

# Effets des concentrations environnementales des antibiotiques sur la dénitrification dans les sédiments de la Charmoise (bassin de l'Orge)

Chen Yan, Annet Laverman\*, Josette Garnier, Céline Roose-Amsaleg, Thibaut Cazier, Olivier Tronquart, Benjamin Mercier, Anun Martinez, Tuc Dinh, Marc Chevreuil

UMR 7619 Sisyphe, UPMC Paris

\*personne à contacter : [Annet.Laverman@upmc.fr](mailto:Annet.Laverman@upmc.fr)

## 1 Introduction

Les antibiotiques sont des composés très utilisés en médecine humaine et vétérinaire, à titre préventif ou curatif des infections bactériennes. Ces composés sont souvent persistants à la biodégradation (Kummerer, Al-Ahmad et al. 2000; Drillia, Dokianakis et al. 2005), et ils sont souvent partiellement métabolisés dans l'organisme et ne sont pas complètement éliminés dans les stations d'épuration (STEPs) (Heberer 2002 (a); Kummerer 2009). En conséquence, les antibiotiques humains sont libérés dans l'environnement aquatique principalement par les effluents de STEP (Halling-Sorensen, Nors Nielsen et al. 1998; Kummerer 2003), ou par des déchets ménagers (Kummerer 2010). Les antibiotiques vétérinaires, utilisés comme promoteurs de croissance sont excrétés par les animaux et se retrouvent dans l'environnement par l'application d'engrais agricole (Halling-Sorensen, Nors Nielsen et al. 1998; Kummerer 2003). Les concentrations d'antibiotiques sous formes actives ou leurs métabolites mesurés dans l'eau de surface ou des effluents de STEP sont généralement de l'ordre du ng au  $\mu\text{g}$  par litre (Zuccato, Calamari et al. 2000; Golet, Alder et al. 2001; Tamtam, Mercier et al. 2008; Kummerer 2009; Fatta-Kassinos, Meric et al. 2011), et s'élèvent à  $100 \mu\text{g}$  par litre dans les effluents de l'hôpital (Lindberg, Jarnheimer et al. 2004; Fatta-Kassinos, Meric et al. 2011). En général, les concentrations étaient de l'ordre du  $\mu\text{g}$  par g dans les sédiments, les sols et les boues de STEP, et atteignent l'ordre du mg par g dans le fumier (Thiele-Bruhn 2003).

La contamination de l'environnement par ces composés suscite un intérêt croissant du fait de leur capacité de sélection d'antibiorésistance chez les bactéries, ainsi qu'en raison de leurs effets toxiques sur les organismes non ciblés (Obst, Schwartz et al. 2006). Leur action spécifique sur les bactéries peut conduire à un risque de perturbation des cycles biogéochimiques, en particulier dans les sédiments, compartiment important pour la dénitrification (Costanzo, Murby et al. 2005). La plupart des études travaillant sur l'effet des antibiotiques sur les processus biogéochimiques en utilisant les concentrations thérapeutiques plutôt que les concentrations environnementales (concentrations sous-inhibitrices). Les effets des antibiotiques sur les processus biogéochimiques en présence de fortes concentrations d'antibiotiques ont été trouvés (Dokianakis, Kornaros et al. 2004; Fernandez, Mosquera-Corral et al. 2009). Il semble que la connaissance des concentrations environnementales et leur effets sur l'activité microbienne, comme la dénitrification, est rare (Ding and He 2010). Il est ainsi important d'étudier les effets des antibiotiques sur les processus biogéochimiques à des concentrations rencontrées dans le milieu naturel, en exposition continue.

Les comportements et les effets des antibiotiques sont liés à leurs caractéristiques physicochimiques. Les antibiotiques pourraient perdre leur bioactivité par l'absorption sur les particules de sédiments ou par la formation des complexes avec les cations. Les tétracyclines s'absorbent fortement aux matières organiques et aux particules minérales dans le sol. Les sulfamides sont considérés mobiles (Tamtam, Le Bot et al. 2011), et souvent détectés dans les eaux souterraines (Sacher, Lange et al. 2001; Batt, Snow et al. 2006), cependant d'autres études ont montré que la sorption au sol peut être un processus important pour les sulfamides (Tolls 2001; Kreuzig, Holtge et al. 2005). En revanche, les fluoroquinolones absorbent fortement aux sédiments (Hektoen, Berge et al. 1995; Cordova-Kreylos and Scow 2007). La dégradation (biodégradation) des antibiotiques, par exemple comme source de

carbone pour les microbes pourraient avoir un rôle important dans la dissipation ou l'élimination des antibiotiques dans l'environnement (Ingerslev, Torang et al. 2001(b); Maki, Hasegawa et al. 2006).

L'objectif de cette étude est d'examiner l'activité de dénitrification en présence d'antibiotiques, afin de déterminer les perturbations de la dénitrification par les antibiotiques en concentrations environnementales. De plus, nous avons déterminé les concentrations des antibiotiques dans les sédiments initiaux et traités par les antibiotiques et les concentrations dans les solutions nourrices et les échantillons sortis du réacteur afin de déterminer le comportement des antibiotiques. Finalement nous avons analysé les communautés microbiennes avec des techniques de biologie moléculaire (extraction ADN, PCR et DGGE) afin de déterminer l'effet de la vancomycine (VA) sur la structure des communautés microbiennes. Trois antibiotiques ont été choisis selon leur présence dans les sédiments du bassin de la Seine, en fonction de leurs familles différentes et de différents modes d'actions ainsi que leur stabilité chimique.

## 2 Matériel et méthodes

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

Les sédiments utilisés au cours de cette étude sont prélevés dans la Charmoise (Figure 1), sur le bassin de l'Orge. L'Orge, un affluent de la Seine, a un bassin versant de 952 km<sup>2</sup>. La Charmoise a une longueur de 7,5 km. Elle reçoit le rejet (18000l h<sup>-1</sup>) de la station d'épuration (STEP) de Fontenay-les-Briis qui traite les effluents domestiques de la ville Fontenay-les-Briis et ceux de l'hôpital de Bligny. Cette STEP a une capacité de 5000 équivalent-habitants. Les boues de cette STEP sont séchées et sont utilisés pour l'épandage sur des parcelles agricoles de la commune.

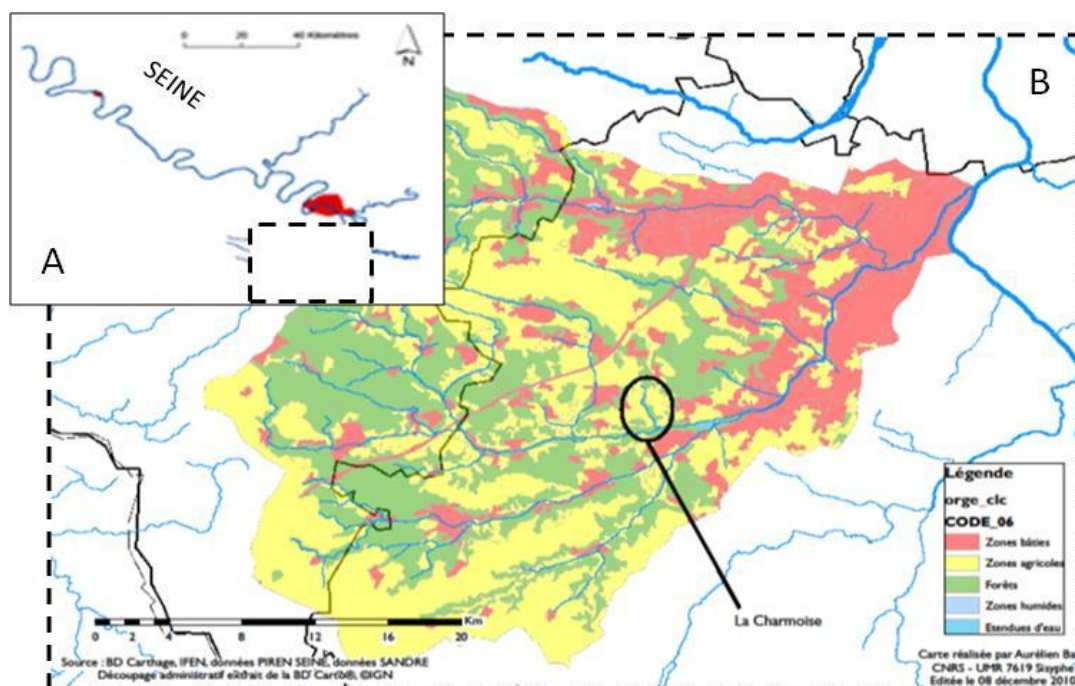


Figure 1 : Site d'étude de la Charmoise dans le bassin de l'Orge

Les sédiments ont été prélevés en amont et en aval du rejet de STEP, 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, Van

Cappellen et al. 2006). En même temps, que les collectes de sédiments étaient effectuées pour l'étude des effets des concentrations naturelles des antibiotiques sur la dénitrification, des échantillons étaient prélevés pour les analyses des caractéristiques des sédiments (contenu en carbone, azote, humidité, etc.). Les échantillons de l'eau ont été filtrés sur place par les filtres de 0.22  $\mu\text{m}$  pour les analyses de différentes formes d'azote ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NH}_4^+$ ).

Nous avons ciblé trois antibiotiques pour étudier les effets des concentrations environnementales des antibiotiques sur la dénitrification : la vancomycine (VA), la sulfaméthoxazole (SMX) et la fluméquine (FLU), qui sont en fait les antibiotiques principalement détectés dans le ruisseau de la Charmoise (Dinh, Alliot et al. 2011). Le prélèvement du sédiment pour l'expérience de la VA a été effectué en février 2010, février et en septembre 2011 pour les expériences avec la SMX et la FLU.

## 2.2 Les réacteurs à flux continu

Les segments constituent les corps des réacteurs où les sédiments ont été conservés (Figure 2). Les sédiments sont alimentés avec une solution nourrice contenant du nitrate (le contrôle), et d'autre avec nitrate et différentes concentrations des trois antibiotiques (Tableau 1). Les solutions nourrices sont préparées en quantité suffisante et avec différentes concentrations d'antibiotiques. Les réacteurs sont traités en triplicats avec du nitrate (contrôle), du nitrate plus différents antibiotiques en concentrations différentes. Toutes les solutions nourrices sont bullées avec le gaz inerte  $\text{N}_2$  avant l'expérience pour produire des conditions anoxiques. Les réacteurs sont reliés aux solutions nourrices avec une pompe péristaltique qui assure un débit stable au cours de l'expérience. Les solutions nourrices qui ont circulé dans les réacteurs sont recueillies dans des pots et échantillonnées une fois par jour pendant la période de l'expérience. Ces échantillons sont congelés pour l'analyse des nutriments ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ ). Les concentrations obtenues sont représentées en fonction du temps afin de déterminer les taux de réduction du nitrate, la production du nitrite et de l'oxyde nitreux ( $\text{nmol cm}^{-3} \text{ sédiments h}^{-1}$ ), et ainsi appréhender l'effet des antibiotiques. Les réacteurs ont été alimentés pendant 24 jours pour l'expérience de la VA et 14 jours pour l'expérience de la SMX et de la FLU, avec un débit de 2  $\text{ml h}^{-1}$ . Les expériences se font à l'obscurité pour éviter la photosynthèse et la photo dégradation des antibiotiques. Les sédiments initiaux et soumis aux différentes concentrations antibiotiques sont ensuite conservés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à extraction d'ADN et analyses d'antibiotiques.

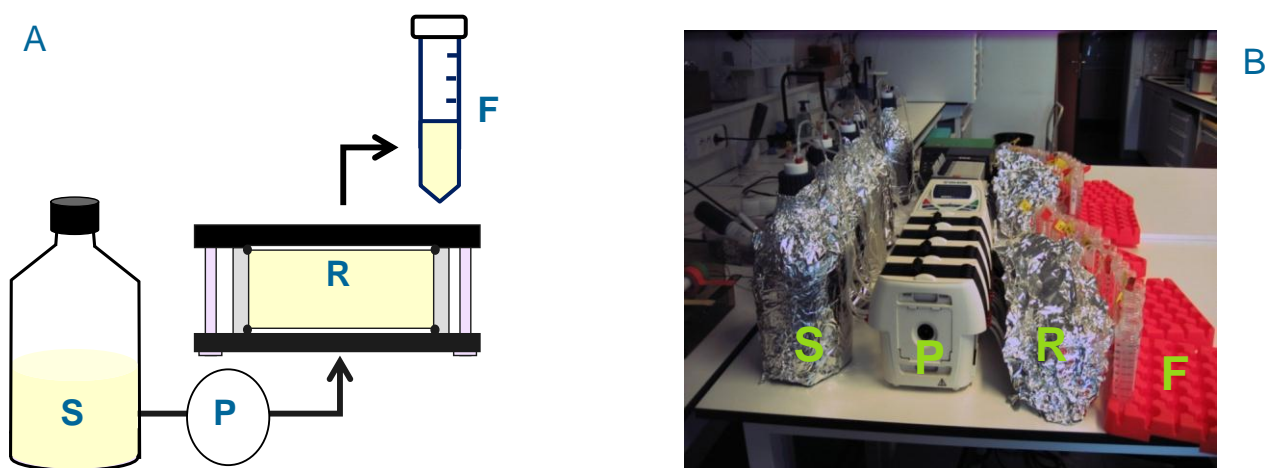


Figure 2 : Dispositif schématique des réacteurs (A) et en photographie du montage (B) avec la solution nourrice (S), la pompe (P) qui alimente les réacteurs (R) et le flaconnage (F) pour le recueil des échantillons

Site et date	Durée	Concentration prévue	Concentration mesurée
Upstream Feb 2010	24 days	VA 100, 1000 ng L <sup>-1</sup> , 200, 1000 µg L <sup>-1</sup>	VA 223, 268 ng L <sup>-1</sup> , 66, 187 µg L <sup>-1</sup>
Downstream Feb 2010			
Upstream Feb 2011	14 days	FLU 100 mg L <sup>-1</sup>	FLU 52 mg L <sup>-1</sup>
		SMX 100 mg L <sup>-1</sup>	SMX 58 mg L <sup>-1</sup>
		FLU 1000 ng L <sup>-1</sup> + SMX 19000 ng L <sup>-1</sup>	FLU 204 ng L <sup>-1</sup> + SMX 4111 ng L <sup>-1</sup>
		FLU 2000 ng L <sup>-1</sup> + SMX 18000 ng L <sup>-1</sup>	FLU 520 ng L <sup>-1</sup> + SMX 5060 ng L <sup>-1</sup>
		FLU 10000 ng L <sup>-1</sup> + SMX 10000 ng L <sup>-1</sup>	FLU 2465 ng L <sup>-1</sup> + SMX 3519 ng L <sup>-1</sup>
Upstream Sep 2011	14 days	FLU 200 µg L <sup>-1</sup> + SMX 20 µg L <sup>-1</sup>	FLU 58 µg L <sup>-1</sup> + SMX 4.3 µg L <sup>-1</sup>
		FLU 300 ng L <sup>-1</sup> , 3000 ng L <sup>-1</sup> , 15 µg L <sup>-1</sup> SMX 300 ng L <sup>-1</sup> , 3000 ng L <sup>-1</sup> , 15 µg L <sup>-1</sup>	FLU 144 ng L <sup>-1</sup> , 2626 ng L <sup>-1</sup> , 13 µg L <sup>-1</sup> SMX 237 ng L <sup>-1</sup> , 2141 ng L <sup>-1</sup> , 15.7 µg L <sup>-1</sup>

**Tableau 1 : Vue d'ensemble de FTRs avec sédiments en amont et aval du rejet de STEP de la Charmoise, les dates d'échantillonnage, la durée des expériences, des concentrations prévues et mesurées (les expériences en gris sont effectuées uniquement pour déterminer le comportement d'antibiotique)**

### 2.3 Analyse des communautés microbiennes

L'extraction de l'ADN des sédiments exposés à différentes concentrations de la VA a été effectuée grâce au kit 'Powersoil™ DNA Isolation Kit' (MoBio). Les sédiments sont pesés (0,25g) puis placés dans des tubes contenant une solution de lyse ainsi que des billes de silice dont le rôle est de réaliser un broyage des bactéries. Pour cela, les tubes sont placés 2 fois 45 secondes dans un « Bead Beater ». Cette lyse, combinant des procédés physiques et chimiques, permet de libérer l'ADN contenu dans les cellules présentes dans les sédiments. La solution obtenue est ensuite soumise à différentes centrifugations et purifications sur colonne avant d'éluer l'ADN purifié. Avant cela, un dosage par mesure d'absorbance (230/260/280 nm) permet de quantifier l'ADN et de déterminer sa pureté.

Afin d'amplifier un fragment d'ADN cible, on utilise la PCR, une technique qui permet de multiplier un fragment d'ADN dans une solution, par exemple un gène afin de déterminer sa présence ou son absence dans un échantillon. Les communautés bactériennes sont ciblées par le gène 16s rADN, les bactéries dénitrifiantes pour leur gène fonctionnel nosZ (réductase d'oxyde nitreux). Pour vérifier qu'une amplification a bien eu lieu et que l'amplification est de bonne taille (bon gène amplifié), une électrophorèse est réalisée avec les produits PCR (gel d'agarose 2%) dans un bain de TAE 1x (Tris Acetate EDTA) et à 100V avec un marqueur de taille 100pb (Invitrogen 100 pb Ladder). La révélation est faite aux UV après avoir fait colorer le gel dans un bain de TAE 1x (300mL) contenant un agent intercalant, 25µL de Sight DNA Stain 5x (Euromedex). Les photos sont réalisées par l'appareil GelDocXR (Biorad).

La « denaturing gradient gel electrophoresis » (DGGE) est ensuite utilisée pour obtenir des empreintes moléculaires des communautés. Cette technique repose sur la vitesse de dénaturation de l'ADN double brin en fonction de sa composition en bases, les bases A et T étant reliées par 2 liaisons hydrogènes et G et C par 3 liaisons hydrogènes. Les bases G et C sont donc plus difficiles à séparer, et il en résulte que les morceaux d'ADN double brin contenant plus de GC dans leur séquence sont plus difficiles à dénaturer que ceux contenant une majorité de A et de T. Un gradient de dénaturant va donc être utilisé pour séparer les 2 brins de plusieurs fragments d'ADN de façon différentielle suivant leur pourcentage en bases G et C. Pour éviter la séparation complète des deux brins, un clamp de GC est utilisé, qui ne va pas se séparer même à fort taux de dénaturant, ce qui va augmenter l'encombrement du fragment

d'ADN. Une fois les fragments totalement séparés et maintenus uniquement par le GC clamp, le fragment d'ADN arrête sa migration. Le gel utilisé est à base d'acrylamide 9%, et les dénaturants utilisés sont l'urée et le formamide. Les gels utilisés ont été des gels à gradient 40-70% pour les DGGE *ADNr16S* ou 40-60% Pour les DGGE *nosZ*. La quantité de produit PCR déposée est de 50 µL environ, ce qui conduit à « pooler » les produits de plusieurs PCR d'un même gène ayant fonctionné. La migration est réalisée dans un tampon TAE 1x (Tris Acetate EDTA) à 62°C et à un voltage constant de 130 à 160V pour un ampérage optimal de 70mA (pour un gel seul), pendant une nuit (de 990 à 1300 minutes soit 16h30 à 21h40 de migration). Le colorant utilisé pour révéler le gel DGGE est le même que pour les produits de PCR : Sight DNA Stain (Euromedex). Le résultat obtenu après DGGE doit être exploité par informatique.

Les empreintes moléculaires obtenues par DGGE sont analysés avec « GelCompar, fingerprint and gel analysis software » (Applied Maths). Ce logiciel permet de calculer des pourcentages de similarité (bandes en commun relatif aux nombre total de bandes) entre les différents profils de migration issus des échantillons en calculant le coefficient de similarité de Jaccard et en construisant un arbre grâce à la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) qui identifie des relations et les regroupe par similarité pour former l'arbre.

## 2.4 Tests statistiques

Le test statistique Kruskal-Wallis (test non paramétrique) a été utilisé pour comparer les différences sur la réduction du nitrate, la production du nitrite et de l'oxyde nitreux en présence des antibiotiques par rapport au contrôle (sans ajout d'antibiotique).

### 3 Résultats et discussions

#### 3.1 Caractéristiques des sédiments étudiés

Les propriétés des sédiments en amont et aval de la Charmoise pour ces trois expériences sont montrées dans Tableau 2. L'humidité des sédiments varie entre 31 et 74% en amont et entre 35 et 77% en aval. La teneur en carbone organique variait entre 1,2 et 7,7% pour l'amont et entre 2,2 et 5,6% pour les sédiments en aval. Le ratio du C/N dans les sédiments en amont est entre 14 et 22, et la même observation est trouvée en aval (16-20).

Les trois antibiotiques déterminés et étudiés dans notre travail ont montré que la concentration de la VA est beaucoup plus élevée dans les sédiments en aval (de 1 à 116 ng g<sup>-1</sup>) par rapport aux sédiments en amont (0-1 ng g<sup>-1</sup>). Ces valeurs sont en accord avec la présence de la VA dans le rejet de STEP qui reçoit des effluents de l'hôpital. Au contraire, les concentrations de la SMX ont été légèrement plus élevées dans les sédiments en amont (de 0 à 118 ng g<sup>-1</sup>) que les sédiments en aval (1-88 ng g<sup>-1</sup>). Cela peut être dû au ruissellement du champ en amont qui est fertilisé par la boue de STEP contenant ce composé. La FLU, un composé utilisé souvent pour la pisciculture, n'est pas présenté dans le rejet de STEP, dont les concentrations étaient presque identiques dans les deux types de sédiments (0-66 pour amont et 1-50 ng g<sup>-1</sup> pour aval). Les concentrations sont présentées par le sédiment humide pour pouvoir calculer le bilan d'antibiotique.

	C <sub>org</sub> (%)	C <sub>org</sub> /N (mol/mol)	Humidité (%)	[VA] ng g <sup>-1</sup> sédiment humide	[FLU] ng g <sup>-1</sup> sédiment humide	[SMX] ng g <sup>-1</sup> sédiment humide
Amont	1.2-7.7	14.1-21.8	31-74	0-1	0-66	0-118
Aval	2.2-5.6	16.3-20.4	35-77	1-116	1-50	0-88

**Tableau 2. Caractéristiques des sédiments en amont et aval du rejet de STEP du ruisseau de la Charmoise (Bassin de l'Orge) au cours des trois expériences en février 2010, février et en septembre 2011**

#### 3.2 Le comportement des antibiotiques

Tableau 3 montre que les concentrations d'antibiotiques dans les solutions nourrices diminuent au cours du temps en fonction des concentrations appliquées. La perte moyenne dans les solutions pour les 4 traitements avec VA est 85,1% pour 24 jours, lorsque les pertes sont entre 0 et 42,3% pour la SMX et entre 0 et 46,1% pour la FLU sur 14 jours. La photodégradation est connue pour provoquer la disparition d'antibiotiques. Ce processus peut être exclu de notre étude puisque toutes les expériences ont été réalisées dans l'obscurité. Les pertes importantes de la VA pourraient être dues à l'hydrolyse, la transformation du composé à une autre forme non mesurable (Kummerer 2009). La SMX et la FLU sont plus résistantes à l'hydrolyse. Cela peut expliquer pourquoi nous en retrouvons plus de ces deux antibiotiques. La demi-vie de la SMX (20 µg L<sup>-1</sup>) est 273 jours dans l'eau superficielle à 20 °C (Radke, Lauwigi et al. 2009). Seulement 1,4% de la FLU est dégradé dans l'eau déminéralisée dans l'obscurité à 8 °C (Pouliquen, Delepee et al. 2007). Considérant que la concentration utilisée dans cette étude était de 1 mg L<sup>-1</sup>, les concentrations sub-inhibitrices appliquées dans notre travail sont des concentrations inférieures à ces valeurs. Apparemment une forte concentration peut éviter la transformation en une autre forme car nous n'avons pas trouvé de perte dans la solution nourrice à 52 mg L<sup>-1</sup> (FLU) et à 58 mg L<sup>-1</sup> (SMX). Le temps d'incubation (24 jours pour la VA et 14 jours pour la SMX et la FLU) pourrait jouer un rôle dans la perte. En outre, La plupart des études qui déterminent l'effet des antibiotiques sur les processus biogéochimiques, ne confirment pas la concentration appliquée. Il semble que les concentrations peuvent être plus faibles que prévu ou diminuer au cours du temps. Il faut donc prendre soin de conclure une absence d'effet des antibiotiques sur les processus biogéochimiques.

Concentration	Loss
VA 223 ng L <sup>-1</sup>	82.0% (VA)
VA 268 ng L <sup>-1</sup>	81.7% (VA)
VA 66 µg L <sup>-1</sup>	90.8% (VA)
VA 187 µg L <sup>-1</sup>	85.9% (VA)
FLU 144 ng L <sup>-1</sup>	32.8% (FLU)
FLU 2626 ng L <sup>-1</sup>	0% (FLU)
FLU 13 µg L <sup>-1</sup>	19.4% (FLU)
FLU 52 mg L <sup>-1</sup>	0% (FLU)
SMX 237 ng L <sup>-1</sup>	0% (SMX)
SMX 2141 ng L <sup>-1</sup>	0% (SMX)
SMX 15.7 µg L <sup>-1</sup>	0% (SMX)
SMX 58 mg L <sup>-1</sup>	0% (SMX)
FLU 204 ng L <sup>-1</sup> + SMX 4111 ng L <sup>-1</sup>	40.0% (FLU); 42.3% (SMX)
FLU 520 ng L <sup>-1</sup> + SMX 5060 ng L <sup>-1</sup>	46.1% (FLU); 33.8% (SMX)
FLU 2465 ng L <sup>-1</sup> + SMX 3519 ng L <sup>-1</sup>	32.0% (FLU); 23.0% (SMX)
FLU 58 µg L <sup>-1</sup> + SMX 4.3 µg L <sup>-1</sup>	0% (FLU); 0% (SMX)

**Tableau 3. Les antibiotiques dans les solutions nourrices : les concentrations mesurées au début et le pourcentage de perte (loss) après 2-3 semaines**

Afin de comprendre le comportement d'antibiotiques appliqués, nous avons déterminé un bilan de la masse d'antibiotiques (Tableau 4) par les concentrations d'antibiotiques dans les sédiments naturels, les sédiments alimentés avec des antibiotiques et la concentration dans les solutions nourrices et sorties. Idéalement, la quantité d'antibiotique dans la solution nourrice et le sédiment naturel devrait être égale à la quantité dans l'échantillon sorti et le sédiment traité s'il n'y a pas de perte due à la dégradation ou l'adsorption. Pour le sédiment en amont qui est traité par une concentration de 268 ng L<sup>-1</sup>, la VA n'a été ni détectée dans le sédiment naturel et le sédiment traité, ni dans la solution de sortie. Gartiser et ses collègues (Gartiser, Urich et al. 2007) n'ont pas trouvé la biodégradation de la VA sous condition anaérobie. Cette observation a été trouvée dans la boue de STEP qui ne reçoit pas l'effluent d'hôpital contenant les antibiotiques et qui est différent de notre sédiment. En revanche, nous avons retrouvé toute la VA dans le sédiment en aval qui sont alimenté par la VA, ainsi que dans l'échantillon sorti du réacteur. Les différents teneurs de VA dans ces deux sédiments traités peuvent être dû au différentes caractéristiques du sédiment et à la structure des communautés microbiennes, responsable de la dégradation de la VA.

D'autre part, pour le traitement à la FLU 520 ng L<sup>-1</sup> et SMX 5060 ng L<sup>-1</sup>, 312 ng FLU et 2956 ng SMX ont été trouvés dans le sédiment naturel et la solution nourrice lorsque 128 ng FLU et 287 ng SMX ont été détectés dans le sédiment traité et la solution sortie. Ce résultat indique une perte de 59% pour la FLU et 90% pour la SMX. Une perte similaire a été trouvé dans le traitement avec la FLU 2465 ng L<sup>-1</sup> et SMX 3519 ng L<sup>-1</sup>, 69% pour la FLU et 91% pour la SMX. Nous avons trouvé peu d'accumulation de la FLU dans les sédiments après le traitement, et environ deux tiers de la FLU n'est pas retrouvé malgré le fait que les fluoroquinolones sont généralement bien adsorbés au sol ou au sédiment (Picó and Andreu 2007; Tamtam, Le Bot et al. 2011). La perte de la FLU pourrait être due aux transformations abiotiques, par exemple, la conjugaison avec le complexe, une forme non détectable par notre méthode d'analyse. Certaines études ont montré la transformation des fluoroquinolones (enrofloxacin et la danofloxacin) par les microorganismes environnementales (Martens, Wetzstein et al. 1996; Chen, Rosazza et al. 1997) lorsque d'autres (Samuelsen, Lunestad et al. 1994; Hektoen, Berge et al. 1995) ont trouvé que la FLU est persistante et stable, et la biodégradation est un effet

mineur sur la FLU dans les sédiments (Lai and Lin 2009). La nature, la teneur en carbone et la structure des communautés microbiennes des sédiments peuvent jouer un rôle sur la dégradation des antibiotiques.

La SMX, une molécule de la famille des sulfamides, est considéré mobiles (Tamtam, Le Bot et al. 2011). Cela peut expliquer pourquoi il n'y avait plus de perte de SMX par rapport à la FLU dans notre étude. En général une forte adsorption n'est pas favorable à la dégradation (Ingerslev and Halling-Sorensen 2001(a)). La disparition de la SMX dans les sédiments peuvent être dû à: i) la biodégradation; la demi-vie de SMX dans les sols était de 7 jours sous la condition anoxique (Liu, Ying et al. 2010), tandis que Radke et ses collègues (Radke, Lauwigi et al. 2009) ont montré que le SMX a été éliminée efficacement par biodégradation dans les sédiments. ii) la réaction abiotique dans les sédiments; transformation abiotique de la SMX et le fer ferreux générés de la réduction microbienne du fer ferrique dans le sol a été observée (Mohatt, Hu et al. 2011). iii) la diminution d'extraction au cours du temps; Holtge et son collègue ont observé que la  $^{14}\text{C}$ -SMX extractable est diminuée de 102 à 7% tandis que la  $^{14}\text{C}$ -SMX non-extractable est augmentée de 9 à 91% pendant 102 jours.

		initial sediment	Inflow	Treated sediment	Outflow	Loss	
		ng				(%)	
VA 268 ng L <sup>-1</sup>	Up	VA	0	247 ± 241	0	0	<b>100</b>
	Down	VA	1190 ± 437	247 ± 241	1450	90 ± 16	<b>0</b>
FLU 520 ng L <sup>-1</sup> + SMX 5060 ng L <sup>-1</sup>	Up	FLU	32 ± 4	280 ± 118	90 ± 1	38 ± 66	<b>59</b>
		SMX	236 ± 117	2720 ± 782	195 ± 225	92 ± 25	<b>90</b>
FLU 2465 ng L <sup>-1</sup> + SMX 3519 ng L <sup>-1</sup>	Up	FLU	32 ± 4	1396 ± 395	27 ± 11	410 ± 113	<b>69</b>
		SMX	236 ± 117	2010 ± 371	58 ± 81	141 ± 33	<b>91</b>

**Tableau 4. Bilan d'antibiotiques ; concentration totale dans les sédiments initiaux et traités (en ng) et concentration totale alimenté par les solutions nourrices tout au long de l'expérience (14-24 j) et dans les échantillons sortis du réacteur (ng)**

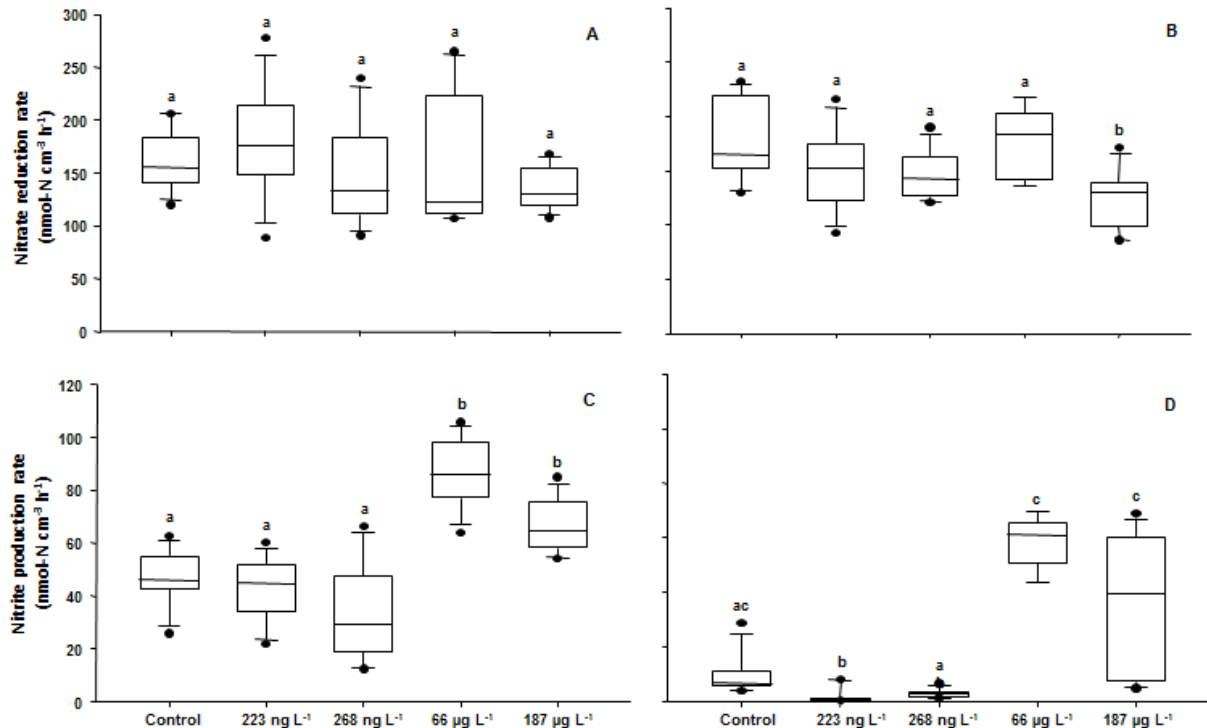
### 3.3 Effets de la VA, SMX et FLU sur le taux de la réduction du nitrate et production du nitrite et d'oxyde nitreux

L'effet des différents concentrations de la VA sur les taux de la réduction des nitrates et la production du nitrite dans les sédiments en amont et en aval du rejet de STEP de Charmoise sont présentés dans la Figure 3. Taux de réduction de nitrates pour le contrôle varient entre 122 et 177 nmol NO<sub>3</sub><sup>-1</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> dans les sédiments en amont et entre 130 et 184 nmol NO<sub>3</sub> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> dans les sédiments en aval. Les taux de réduction du nitrate en présence de différentes concentrations de VA n'ont montré aucune différence significative entre les traitements et le contrôles (Figure 3A) dans les sédiments en amont. Toutefois, une diminution faible, mais significative du taux de réduction des nitrates (test de Tukey,  $p < 0,05$ ) a été observée dans les sédiments en aval alimentés par 187 µg L<sup>-1</sup> VA par rapport au témoin. La dénitrification est la réduction du nitrate en N<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>O par l'intermédiaire du nitrite. Les taux de production de nitrite dans les sédiments en amont varient entre 29 et 86 nmol NO<sub>2</sub><sup>-1</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (Figure 3). Les deux plus fortes concentrations de VA (66 et 187 mg L<sup>-1</sup>) a montré une augmentation significative de la production de nitrite (test de Tukey,  $p < 0,05$ ) par rapport au contrôle (Figure 3C). Les taux de production de nitrite comptent à 60% de la réduction des taux de nitrates dans ces deux traitements. Les deux concentrations environnementale (223 et 268 ng L<sup>-1</sup>) n'ont montré aucune différence significative dans la production du nitrite et présenté en moyenne 24%, tandis que le contrôle représentait 29% du taux de réduction du nitrate. Les taux de production du nitrite dans les sédiments en aval étaient plus faibles et variables par rapport aux sédiments en amont, variant entre 1 et 61 nmol NO<sub>2</sub><sup>-1</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, et n'ont pas montré de différence significative entre les traitements et les contrôles



(Figure 3D), sauf pour les 223 ng VA L<sup>-1</sup> a montré un taux significativement plus faible par rapport au témoin. La production de nitrite a représenté en moyenne 1% des taux de réduction des nitrates à la présence de faibles concentrations (223 et 268 ng L<sup>-1</sup>) et environ 32% et 4% pour les deux concentrations plus élevées (66 et 187 mg L<sup>-1</sup>) et le contrôle respectivement.

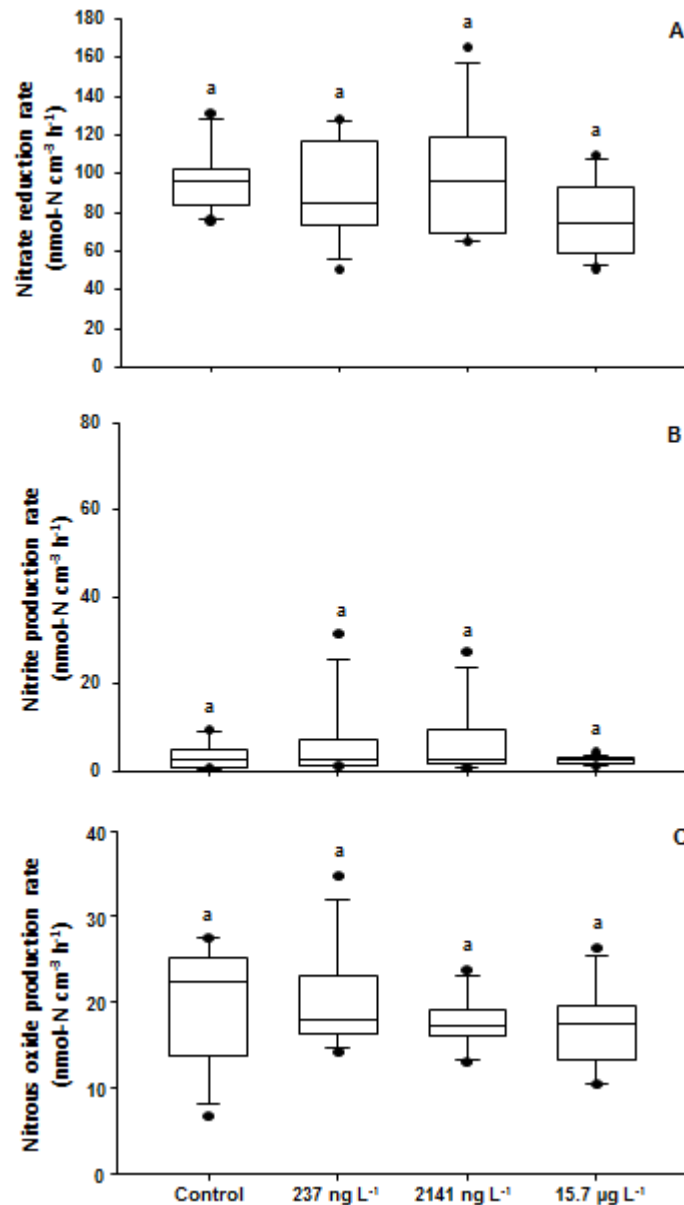
La VA est un antibiotique qui agit sur la synthèse de la paroi bactérienne. Les bactéries à Gram-négatif sont intrinsèquement résistantes à ce composé en raison d'imperméabilité à la membrane extérieure (Wright 2003). La résistance à la VA sur les taux de dénitrification jusqu'à 187 mg L<sup>-1</sup> pourrait être expliquée soit par la présence de bactéries Gram-négatives ou VA dénitrifiantes résistantes ou par un changement dans la communauté dénitrifiante vers une communauté plus résistante (Gram négatif ou Gram positif résistante) pendant trois semaines d'incubation.



**Figure 3 : Taux de réduction du nitrate (A, B) et de production du nitrite (C, D) des sédiments de la Charmoise amont (A, C) et aval (B, D) (médian de triplicat et la sortie des réacteurs entre 7 et 14 jours). Tous les réacteurs sont alimentés avec 5 mM de nitrate et différentes concentrations de VA**

La Figure 4 montre les résultats de l'effet des différents traitements de la SMX (237 ng L<sup>-1</sup> -15,7 µg L<sup>-1</sup>) sur la réduction du nitrate, production du nitrite et d'oxyde nitreux les sédiments en amont de la Charmoise. Les taux moyens de réduction du nitrate sans SMX (contrôle) sont de 96 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>. L'application de 237, 2141 ng L<sup>-1</sup> et 15,7 µg L<sup>-1</sup> présentant 85, 96 et 74 nmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> respectivement pour les taux de réduction du nitrate, et n'ont pas montré de différence significative. Les taux de production de nitrite dans les sédiments traités étaient stables (de 2 à 3 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>) et ne sont pas significativement différents du contrôle (2 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>). La production de nitrite compté pour 3% de la production du nitrite dans tous les sédiments (contrôle et sédiments traités). Il n'y a pas d'effet significatif sur la production du nitrite. L'oxyde nitreux est un gaz à effet de serre responsable du changement climatique ainsi qu'un produit intermédiaire de la dénitrification. Nous avons mesuré les concentrations de N<sub>2</sub>O en sortie des sédiments pour déterminer les effets de la SMX sur la production d'oxyde nitreux dans les sédiments amont de la Charmoise (Figure 4C). Le taux de production d'oxyde nitreux mesuré simultanément en Septembre 2011 indique une forte production d'oxyde dans ces sédiments. Les taux variaient entre 17 et 18 nmol N<sub>2</sub>O cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, en présence de 237 ng L<sup>-1</sup>-15,7 µg L<sup>-1</sup> SMX alors que 22 nmol nmol N<sub>2</sub>O cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> pour le contrôle. Moyenne de la

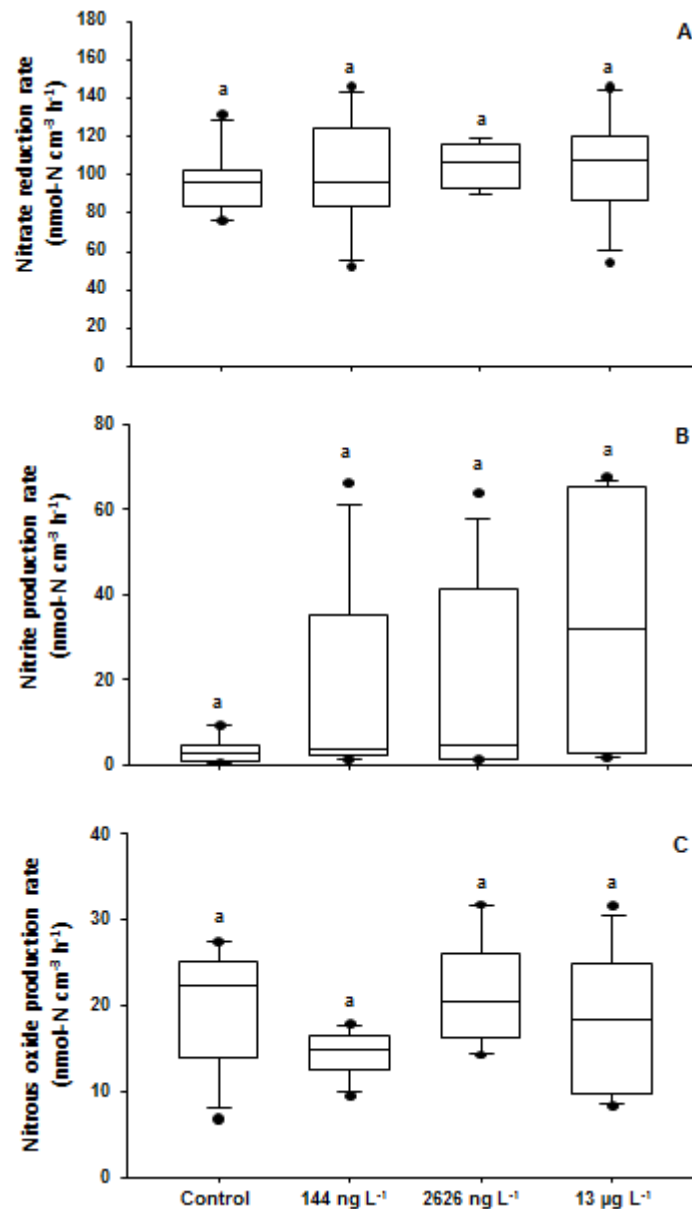
production d'oxyde nitreux dans tous les sédiments représentaient 21% des taux de réduction du nitrate. Aucune différence significative n'est observée avec et sans ajout de la SMX.



**Figure 4 : Taux de réduction du nitrate (A), production du nitrite (B) et production d'oxyde nitreux (C) des sédiments de la Charmoise amont (médian de triplicat et la sortie des réacteurs entre 9 et 14 jours). Tous les réacteurs sont alimentés avec 5 mM de nitrate et différentes concentrations de SMX**

La réduction du nitrate et la production du nitrite et d'oxyde nitreux dans les sédiments de la Charmoise en amont, et les effets des différentes concentrations de FLU sur ces taux sont représentés à la Figure 5. Les sédiments non traités (nitrates uniquement) sont les mêmes que pour l'expérience de la SMX (96 nmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> et 2 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>), et les taux de réduction du nitrate varient entre 96 et 107 nmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> présence de trois concentrations environnementale (144 ng L<sup>-1</sup>-13µg L<sup>-1</sup>). Il n'apparaît donc pas d'effet de la FLU sur les taux de réduction du nitrate. Aucune différence significative des taux de production du nitrite n'est observée entre le contrôle et les traitements, alors que les taux varient entre 2 à 32 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>. Notez que même s'il n'y avait pas d'augmentation significative de la production de nitrite dans la présence de FLU, une augmentation de la variabilité est

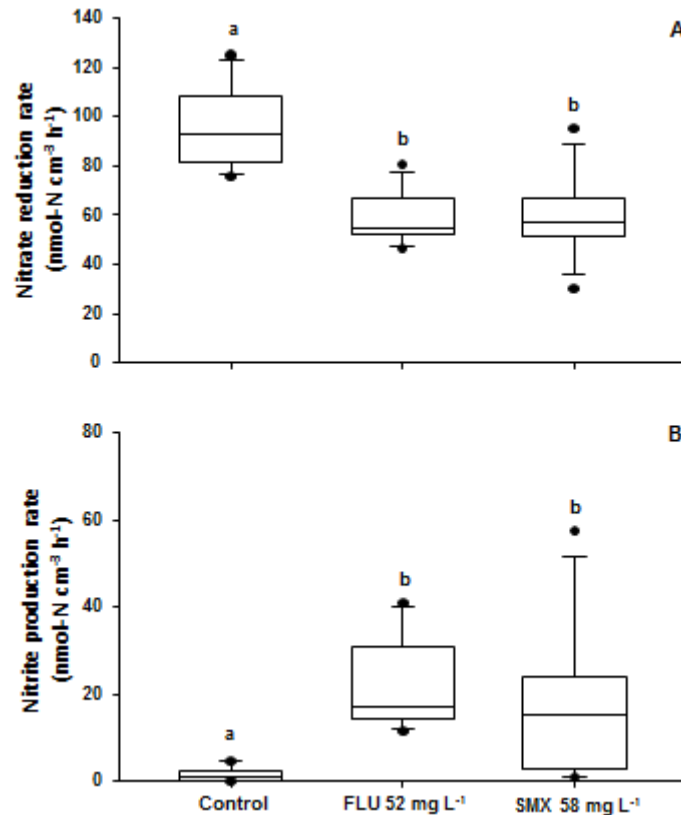
observée. En moyenne, les taux de production de nitrite représentaient entre 3-4% du taux de réduction des nitrates pour le contrôle et deux faibles concentrations, et augmentait jusqu'à 29% pour la concentration plus élevée ( $13 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Les taux de la production d'oxyde nitreux varient entre 15 et 20  $\text{nmol N}_2\text{O cm}^{-3} \text{h}^{-1}$  en présence de  $144 \text{ ng L}^{-1}$  -  $13 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivement et 22  $\text{nmol N}_2\text{O cm}^{-3} \text{h}^{-1}$  pour le contrôle. La moyenne de la production d'oxyde nitreux du contrôle et des sédiments traités représentaient 19% du taux de réduction des nitrates. Ce pourcentage est dans le même ordre de grandeur que celle dans l'étude de la SMX (21%).



**Figure 5 : Taux de réduction du nitrate (A), production du nitrite (B) et production d'oxyde nitreux (C) des sédiments de la Charmoise amont (médian de triplicat et la sortie des réacteurs entre 9 et 14 jours). Tous les réacteurs sont alimentés avec 5 mM de nitrate et différentes concentrations de FLU**

La présence de la FLU (test de Tukey,  $p < 0,05$ ) et la SMX (Test de Dunn's,  $p < 0,05$ ) diminuent significativement les taux de réduction du nitrate en présence des concentrations thérapeutiques ( $52 \text{ mg L}^{-1}$  pour la FLU et  $58 \text{ mg L}^{-1}$  pour la SMX) (Figure 6A). Taux de réduction du nitrate sont de 55 et 57  $\text{nmol NO}_3^- \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$  pour le traitement avec la FLU et la SMX respectivement, versus 92  $\text{nmol NO}_3^- \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$  pour le contrôle. Des augmentations significatives (Figure 6B, Test de Dunn,  $p < 0,05$ )

des taux de production de nitrite ont été observées dans les sédiments traités avec 52 mg L<sup>-1</sup> FLU (17 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>) et 58 mg L<sup>-1</sup> SMX (15 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>) par rapport aux sédiments non traités (1 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>). En moyenne, les taux de production de nitrite représentaient 31 et 27% pour les traitements avec FLU et SMX, et 1% pour le contrôle.



**Figure 6 : Taux de réduction du nitrate (A), production du nitrite (B) des sédiments de la Charmoise amont (médian de triplicat et la sortie des réacteurs entre 7 et 14 jours). Tous les réacteurs sont alimentés avec 5 mM de nitrate et différentes concentrations de FLU et SMX**

SMX, en inhibant la synthèse de l'acide folique (un métabolite clé dans la synthèse de l'ADN), et la FLU qui perturbe l'action enzymatique de l'ADN gyrase, inhibent les bactéries à Gram-positives et Gram-négatives. Réduction du nitrate, production du nitrite et d'oxyde nitreux n'étaient pas vulnérables en présence de concentrations sub-inhibitrices de ces deux antibiotiques, alors que les taux sont inhibés en présence de concentrations thérapeutiques. La résistance à concentrations sub-inhibitrices indique la présence d'une résistance de la communauté microbienne à ces deux antibiotiques. Cette résistance peut être due à la résistance intrinsèque ou à un effet mineur sur les taux en raison de changement de structure de la communauté. Considérant que les concentrations minimales inhibitrices (CA-SFM) est de 4 mg L<sup>-1</sup> pour la FLU et de 64 mg L<sup>-1</sup> pour la SMX, les concentrations sub-inhibitrices appliquées dans ce travail sont des concentrations bien au-dessous de ces valeurs. La sulfaméthazine et l'enrofloxacin, deux antibiotiques des sulfamidés et des fluoroquinolones respectivement, ont été retrouvés diminuer le nombre le plus probable (NPP) et le nombre des dénitrifiantes nosZ, mais pas d'effet sur les taux de dénitrification même à 5 mg L<sup>-1</sup> après 5 jours de l'application de ces deux antibiotiques (Ilhan, Ong et al. 2011).

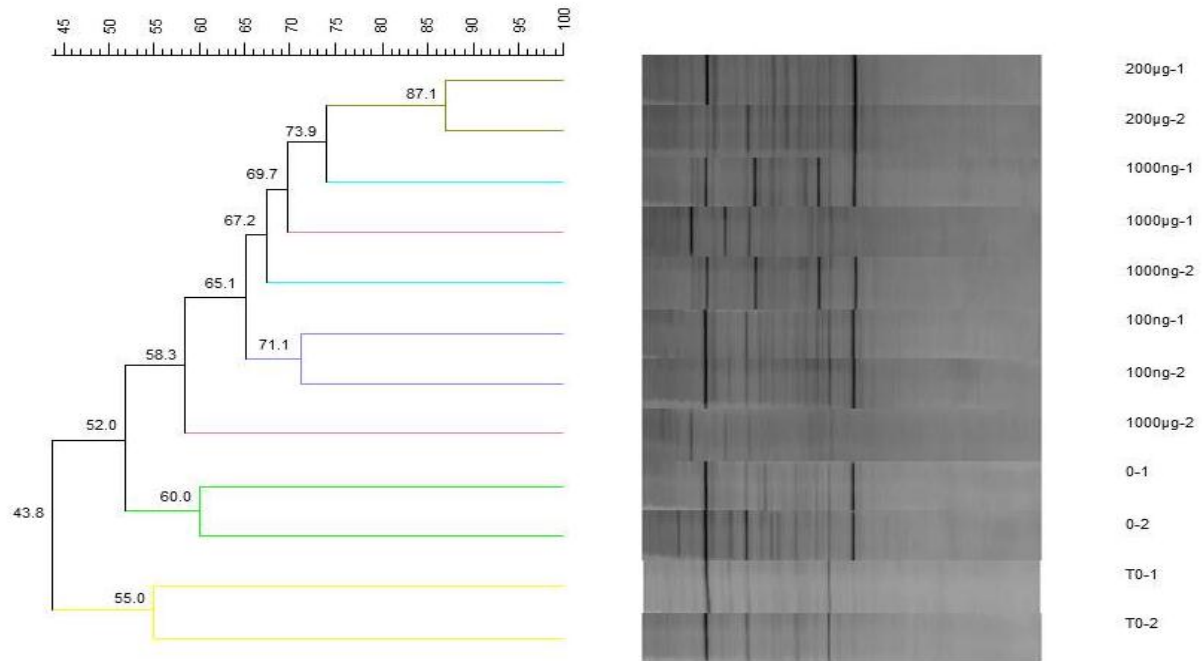
Le nitrite est un produit intermédiaire de la dénitrification et de la réduction dissimilaire du nitrate (DNRA). Un grand nombre de bactéries sont capables de réduire le nitrate en nitrite sous condition anoxique (Tiedje 1988; Burgin and Hamilton 2007). Les productions du nitrite sont augmentées et plus variables en présence de concentrations sub-inhibitrices, malgré qu'il n'y a pas un effet

significatif. Apparemment, les microorganismes qui réalisent la production du nitrite sont sensibles et affectés par la présence des antibiotiques appliqués. Il semble que les antibiotiques influencent la structure de la communauté et l'abondance bactérienne et aboutissent à l'accumulation du nitrite. L'accumulation du nitrite a été observée en présence de la SMX, l'ofloxacine et le triclosan, et les bactéries oxydant le nitrite sont diminuées en présence des médicaments pharmaceutiques lorsqu'on recherche les effets des médicaments sur la nitrification, un autre processus important du cycle de l'azote. La recherche du futur sur la structure et la diversité de la communauté nous permet de mieux comprendre l'effet des antibiotiques sur la production du nitrite.

L'effet de la FLU et la SMX sur la réduction du nitrate et la production du nitrite en présence de concentrations thérapeutiques pourrait être due à la réduction du nombre de réducteurs du nitrate et du nitrite ou au changement de la structure de la communauté dénitrifiante. L'effet d'inhibition de la croissance (Zielezny, Groeneweg et al. 2006), du ratio bactérie : fungi (Hammesfahr, Heuer et al. 2008) et d'activité microbienne (Thiele-Bruhn and Beck 2005) ont été reportée dans les littératures, essentiellement en présence de fortes concentrations. L'effet de fortes concentrations des antibiotiques sur la dénitrification a été étudié. L'érythromycine, la clarithromycine et l'amoxicilline à  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ont été trouvés diminuant les taux de dénitrification dans les sédiments (Costanzo, Murby et al. 2005), tandis que le chloramphénicol ( $>100 \text{ mg L}^{-1}$ ) a été observée inhibant l'activité enzymatique de dénitrification dans les sols (Murray and Knowles 1999). Les deux études mentionnées ci-dessus ont étudié les effets de l'exposition courte (heures) avec une seule application d'antibiotiques, qui semblent être un effet toxique aigu directement sur les microorganismes impliqués dans la dénitrification. Cela est différent de notre étude dans un mode continu à long terme avec un effet chronique sur les bactéries dénitrifiantes. Actuellement, la plupart des études montrent les effets des antibiotiques en présence de concentration thérapeutiques qu'il n'est pas possible de trouver dans les écosystèmes aquatiques (Tamtam, Mercier et al. 2008; Dinh, Alliot et al. 2011). L'effet de la SMX ( $1,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) sur la dénitrification dans l'eau souterraine étudiée par Underwood et ses collègues (Underwood, Harvey et al. 2011) est actuellement la seule étude qui examine l'effet d'antibiotique sur la dénitrification en présence de concentration environnementale. Le nitrite, un intermédiaire dans la nitrification et la dénitrification est toxique. Nous avons montré que la production de nitrite augmente en présence des trois antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices ainsi que concentrations thérapeutiques. Les mécanismes de ce phénomène ne sont pas bien connus et devraient être étudiés dans la recherche du futur. Des travaux sur les effets d'antibiotiques à faibles concentrations sont donc encore nécessaires. Ces travaux doivent de plus être réalisés sur des durées assez longues d'incubation, comme nous l'avons fait ici pour s'approcher au mieux des conditions environnementales.

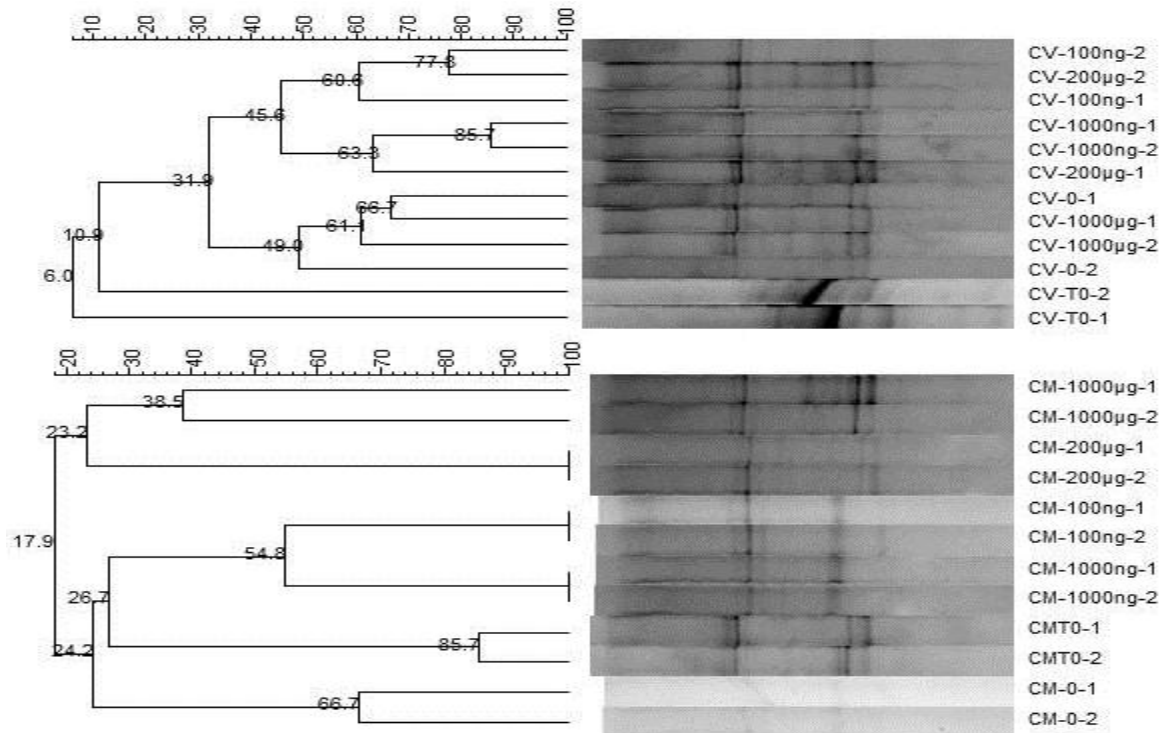
### **3.4 Effets de la VA sur les communautés microbiennes dans les sédiments**

La DGGE ADNr 16S permet d'obtenir des informations sur la communauté bactérienne totale. Ici, elle a permis de suivre l'évolution de la communauté totale dans les sédiments exposés à des concentrations de la VA allant de  $100 \text{ ng L}^{-1}$  à  $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  pendant plusieurs semaines dans le but de vérifier l'impact sur la réduction des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ). Pour le gel DGGE ADNr 16S Charmoise Amont (CM Figure 7), on observe une bonne similarité entre les duplicatas d'un sédiment, sauf pour la plus forte concentration de la VA ( $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ). On observe également que les sédiments frais et les sédiments de réacteur sans la VA sont regroupés, et diffèrent des autres échantillons. On observe une différence entre le profil DGGE obtenu pour les sédiments naturels (T0) et le contrôle (0). On observe également que les bandes majoritaires présentes dans les échantillons 0 à  $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  ne sont pas retrouvées comme bande majoritaire dans les puits  $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Figure 7 Photographie du gel DGGE (au milieu) et Dendrogramme (à gauche) basé sur le calcul de l'indice de similarité de Jaccard et reconstruit par la méthode UPGMA des amplifias des gènes codant pour l'ADNr 16S Charmoise Amont : sédiments exposés à différentes concentration de la VA en masse par Litre, les duplicats étant indiqué par -1 ou -2**

La Figure 8 montre la diversité fonctionnelle des bactéries possédant le gène *nosZ* (représente des communautés dénitrifiantes) en amont et en aval du rejet de la STEP. On observe que les échantillons naturels (T0) correspondant aux sédiments naturels pour les 2 sites de prélèvement sont très différents des autres échantillons en DGGE *nosZ*. On observe de plus qu'il y a peu de bandes en DGGE *nosZ* le nombre étant compris entre 6 et 10 en fonction des échantillons. On observe que pour les sédiments amont, les échantillons peuvent être regroupés en 2 groupes : le premier comprend les sédiments naturel, le sédiment sans VA et les 2 plus faibles concentrations en VA (qui sont plus proches entre elles que de V0 et T0), tandis que le deuxième comprenant les concentrations les plus fortes présente seulement 17% de similarité avec les échantillons du 1<sup>er</sup> groupe. Il est plus difficile de former des groupes aussi nettement pour la DGGE *nosZ* des échantillons aval bien qu'on puisse noter que les échantillons naturels (T0) se distinguent de tous les autres.



**Figure 8** Gel DGGE (au milieu) et Dendrogramme (à gauche) basé sur le calcul de l'indice de similarité de Jaccard et reconstruit par la méthode UPGMA des amplifias des gènes *nosZ* codant pour la  $N_2O$  reductase Charmoise amont (CM) et aval (CV) : sédiments exposés à différentes concentrations de la VA indiqués en masse pas Litre

Le changement de communauté totale (ADNr16S) dans les réacteurs au cours des 3 semaines de l'expérience en réacteur est donc confirmé par le changement observé dans la communauté des dénitrifiantes (*nosZ*). On observe une influence de la VA sur la communauté des dénitrifiantes dans les sédiments amont, la similarité des échantillons avec la VA étant de 26% au mieux avec le contrôle. Il est plus difficile de tirer une conclusion du gel obtenu à partir des sédiments aval avec la DGGE *nosZ*. Cependant, une étude récente (Verbaendert et al. 2011) a montré que la PCR *nosZ* visait principalement la communauté des dénitrifiantes à gram négatif, qui sont naturellement résistantes à la VA. De plus, la DGGE a été faite sans quantifier l'ADN déposé au préalable, ce qui nous empêche de considérer les variations d'intensité des bandes comme fiables.

## 4 Conclusion

Notre étude montre que la VA, SMX et FLU, aux concentrations sub-inhibitrices ( $144 \text{ ng L}^{-1}$ - $15 \text{ µg L}^{-1}$ ), mais qui correspondent aux concentrations observées dans les milieux, ne modifient pas significativement les taux de réduction du nitrate dans les sédiments amont et aval du rejet de STEP dans le ruisseau de la Charmoise. La réduction du nitrate et la production du nitrite ont été affectées en présence de FLU et SMX aux concentrations thérapeutiques ( $>50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Notre étude montre que les taux de production de nitrite ont augmenté et étaient plus variés en présence de ces trois antibiotiques. Même si les effets sur les taux sont faibles, nos résultats montrent que la communauté bactérienne change en fonction des présences des antibiotiques, qui signifie peut-être une adaptation de la communauté favorisant des espèces résistantes. Des études sur l'effets des antibiotiques sur les communautés bactériennes sont en cours.

En outre, notre travail montre que les concentrations d'antibiotiques étaient plus basses que prévu et sont diminuées au cours du temps dans les solutions nourrices qui alimentent les sédiments. Une dissipation de la VA, SMX et FLU ont été observées dans les sédiments, qui peuvent contribuer à l'absence d'effet d'antibiotiques sur la dénitrification.

## Références

- Batt, A. L., D. D. Snow, et al. (2006). "Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA." *Chemosphere* **64**(11): 1963-1971.
- Burgin, A. J. and S. K. Hamilton (2007). "Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways." *Frontiers In Ecology And The Environment* **5**(2): 89-96.
- CA-SFM "Committee of Antibioqram of French Microbiology Society".
- Chen, Y., J. P. N. Rosazza, et al. (1997). "Microbial models of soil metabolism: biotransformations of danofloxacin." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **19**(5-6): 378-384.
- Cordova-Kreylos, A. L. and K. M. Scow (2007). "Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities." *Isme Journal* **1**(7): 585-595.
- Costanzo, S. D., J. Murby, et al. (2005). "Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment." *Marine Pollution Bulletin* **51**(1-4): 218.
- Ding, C. and J. Z. He (2010). "Effect of antibiotics in the environment on microbial populations." *Applied Microbiology And Biotechnology* **87**(3): 925-941.
- Dinh, T., F. Alliot, et al. (2011). "Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS." - **85**(- 3): - 1245.
- Dokianakis, S. N., M. E. Kornaros, et al. (2004). "On the effect of pharmaceuticals on bacterial nitrite oxidation." *Water Science And Technology* **50**(5): 341-346.
- Drillia, P., S. N. Dokianakis, et al. (2005). "On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole." *Journal of Hazardous Materials* **122**(3): 259.
- Fatta-Kassinos, D., S. Meric, et al. (2011). "Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**(1): 251-275.
- Fernandez, I., A. Mosquera-Corral, et al. (2009). "Operation of an Anammox SBR in the presence of two broad-spectrum antibiotics." *Process Biochemistry* **44**(4): 494-498.
- Gartiser, S., E. Urich, et al. (2007). "Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes." *Chemosphere* **66**(10): 1839.
- Golet, E. M., A. C. Alder, et al. (2001). "Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection." *Anal. Chem.* **73**(15): 3632-3638.
- Halling-Sorensen, B., S. Nors Nielsen, et al. (1998). "Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review." *Chemosphere* **36**(2): 357-393.
- Hammesfahr, U., H. Heuer, et al. (2008). "Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils." *Soil Biology and Biochemistry* **40**(7): 1583.
- Heberer, T. (2002 (a)). "Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data." *Toxicology Letters* **131**(1-2): 5.
- Hektoen, H., J. A. Berge, et al. (1995). "Persistence of antibacterial agents in marine sediments." *Aquaculture* **133**(3-4): 175-184.
- Ilhan, Z. E., S. K. Ong, et al. (2011). "Dissipation of Atrazine, Enrofloxacin, and Sulfamethazine in Wood Chip Bioreactors and Impact on Denitrification." *Journal Of Environmental Quality* **40**(6): 1816-1823.
- Ingerslev, F. and B. Halling-Sorensen (2001(a)). "Biodegradability of Metronidazole, Olaquinox, and Tylosin and Formation of Tylosin Degradation Products in Aerobic Soil-Manure Slurries." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **48**(3): 311.
- Ingerslev, F., L. Torang, et al. (2001(b)). "Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems." *Chemosphere* **44**(4): 865-872.
- Kreuzig, R., S. Holtge, et al. (2005). "Test-plot studies on runoff of sulfonamides from manured soils after sprinkler irrigation." *Environmental Toxicology And Chemistry* **24**(4): 777-781.



- Kummerer, K. (2003). "Significance of antibiotics in the environment (vol 52, pg 5, 2003)." Journal Of Antimicrobial Chemotherapy **52**(2): 317-317.
- Kummerer, K. (2009). "Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I." Chemosphere **75**(4): 417-434.
- Kümmerer, K. (2010). "Pharmaceuticals in the Environment- Annual review." Annu. Rev. Environ. Resour. (35): 57-75.
- Kummerer, K., A. Al-Ahmad, et al. (2000). "Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test." Chemosphere **40**(7): 701-710.
- Lai, H. T. and J. J. Lin (2009). "Degradation of oxolinic acid and flumequine in aquaculture pond waters and sediments." Chemosphere **75**(4): 462-468.
- Laverman, A. M., P. Van Cappellen, et al. (2006). "Potential rates and pathways of microbial nitrate reduction in coastal sediments." Fems Microbiology Ecology **58**(2): 179-192.
- Lindberg, R., P.-A. Jarnheimer, et al. (2004). "Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards." Chemosphere **57**(10): 1479.
- Liu, F., G. G. Ying, et al. (2010). "Dissipation of sulfamethoxazole, trimethoprim and tylosin in a soil under aerobic and anoxic conditions." Environmental Chemistry **7**(4): 370-376.
- Maki, T., H. Hasegawa, et al. (2006). "Bacterial degradation of antibiotic residues in marine fish farm sediments of Uranouchi Bay and phylogenetic analysis of antibiotic-degrading bacteria using 16S rDNA sequences." Fisheries Science **72**(4): 811-820.
- Martens, R., H. G. Wetzstein, et al. (1996). "Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by wood-rotting fungi." Appl. Environ. Microbiol. **62**(11): 4206-4209.
- Mohatt, J. L., L. H. Hu, et al. (2011). "Microbially Mediated Abiotic Transformation of the Antimicrobial Agent Sulfamethoxazole under Iron-Reducing Soil Conditions." Environmental Science & Technology **45**(11): 4793-4801.
- Murray, R. E. and R. Knowles (1999). "Chloramphenicol inhibition of denitrifying enzyme activity in two agricultural soils." Applied And Environmental Microbiology **65**(8): 3487-3492.
- Obst, U., T. Schwartz, et al. (2006). "Antibiotic resistant pathogenic bacteria and their resistance genes in bacterial biofilms." International Journal of Artificial Organs **29**(4): 387-394.
- Picó, Y. and V. Andreu (2007). "Fluoroquinolones in soil—risks and challenges." Analytical and Bioanalytical Chemistry **387**(4): 1287.
- Pouliquen, H., R. Delepee, et al. (2007). "Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions." Aquaculture **262**(1): 23.
- Radke, M., C. Lauwigi, et al. (2009). "Fate of the Antibiotic Sulfamethoxazole and Its Two Major Human Metabolites in a Water Sediment Test." Environmental Science & Technology **43**(9): 3135-3141.
- Sacher, F., F. T. Lange, et al. (2001). "Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany." Journal of Chromatography A **938**(1-2): 199-210.
- Samuelsen, O. B., B. T. Lunestad, et al. (1994). "Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions." Aquaculture **126**(3-4): 283.
- Tamtam, F., B. Le Bot, et al. (2011). "A 50-year record of quinolone and sulphonamide antimicrobial agents in Seine River sediments." Journal of Soils and Sediments **11**(5): 852-859.
- Tamtam, F., F. Mercier, et al. (2008). "Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions." Science of The Total Environment **393**(1): 84.
- Thiele-Bruhn, S. (2003). "Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review." Journal of Plant Nutrition and Soil Science **166**(2): 145-167.
- Thiele-Bruhn, S. and I. C. Beck (2005). "Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass." Chemosphere **59**(4): 457-465.
- Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. Biology of anaerobic microorganisms. A. J. B. Zehnder.
- Tolls, J. (2001). "Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review." Environmental Science & Technology **35**(17): 3397-3406.

- Underwood, J. C., R. W. Harvey, et al. (2011). "Effects of the Antimicrobial Sulfamethoxazole on Groundwater Bacterial Enrichment." Environmental Science & Technology **45**(7): 3096-3101.
- Wright, G. D. (2003). "Mechanisms of resistance to antibiotics." Current Opinion in Chemical Biology **7**(5): 563-569.
- Zielezny, Y., J. Groeneweg, et al. (2006). "Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity." Soil Biology & Biochemistry **38**(8): 2372-2380.
- Zuccato, E., D. Calamari, et al. (2000). "Presence of therapeutic drugs in the environment." The Lancet **355**(9217): 1789.