

# Effet des antibiotiques sur les processus de nitrification et dénitrification : synthèse bibliographique et résultats préliminaires

Anniet Laverman \*, Chen Yan, Céline Roose-Amsaleg, Josette Garnier  
UMR Sisyphe 7619, Fonctionnement des Hydrosystèmes, Université Pierre et Marie Curie-CNRS, Boite  
105, Tour 56, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France  
[\\*Anniet.laverman@upmc.fr](mailto:Anniet.laverman@upmc.fr)

## 1 Sources et distributions des antibiotiques

Certaines bactéries comme les Actinomycètes et les Streptomycètes produisent naturellement des antibiotiques, tels que la pénicilline et la céphalosporine, dans les sols. Les quantités produites sont cependant très faibles et difficiles à détecter (Kummerer, 2009). A ce jour, les données et études sur la présence et la production d'antibiotiques à des concentrations naturelles manquent sérieusement.

Depuis leur découverte en 1929 par Alexander Fleming, l'usage des antibiotiques, afin de traiter et empêcher les infections bactériennes, n'a fait que croître à la fois en médecine humaine et vétérinaire. Les antibiotiques sont peu dégradés lors du métabolisme humain et animal et c'est environ 70% des antibiotiques consommés qui sont excrétés (Kummerer, 2009). Par conséquent, après leur utilisation, les antibiotiques utilisés en ville et leurs métabolites, sont rejetés dans les eaux usées puis retrouvés dans les stations d'épuration (STEP). Les antibiotiques sont partiellement éliminés dans les STEPs. Certains finissent donc dans l'environnement, à savoir dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les sols et les sédiments. Les antibiotiques retrouvés dans l'environnement proviennent également de l'épandage sur les sols agricoles des boues de stations d'épuration ou encore de fumiers, riches en antibiotiques suite au traitement des animaux d'élevages. Enfin l'application directe d'antibiotiques dans l'eau pour traiter les élevages piscicoles constitue une autre source.

Dans le bassin de la Seine, les teneurs en certains antibiotiques dans le réseau hydrographique de l'amont de la région Ile-de-France jusqu'à l'estuaire interne (Poses) ont été mesurées (Tamtam et al., 2008). Une augmentation des concentrations d'amont en aval a été démontrée. Des antibiotiques ont également été détectés dans des sites ruraux sans influence des STEPs, c'est-à-dire en dehors d'une origine hospitalière ou domestique, car ils peuvent aussi être d'origine naturelle (la découverte des antibiotiques découle en effet de l'observation des *Penicillium* sp.). Ce même travail a aussi montré la présence de fortes concentrations autour des piscicultures, dans l'eau et dans les sédiments.

## 2 Elimination des antibiotiques dans l'environnement

Les antibiotiques peuvent être éliminés par différents processus i) biotique, par la biodégradation par des bactéries ou des champignons ou ii) abiotiques par adsorption, hydrolyse, photolyse, thermolyse, oxydation ou réduction. Les antibiotiques peuvent également être conjugués, notamment au sein de mécanismes qui favorisent leur excrétion eau chez les individus traités. En fonction des conditions du milieu, les antibiotiques peuvent être libérés ou transformés et devenir à nouveau disponibles.

Certaines familles d'antibiotiques, comme les quinolones et fluoroquinolones, ont un fort coefficient d'adsorption (Tolls, 2001). Ces composants disparaissent de la phase aqueuse et sont retrouvés dans les sols et sédiments. L'adsorption dépend cependant aussi de la présence de matière organique et des conditions redox (Tolls, 2001). L'attachement des antibiotiques sur les particules ou sur des complexes peut conduire à une perte de l'activité antibactérienne. La photodécomposition, qui dépend de l'énergie lumineuse reçue (de sa fréquence et de son intensité), peut être importante dans le processus d'élimination. Elle joue un rôle important dans les eaux superficielles comme un moyen d'élimination ou de traitement d'effluents

(Kummerer, 2009). Certains antibiotiques sont particulièrement sensibles à la lumière, tel que les quinolones, les tétracyclines, les sulphonamides, le tylosine. L'hydrolyse, qui conduit à la désactivation de l'antibiotique, est également un processus abiotique d'élimination des matières organiques dans l'environnement. La plupart des antibiotiques ne sont pas biodégradables, certains sont dégradés partiellement et seuls quelques uns sont totalement biodégradables dans l'environnement ou en laboratoire (Kummerer, 2009). A ce jour, aucune étude ne peut faire la synthèse complète du comportement/devenir d'un antibiotique en milieu naturel en fonction des conditions qu'il rencontre, vue la complexité des mécanismes en jeu.

### **3 Mode d'action des antibiotiques**

Les antibiotiques ont une action spécifique sur les bactéries. Ils peuvent avoir une action toxique directe, c'est-à-dire bactéricide, mais le plus souvent ils empêchent le développement des micro-organismes (action bactériostatique).

Les antibiotiques agissent en perturbant l'un des mécanismes cellulaires suivants :

- la biosynthèse de la paroi bactérienne
- la réplication et la réparation de l'ADN bactérien
- la synthèse des protéines bactériennes.

Les antibiotiques qui bloquent la synthèse de la paroi cellulaire (e.g. les pénicillines: amoxicilline et les céphalosporines), ne sont actifs que sur les germes en croissance. Les cellules au repos ne sont pas perturbées par l'action de ces molécules. Un grand nombre d'antibiotiques agit sur l'ADN bactérien, par blocage de l'ADN ou ARN polymérase. Les sulfamides sont des analogues structurels de molécules biologiques qui peuvent bloquer les voies métaboliques et inhiber la synthèse des bases nucléiques. Les quinolones et fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase qui contrôle le surenroulement de l'ADN. L'inhibition de la gyrase empêche la réplication et la réparation de l'ADN et donc la croissance des bactéries.

De nombreux antibiotiques ont pour cible le ribosome bactérien, l'organite cellulaire qui est responsable de la synthèse des protéines. Ces antibiotiques se répartissent en plusieurs classes, de nature chimique et de mode d'action différents. La plupart interagissent avec l'ARN ribosomique, en empêchant la traduction de l'ARNm ou bloquent l'élongation de la chaîne polypeptidique ; parmi eux, des aminoglycosides ou aminosides (streptomycine, gentamicine, amikacine), les phénicol (chloramphénicol, thiamphénicol) et les cyclines (tétracycline, doxycycline, auréomycine).

## **4 Effet des antibiotiques sur les micro-organismes et les processus biogéochimiques**

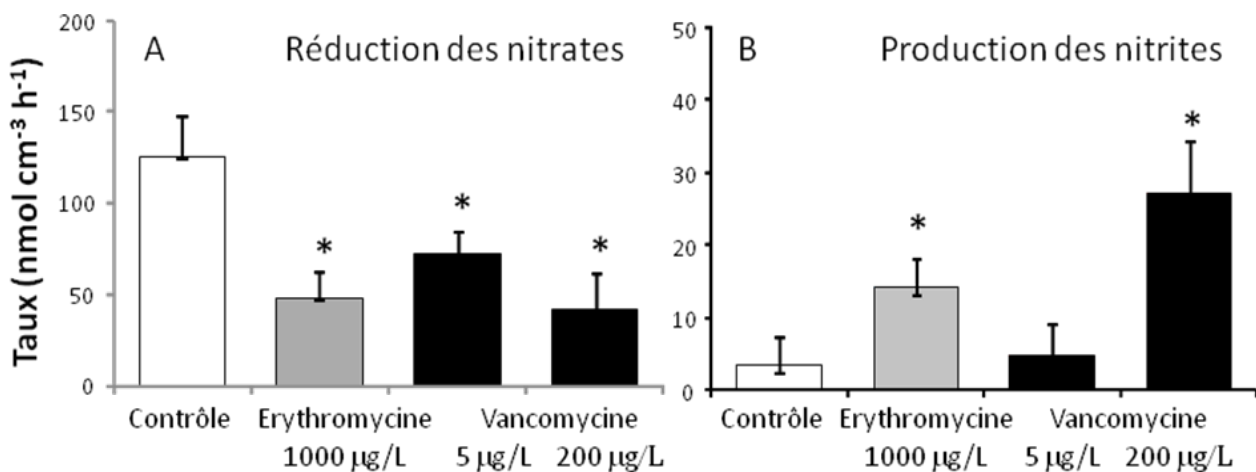
### ***4.1 Effets sur les processus biogéochimiques***

Comme décrit ci-dessus, les antibiotiques agissent en inhibant la croissance des micro-organismes. Des effets sur les communautés et processus microbiens sont attendus sur les populations actives et en période de croissance. Une vue d'ensemble des études qui ont observé des effets des antibiotiques sur les processus et les micro-organismes impliqués dans les cycles biogéochimiques est rassemblée dans le tableau 1. Ce tableau montre non seulement l'intérêt d'étudier les antibiotiques en lien avec le cycle de l'azote mais encore en lien avec d'autres processus biogéochimiques, tels que la réduction du sulfate ou la réduction du fer.

A ce jour, il a été publié quatre articles qui ont étudié les effets des antibiotiques sur le cycle d'azote en milieu aquatique, et cinq dans les sols. En général, de fortes concentrations (mg/L ou mg/kg) par rapport à celles rencontrées dans l'environnement (même perturbé) sont testées et des effets plutôt inhibiteurs sont observés. Costanzo et al. (2005) ont également testé des concentrations de ciprofloxacine plus basses (jusqu'à 0,1 µg/L), pour lesquelles ils n'ont pas observé d'effet, mais aucune réponse non plus n'était montrée pour cet antibiotique à des concentrations plus élevées. La conception de cette étude était destinée à déterminer les impacts sur la dénitrification à très court terme (heures) ; ce sont donc principalement des

effets directs sur les enzymes de la dénitrification. Comme l'action des antibiotiques est biostatique et pas obligatoirement toxique, on s'attend à avoir des effets plutôt sur une période allant de plusieurs jours à semaines, pendant laquelle les populations microbiennes sont censées se multiplier. De cette manière, des concentrations élevées (g/L) de chloramphénicol ont un effet inhibiteur sur les enzymes de dénitrification, plus précisément sur la production d'oxyde nitreux (Murray and Knowles, 1999).

Dans une étude, avec des sédiments du bassin de la Seine (Tresmes, Bassin du Grand Morin) nous avons observé des effets sur la dénitrification avec de hautes concentrations en érythromycine (1000 µg/L) et vancomycine (200 µg/L) après incubation pendant 2 semaines (Laverman et al., 2008). Avec une faible concentration en vancomycine (50 µg/L), le taux moyenné sur deux semaines de la réduction des nitrates n'était pas affecté significativement par rapport au contrôle, sans antibiotique (Laverman et al., 2008). Comme un effet inhibiteur est plutôt attendu sur une plus longue durée, nous avons calculé les taux moyennés entre 8 et 12 jours d'exposition aux antibiotiques et toutes les concentrations montraient un effet significatif inhibiteur par rapport au contrôle (Figure 1A). Les hautes concentrations d'antibiotiques montraient également sur cette période une augmentation de la production de nitrite (un intermédiaire de la dénitrification, voir figure 1B).



**Figure 1. Taux moyen des réductions des nitrates (A) et production des nitrites (B) en nmol NO<sub>3</sub> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> des sédiments de Tresmes (moyenne des duplicats). Tous les réacteurs sont alimentés avec 5 mM de nitrate et différentes concentrations d'antibiotiques ; 1000 µgL<sup>-1</sup> Erythromycine, 50 µgL<sup>-1</sup> et 200 µgL<sup>-1</sup> Vancomycine. Les astérisques indiquent un effet significatif (P<0.01)**

En milieu aquatique un effet inhibiteur a été montré sur l'oxydation d'ammonium dans l'eau. L'oxydation du nitrite, la deuxième étape de la nitrification, était affectée par la présence d'ofloxacine et de sulfaméthaxazole dans une station d'épuration au bout de quelques heures (Dokianakis et al., 2004). L'activité anammox diminue sur plusieurs semaines en présence de tétracycline et chloramphénicol (Fernandez et al., 2009).

Dans des sols australiens, la quantité de gènes des nitrifiantes (*amoA*) diminue en présence d'oxytétracycline et streptomycine après une journée d'exposition (Colloff et al., 2008). Dans cette même étude, aucun effet n'a été montré sur la dénitrification en détectant les gènes des dénitrifiantes.

Par ailleurs, dans des sols agricoles, (Kotzerke et al., 2008) ont montré que la dénitrification était aussi inhibée par le sulfadiazine (10-100 mg/kg), alors que la nitrification était « stimulée ». Les auteurs suggéraient que cette augmentation était liée à l'activité des archéobactéries nitrifiantes, non affectée par le sulfadiazine. Dans une étude postérieure portant sur les mêmes sols, la nitrification était également inhibée par la présence de sulfadiazine, de même que la densité des bactéries nitrifiantes, ce qui vérifiait l'hypothèse selon laquelle les archéobactéries nitrifiantes étaient moins affectées par le sulfadiazine que les bactéries, en raison des spécificités des *Archaea*.

Tableau 1. Les effets des antibiotiques sur les communautés microbiennes et processus biogéochimiques

# Les méthodes seront testées en batch ou colonne, la présence par détection des gènes.

Processus microbiens	Antibiotique	concentrations	effets	Méthode#	durée	Origine	référence
nitrification	oxytétracycline	12.5-75 mg/L	inhibition	activité	jours	eau	(Klaver and Matthews, 1994)
dénitrification	ciprofloxacine	0.1 µg/L -1 mg/L	pas d'effet	activité	heures	sédiment	(Costanzo et al., 2005)
dénitrification	amoxicilline, clavulanic acid	1 mg/L	pas d'effet	activité	heures	sédiment	
dénitrification	érythromycine	1 mg/L	inhibition	activité	heures	sédiment	
dénitrification	clarithormycine	1 mg/L	inhibition	activité	heures	sédiment	
dénitrification	amoxicilline	1 mg/L	inhibition	activité	heures	sédiment	
dénitrification	ciprofloxacine	1 mg/L	pas d'effet	activité	heures	sédiment	
dénitrification	érythromycine	1 mg/L	inhibition	activité	jours	sédiment	(Laverman et al., 2008)
dénitrification	vancomycine	50-200 µg/L	inhibition	activité	jours	sédiment	
nitrification	ofloxacine, sulfaméthoxazole	2-10 mg/L	inhibition	activité	heures	STEP	(Dokianakis et al., 2004)
anammox	tétracycline, chloramphénicol	100-1000 mg/L	inhibition	activité	mois	STEP	(Fernandez et al., 2009)
nitrifiantes	sulfaméthaxazole, oxytétracycline, streptomycine	3- 5 mg/kg	inhibition	présence	mois	Sol	(Colloff et al., 2008)
denitrifiantes	sulfaméthaxazole, oxytétracycline, streptomycine	3-5 mg/kg	pas d'effet	présence	mois	Sol	
nitrification	sulfadiazine	10-100 mg/kg	inhibition et stimulation	activité	mois	Sol	(Kotzerke et al., 2008)
dénitrification	sulfadiazine	10-100 mg/ kg	inhibition	activité	mois	Sol	
nitrifiantes	sulfadiazine	10 -100 mg/kg	Inhibition	présence	mois	Sol	(Schauss et al., 2009)
dénitrification	chloramphénicol	0.1 - 2 g/L	inhibition	activité	heures	Sol	(Murray and Knowles, 1999)
réduction de sulfate	oxytétracycline, acide oxolinic, flumequine		inhibition	activité	jours	sédiment	(Hansen et al., 1992)
réduction de sulfate	chloramphénicol	20- 100 mg/L	inhibition	activité	jours	STEP	(Ingvorsen et al., 2003)
réduction de sulfate	streptomycine						
réduction de sulfate	ciprofloxacine	0.02 - 200 mg/L	stimulation	présence	jours	sédiment	(Cordova-Kreylos and Scow, 2007)
Réduction de fer	sulfapyridine and oxytétracycline	0.02-500 mg/kg	inhibition	activité	jours	SOL	(Thiele-Bruhn and Beck, 2005)
Dégradation du pyrène	ciprofloxacine	20- 2000 µg/L	inhibition	activité	mois	sédiment	(Naslund et al., 2008)

L'activité des autres processus biogéochimiques (réduction du sulfate, réduction du fer) est aussi inhibée par les antibiotiques, ainsi que la dégradation du pyrène (Hansen et al., 1992, Thiele-Bruhn and Beck, 2005, Naslund et al., 2008). L'étude par Thiele-Bruhn et Beck (2005) montre que les effets sur le court terme (heures) n'affectent pas les activités enzymatiques, seule une adaptation des incubations sur plusieurs jours montrant des effets.

L'activité de la réduction du sulfate dans les sédiments et dans les boues d'une station d'épuration était affectée par l'oxytétracycline, l'acide oxolinique, le fluméquine et le chloramphénicol (Hansen et al., 1992, Ingvorsen et al., 2003). La présence de ciprofloxacine dans des sédiments a pu être à l'origine d'une densification des bactéries réductrices de sulfate, détectées par la présence de lipides spécifiques de ces micro-organismes (par PLFA : acides gras phospholipidiques (Cordova-Kreylos and Scow, 2007)).

En général les études faites jusqu'à présent montrent un effet inhibiteur sur les processus biogéochimiques dans le cycle d'azote, mais également dans les autres cycles. Cependant les résultats sont nettement insuffisants pour appréhender le rôle des antibiotiques sur les processus, car des concentrations très élevées, et donc non retrouvées dans l'environnement sont utilisées et le seul test qui utilisait des concentrations plus basses, observées dans l'environnement (cf. Costanzo et al 2005) ciblait des effets directs, à court terme.

## 4.2 Effets sur les communautés microbiennes

Les communautés, comme les activités microbiennes sont affectées par la présence des antibiotiques (Tableau 2). Quelques études montrent par exemple un changement dans la proportion bactéries/champignons (Thiele-Bruhn and Beck, 2005, Hammesfahr et al., 2008) ; les champignons n'étant pas censés être affectés par les antibiotiques, leur densité ne change pas, contrairement à celle des bactéries qui diminue.

L'oxytétracycline réduit la diversité fonctionnelle dans les communautés microbiennes du sol analysé par la méthode Biolog (Kong et al., 2006) et d'une manière générale les antibiotiques inhibent les activités enzymatiques des bactéries des sols (Wei et al., 2009, Boleas et al., 2005).

Tableau 2 : Recensement des effets des antibiotiques sur les communautés microbiennes environnementales

Effets sur :	Antibiotique	concentration	effets	durée	origine	publication
Communauté microbienne	ciprofloxacine	20- 2000 µg/L	changement	mois	sédiment	(Naslund et al., 2008)
	ciprofloxacine	0.02 - 200 mg/L	changement	mois	sédiment	(Cordova-Kreylos and Scow, 2007)
	culfadiazine	10-100 mg/kg	changement	mois	sol	(Hammesfahr et al., 2008)
	erythromycine	-	changement	mois	sédiment	Kim et al 2005
	culfamethoxazole	0.1-500 mg/kg	changement	mois	sol	(Demoling et al., 2009)
	tétracycline	1-100 mg/kg	changement	mois	sol	(Wei et al., 2009)
Activité microbienne	oxytétracycline	0.01-100 mg/kg	inhibition	mois	sol	(Boleas et al., 2005)
	sulfapyridine and oxytétracycline	0.02-500mg/kg	inhibition	heures-jours	sol	(Thiele-Bruhn and Beck, 2005)
	Sulfadiazine	10-100 mg/kg	inhibition	mois	sol	(Kotzerke et al., 2008)
Diversité fonctionnelle	oxytétracycline	1-217 µmol/L	inhibition	jours	sol	(Kong et al., 2006)

## 5 Conclusion

Cette rapide synthèse sur les effets des antibiotiques, non pas sur les bactéries en tant qu'individu mais sur les communautés bactériennes et donc sur les processus biogéochimiques auxquels elles participent au travers de leurs activités, nous montre à quel point cette problématique reste à explorer. Par ailleurs, les concentrations testées sont très élevées et appliquées en une seule fois début d'expérimentation, les méthodes sont parfois inadéquates à l'effet recherché.

En dépit de cela, les antibiotiques ont en général un effet plutôt inhibiteur sur les processus biogéochimiques, les communautés et les activités enzymatiques. Les études sur le court terme (heures) montrent des effets directs sur les enzymes en appliquant de fortes concentrations d'antibiotiques. Les études sur le long terme, dans lesquelles les communautés actives et en croissance sont affectées, montrent dans la plupart des cas un effet négatif sur les processus.

Pour appréhender les conditions environnementales, d'un effluent agricole ou urbain par exemple, il sera donc nécessaire d'étudier les effets des antibiotiques en alimentant les expériences en continu à des concentrations proches de celles précédemment mesurées. Au cours des prochaines expériences, nous explorerons donc les effets d'un gradient de concentrations en antibiotiques sur les processus biogéochimiques, sur différents sédiments, soumis à des flux constants.

## Références

- Boleas, S., Alonso, C., Pro, J., Fernandez, C., Carbonell, G. and Tarazona, J.V. (2005) Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system (MS center dot 3) and influence of manure co-addition. *Journal of Hazardous Materials* 122(3), 233-241.
- Colloff, M.J., Wakelin, S.A., Gomez, D. and Rogers, S.L. (2008) Detection of nitrogen cycle genes in soils for measuring the effects of changes in land use and management. *Soil Biology & Biochemistry* 40(7), 1637-1645.
- Cordova-Kreylos, A.L. and Scow, K.M. (2007) Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. *Isme Journal* 1(7), 585-595.
- 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.
- Demoling, L.A., Baath, E., Greve, G., Wouterse, M. and Schmitt, H. (2009) Effects of sulfamethoxazole on soil microbial communities after adding substrate. *Soil Biology & Biochemistry* 41(4), 840-848.
- Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E. and Lyberatos, G. (2004) On the effect of pharmaceuticals on bacterial nitrite oxidation. *Water Science And Technology* 50(5), 341-346.
- Fernandez, I., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L. and Mendez, R. (2009) Operation of an Anammox SBR in the presence of two broad-spectrum antibiotics. *Process Biochemistry* 44(4), 494-498.
- Hammesfahr, U., Heuer, H., Manzke, B., Smalla, K. and Thiele-Bruhn, S. (2008) Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* 40(7), 1583-1591.
- Hansen, P.K., Lunestad, B.T. and Samuelsen, O.B. (1992) Effects of oxytetracycline, oxolinic acid, and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. *Canadian Journal of Microbiology* 38(12), 1307-1312.
- Ingvorsen, K., Nielsen, M.Y. and Joulain, C. (2003) Kinetics of bacterial sulfate reduction in an activated sludge plant. *Fems Microbiology Ecology* 46(2), 129-137.
- Klaver, A.L. and Matthews, R.A. (1994) Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. *Aquaculture* 123(3-4), 237-247.
- Kong, W.D., Zhu, Y.G., Fu, B.J., Marschner, P. and He, J.Z. (2006) The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community. *Environmental Pollution* 143(1), 129-137.
- Kotzerke, A., Sharma, S., Schauss, K., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B.M. and Schloter, M. (2008) Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. *Environmental Pollution* 153(2), 315-322.
- Kummerer, K. (2009) Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere* 75(4), 417-434.
- Laverman, A.M., Roose-Amsaleg, C. and Garnier, J. (2008) Effets potentiels des antibiotiques sur le taux de dénitrification des sédiments de Tresme (bassin de la Seine) SEINE, P.P. (ed).
- Murray, R.E. and Knowles, R. (1999) Chloramphenicol inhibition of denitrifying enzyme activity in two agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8), 3487-3492.
- Naslund, J., Hedman, J.E. and Agestrand, C. (2008) Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquatic Toxicology* 90(3), 223-227.
- Schauss, K., Focks, A., Heuer, H., Kotzerke, A., Schmitt, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B.M., Matthies, M., Amelung, W., Klasmeier, J. and Schloter, M. (2009) Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 28(5), 612-618.
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Dinh, Q.T., 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), 84-95.
- Tolls, J. (2001) Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environmental Science & Technology* 35(17), 3397-3406.
- Thiele-Bruhn, S. and Beck, I.C. (2005) Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59(4), 457-465.

Wei, X., Wu, S.C., Nie, X.P., Yediler, A. and Wong, M.H. (2009) The effects of residual tetracycline on soil enzymatic activities and plant growth. *Journal of Environmental Science and Health Part B- Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 44(5), 461-471.