique et en y ajoutant les LOD. Cette proposition graphique permet de voir si une contamination fécale a eu lieu à une date donnée et d'y associer, ou pas, la source à l'aide des marqueurs spécifiques évalués.

Si un seul échantillon est analysé de façon ponctuelle, il est davantage intéressant de présenter les résultats en tableau et en graphique et ce, de façon à voir une proportion de chacun. Une proposition de rapport d'analyse est présentée à l'Annexe 19, mais voici un exemple de ce dont il est question pour un échantillon pris de façon ponctuelle. Noter que les résultats en graphique sont présentés en Log_{10} nombre de copies de marqueurs par 100 ml d'eau de façon à pouvoir y présenter tous les marqueurs. Il est possible de mettre les valeurs absolues des marqueurs spécifiques en excluant BacGen. Il serait aussi possible de les présenter en charges si les mesures de débit de l'eau sont disponibles.

Ex. Numéro de référence de l'échantillon: 2023-567-RA

<i>E. coli</i>	BacGen	BacR	Pig-1-Bac	HumM2	CDB
UFC/100 ml	copies/100 ml				
8 320	$1,88 \times 10^8$	$4,42 \times 10^5$	$3,30 \times 10^4$	$<6,45 \times 10^2$	$8,68 \times 10^4$
Log_{10} UFC/100 ml					
3,92	8,27	5,65	4,52	<2,81	4,94

Concentrations des marqueurs *Bacteroidetes*



HumM2 est hachuré puisqu'il s'agit de la LOD.

En tableau, il est possible de voir les concentrations en *E. coli* qui sont davantage utilisés comme indicateurs généraux de contamination fécale, puis de voir les sources de contamination potentielle en graphique avec les marqueurs spécifiques et BacGen. Avec le temps, les usagers pourront mieux interpréter les résultats. Par

exemple, si la concentration de BacGen est inférieure à $1,00 \times 10^5$, il ne serait pas surprenant de ne pas retrouver de marqueurs spécifiques. À l'inverse, si la concentration de BacGen est de $1,00 \times 10^5$ et qu'une concentration plus élevée de marqueurs spécifiques est quantifiée, il faudrait envisager reprendre l'analyse, puisque la concentration du marqueur ciblant l'ADN des *Bacteroidetes* devrait toujours être plus élevé que celle des marqueurs spécifiques. Pour ce qui est du marqueur Chicken/Duck-Bac, il est quand même présenté malgré son manque de spécificité et doit donc être interprété avec attention. Le marqueur détecte principalement des sources aviaires, mais des sources humaines et porcines peuvent aussi contribuer à la quantification du marqueur. Ainsi, une détection seule de CDB ($>LOD$) sans Pig-1-Bac ou HumM2 ($<LOD$) indique une contamination d'origine aviaire probablement plus importante que celle d'origine porcine et humaine. Au contraire, si les marqueurs HumM2 et/ou Pig-1-Bac obtiennent des concentrations plus élevées que celle de CDB, alors la contamination fécale s'explique principalement par une source humaine et/ou porcine, mais peu par une source aviaire.

CONCLUSIONS

Le mandat octroyé par le MELCCFP à l'IRDA avait pour but de développer une procédure permettant d'identifier différentes sources animales à l'origine de la contamination fécale de l'eau à l'aide de marqueurs génétiques. Entre 2019 et 2023, six principales étapes ont été accomplies, soit :

- Faire une revue de littérature afin de cibler les meilleurs marqueurs génétiques.
- Mettre au point la méthode de dénombrement des marqueurs par qPCR
- Évaluer la persistance des marqueurs dans différents engrais organiques en conditions contrôlées
- Évaluer la contribution relative des marqueurs dans des échantillons d'eau contaminés artificiellement en conditions contrôlées
- Évaluer le devenir environnemental des marqueurs dans des sols agricoles, ainsi que l'eau de ruissellement et de lessivage suivant l'épandage d'engrais organiques
- Valider la méthode en bassins versants

À la suite de la revue de littérature, l'analyse des *Bacteroidales* semble le meilleur choix pour la détermination des sources de contamination fécale. La prémisse de base, voulant que les marqueurs sélectionnés ciblent le même groupe de microorganismes afin de pouvoir mesurer les contributions relatives de chaque espèce animale à la source de la contamination, apparaît intéressante.

Au cours de la mise au point de la méthode, la plupart des marqueurs ont présenté une bonne spécificité d'après les espèces animales et les types d'échantillons analysés. De plus, les limites de quantification et de détection trouvées étaient, pour la plupart, en accord avec celles rapportées par la littérature. Les analyses qui ont suivi avaient pour but de déterminer l'inhibition qPCR des différentes matrices sur tous les marqueurs et d'optimiser la méthode afin d'améliorer leur spécificité. Le marqueur universel BacGen a été détecté dans tous les échantillons de matières fécales et tous les échantillons d'eau. Ensuite, après plusieurs essais, le marqueur humain HumM2 s'est révélé le plus spécifique, BacHum et HF183 ayant effectivement été trouvés dans des échantillons de fumier de poulet. Par la suite, le marqueur porcin Pig-1-Bac a présenté une excellente spécificité, seul un échantillon provenant de bovins de boucherie avait été détecté positif. Ce même échantillon a par ailleurs montré une faible concentration en marqueurs bovins, malgré un signal très fort pour tous les autres échantillons provenant de bovins. Le marqueur ruminant n'a pas été détecté dans ce même échantillon. Il serait intéressant de préciser si le type d'élevage ou l'âge des animaux peut avoir un effet sur la présence des marqueurs. Ainsi, d'autres échantillons devront être prélevés afin de s'assurer de la polyvalence des marqueurs en fonction des échantillons, notamment pour les marqueurs bovin et ruminant qui devraient ultimement permettre de distinguer l'ensemble des ruminants (bovins d'élevage, chevreuil, chèvre, mouton, etc.) des bovins d'élevage spécifiquement. Finalement, le marqueur ciblant le poulet Chicken/Duck-Bac (CDB) s'est révélé plutôt difficile à mettre au point. En effet, sa spécificité et sensibilité n'étaient pas optimales. Les résultats rencontrés avec un lisier de poules pondeuses sans ripe permettent tout de même de croire que la nature de la matrice joue un rôle prépondérant dans la sensibilité de la méthode et la présence des marqueurs. L'analyse de futurs échantillons pourra permettre de mieux évaluer ces problèmes et de bien interpréter les résultats obtenus avec le marqueur CDB. Dans le cadre d'un futur projet,

il serait idéal de travailler davantage sur la discrimination des animaux sauvages de ceux d'élevages en optimisant les marqueurs existants ou en développant de nouveaux.

Les essais d'entreposage des engrais organiques ont permis de confirmer la décroissance exponentielle des populations d'*E. coli* dans les quatre matrices étudiées et ce, à un taux plus élevé à 12 °C qu'à 4 °C. Ces essais ont d'ailleurs permis de démontrer que les marqueurs génétiques étaient plutôt stables dans le temps. Leur devenir n'a pu être caractérisé par une décroissance linéaire ou exponentielle dans le contexte de l'étude. La quantité de marqueurs universels est demeurée stable durant l'essai dans le lisier de porc, alors que le marqueur spécifique porcine a diminué et ce, aux deux températures évaluées. Cette information sera cruciale dans l'interprétation des résultats des sources de contamination de l'eau.

Les essais de contamination artificielle d'échantillons d'eau de surface et souterraine ont confirmé, encore une fois, la non-spécificité du marqueur BacBov1. Le marqueur BacR a été préférable pour distinguer les *Bacteroidales* provenant des ruminants de ceux de porcs, de poules ou d'humains. La concentration, le taux de recouvrement ainsi que la contribution relative des marqueurs à l'étude variaient davantage dans les échantillons d'eau de surface que dans les eaux de puits. La nature et la composition de l'eau de surface pourraient en être la cause. Aussi, les analyses ont permis d'observer l'impact de la quantité ajoutée par un intrant sur la détection des marqueurs. Plus il y a de l'ADN de *Bacteroidales*, mieux les marqueurs sont détectés et quantifiés. De ce fait, il serait intéressant de considérer les quantités théoriques de *Bacteroidales* contenues dans les matières fécales et d'en tenir compte lors de la recherche de la source de contamination fécale. Enfin, la variabilité observée des résultats de nature exponentielle associée à la méthode qPCR rend encore plus importante la normalisation de la procédure pour des fins de traçage des sources de contamination fécale dans l'eau.

L'année consacrée à étudier le devenir environnemental des marqueurs génétiques *Bacteroidetes* a permis d'évaluer l'impact de certaines pratiques d'épandage (types de fumiers et dates d'épandage) en parcelles de recherche. Pour ce faire, des sites expérimentaux en sol de type loam argileux, loam sableux et argile lourde ont été mis en place afin de recueillir l'eau des piézomètres et de ruissellement. Les épandages de lisier de porc ajoutaient des *Bacteroidetes* dans le sol, selon les résultats obtenus avec le marqueur général BacGen et le marqueur spécifique aux porcs Pig-1-Bac. Malgré cela, Pig-1-Bac n'a pas été retrouvé dans tous les échantillons de sol ayant reçu du lisier, ni dans l'eau des piézomètres et de ruissellement qui était associée à la parcelle. Le transport des *Bacteroidetes* et leur ADN dans l'eau semble avoir été plus important à l'automne, lorsque les températures moyennes baissent et que les précipitations augmentent. Enfin, le marqueur BacGen a été retrouvé dans le sol à des concentrations élevées avant même que les épandages aient eu lieu. Sans épandage de lisier de porc, la concentration de ce marqueur dans le sol de type loam argileux a eu tendance à diminuer aux mois de juillet et août, lorsque les températures augmentent et que les précipitations baissent. Des facteurs tels que la température, les précipitations, le niveau d'ensoleillement et les sources potentielles de contamination de l'eau doivent inévitablement être considérés dans la méthode de traçage de la source de contamination fécale appliquée à l'eau d'un bassin versant. Dans le cadre de prochains travaux, il serait intéressant d'étudier l'impact de la gestion des fumiers solides à la ferme, puisque cela pourrait influencer les niveaux de bactéries dans les engrais lors de l'épandage et par conséquent leur devenir dans l'environnement. Par exemple, les

microorganismes présents dans des amas entreposés au champ ou sur une dalle de béton avec ou sans toiture risquent de ne pas se comporter de la même façon.

Finalement, la validation de la méthode développée a été mise à l'épreuve à l'échelle de trois bassins versants du Québec, soit le Lac Boivin et le ruisseau au Castor en Montérégie, ainsi que la rivière du Chicot dans les Laurentides. Les populations d'*E. coli* ont été mesurées en parallèle aux marqueurs génétiques, et la visualisation des résultats a permis de confirmer l'intérêt de conserver cette analyse, en raison de sa force à indiquer une contamination fécale de l'eau. Avec le temps, il sera peut-être possible de déterminer un facteur de conversion entre ces populations bactériennes et les concentrations en marqueurs BacGen, la corrélation entre les deux comptes étant pour l'instant modérée, mais robuste. En effet, l'analyse des populations d'*E. coli* par méthode culturale ainsi que par qPCR permettrait de comparer la décroissance de l'ADN d'*E. coli* avec celui des marqueurs *Bacteroidetes*. L'exposition des échantillons aux UV pourrait aussi être évaluée en parallèle afin de documenter la décroissance des marqueurs *Bacteroidetes* et *E. coli* dans d'autres conditions qu'à l'obscurité, tel qu'évalué lors de la première année du projet pour l'évaluation de la persistance des marqueurs dans des fumiers et lisiers en conditions contrôlées.

La présentation des résultats de marqueurs spécifiques séparément permet de visualiser la proportion de chacun dans un même échantillon et d'indiquer quelle pourrait être la source prédominante de contamination. À mesure que la méthode sera appliquée par les intervenants, il sera possible de peaufiner l'interprétation des résultats, comme cela a été possible historiquement avec les populations d'*E. coli*. L'acquisition de données pourra aussi permettre d'étudier l'application d'un facteur de correction au marqueur Chicken/Duck-Bac par rapport aux autres marqueurs, principalement Pig-1-Bac. D'autres marqueurs *Bacteroidetes* devraient être ajoutés à la méthode pour cibler davantage de sources de contamination animale et de distinguer les animaux sauvages des animaux d'élevage. La recherche d'ADN mitochondrial serait complémentaire comme indicateur de présence animale, entre autres. D'autres méthodes pourraient aussi être explorées comme complément à la méthode de traçage des marqueurs dans l'eau, tel que l'amplification dépendante de l'hélicase (HDA) avec un test sur bandelette suggérée par [Kolm et al. \(2019\)](#) pour orienter les analyses plus coûteuses par qPCR en ciblant les marqueurs présents sans toutefois les quantifier.

Selon l'objectif visé lors de la prise d'un échantillon d'eau, il est nécessaire de bien caractériser le territoire, les sources de contamination fécale potentielles, ainsi que les périodes à risque associées à chacune d'elles. Ceci permet de cibler et de prioriser les zones où une intervention est requise afin d'améliorer la qualité de l'eau.

Au final, ce projet d'envergure a permis de jeter les bases sur le traçage des sources de contamination fécale de l'eau dans les conditions du Québec. L'approche préconisée, soit l'analyse des marqueurs génétiques de *Bacteroidetes*, semble prometteuse, bien que d'autres d'essais soient nécessaires afin de viser davantage d'espèces animales dans un contexte de contamination fécale de l'eau au Québec.

RÉFÉRENCES

- Ahmed, W., Hughes, B. et J. Harwood, V. (2016). *Current Status of Marker Genes of Bacteroides and Related Taxa for Identifying Sewage Pollution in Environmental Waters*. ResearchGate.
https://www.researchgate.net/publication/303625442_Current_Status_of_Marker_Genes_of_Bacteroides_and_Related_Taxa_for_Identifying_Sewage_Pollution_in_Environmental_Waters
- Bae, S. et Wuertz, S. (2012). Survival of host-associated bacteroidales cells and their relationship with *Enterococcus* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and adenovirus in freshwater microcosms as measured by propidium monoazide-quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 922-932. <https://doi.org/10.1128/AEM.05157-11>
- Baker-Austin, C., Rangdale, R., Lowther, J. et Lees, D. N. (2010). Application of mitochondrial DNA analysis for microbial source tracking purposes in shellfish harvesting waters. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 61(1), 1-7.
<https://doi.org/10.2166/wst.2010.767>
- Ballesté, E. et Blanch, A. R. (2011). Bifidobacterial Diversity and the Development of New Microbial Source Tracking Indicators. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3518-3525.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02198-10>
- Bell, A., Layton, A. C., McKay, L., Williams, D., Gentry, R. et Sayler, G. S. (2009). Factors influencing the persistence of fecal Bacteroides in stream water. *Journal of Environmental Quality*, 38(3), 1224-1232.
<https://doi.org/10.2134/jeq2008.0258>
- Bernhard, A. E. et Field, K. G. (2000). A PCR Assay To Discriminate Human and Ruminant Feces on the Basis of Host Differences in Bacteroides-Prevotella Genes Encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(10), 4571-4574. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4571-4574.2000>
- Blais, M.-A., Côté, C., Villemur, R., Gagnéux, M., Cantin, P. et Villion, M. Évaluation du potentiel de méthodes de détermination de sources de contamination microbiologique de l'eau. Rapport présenté au ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. 40 pages. 2015.
- Boehm, A. B., Van De Werfhorst, L. C., Griffith, J. F., Holden, P. A., Jay, J. A., Shanks, O. C., Wang, D. et Weisberg, S. B. (2013). Performance of forty-one microbial source tracking methods: a twenty-seven lab evaluation study. *Water Research*, 47(18), 6812-6828. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.046>
- Burch, T. R., Spencer, S., Borchardt, S. S., Larson, R. A. et Borchardt, M. (2018). Fate of manure-borne pathogens during anaerobic digestion and solids separation. *Journal of Environmental Quality*, 47(2), 336-344.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. et Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Caldwell, J. M. et Levine, J. F. (2009). Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 17-22.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.11.007>
- Caldwell, J. M., Raley, M. E. et Levine, J. F. (2007). Mitochondrial Multiplex Real-Time PCR as a Source Tracking Method in Fecal-Contaminated Effluents. *Environmental Science & Technology*, 41(9), 3277-3283.
<https://doi.org/10.1021/es062912s>
- Caldwell, J., Payment, P. et Villemur, R. (2011). Mitochondrial DNA as Source Tracking Markers of Fecal Contamination. Dans C. Hagedorn, A. R. Blanch et V. J. Harwood (dir.), *Microbial Source Tracking*:

- Methods, Applications, and Case Studies* (p. 229-250). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9386-1_10
- Cruz-Paredes, C., Tájmél, D. et Rousk, J. (2021). Can moisture affect temperature dependences of microbial growth and respiration? *Soil Biology and Biochemistry*, 156, 108223. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108223>
- Dick, L. K., Bernhard, A. E., Brodeur, T. J., Domingo, J. W. S., Simpson, J. M., Walters, S. P. et Field, K. G. (2005). Host Distributions of Uncultivated Fecal Bacteroidales Bacteria Reveal Genetic Markers for Fecal Source Identification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6), 3184-3191. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3184-3191.2005>
- Edge, T. A., Hill, S., Crowe, A., Marsalek, J., Seto, P., Snodgrass, B., Toner, R. et Patel, M. (2018). Remediation of a Beneficial Use Impairment at Bluffer's Park Beach in the Toronto Area of Concern. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 21(3), 285-292. <https://doi.org/10.1080/14634988.2018.1497401>
- Fremaux, B., Boa, T. et Yost, C. K. (2010). Quantitative Real-Time PCR Assays for Sensitive Detection of Canada Goose-Specific Fecal Pollution in Water Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4886-4889. <https://doi.org/10.1128/AEM.00110-10>
- Fremaux, B., Gritzfield, J., Boa, T. et Yost, C. K. (2009). Evaluation of host-specific Bacteroidales 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed. *Water Research*, 43(19), 4838-4849. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.045>
- Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C. et Mills, D. A. (2015). Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome*, 3(28), 1-10.
- Gómez-Doñate, M., Ballesté, E., Muniesa, M. et Blanch, A. R. (2012). New Molecular Quantitative PCR Assay for Detection of Host-Specific Bifidobacteriaceae Suitable for Microbial Source Tracking. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5788-5795. <https://doi.org/10.1128/AEM.00895-12>
- 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. et Shanks, O. C. (2014). Improved HF183 Quantitative Real-Time PCR Assay for Characterization of Human Fecal Pollution in Ambient Surface Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3086-3094. <https://doi.org/10.1128/AEM.04137-13>
- Green, H. C., Shanks, O. C., Sivaganesan, M., Haugland, R. A. et Field, K. G. (2011). Differential decay of human faecal Bacteroides in marine and freshwater. *Environmental Microbiology*, 13(12), 3235-3249. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02549.x>
- Gruzdev, N., Pinto, R. et Sela, S. (2011). Effect of Desiccation on Tolerance of Salmonella enterica to Multiple Stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1667-1673. <https://doi.org/10.1128/AEM.02156-10>
- Harwood, V. J., Staley, C., Badgley, B. D., Borges, K. et Korajkic, A. (2014). Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS microbiology reviews*, 38(1), 1-40. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12031>
- Haugland, R. A., Varma, M., Sivaganesan, M., Kelty, C., Peed, L. et Shanks, O. C. (2010). Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected Bacteroidales species and human fecal waste by qPCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(6), 348-357. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.06.001>
- Hundesda, A., Maluquer de Motes, C., Albinana-Gimenez, N., Rodriguez-Manzano, J., Bofill-Mas, S., Sunen, E. et Rosina Girones, R. (2009). Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *Journal of Virological Methods*, 158(1-2), 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.02.006>
- Jamieson, R. C., Gordon, R. J., Sharples, K. E., Stratton, G. W. et Madani, A. (2002). Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water: a review. *Canadian Biosystems*

- Engineering/Le génie des biosystèmes au Canada*, 44. <http://csbe-scgab.ca/publications/cbe-journal/browse/3555-movement-and-persistence-of-fecal-bacteria-in-agricultural-soils-and-subsurface-drainage-water-a-review>
- Johnston, C., Byappanahalli, M. N., Gibson, J. M., Ufnar, J. A., Whitman, R. L. et Stewart, J. R. (2013). Probabilistic Analysis Showing That a Combination of Bacteroides and Methanobrevibacter Source Tracking Markers Is Effective for Identifying Waters Contaminated by Human Fecal Pollution. *Environmental Science & Technology*, 47(23), 13621-13628. <https://doi.org/10.1021/es403753k>
- Kildare, B. J., Leutenegger, C. M., McSwain, B. S., Bambic, D. G., Rajal, V. B. et Wuertz, S. (2007). 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: A Bayesian approach. *Water Research*, 41(16), 3701-3715. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.037>
- Kim, H. B., Borewicz, K., White, B. A., Singer, R. S., Sreevatsan, S., Tu, Z. J. et Isaacson, R. E. (2011). investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Veterinary Microbiology*, 153, 124-133.
- Ko, H. Y., Cho, K., Park, S., Kim, J. H., Kang, J.-H., Jeong, Y. S., Choi, J. D., Sin, Y., Lee, C. et Ko, G. (2018). Host-Specific Bacteroides Markers-Based Microbial Source Tracking in Aquaculture Areas. *Microbes and Environments*, 33(2), 151-161. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17166>
- Kobayashi, A., Sano, D., Hatori, J., Ishii, S. et Okabe, S. (2013). Chicken- and duck-associated Bacteroides-Prevotella genetic markers for detecting fecal contamination in environmental water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7427-7437. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4469-2>
- Kolm, C., Martzy, R., Führer, M., Mach, R. L., Krska, R., Baumgartner, S., Farnleitner, A. H. et Reischer, G. H. (2019). Detection of a microbial source tracking marker by isothermal helicase-dependent amplification and a nucleic acid lateral-flow strip test. *Scientific Reports*, 9, 393. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36749-7>
- Kortbaoui, R., Locas, A., Imbeau, M., Payment, P. et Villemur, R. (2009). Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking method of human, bovine, chicken, ovine, and porcine in fecal-contaminated surface water. *Water Research*, 43(7), 2002-2010. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.030>
- Larouche, É., Gagnéux, M., Tremblay, M.-È., Rhouma, M., Gasser, M.-O., Quessy, S. et Côté, C. (2020). Impact of liquid hog manure applications on antibiotic resistance genes concentration in soil and drainage water in field crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 66(10), 549-561. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0343>
- Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R. et Saylor, G. (2006). Development of Bacteroides 16S rRNA Gene TaqMan-Based Real-Time PCR Assays for Estimation of Total, Human, and Bovine Fecal Pollution in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4214-4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.01036-05>
- Lee, D.-Y., Weir, S. C., Lee, H. et Trevors, J. T. (2010). Quantitative identification of fecal water pollution sources by TaqMan real-time PCR assays using Bacteroidales 16S rRNA genetic markers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(6), 1373-1383. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2880-0>
- Lim, J.-S., Yang, S. H., Kim, B.-S. et Lee, E. Y. (2018). Comparison of microbial communities in swine manure at various temperatures and storage times. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(8), 1373-1380. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0704>
- Linke, R. B., Kebede, G., Mushi, D., Lakew, A., Hayes, D. S., Graf, W. et Farnleitner, A. H. (2021). Assessing the faecal source sensitivity and specificity of ruminant and human genetic microbial source tracking markers in the central Ethiopian highlands. *Letters in Applied Microbiology*, 72(4), 458-466. <https://doi.org/10.1111/lam.13436>

- Louca, S., Doebeli, M. et Parfrey, L. W. (2018). Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome*, 6(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0420-9>
- Lv, L., Li, W., Wu, C., Meng, L. et Qin, W. (2017). Microbial community composition and function in a pilot-scale anaerobic-anoxic-aerobic combined process for the treatment of traditional Chinese medicine wastewater. *Bioresource Technology*, 240, 84-93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.053>
- Maluquer de Motes, C., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Martín, M. et Girones, R. (2004). Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for Tracing the Source of Fecal Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1448-1454. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1448-1454.2004>
- Martellini, A., Payment, P. et Villemur, R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Research*, 39, 541-548.
- Marti, R., Tien, Y.-C., Murray, R., Scott, A., Sabourin, L. et Topp, E. (2014). Safely Coupling Livestock and Crop Production Systems: How Rapidly Do Antibiotic Resistance Genes Dissipate in Soil following a Commercial Application of Swine or Dairy Manure? *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3258-3265. <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-14>
- Marti, R., Zhang, Y., Tien, Y.-C., Lapen, D. R. et Topp, E. (2013). Assessment of a new Bacteroidales marker targeting North American beaver (*Castor canadensis*) fecal pollution by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 95(2), 201-206. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.016>
- Mattioli, M. C., Sassoubre, L. M., Russell, T. L. et Boehm, A. B. (2017). Decay of sewage-sourced microbial source tracking markers and fecal indicator bacteria in marine waters. *Water Research*, 108, 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.066>
- Mayer, R. E., Vierheilig, J., Egle, L., Reischer, G. H., Saracevic, E., Mach, R. L., Kirschner, A. K. T., Zessner, M., Sommer, R. et Farnleitner, A. H. (2015). Automated Sampling Procedures Supported by High Persistence of Bacterial Fecal Indicators and Bacteroidetes Genetic Microbial Source Tracking Markers in Municipal Wastewater during Short-Term Storage at 5°C. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5134-5143. <https://doi.org/10.1128/AEM.00998-15>
- Mieszkis, S., Furet, J.-P., Corthier, G. et Gourmelon, M. (2009). Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific Bacteroidales 16S rRNA genetic markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3045-3054. <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-08>
- Naturalis Biodiversity. (s. d.). 2019 Annual Checklist : Arbre taxonomique. Catalogue of Life. Récupéré le 4 décembre 2019 de <http://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree/id/721054a9d659da67eabf3b1d8300465a>
- Odagiri, M., Schriewer, A., Hanley, K., Wuertz, S., Misra, P. R., Panigrahi, P. et Jenkins, M. W. (2015). Validation of Bacteroidales quantitative PCR assays targeting human and animal fecal contamination in the public and domestic domains in India. *Science of The Total Environment*, 502, 462-470. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.040>
- Okabe, S., Okayama, N., Savichtcheva, O. et Ito, T. (2007). Quantification of host-specific Bacteroides-Prevotella 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4), 890-901. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0714-x>
- Phong, S. F., Shanmugavelu, S., Thayalini, K., Noraini, S. et Wong, H. K. (2010). Detection of Lactobacillus, Bacteroides and Clostridium perfringens in the gastrointestinal contents of chicken fed different diets by real-time PCR. *J.Trop.Agric. and Fd. Sc.*, 38(1), 81-87.
- Piorkowski, G. S., Bezanson, G. S., Jamieson, R. C., Hansen, L. T. et Yost, C. K. (2014). Effect of hillslope position and manure application rates on the persistence of fecal source tracking indicators in an agricultural soil. *Journal of Environmental Quality*, 43(2), 450-458. <https://doi.org/10.2134/jeq2013.07.0274>

- Purcell, R. V., Pearson, J., Frizelle, F. A. et Keenan, J. I. (2016). Comparative of standard, quantitative and digital PCR in the detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Nature Scientific Reports*, 6(34554), 1-8.
- Raith, M. R., Kelty, C. A., Griffith, J. F., Schriewer, A., Wuertz, S., Mieszkina, S., Gourmelon, M., Reischer, G. H., Farnleitner, A. H., Ervin, J. S., Holden, P. A., Ebentier, D. L., Jay, J. A., Wang, D., Boehm, A. B., Aw, T. G., Rose, J. B., Balleste, E., Meijer, W. G., ... Shanks, O. C. (2013). Comparison of PCR and quantitative real-time PCR methods for the characterization of ruminant and cattle fecal pollution sources. *Water Research*, 47(18), 6921-6928. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.061>
- Reischer, G. H., Kasper, D. C., Steinborn, R., Mach, R. L. et Farnleitner, A. H. (2006). Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5610-5614. <https://doi.org/10.1128/AEM.00364-06>
- Rogers, S. W., Donnelly, M., Peed, L., Kelty, C. A., Mondal, S., Zhong, Z. et Shanks, O. C. (2011). Decay of Bacterial Pathogens, Fecal Indicators, and Real-Time Quantitative PCR Genetic Markers in Manure-Amended Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(14), 4839-4848. <https://doi.org/10.1128/AEM.02427-10>
- Salyers, A. A. (1984). *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annual review of microbiology*, 38(1), 293-313.
- Savichtcheva, O., Okayama, N. et Okabe, S. (2007). Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Research*, 41(16), 3615-3628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.028>
- Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W. et Siciliano, S. D. (2005). Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environmental Microbiology*, 7(2), 249-259. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00702.x>
- Shanks, O. C., Kelty, C. A., Sivaganesan, M., Varma, M. et Haugland, R. A. (2009). Quantitative PCR for Genetic Markers of Human Fecal Pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5507-5513. <https://doi.org/10.1128/AEM.00305-09>
- Shanks, O., Kelty, C., Peed, L., Sivaganesan, M., Mooney, T. et Jenkins, M. (2014). Age-related shifts in the density and distribution of genetic marker water quality indicators in cow and calf feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1588-1594.
- Solecki, O., Jeanneau, L., Jardé, E., Gourmelon, M., Marin, C. et Pourcher, A. M. (2011). Persistence of microbial and chemical pig manure markers as compared to faecal indicator bacteria survival in freshwater and seawater microcosms. *Water Research*, 45(15), 4623-4633. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.012>
- Somnark, P., Chyerochana, N., Kongprajug, A., Mongkolsuk, S. et Sirikanchana, K. (2018a). PCR data and comparative performance of *Bacteroidales* microbial source tracking genetic markers. *Data in Brief*, 19, 156-169. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.04.129>
- Somnark, P., Chyerochana, N., Mongkolsuk, S. et Sirikanchana, K. (2018b). Performance evaluation of *Bacteroidales* genetic markers for human and animal microbial source tracking in tropical agricultural watersheds. *Environmental Pollution*, 236, 100-110. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.052>
- Spilki, F. R., Luz, R. B. da, Fabres, R. B., Soliman, M. C., Kluge, M., Fleck, J. D., Rodrigues, M. T., Comerlato, J., Cenci, A., Cerva, C., Dasso, M. G. et Roehe, P. M. (2013). Detection of human adenovirus, rotavirus and enterovirus in water samples collected on dairy farms from Tenente Portela, Northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 953-957. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300046>

- Tambalo, D. D., Fremaux, B., Boa, T. et Yost, C. K. (2012). Persistence of host-associated Bacteroidales gene markers and their quantitative detection in an urban and agricultural mixed prairie watershed. *Water Research*, 46(9), 2891-2904. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.048>
- Ufnar, J. A., Wang, S. Y., Ufnar, D. F. et Ellender, R. D. (2007). Methanobrevibacter ruminantium as an Indicator of Domesticated-Ruminant Fecal Pollution in Surface Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 7118-7121. <https://doi.org/10.1128/AEM.00911-07>
- USEPA. Method B: Bacteroidales in Water by TaqMan® Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Assay. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_b_2010.pdf 2010.
- USEPA. Method 1696: Characterization of Human Fecal Pollution in Water by HF183/BacR287 TaqMan® Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Assay. https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-03/documents/method_1696_draft_2019.pdf 2019a.
- USEPA. Method 1697: Characterization of Human Fecal Pollution in Water by HumM2TaqMan® Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Assay. https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-03/documents/method_1697_draft_2019.pdf 2019b.
- Verschuren, L. M. G., Calus, M. P. L., Jansman, A. J. M., Bergsma, R., Knol, E. F., Gilbert, H. et Zemb, O. (2018). fecal microbial composition associated with variation in feed efficiency in pigs depends on diet and sex. *Journal of Animal Science*, 96, 1405-1418.
- Vetrovsky, T. et Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS ONE*, 8(2), e57923.
- Villemur, R., Imbeau, M., Vuong, M. N., Masson, L. et Payment, P. (2015). An environmental survey of surface waters using mitochondrial DNA from human, bovine and porcine origin as fecal source tracking markers. *Water Research*, 69, 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.063>
- Vuong, N.-M., Villemur, R., Payment, P., Brousseau, R., Topp, E. et Masson, L. (2013). Fecal source tracking in water using a mitochondrial DNA microarray. *Water Research*, 47(1), 16-30. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.011>
- Walters, S. P. et Field, K. G. (2009). Survival and persistence of human and ruminant-specific faecal Bacteroidales in freshwater microcosms. *Environmental Microbiology*, 11(6), 1410-1421. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01868.x>
- Walters, S. P., Gannon, V. P. J. et Field, K. G. (2007). Detection of Bacteroidales Fecal Indicators and the Zoonotic Pathogens E. coli O157:H7, Salmonella, and Campylobacter in River Water. *Environmental Science & Technology*, 41(6), 1856-1862. <https://doi.org/10.1021/es0620989>
- Wang, D., Farnleitner, A. H., Field, K. G., Green, H. C., Shanks, O. C. et Boehm, A. B. (2013). Enterococcus and Escherichia coli fecal source apportionment with microbial source tracking genetic markers--is it feasible? *Water Research*, 47(18), 6849-6861. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.058>
- Weidhaas, J., Mantha, S., Hair, E., Nayak, B. et Harwood, V. J. (2015). Evidence for Extraintestinal Growth of Bacteroidales Originating from Poultry Litter. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(1), 196-202. <https://doi.org/10.1128/AEM.02354-14>