

## Effets potentiels des antibiotiques sur le taux de dénitrification des sédiments de Tresme (bassin de la Seine)

Anniét Laverman \*, Céline Roose-Amsaleg, Josette Garnier

UMR Sisyphé 7619

\* [Anniét.laverman@upmc.fr](mailto:Anniét.laverman@upmc.fr)

### 1 Introduction

Des concentrations importantes d'antibiotiques, pouvant atteindre plusieurs centaines de nanogrammes par litres, ont pu être mises en évidence dans les eaux de surface, aux Etats-Unis (Kolpin *et al.*, 2002) mais aussi en Europe, notamment en France (Tamtam *et al.*, 2008). L'usage urbain, comprenant la médecine hospitalière et domestique, est considéré comme la principale source de contamination des antibiotiques aux eaux de surface, par le biais des eaux usées. En effet, plusieurs études ont montré que ces composés n'étaient pas complètement éliminés par les STEP (stations d'épuration), et pouvaient donc contaminer les milieux récepteurs (Batt *et al.*, 2007; Vieno *et al.*, 2007).

La contamination de l'environnement par ces composés suscite un intérêt croissant du fait de leur capacité de sélection d'antibiorésistances chez les bactéries, ainsi que de leurs effets toxiques sur les organismes non cibles (Isidori *et al.*, 2005; Obst *et al.*, 2006). Du fait de leur action spécifique sur les bactéries, un risque de perturbation des cycles biogéochimiques pourrait également être possible, en particulier dans les sédiments, compartiment important pour la dénitrification (Costanzo *et al.*, 2005).

L'objectif de cette étude a été de suivre au cours du temps l'activité de dénitrification de communautés bactériennes en présence d'antibiotiques, l'érythromycine et la vancomycine, afin de déterminer l'existence d'éventuelles perturbations de la dénitrification.

## 2 Matériel et méthode

### 2.1 Site d'étude et prélèvement du sédiment

Les sédiments utilisés dans cette étude sont prélevés à Tresmes, dans le bassin du Grand Morin. Le Grand Morin présente un bassin versant de 1 180 km<sup>2</sup> qui est devenu un bassin type pour l'étude du fonctionnement écologique d'un cours d'eau de tête de bassin en milieu agricole. Le Grand Morin est un affluent de la Marne, un des principaux affluents de La Seine, avec un bassin hydrographique d'une superficie de 12800 km<sup>2</sup> (Figure 1).

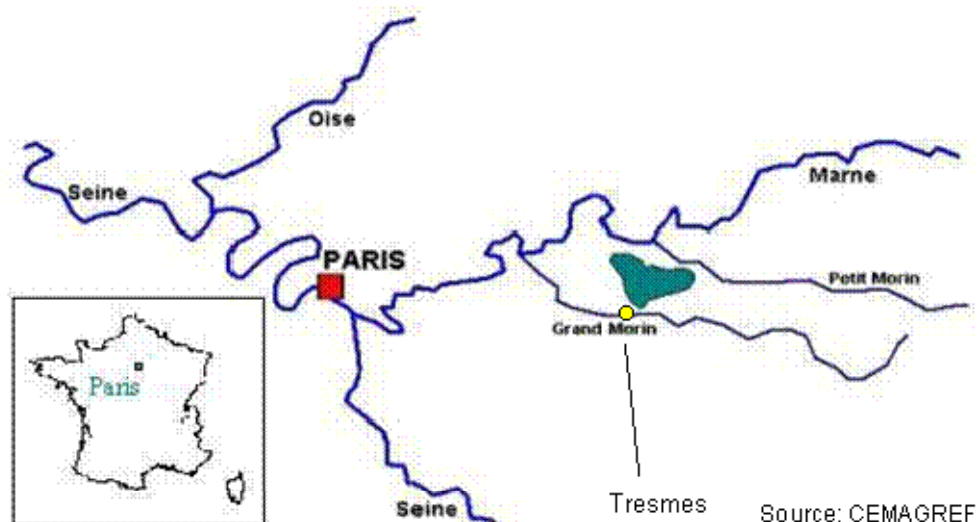


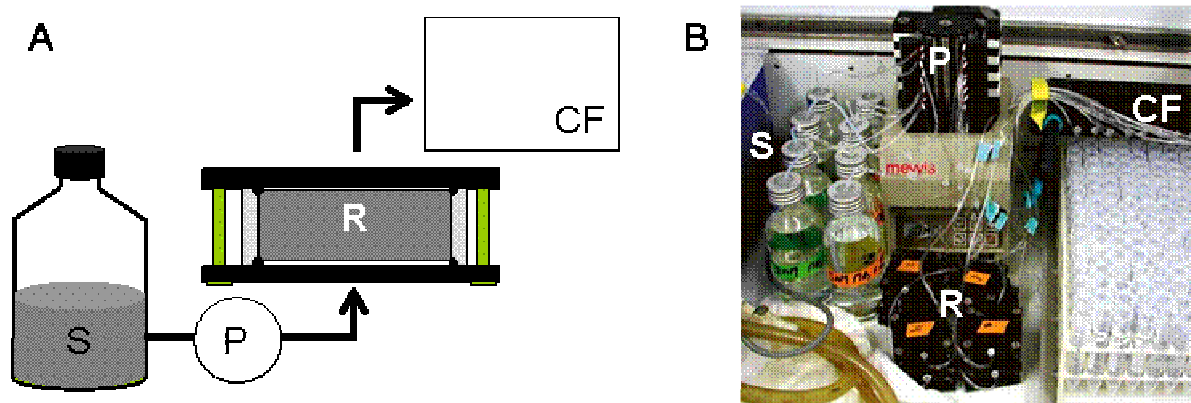
Figure 1 : Site de prélèvement de Tresmes dans le bassin du Grand Morin.

Les sédiments sont prélevés avec des tubes de 47 mm diamètre en plexiglas qui sont enfoncés dans le sédiment sur une hauteur de 1 cm. Ces segments constituent les corps des réacteurs, les sédiments y sont ainsi conservés intacts (Laverman et al. 2006). Les échantillons de sédiments sont collectés dans un carré d'environ 1 mètre de côté et des prélèvements supplémentaires sont pratiqués pour les analyses permettant de caractériser le sédiment (contenu en carbone et azote, granulométrie).

### 2.2 Détermination des taux de dénitrification : Les réacteurs en flux continu

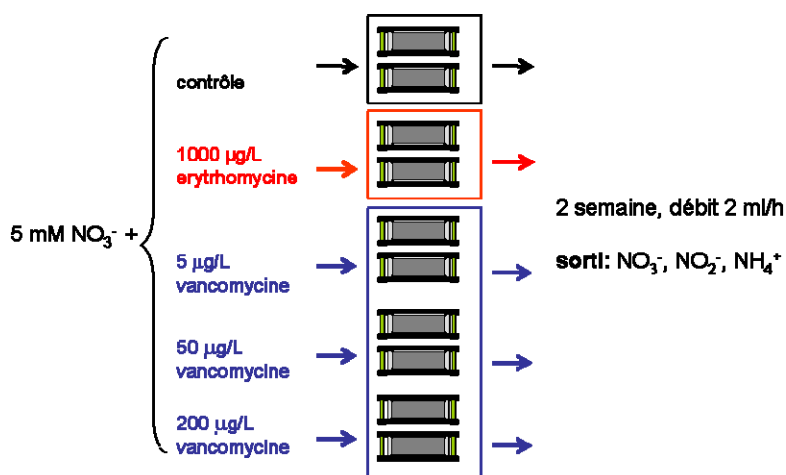
Les segments cylindriques contenant le sédiment sont fermés avec un filtre épais (filtre en fibre de verre, épaisseur 1.2 mm) et un filtre à très faible porosité (0.2  $\mu$ m, nitrocellulose). Un joint est placé de part et d'autre du segment pour éviter les fuites, et est maintenu avec des vis (figure 2).

Pour déterminer l'effet des antibiotiques sur les taux de dénitrification, nous avons alimenté les sédiments avec une solution contenant du nitrate seul, et d'autres avec nitrate et différentes concentrations de deux antibiotiques : l'érythromycine et la vancomycine (figure 3).



**Figure 2 : Dispositif schématique des réacteurs (A) et en <photo/vrai> (B) avec la solution nourrice (S), la pompe (P) qui alimente les réacteurs (R) et le collecteur de fractions (CF) pour le recueil des échantillons.**

Les solutions nourrices (voir Figures 2 et 3) sont préparées en quantité suffisante et avec différentes concentrations d'antibiotiques. Les réacteurs sont traités en duplicats avec nitrate (contrôle), une série avec une forte concentration d'un antibiotique ayant un effet déjà connu (Erythromycine, 1000 µg/L, Costanzo *et al.*, 2005), et trois concentrations différentes de vancomycine (5, 50 et 200 µg/L). Toutes les solutions sont « bullées » avec le gaz inerte N<sub>2</sub> avant et pendant l'expérience pour créer des conditions anoxiques. Les réacteurs de volume connu (V) sont reliés aux solutions nourrices avec une pompe péristaltique qui assure le débit (Q) tout au long de l'expérience. L'eau de la nourrice ayant circulé dans les réacteurs pendant une durée égale à V/Q est recueillie dans des fioles et échantillonnées 3 fois par jour (2 fois dans la journée et 1 fois dans la nuit) pendant plusieurs jours. Les échantillons sont congelés jusqu'à l'analyse des nutriments (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> et NH<sub>4</sub>). Les concentrations obtenues sont représentées en fonction du temps afin de déterminer les taux de réduction du nitrate, mais aussi les taux de production éventuelle du nitrite et de l'ammonium, et ainsi appréhender l'effet des antibiotiques. Les réacteurs ont été alimentés pendant 12 jours avec un débit de 2 ml h<sup>-1</sup>. A la fin de l'expérience, les sédiments ont été retirés des réacteurs, et congelés pour les autres analyses (granulométrie, carbone, concentrations d'antibiotiques dans le sédiment).



**Figure 3 : Schéma des manipulations avec les réacteurs en flux continu. Tous les réacteurs sont alimentés avec une solution nourrice qui contient du nitrate (5 mM) et différentes concentrations en antibiotiques ; 1000 µg/L pour l'erythromycine, et 5, 50 et 200 µg/L pour la vancomycine.**

### 3 Résultats

#### 3.1 Effets des antibiotiques sur les taux de réduction du nitrate

La réduction du nitrate dans les sédiments de Tresmes et les effets des différentes concentrations d'antibiotiques sur ces taux sont représentés à la figure 4. Le taux moyen de la réduction du nitrate sans 'ajout' (contrôle) d'antibiotiques est de  $107 (\pm 33)$   $\text{nmol NO}_3 \text{ cm}^{-3} \text{ sédiments h}^{-1}$ . L'ajout de l'érythromycine ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) dans la solution qui nourri les sédiments montre une baisse du taux significative (t-test,  $p=0.001$ ) de la réduction du nitrate d'environ 50% : le taux moyen de la réduction du nitrate avec des concentrations élevées d'érythromycine est en effet de  $53 (\pm 30)$   $\text{nmol NO}_3 \text{ cm}^{-3} \text{ sédiments h}^{-1}$ . Les taux de réduction des nitrates en présence de vancomycine varient entre  $91 (\pm 36)$  pour la plus faible concentration,  $118 (\pm 63)$  pour la concentration moyenne et  $71 (\pm 49)$   $\text{nmol NO}_3 \text{ cm}^{-3} \text{ sédiment h}^{-1}$  pour la plus haute concentration de vancomycine. Il n'y a donc pas d'effet significatif sur les taux de réduction du nitrates avec les deux plus faibles concentrations (T-test,  $p>0.05$ ) testées pendant 2 semaines dans ces sédiments ; par contre pour la concentration le plus élevée ( $200 \mu\text{g vancomycine L}^{-1}$ ) il apparait une réduction significative (t-test,  $p<0.05$ ) par rapport au contrôle comportant un ajout de nitrate, uniquement.

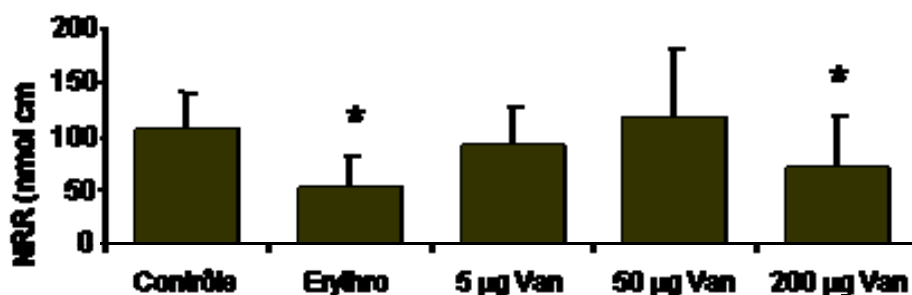


Figure 4 : Taux moyen de réduction du nitrate (NRR) en  $\text{nmol NO}_3 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$  des sédiments de Tresme (moyenne des duplicats). Tous les réacteurs sont alimentés avec 5 mM de nitrate et différentes concentrations d'antibiotiques ;  $1000 \mu\text{gL}^{-1}$  Erythromycine (Erythro),  $5 \mu\text{gL}^{-1}$  Vancomycine (5  $\mu\text{gVan}$ ),  $50 \mu\text{gL}^{-1}$  Vancomycine (50  $\mu\text{gVan}$ ),  $200 \mu\text{gL}^{-1}$  Vancomycine (200  $\mu\text{gVan}$ ).

#### 3.2 Effets des antibiotiques sur les taux de production du nitrite

La dénitrification est la réduction du nitrate en azote gazeux, di-azote atmosphérique  $-\text{N}_2-$  ou  $\text{N}_2\text{O}$  par l'intermédiaire du nitrite. Nous avons donc déterminé en même temps la production de nitrite, produit intermédiaire de la dénitrification. La Figure 5 montre les effets des antibiotiques sur les taux de production de nitrite à différentes périodes de l'expérience. Les taux moyen de production de nitrite pendant les 12 jours de l'expérience varient entre  $13 \text{ nmol NO}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ sédiments h}^{-1}$ , sans ajout d'antibiotiques,  $10 \text{ nmol NO}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ sédiments h}^{-1}$  avec l'érythromycine et  $15$ ,  $17$  et  $20 \text{ nmol NO}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ sédiments h}^{-1}$  aux trois niveaux de concentrations de la vancomycine. Il y a une large variation (voir l'écart-type) de la production de nitrite pendant cette période. La production de nitrite est la plus haute pendant les quatre premiers jours d'alimentation avec le nitrate et les différents antibiotiques, et varie de  $26$  à  $35 \text{ nmol NO}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ sédiments h}^{-1}$  sauf pour les sédiments alimenté avec de l'érythromycine, lesquels montrent une production relativement basse ( $13 \text{ nmol NO}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ sédiment h}^{-1}$ ) pendant cette période initiale.

Il semble qu'en fin de période (9-12 jours) expérimentale, la production du nitrite ne soit plus significative (t-test,  $p<0.05$ ) que pour les sédiments alimentés avec des fortes concentrations d'antibiotiques (Erythromycine  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  et Vancomycine  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

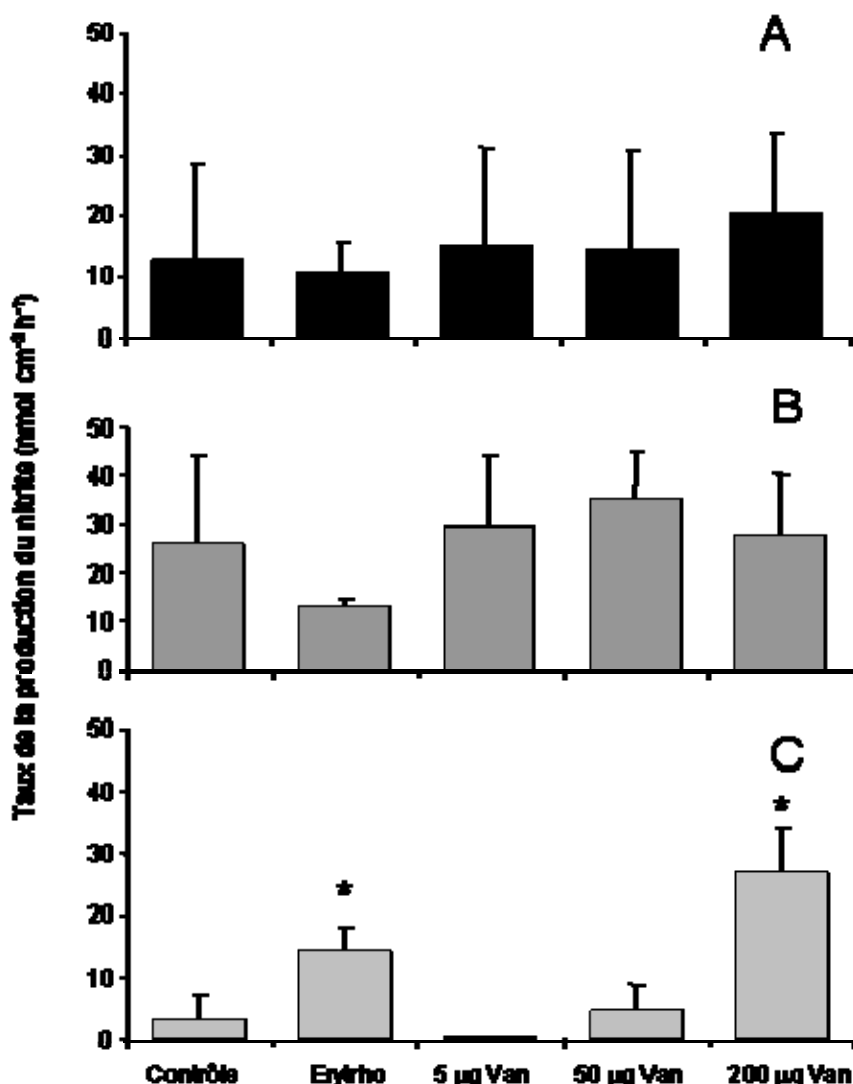


Figure 5 : Taux moyen de la production du nitrite en  $\text{nmol NO}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$  dans des sédiments de Tresmes tous alimentés avec 5 mM nitrate et différentes concentrations des antibiotiques (voir légende figure 4). (A) production moyenne de nitrite pendant les 12 jours de l'expérience (B) production moyenne du nitrite entre le début de l'expérience jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour (C) production moyenne entre les jours 9 et 12 (la fin de l'expérience).

### 3.3 Concentrations de nitrate, nitrite et d'antibiotiques, dans les solutions nourrices

*Nitrate.* Des échantillons dans les solutions nourrices sont prélevés pendant l'expérience tous les trois jours et analysés pour les concentrations de nitrate, nitrite, érythromycine et vancomycine.

Les concentrations en nitrate tant dans les solutions avec nitrate et quand dans les solutions avec nitrate + érythromycine étaient dans la gamme prévue par les ajouts, et sont restés stables au cours de l'expérience.

En revanche, les concentrations en nitrate dans les solutions nourrices contenant de la Vancomycine montrent des diminutions dans les derniers prélèvements (12<sup>ème</sup> jour)

*Nitrite.* On constate, de manière anormale, une présence de nitrites dans ces solutions nourrices avec les ajouts de 50 et 200 mg L<sup>-1</sup> de vancomycine.

*Antibiotiques.* Les concentrations en vancomycine tant dans la solution nourrice qu'à la sortie des réacteurs montrent des valeurs en dessous de la limite de détection, quelque soit la concentration ajoutée. Ces résultats indiquent une dégradation et/ou une adsorption de cette molécule tant dans la nourrice que dans les réacteurs.

En ce qui concerne l'érythromycine dans la solution nourrice, et en comparaison des 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  ajoutés, les concentrations dans la solution nourrice n'étaient plus que de 170  $\mu\text{g L}^{-1}$ , dès le premier jour, et après quelques jours les concentrations avaient diminué à  $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Pourtant, la solution en sortie des réacteurs montre des concentrations à la fois proches de ce qui avait été ajouté, ( $\sim 850 \mu\text{g L}^{-1}$ ) au premier jour, mais bien plus élevée ( $\sim 1100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) au jour 5 de l'expérience. Le comportement de l'érythromycine est donc différent de celui de la vancomycine, car malgré une diminution dans la nourrice, la molécule d'érythromycine est restituée à la sortie du réacteur.

## 4 Discussion

### 4.1 Effets des antibiotiques sur la dénitrification, réactions biologique vs. chimique

Nous avons montré dans les sédiments de Tresmes que la présence d'érythromycine et de vancomycine à hautes concentrations diminue la réduction du nitrate et/ou a un effet important sur la production du nitrite.

Les plus faibles concentrations ajoutées de la vancomycine ne montrent pas un effet sur la réduction du nitrate, ni sur la production de nitrite. L'apparition de nitrite dans les solutions nourrices, qui n'apparaît qu'aux deux plus hautes concentrations de vancomycine, indique une transformation chimique du nitrate en présence de vancomycine. Dans les réacteurs, compte tenu de la disparition de la vancomycine dans la nourrice et en sortie de réacteurs, aucune conclusion ne peut être apportée sur l'augmentation de la production de nitrite ou la réduction de nitrate, en termes d'effet chimique ou d'un effet de cet antibiotique sur les enzymes bactériennes impliquées dans la dénitrification.

Nous confirmons cependant avec cette étude, un effet de l'érythromycine sur la dénitrification déjà montré sur des eaux en aval d'une station d'épuration, résultats encore unique dans la littérature (Costanza et al., 2005). Compte tenu de la présence d'érythromycine dans les eaux de sorties de réacteurs, l'augmentation de la production de nitrite, la diminution de la production de nitrate (en comparaison du contrôle) tend en effet à montrer un effet biologique. Toutefois, la présence des concentrations 10 fois plus élevées d'érythromycine à la sortie d'un des réacteurs, après passage au travers du sédiment, pose un problème d'ordre chimique.

Au total, la conservation des molécules d'antibiotiques dans les solutions nourrices semble de courte durée, et les conditions de leur stabilité/instabilité doit être recherchée. Il serait par ailleurs indispensables de pouvoir caractériser les produits de dégradation. La conservation/transformation des molécules d'antibiotiques devra être optimisée avant de réaliser de nouvelles expériences sur leurs effets sur le plan des processus microbiologiques.

### 4.2 Expériences futures

Nous prévoyons de nouvelles expériences avec différentes concentrations de molécules d'antibiotique sur une durée plus longue pour déterminer les effets sur la réduction de nitrate et la production du nitrite. Mais il nous semble important d'étudier d'abord la conservation des molécules ainsi que leurs effets sur les transformations chimiques du nitrate. Compte tenu des problèmes de non conservation des concentrations des antibiotiques, différents tests préalables de possibles transformations chimiques ou photochimiques des molécules antibiotiques ainsi que des comportements d'adsorption dans le dispositif expérimental seront effectués, sur des réacteurs avec des sédiments stérilisés.

Des sédiments non contaminés seront d'abord étudiés des points de vue de la réduction du nitrate, de la

production du nitrite et de N<sub>2</sub>O, **avec différentes molécules d'antibiotiques dans un gradient de concentrations** (teneurs conservées dans la Seine d'amont en aval, et teneurs mesurées dans des effluents bruts). L'effet du temps de contact avec l'antibiotique sera étudié (de quelques heures à quelques semaines, voire quelques mois).

## 5 . Références

- Batt, A. L., Kim, S. and Aga, D. S. (2007). "Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations." *Chemosphere* **68**(3): 428-435.
- Costanzo, S. D., Murby, J. and Bates, J. (2005). "Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment." *Marine Pollution Bulletin* **51**(1-4): 218-223.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L. and Parrella, A. (2005). "Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms." *Science of The Total Environment* **346**(1-3): 87-98.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. and Buxton, H. T. (2002). "Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance." *Environmental Science & Technology* **36**(6): 1202-1211.
- Laverman AM, Van Cappellen P, van Rotterdam-Los D, Pallud C & Abell J (2006) Potential rates and pathways of microbial nitrate reduction in coastal sediments. *Fems Microbiology Ecology* 58: 179-192
- Obst, U., Schwartz, T. and Volkmann, H. (2006). "Antibiotic resistant pathogenic bacteria and their resistance genes in bacterial biofilms." *International Journal of Artificial Organs* **29**(4): 387-394.
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Tuc Dinh, Q., Clement, M. and Chevreuil, M. (2008). "Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions." *Science of The Total Environment* **393**(1): 84.
- Vieno, N., Tuhkanen, T. and Kronberg, L. (2007). "Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland." *Water Research* **41**(5): 1001.