

Les antibiotiques dans les eaux de surface du bassin de la Seine : Suivi des molécules en station d'épuration

Fatima Tamtam¹, Barbara LeBot², Joëlle Eurin¹, Fabien Mercier², Karen Tiphagne-Larcher¹,
Annie Desportes¹, René Seux², Marc Chevreuil¹

¹: Laboratoire Hydrologie et Environnement - EPHE/UMR Sisyphe 7619, Université Pierre et Marie Curie - BC 105 - 4 place Jussieu 75252 Paris cedex 05

²: Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé (LERES), Ecole Nationale de la Santé Publique, Avenue Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France

fatima.tamtam@ccr.jussieu.fr, joelle.eurin@ccr.jussieu.fr

Les antibiotiques dans les eaux de surface du bassin de la Seine : Suivi des molécules en station d'épuration	1
1. Introduction	1
2. Matériel & méthode.....	2
2.1. Choix des molécules de l'étude.....	2
2.2. Propriétés physico-chimiques des antibiotiques étudiés	2
2.3. Protocole analytique	3
3. Résultats	4
3.1. Evolution des concentrations en phase aqueuse entre les entrées et sorties de STEP	4
3.2. Comportement des antibiotiques lors des processus d'épuration.....	5
3.3. Concentrations environnementales prédictives	6
3.4. Autres antibiotiques détectés	7
4. Conclusion et perspectives	7
5. Remerciements	7
6. Bibliographie.....	8

1. Introduction

Les antibiotiques sont consommés en quantités très importantes en médecine humaine. Une proportion allant jusqu'à 80% du principe actif peut être excrétée inchangée pour certaines molécules. Ces résidus d'antibiotiques sont ensuite rejetés dans les eaux usées. De nombreuses études ont montré que ces molécules étaient présentes dans les eaux usées brutes ou épurées (Golet et al., 2001; Androzzini et al., 2003; Gros et al., 2006; Karthikeyan and Meyer, 2006; Vieno et al., 2006) et étaient plus ou moins dégradées ou retenues sur les boues urbaines selon leurs propriétés physico-chimiques. La valorisation de ces boues urbaines par épandage sur les sols agricoles pourrait ainsi être à l'origine d'un risque d'infiltration d'antibiotiques vers les eaux souterraines ou de ruissellement vers les eaux de surface, au même titre que l'épandage des déchets des animaux d'élevage traités aux antibiotiques.

La présence de ces molécules dans les eaux usées ou dans les effluents de station d'épuration, ainsi que dans les milieux récepteurs (Hilton and Thomas, 2003; Brown *et al.*, 2006; Giger *et al.*, 2003) est préoccupante, en raison de la toxicité directe de nombreuses molécules ou d'effets cumulatifs ou synergiques avec des composés pharmaceutiques (Pomati *et al.*, 2006) ou d'autres classes de polluants.

De plus, la présence d'antibiotiques pourrait perturber les populations bactériennes intervenant dans le cycle des nutriments dans les eaux naturelles et être également à l'origine d'une diminution de l'efficacité des traitements biologiques en station d'épuration (Al-Ahmad *et al.*, 1999; Costanzo *et al.*, 2005). L'évaluation de telles perturbations se heurte à un manque de données concernant leur niveau de présence, en particulier en France, qui est pourtant le premier pays européen consommateur d'antibiotiques (Goossens *et al.*, 2005). Cela souligne la nécessité de conduire de telles études

permettant une meilleure caractérisation de la présence de ces molécules et de leur comportement dans l'environnement.

La chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse en tandem a été ici utilisée car elle contribue à une meilleure fiabilité de l'identification de ces composés et de leurs métabolites à très faibles niveaux de concentration.

Le site d'étude, la station d'épuration du SIAAP de Marne Aval à Noisy-le Grand, a été choisi car elle possède un procédé de désinfection aux ultraviolets qui pourrait éventuellement contribuer à la dégradation de molécules d'antibiotiques.

2. Matériel & méthode

2.1. Choix des molécules de l'étude

Les antibiotiques sont rassemblés en familles en fonction des groupements chimiques qui leur confèrent leur activité thérapeutique. Ces propriétés chimiques variées induisent des comportements différents dans l'environnement.

Par ailleurs, le développement et l'utilisation d'une méthode multi-résidus a permis l'étude d'une large gamme de composés aux propriétés chimiques différentes, et constitue un bon compromis entre la qualité des résultats et les temps et coûts d'analyse.

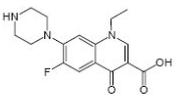
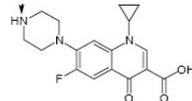
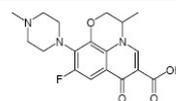
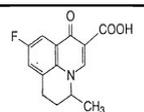
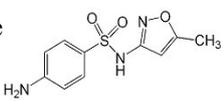
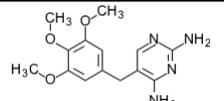
Nous avons choisi d'étudier des antibiotiques de la famille des fluoroquinolones : ciprofloxacine, norfloxacine, ofloxacine, fluméquine ainsi que le sulfaméthoxazole, un sulfamide, et le triméthoprime, utilisé en association avec le sulfaméthoxazole pour en accroître l'efficacité. La sélection des antibiotiques de l'étude a été effectuée en fonction des données d'utilisation en France, et de celles de la littérature.

2.2. Propriétés physico-chimiques des antibiotiques étudiés

Nous avons poursuivi la validation de la méthode de dosage des antibiotiques présentée dans le précédent rapport (Eurin *et al.*, 2006) en analysant des molécules pilotes de différentes familles d'antibiotiques dont les principales propriétés sont résumées dans le Tableau 1.

Bien que ces molécules soient pour certaines assez solubles, elles présentent néanmoins des capacités d'adsorption très variables (Tolls, 2001). Ces propriétés sont importantes car elles déterminent le comportement de ces molécules dans le milieu aquatique et en station d'épuration. Ainsi, les fluoroquinolones présentent souvent une tendance à l'adsorption aux boues urbaines, contrairement aux sulfamides, qui auront tendance à rester dans la phase aqueuse.

Tableau 1: propriétés physico-chimiques des différents antibiotiques étudiés

Molécule PM	Formule	Solubilité	pKa (1-2)	Log Kow	Koc (L/ Kg)
Norfloxacin 319.34		178 g/L ^b	6.26-8.85 ^b	-1.03 ^b	?
Ciprofloxacin 331.35		30 g/L ^a	5.90-8.89 ^a	0,4 ^a	61000 ^a
Ofloxacin 361.38		28.3g/L ^b	5.97-7.65 ^b	-0.39 ^b	44100 ^a
Fluméquine 261.25		0.07 g/L ^a	6.4 ^a	1.7 ^a	24500
Sulfaméthoxazole 253.28		3.9 g/L	6 ^c	0.89 ^c	60-300
Triméthoprime 290.32		2.3 g/L ^c	7.12 ^c	0.91 ^c	905

^a :Tolls et al., 2001, ^b :Vieno et al., 2006, ^c : Gros et al., 2006, non précisé : calculé par logiciel EPI suite TM de l'USEPA)

2.3. Protocole analytique

Nous mesurons les concentrations de ces antibiotiques dans les eaux usées suivant un protocole que nous avons mis au point au laboratoire. Le protocole d'extraction a été présenté précédemment (Eurin *et al.*, 2006; Tamtam *et al.*, 2007). Les échantillons après avoir été filtrés et ajustés au pH7 sont extraits sur phase solide à l'aide de cartouches Oasis HLB, puis élués par du méthanol. Ils sont ensuite analysés par chromatographie liquide ultra performance couplée à une détection en spectrométrie de masse en tandem (UPLCTM /MS/MS). Les deux transitions donnant la meilleure réponse sont choisies pour chaque molécule par injection d'une solution de standard dans le détecteur (Tableau 2).

Des essais ont été effectués sur eau d'Evian et eau de Seine. Les résultats montrent une bonne séparation des composés, de bons rendements d'extraction, supérieur à 80% pour les six composés cités dans cette étude, ainsi qu'une reproductibilité satisfaisante. Des limites de quantification très basses, de l'ordre de 10 ng/L ont été obtenues.

Tableau 2 : fragmentation des molécules de l'étude et temps de rétention associés

compound	retention time (min)	Precursor ion (m/z)	product ion I (m/z)	product ion II (m/z)
trimethoprim	1.91	291.1	261.1	123.1
norfloxacin	2.09	320	233.1	276.1
ofloxacin	2.2	362.1	261.3	318.3
ciprofloxacin	2.41	332	288.1	332.1
sulfamethoxazole	4.59	253.9	91.9	155.9
flumequine	8.83	262	202.1	244.1

Prélèvements :

Les prélèvements ont été effectués selon le protocole cité par M. Teil (Teil *et al.*, 2007), à la station de Marne Aval. Les prélèvements sont effectués systématiquement en sortie de traitement, et sont désignés par le nom du traitement duquel ils sont issus.

Les échantillons sont ensuite congelés jusqu'à l'extraction. Le volume d'eau usée extrait est de 50 ml.

3. Résultats

3.1. Evolution des concentrations en phase aqueuse entre les entrées et sorties de STEP

Les concentrations des six molécules de l'étude (triméthoprime, sulfaméthoxazole, norfloxacine, ciprofloxacine, ofloxacine, fluméquine) ont pu être détectées dans les eaux usées à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/L}$. (Ces prélèvements ont été effectués alors que le traitement par les UV n'était pas en service).

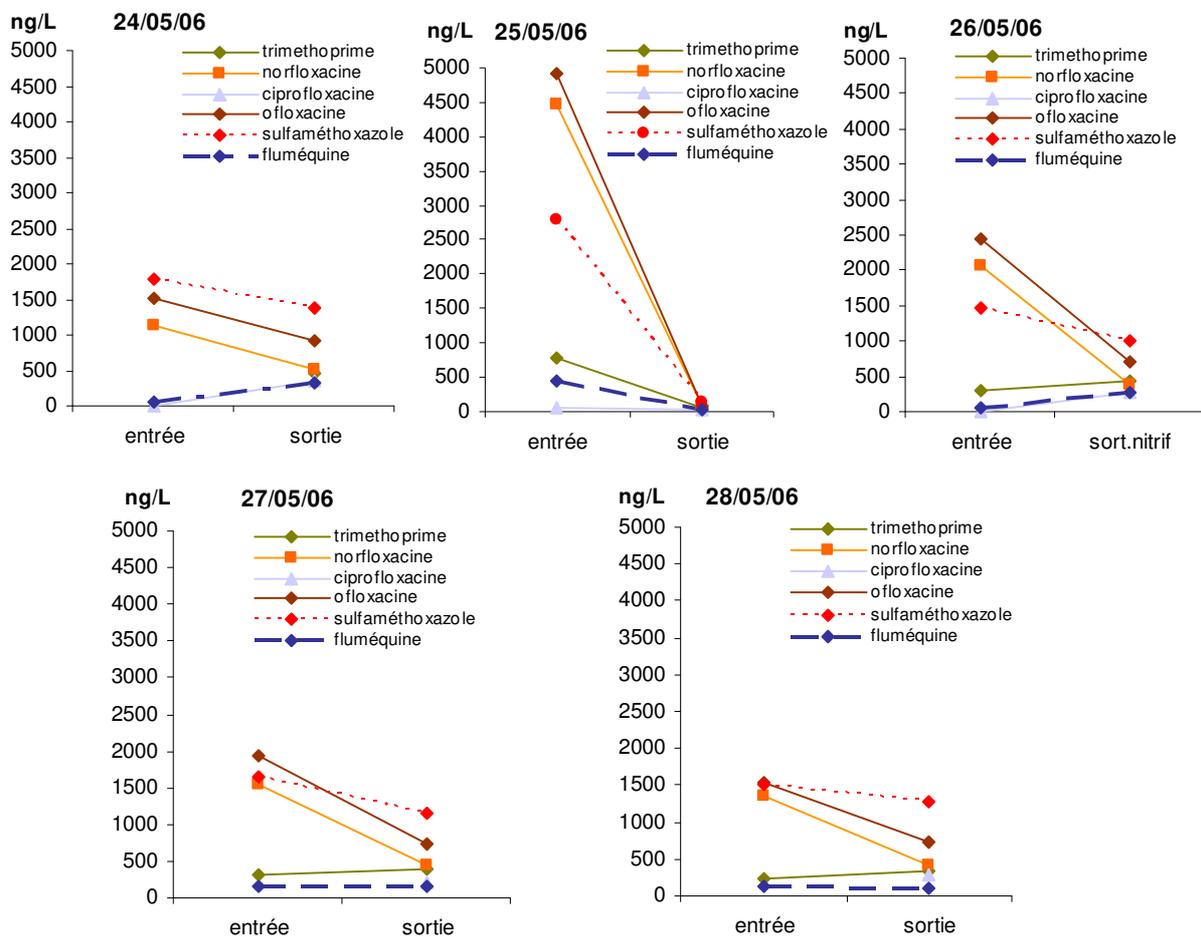


Figure 1: Concentrations instantanées des 6 antibiotiques mesurées en différents jours dans la phase aqueuse en entrée et en sortie de la station d'épuration de Marne Aval (sans traitement UV).

Les résultats présentés concernent uniquement les concentrations présentes dans l'eau filtrée. Une partie importante, la fraction adsorbée n'a pas été estimée dans cette étude. Cette fraction peut être plus ou moins importante en fonction des propriétés respectives des molécules (Tableau 1). Ainsi, les concentrations des fluoroquinolones ont été très probablement sous estimées dans les eaux entrant en station d'épuration. Le sulfaméthoxazole et le triméthoprime sont également sous estimés, mais dans une moindre mesure, compte tenu du fait qu'ils se répartissent en plus grande partie dans la phase aqueuse (Lindberg *et al.*, 2005).

On observe que les concentrations en plusieurs antibiotiques diminuent systématiquement en sortie. Paradoxalement, des concentrations d'antibiotiques augmentent parfois en sortie par rapport à l'entrée. Différentes explications peuvent être envisagées, notamment une désorption de molécules adsorbées aux matières en suspension. En effet, les eaux usées brutes ont une teneur d'environ 200 mg/L en entrée de station d'épuration, et environ 20mg/L en sortie. Une proportion plus ou moins importante des molécules va être adsorbée aux matières en suspension présentes dans les eaux brutes, en fonction des propriétés respectives de chacune (Tableau 1), il est possible que les traitements d'épuration aient pour conséquence une désorption d'une partie des molécules adsorbées. Ces molécules n'entrant pas en compte dans les mesures effectuées en entrée (eau filtrée), les concentrations en sortie seront supérieures aux valeurs attendues. Les antibiotiques pourraient par ailleurs, compte tenu de leur activité, se complexer à d'autres molécules, et suite aux traitements revenir à leur forme active et détectable.

De plus, il ne faut pas négliger des effets de matrice lors de la détection en spectrométrie de masse, qui pourraient entraîner une surestimation des composés par la co-élution de substances parasites (Benijts *et al.*, 2004; Petrovic *et al.*, 2005; Van De Steene *et al.*, 2006).

3.2. Comportement des antibiotiques lors des processus d'épuration

Des prélèvements au niveau des différents bassins de traitements ont été réalisés sur trois jours, dont un où les eaux usées ont subi une désinfection aux UV (Figure 2).

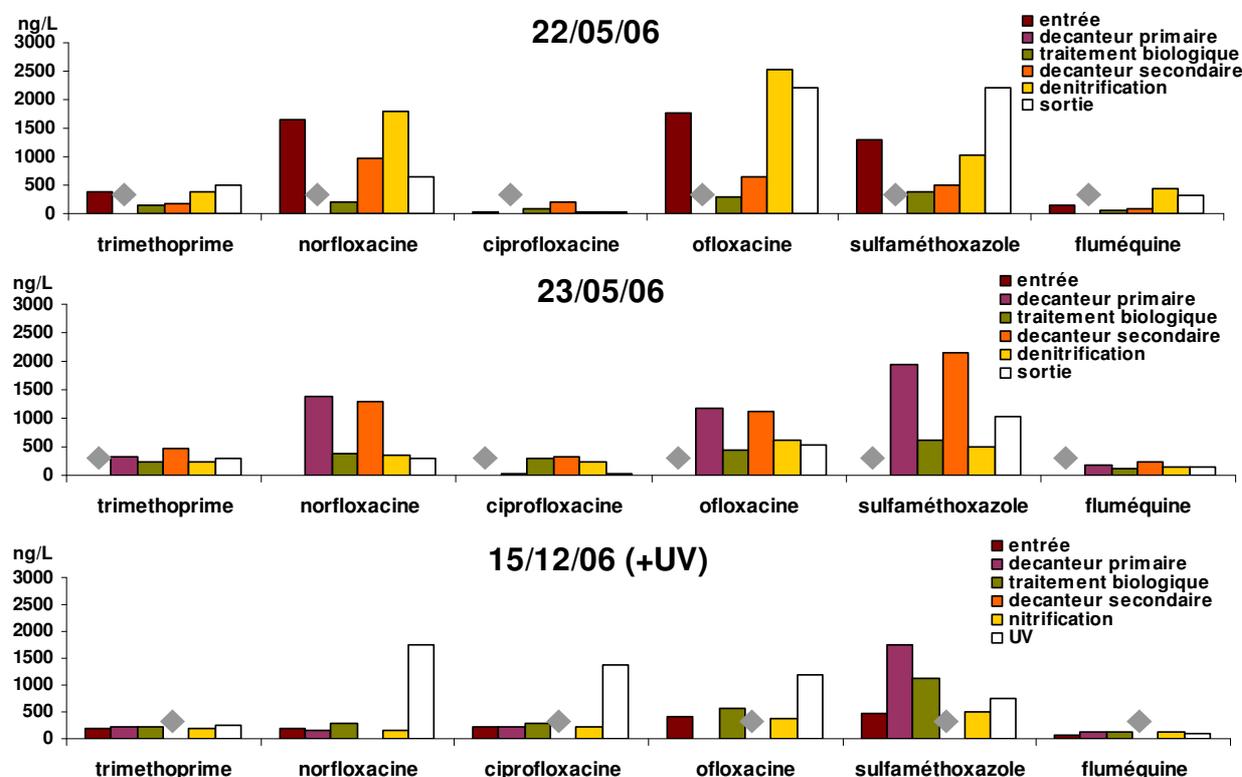


Figure 2: évolution des concentrations des 6 antibiotiques étudiés en fonction des différents traitements d'épuration (◆=prélèvement manquant)

Les concentrations mesurées pour ces différents composés montrent des évolutions complexes. Il est difficile de dégager une tendance constante pour une molécule ou pour un traitement donné. Des tests en laboratoire doivent être effectués afin de comprendre l'évolution de ces molécules lors des traitements appliqués en station d'épuration. L'évolution des concentrations est récapitulée dans le Tableau 3.

Tableau 3: évaluation de l'abattement des antibiotiques en phase aqueuse suite aux traitement des eaux usées.

évolution des concentrations en antibiotiques en sortie par rapport à l'entrée		
	minimum (%)	maximum (%)
trimethoprime	+49*	-92
norfloxacin	-56	-98
ciprofloxacine	nd	nd
ofloxacine	-40	-71
sulfaméthoxazole	-14	-32
fluméquine	+17*	-28

*augmentation de la concentration en sortie

3.3. Concentrations environnementales prédictives

A partir des concentrations mesurées dans les effluents de sortie de station d'épuration nous avons calculé des concentrations environnementales prédictives (PEC), en considérant un débit moyen de 100 m³/s pour la Marne (Tableau 4). Le flux moyen instantané d'antibiotiques de l'effluent traité a été calculé en se basant sur la capacité moyenne de traitement de la station de Marne Aval, soit 30000 m³/j.

Tableau 4: concentrations environnementales prédictives pour les six antibiotiques de l'étude

	flux moyen instantané effluent traité (µg)	PEC dans la Marne (ng/L)	flux maximal effluent traité (µg)	PEC dans la Marne (ng/L)
trimethoprime	121	1	175	2
norfloxacin	202	2	625	6
ciprofloxacine	116	1	495	5
ofloxacine	315	3	783	8
sulfaméthoxazole	400	4	792	8
fluméquine	63	1	116	1

On observe que les concentrations finales en rivières sont de l'ordre du ng/L, ce qui est très faible. Ces concentrations ne sont pas suffisantes pour donner lieu à une toxicité aigue chez les organismes aquatiques. Cependant, il convient de prendre en compte les effets d'une exposition à long terme à ces molécules, ainsi que d'éventuels effets cumulatifs de l'ensemble des composés pharmaceutiques.

Par ailleurs, ce calcul a été effectué en considérant une dilution instantanée de l'effluent, ce qui n'est pas toujours le cas, ainsi des concentrations plus élevées pourraient exister dans les zones à proximité immédiate de rejets.

De plus, des mesures effectuées dans différents cours d'eau d'Ile-de-France ont montré la présence d'antibiotiques à des concentrations plus importantes : de l'ordre du µg/L pour certains antibiotiques (données non publiées). En effet, l'ensemble des rejets urbains se cumule avec les apports agricoles de l'amont, et peut aboutir à des concentrations importantes d'antibiotiques, davantage susceptibles de générer des effets à long terme sur l'écosystème.

3.4. Autres antibiotiques détectés

Quelques antibiotiques d'usage exclusivement vétérinaire ont été retrouvés ponctuellement dans les eaux usées, à des concentrations relativement faibles par rapport aux antibiotiques à usage humain. Ces antibiotiques de la famille des fluoroquinolones, la sarafloxacin, difloxacin et enrofloxacin ont été mesurés dans des concentrations allant de 30 à 80 ng/L. L'origine de cet apport pourrait être la médecine vétérinaire de ville ; en effet, le nombre important d'animaux de compagnie pourrait représenter une source importante et non évaluée à ce jour de médicaments vétérinaires dans les eaux usées.

4. Conclusion et perspectives

La méthode développée pour l'analyse de plusieurs antibiotiques dans les matrices environnementales s'est avérée satisfaisante pour l'étude de ces composés dans les matrices complexes telles que les eaux résiduaires.

Cette étude préliminaire confirme la persistance d'antibiotiques dans les eaux usées, aux différentes étapes de traitement. En effet, ces molécules ont été détectées à des concentrations allant jusqu'à plusieurs $\mu\text{g/L}$ aussi bien en entrée qu'en sortie de station d'épuration. Ces résultats, obtenus sur des mesures instantanées, restent toutefois à pondérer par les flux d'eau dans les différents bassins de traitements.

Les concentrations en antibiotiques mesurées en sortie de STEP permettent d'identifier les eaux usées comme source d'apports prépondérante d'antibiotiques à usage humain dans l'environnement. Cependant, bien qu'élevées, ces concentrations sont rapidement diluées dans les cours d'eau récepteurs.

Il est nécessaire de poursuivre cette étude sur les comportements des antibiotiques dans les eaux usées afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ces molécules peuvent être épurées ainsi que les éventuelles transformations qu'elles peuvent subir au cours des différents traitements. En effet, certaines de ces molécules ont été, à certaines occasions, détectées à des concentrations supérieures dans les eaux traitées par rapport aux eaux brutes. Ce phénomène a déjà été décrit pour certaines molécules (Lindberg et al., 2005) et nécessite de réaliser une étude plus poussée en effectuant un suivi de masse d'eau ou/et des prélèvements moyennés au niveau des différents traitements, en intégrant une étude sur la fraction adsorbée aux particules. Ces analyses permettront d'identifier si ces observations sont dues à des variations de flux d'antibiotiques dans les eaux prélevées ou à des interactions de ces molécules avec la matière organique présente dans les eaux usées.

Par ailleurs, l'étude de l'apport des effluents hospitaliers pourra être réalisée et un suivi effluent hospitalier -STEP- eaux de surface pourra être effectué afin de mieux comprendre le devenir de ces molécules de la source à l'exutoire final. L'éventuelle accumulation au niveau des sédiments devra également être étudiée ainsi que le devenir des antibiotiques retenus dans les boues urbaines, et la possibilité d'un transfert de ces molécules vers le sol et les eaux souterraines.

5. Remerciements

Nous tenons à remercier M. Jean-Luc Almayrac, M^{me} Sandrine Lopez et l'ensemble du personnel de la station du SIAAP de Marne Aval pour leur accueil et les prélèvements qu'ils nous ont effectués.

6. Bibliographie

- Al-Ahmad, A., Daschner, F. D. and Kümmerer, K. (1999). "Biodegradability of Cefotiam, Ciprofloxacin, Meropenem, Penicillin G, and Sulfamethoxazole and Inhibition of Waste Water Bacteria." *Journal Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37**(2): 158.
- Andreozzi, R., Raffaele, M. and Nicklas, P. (2003). "Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment." *Chemosphere* **50**(10): 1319.
- Benijts, T., Dams, R., Lambert, W. and De Leenheer, A. (2004). "Countering matrix effects in environmental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals." *Journal of Chromatography A* **1029**(1-2): 153.
- Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H. and Mawhinney, D. B. (2006). "Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico." *Science of The Total Environment* **366**(2-3): 772.
- Costanzo, S. D., Murby, J. and Bates, J. (2005). "Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment." *Marine Pollution Bulletin* **51**(1-4): 218.
- Eurin, J., Tamtam, F., Ollivon, D., Tiphagne-Larcher, K. and Chevreuil, M. (2006). "Les antibiotiques dans les eaux de surface du bassin de la Seine: évaluation de la contamination dans différents milieux." *Rapport Piren 2006*.
- Giger, W., Alder, A. C., Golet, E. M., Kohler, H.-P. E., McArdell, C. S., Molnar, E., Siegrist, H. and Suter, M. J.-F. (2003). "Occurrence and Fate of Antibiotics as Trace Contaminants in Wastewaters, Sewage Sludges, and Surface Waters." *CHIMIA* **57**(No. 9): 485–491.
- Golet, E. M., Alder, A. C., Hartmann, A., Ternes, T. A. and Giger, W. (2001). "Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection." *Analytical Chemistry* **Vol. 73**(No. 15): 3632.
- Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R. and Elseviers, M. (2005). "Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study." *The Lancet* **365**(9459): 579.
- Gros, M., Petrovic, M. and Barcelo, D. (2006). "Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters." *Talanta* **70**(4): 678.
- Hilton, M. J. and Thomas, K. V. (2003). "Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1015**(1-2): 129.
- Karthikeyan, K. G. and Meyer, M. T. (2006). "Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA." *Science of The Total Environment* **361**(1-3): 196.
- Lindberg, R. H., Wennberg, P., Johansson, M. I., Tysklind, M. and Andersson, B. A. V. (2005). "Screening of Human Antibiotic Substances and Determination of Weekly Mass Flows in Five Sewage Treatment Plants in Sweden." *Environ. Sci. Technol.* **39**(10): 3421.
- Petrovic, M., Hernando, M. D., Diaz-Cruz, M. S. and Barcelo, D. (2005). "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review." *Journal of Chromatography A* **1067**(1-2): 1.
- Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C. and Calamari, D. (2006). "Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells." *Environ. Sci. Technol.* **40**(7): 2442.
- Tamtam, F., Eurin, J., Le Bot, B., Mercier, F., Seux, R. and Chevreuil, M. (2007). "Sources et devenir des antibiotiques dans les eaux de la Seine." *European journal of water quality*, submitted.
- Teil, M.-J., Blanchard, M., Dargnat, C. and Chevreuil, M. (2007). "Caractérisation des phtalates dans les échantillons de station d'épuration." *rapport Piren 2007*.
- Tolls, J. (2001). "Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review." *Environ. Sci. Technol.* **35**(17): 3397.
- Van De Steene, J. C., Mortier, K. A. and Lambert, W. E. (2006). "Tackling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine basic pharmaceuticals in aqueous environmental samples." *Journal of Chromatography A* **1123**(1): 71.
- Vieno, N. M., Tuhkanen, T. and Kronberg, L. (2006). "Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection." *Journal of Chromatography A* **1134**(1-2): 101.