Les antibiotiques dans les eaux de surface du bassin de la Seine : évaluation de la contamination dans différents milieux

Joëlle Eurin, Fatima Tamtam, Donatienne Ollivon, Karen Tiphagne-Larcher, Marc Chevreuil

Laboratoire Hydrologie et environnement - EPHE/UMR Sisyphe 7619

Université Pierre et Marie Curie - BC 105 - 4 place Jussieu 75252 Paris cedex 05

joelle.eurin@ccr.jussieu.fr

Les antibiotiques dans les eaux de surface du bassin de la Seine : évaluation de la contamination dans différents milieux 1
1. Introduction 1
2. Validation de la méthode analytique par l'étude d'une molécule pilote, l'acide oxolinique. 2
2.1. Propriétés physico-chimiques de l'acide oxolinique 2
2.2. Protocole analytique du dosage de l'acide oxolinique 2
2.3. Linéarité 3
2.4. Reproductibilité intra et inter essai 4
3. Résultats 4
3.1. Contamination spatiale. 4
3.2. Variations temporelles lors d'un épisode de crue 7
3.3. Estimation des flux d'acide oxolinique à Paris et à Poses pendant et hors période de crue.... 7
4. Conclusion et perspectives 8
5. Bibliographie 9

1. Introduction

Parmi les pays européens, la France est le premier consommateur d'antibiotiques. Ces derniers font partie des substances retrouvées dans les eaux de surface en milieu anthropisé mais il n'existe pas actuellement de réglementation concernant leurs niveaux de présence dans les rejets et l'environnement.

La diffusion d'antibiotiques dans les milieux naturels pourrait modifier la faune bactérienne et contribuer à l'augmentation du nombre de souches résistantes aux antibiotiques observées en médecine humaine et vétérinaire. Les antibiotiques pourraient également provoquer des perturbations écologiques, via un impact sur les bactéries intervenant dans le cycle des nutriments ou sur la dégradation de produits chimiques. Cette problématique à l'échelle nationale constitue une nouvelle préoccupation qui intéresse notamment les gestionnaires des ressources en eau du bassin versant de la Seine.

Les médicaments sont des substances possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Ces médicaments sont en général absorbés par l'organisme avant d'être métabolisés. Cependant une partie de ses substances n'est pas métabolisée et est excrétée par les urines et les fèces (Hirch *et al*. 1999). Les sources anthropiques d'antibiotiques sont principalement les eaux usées urbaines (rejets domestiques et hospitaliers) et les déchets de l'agriculture. Ces derniers sont amenés directement ou indirectement vers les eaux de surface par les effluents d'élevage et les excrétions animales (Thorsten *et al*., 2003). Des résultats d'études ont montré que l'on retrouvait ces substances à des concentrations variant de quelques ng/L à quelques dizaines de µg/L dans les eaux de surface (Halling-Sorensen *et al*., 1998, Kolpin *et al*., 2004) et dans les stations d'épuration (STEP) où ils ne sont pas complètement dégradés (Kümmerer, 2003). Les piscicultures utilisent aussi de façon intensive des antibiotiques incorporés à la nourriture des poissons, ils sont ainsi rejetés directement dans les rivières, les étangs ou dans la mer. L'activité réelle de ces substances dans les hydrosystèmes, dont dépend directement le risque de sélection de bactéries résistantes, est largement méconnue (Schmidt *et al*., 2000, Migliore *et al*., 2003).

Cette présence d'antibiotiques dans le milieux aquatiques constitue un sujet émergent (Richardson et Ternes, 2005). Des études récentes ont montré par exemple que ces antibiotiques étaient capables de modifier les procédés biologiques comme la dénitrification dans les sédiments (Costanzo *et al*., 2005) ou de s'accumuler dans les organismes aquatiques (Le Bris et Pouliquen, 2004). Une étude européenne a également posé la question de la relation entre l'utilisation des antibiotiques et l'augmentation des résistances bactériennes à ces antibiotiques (Goossens et al., 2005).

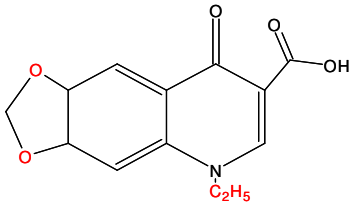
C'est dans ce contexte que nous avons poursuivi la mise au point du dosage de quelques molécules antibiotiques afin de pouvoir étudier leur comportement dans les eaux de surface en différents points du bassin de la Seine.

2. Validation de la méthode analytique par l'étude d'une molécule pilote, l'acide oxolinique.

2.1. Propriétés physico-chimiques de l'acide oxolinique

Nous avons poursuivi la validation de la méthode de dosage des antibiotiques présentée dans le précédent rapport (Eurin *et al*, 2005) en analysant une molécule pilote de la famille des quinolones, l'acide oxolinique dont les principales propriétés sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : propriétés physico-chimiques de l'acide oxolinique.

Quinolone	Formule	Solubilité	pKa	Log Kow	Koc (L/ Kg)
Acide oxolinique	 PM = 261,23	0,004 g/L	6,9	0,68	4510

Tolls *et al*., 2001

C'est donc une molécule assez soluble mais aussi avec une forte capacité d'adsorption. Ces propriétés sont importantes car elles déterminent le comportement de cette molécule dans le milieu aquatique et en station d'épuration.

2.2. Protocole analytique du dosage de l'acide oxolinique

Nous mesurons les concentrations d'acide oxolinique dans des échantillons d'eaux de surface par un protocole que nous avons mis au point au laboratoire, résumé dans la Figure 1. Ce protocole a été développé dans le précédent rapport (Eurin *et al.,* 2005) et a été complété et validé cette année.

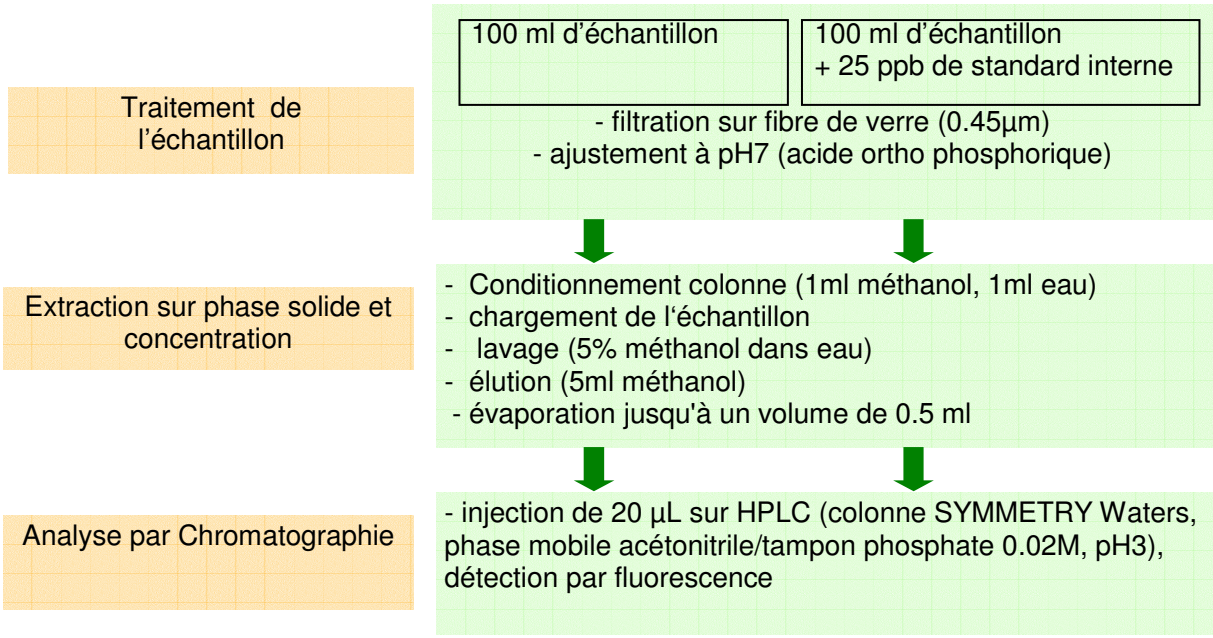


Figure 1: Méthodologie du dosage de l'acide oxolinique

2.3. Linéarité.

Nous avons mesuré les concentrations de l'acide oxolinique dans différents volumes allant de 50 à 250 ml dans une eau prélevée en Seine à Jussieu. Les résultats obtenus montrent une bonne linéarité des concentrations en acide oxolinique mesurées par notre technique (Figure 2).

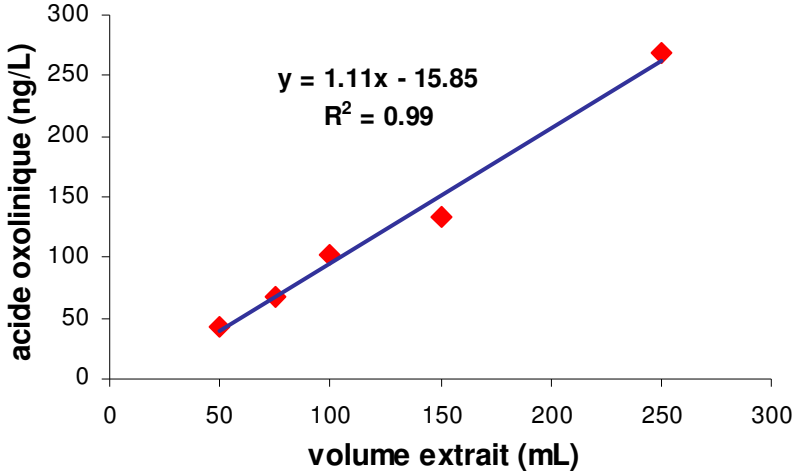


Figure 2: Concentrations d'acide oxolinique mesurées dans différents volumes d'un même échantillon

Cette expérience nous permet de définir un volume d'étude de 100 mL, qui sera utilisé par la suite dans toutes nos analyses, considérant que celui-ci est suffisant pour obtenir des résultats fiables et représentatifs des concentrations présentes dans le milieu.

2.4. Reproductibilité intra et inter essai

Afin d'évaluer la reproductibilité intra et inter essai de notre technique, nous avons analysé d'une part un même échantillon d'eau de Seine (Jussieu) prélevée le 03 novembre 2005, extrait simultanément huit fois. D'autre part, nous avons congelé des échantillons de cette même eau et nous les avons analysés au cours de cinq extractions réalisées à différentes dates. Les résultats obtenus montrent un coefficient de variation respectivement de 4,1 % et 6,6 % (Tableau 2).

Tableau 2: Concentrations d'acide oxolinique mesurées dans des échantillons d'un même prélèvements et extraits le même jour ou à des dates différentes

Intra essai

échantillon	ac. oxolinique (ng/L)
1	26.8
2	25.5
3	26.5
4	23.8
5	25.3
6	24.2
7	24.9
8	24.8
moyenne	25.2
ecart-type	1.0
CV (%)	4.1

Inter essai

date d'extraction	ac. oxolinique (ng/L)
4-nov-05	25.2
25-nov-05	23.5
5-déc-05	21.8
16-déc-05	21.5
12-janv-06	23.9
moyenne	23.2
ecart type	1.5
CV (%)	6.6

3. Résultats

La présence d'acide oxolinique dans les eaux de surface du bassin de la Seine a été étudiée dans différents sites et à différentes périodes de l'année ainsi que lors d'un épisode de crue.

3.1. Contamination spatiale.

Nous avons mesuré les concentrations d'acide oxolinique au cours de 2 campagnes de prélèvements en janvier et mai 2005 à différents stations situées depuis l'aval de la confluence de la Seine et de l'Yonne jusqu'à Poses. Les résultats sont représentés (Figure 3). Les points rouges représentent la campagne de janvier et les points verts la campagne de mai. La taille des points est proportionnelle à la concentration de l'acide oxolinique retrouvée.

L'acide oxolinique est mesuré à des concentrations relativement élevées en aval de la confluence de la Seine et de l'Yonne (20 à 50 ng/L). En Seine, cette molécule est présente en très faible quantité à la Tombe (1ng/L) en amont de cette confluence. L'essentiel de l'acide oxolinique mesuré dans la Seine en aval semble provenir de l'Yonne et serait peut être à mettre en relation avec la présence de nombreuses piscicultures sur ce cours d'eau et ses affluents. En effet, l'utilisation de cet antibiotique est répandue dans l'aquaculture, en prévention ou en traitement d'infections bactériennes (Delépée *et al*., 2004).

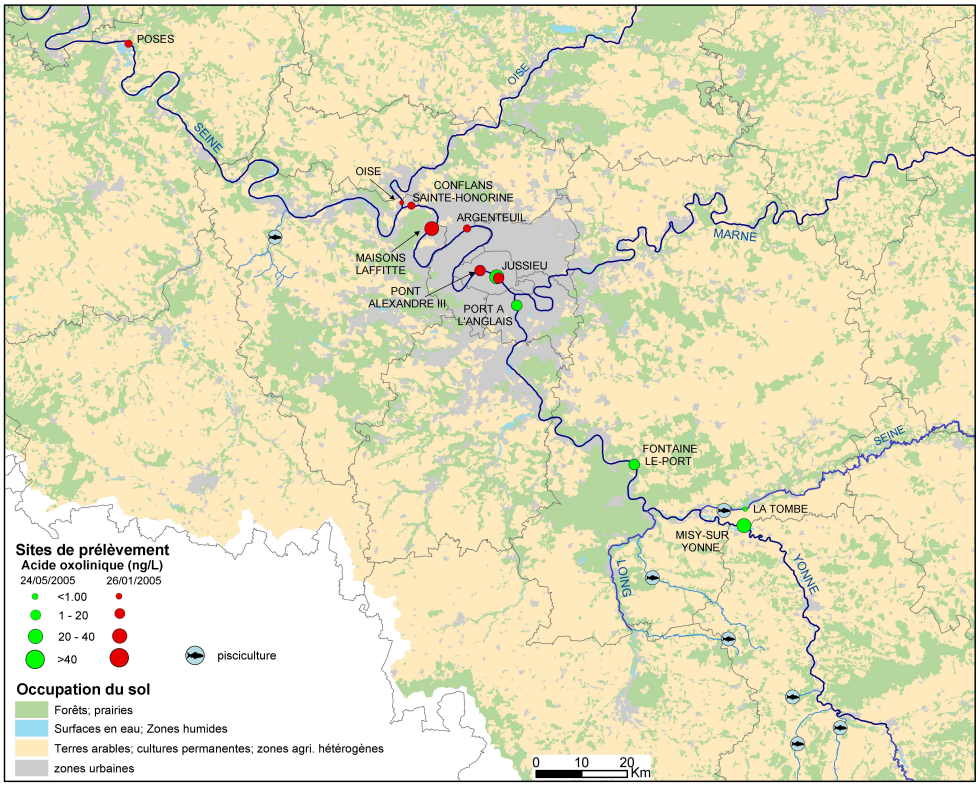


Figure 3: Concentrations d'acide oxolinique aux différents sites de prélèvements du bassin de la Seine au cours de deux campagnes de prélèvements.

Afin de vérifier si cet apport d'acide oxolinique provenait des piscicultures présentes sur l'Yonne en amont de la confluence avec la Seine, nous avons réalisé une série de mesures à l'amont et à l'aval de trois piscicultures situées sur des affluents de l'Yonne (Figure 4).

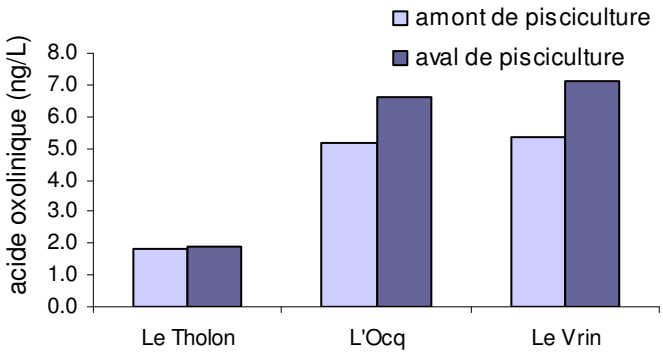


Figure 4 : Prélèvements d'échantillons sur des cours d'eau en amont et en aval de piscicultures

Les concentrations d'acides oxolinique mesurées en aval des piscicultures sont faibles et peu différentes de celles de l'amont. Ces résultats ne permettent pas de conclure que les piscicultures soient à l'origine d'un apport important d'acide oxolinique. Cependant, cette étude d'impact des piscicultures a eu lieu en octobre (hors période de traitement), alors que les concentrations élevées d'acide oxolinique ont été mesurées en mai (Figure 3) période où les élevages piscicoles sont le plus souvent traités. Il faut aussi envisager d'autres sources potentielles de rejets d'acide oxolinique sur

l'Yonne : effluents d'élevage, ruissellement après épandage de lisier contenant cet antibiotique ou rejet au niveau des STEP.

En plus de ces deux campagnes, nous avons étudié l'évolution des concentrations de l'acide oxolinique à Paris de décembre 2004 à janvier 2006 (Figure 5) et à Poses de décembre 2004 à mai 2005 (Figure 6).

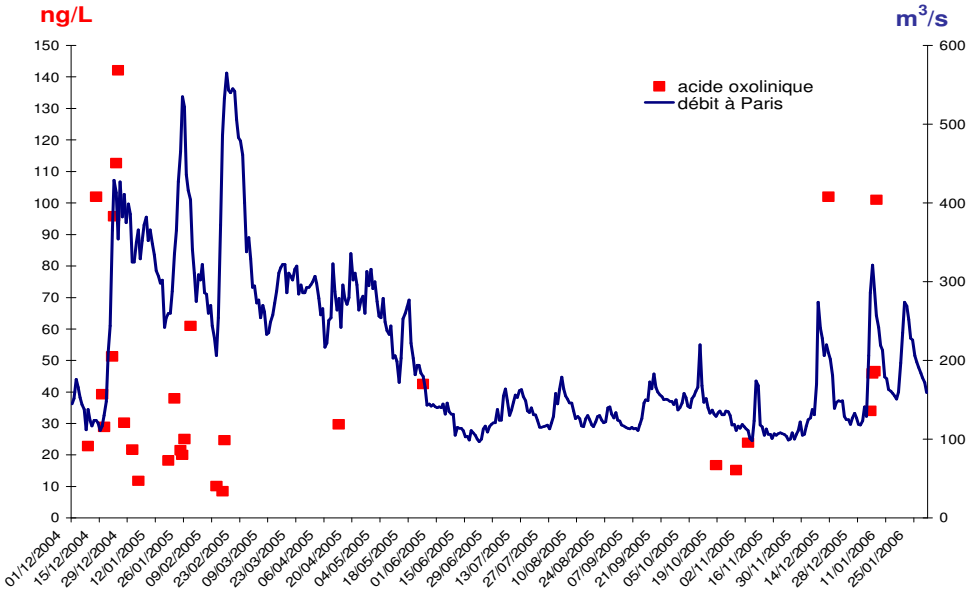


Figure 5:Concentrations d'acide oxolinique à différentes périodes hydrologiques, prélèvements effectués sur le site de Jussieu à Paris

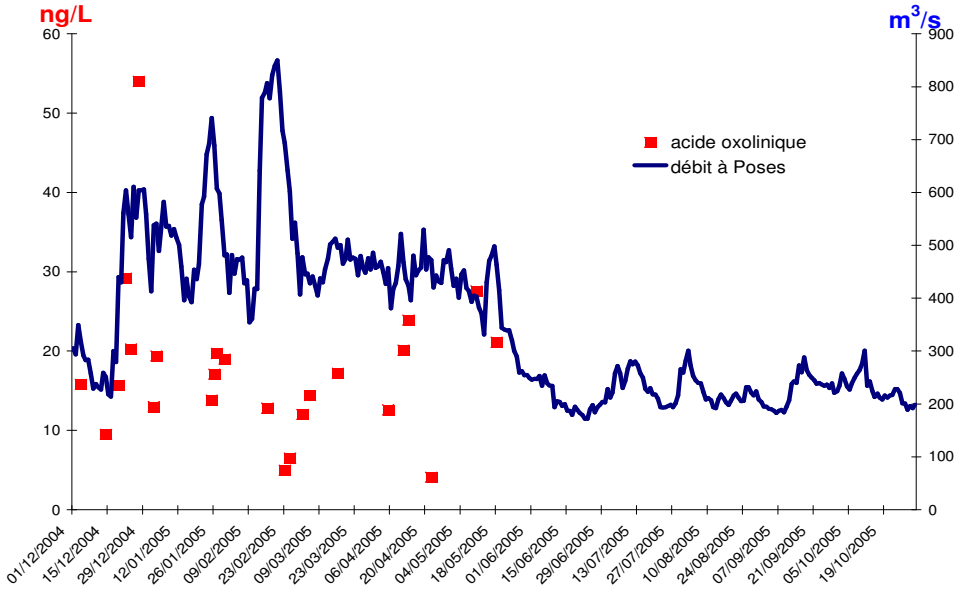


Figure 6 : Concentrations d'aide oxolinique à différentes périodes hydrologiques, prélèvements effectués à Poses

En décembre 2004, l'acide oxolinique présente une augmentation concomitante de concentration à l'augmentation du débit aux deux sites de Paris et à Poses. Cette augmentation des concentrations d'acide oxolinique est plus importante à Paris (jusqu'à 140 ng/L). Nous avons détaillé cet événement dans le paragraphe suivant (Figure 7). Par contre à Poses, les concentrations d'acide oxolinique ont augmenté mais n'ont pas dépassé 54 ng/L.

La même observation peut être faite lors des petites crues observées à Paris en janvier et décembre 2005 et janvier 2006. Les concentrations d'acide oxolinique varient de 20 ng/L à 100 ng/L.

3.2. Variations temporelles lors d'un épisode de crue.

Lors de l'épisode de crue de décembre 2004, une augmentation des concentrations d'acide oxolinique a été observée (Figure 7).

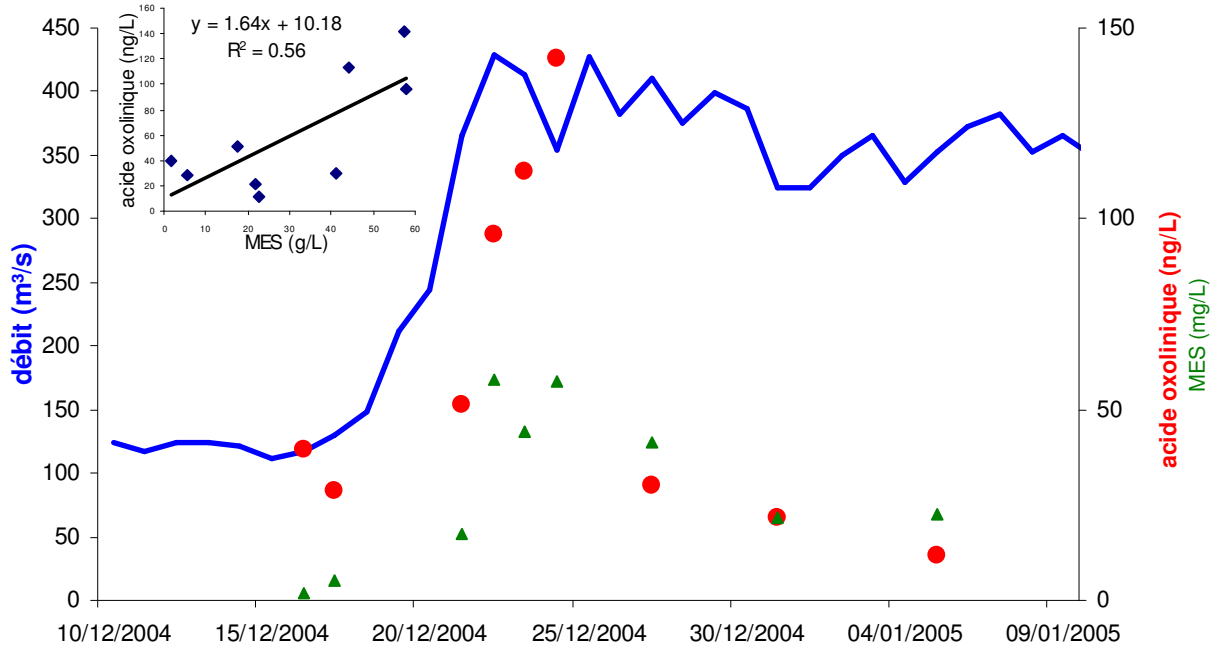


Figure 7 : Concentrations d'acide oxolinique en solution lors d'un épisode de crue de la Seine, prélèvements effectués sur le site de Jussieu

Cette augmentation des concentrations en phase soluble s'est produite parallèlement à une élévation du débit de la Seine et a été suivie par une diminution rapide, bien que le débit de la Seine soit resté élevé. Un comportement similaire est observé pour les matières en suspension (MES). Cette augmentation de l'acide oxolinique pourrait provenir de débordements des réseaux d'assainissements unitaires (Thiele-Bruhn, 2003). Nos analyses étant effectuées sur eau filtrée, on peut également émettre l'hypothèse d'un processus de désorption à partir des sédiments remis en suspension par la crue. Ces hypothèses nécessitent un complément d'étude.

3.3. Estimation des flux d'acide oxolinique à Paris et à Poses pendant et hors période de crue.

Pendant l'année 2005, à Paris, le flux annuel d'acide oxolinique a été estimé à environ 200 kg, dont 70 % de cette quantité seraient transférés lors de débits supérieurs à 200 m^3/s (Tableau 3).

Tableau 3: Estimation des flux d'acide oxolinique en 2005 en Seine à Paris pendant et hors période de crue

	Concentration moyenne d'acide oxolinique	Flux annuel	Flux Q>200m³/s	Contribution des Q>200m³/s
Paris site Jussieu	**20ng/L**	**202 kg**	**143 kg**	**70%**

A Poses, nous n'avons pas suffisamment de données en 2005 pour calculer le flux annuel d'acide oxolinique. Nous avons cependant fait une comparaison des flux journaliers à Paris et à Poses en période d'étiage et de petite crue en décembre 2004. Les résultats sont représentés Figure 8.

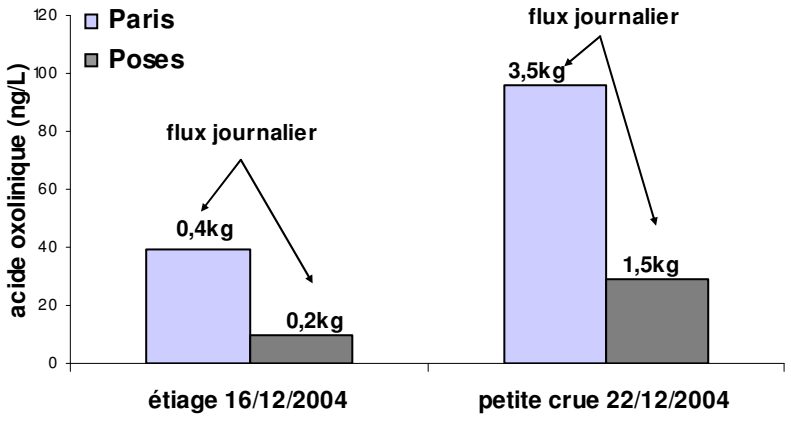


Figure 8 : Concentrations et flux journaliers estimés d'acide oxolinique à Paris et à Poses.

Cette diminution du flux d'acide oxolinique entre Paris et à Poses pourrait s'expliquer soit par un processus de dégradation soit par une adsorption de l'acide oxolinique sur les sédiments. La capacité d'adsorption de l'acide oxolinique aux sédiments sera étudiée dans la suite de ce travail.

Afin de mettre en évidence une photodégradation de l'acide oxolinique, nous avons réalisé une expérience à partir d'un échantillon d'eau naturelle (eau de Seine à Jussieu). Pour cela nous avons prélevé 300 ml que nous avons répartis en 3x100 ml : un échantillon témoin dosé immédiatement, un échantillon gardé à l'obscurité et un autre laissé à la lumière. Ces deux derniers échantillons ont été conservés à la température du laboratoire (18°C) pendant un mois. Les résultats représentés Figure 9 ne montrent pas de diminution significative de la concentration d'acide oxolinique dans l'échantillon laissé à la lumière pendant le temps de l'expérience.

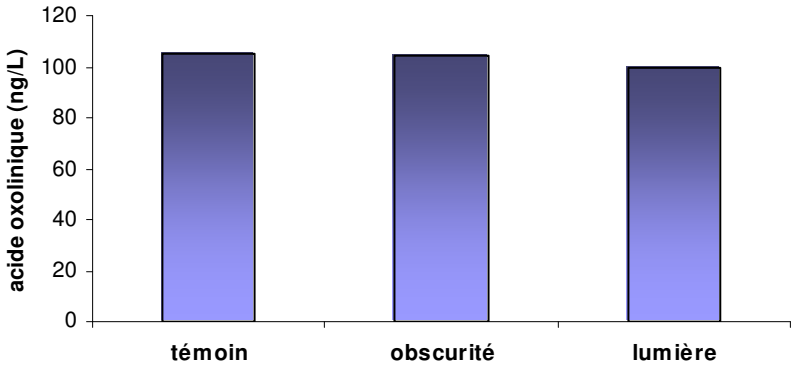


Figure 9: Dégradation de l'acide oxolinique après une exposition d'un mois à la lumière.

Cependant, à titre de précaution, une conservation à l'obscurité et à basse température des prélèvements a été observée afin de ne pas sous estimer les concentrations environnementales en résidus d'antibiotiques.

4. Conclusion et perspectives

Ce travail constitue une première étape dans l'étude d'une molécule d'antibiotique dans les eaux superficielles. L'acide oxolinique est présent dans les eaux de surface du bassin de la Seine à des concentrations variant de 1 à 140 ng/L selon le lieu et la période de prélèvement.

Les recherches doivent se poursuivre pour améliorer nos connaissances sur la qualité des milieux aquatiques dans le bassin de la Seine. Pour cela, nos études s'orienterons vers :

- Prélèvements des rejets d'un hôpital parisien en différents points de son réseau d'égouts et à différentes périodes de l'année.

- comportement et devenir des antibiotiques suivant les filières d'épuration (traitements primaire, secondaire et tertiaire et UV), dégradation, rejets en rivière.

- niveau de contamination des eaux de surface par les antibiotiques suivant les paramètres hydriques et les facteurs saisonniers sur les sites présentés dans ce rapport.

Toutes ces études seront étendues à la famille des fluoroquinolones, et si possible élargies à d'autres molécules d'antibiotiques appartenant à d'autres familles telles que le sulfaméthoxazole (sulfamide) qui possèdent des propriétés physicochimiques différentes et qui présenteront un comportement particulier dans l'environnement aquatique.

5. Bibliographie

Costanzo S., Murby J. et Bates J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, **51**: 218-223.

Delépée R., Pouliquen H., Le Bris H.(2004). The bryophyte *Fontinalis antipyretica* Hedw. bioaccumulates oxytetracycline, fluméquine and oxolinic acid in the freshwater environment. *Science of the Total Environment*, **322**: 243-253.

Eurin J., Ollivon D., Garban B., Tiphagne-Larcher K., Chevreuil M. (2005) Contamination des eaux superficielles par les produits pharmaceutiques : diffusion d'antibiotiques par la medicine humaine et les activités d'élevage. Rapport d'activité 2004 programme scientifique *PIREN Seine*.

Goossens H., Ferech M., Vander Stichele R. et Elseviers M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, **365**: 579-587.

Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lutzhoft H.C., Jorgensen S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. *Chemosphere*, **36**: 357-393.

Hirsch R., Ternes Th.A., Haberer K., Kratz K.L., (1999). Occurence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, **225**: 109-118.

Kolpin D.W., Skopec M., Meyer M.T., Furlong E.T., Zaugg S.D. (2004). Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to stream during differing flow conditions. *Science of the Total Environment*, **328**: 119-130.

Kümmerer K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**: 5-7.

Le Bris H., Pouliquen H. (2004). Experimental study on the bioaccumulationof oxytetracycline and oxolinic acid by the mussel (*Mytilus edulis*). An evaluation of its ability to bio-monitor antibiotics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, **48**: 434-440.

Migliore L., Cozzolino S., Fiori M. (2003). Phytotoxicity to and uptake of flumequine used in intensive aquaculture on the aquatic weed, *Lythrum salicaria* L. *Chemosphere*, **40**: 741-750.

Richardson S. et Ternes T. (2005). Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, **77** (12): 3807-3838.

Schmidt A., Bruun M., Dalsgaard I., Pedersen K., Larsen J. (2000). Occurence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 4908-4915.

Thiele-Bruhn S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils- a review. *The Journal of Plant Nutrition and Soil,* **166**: 145-167.

Thorsten C., Schneider R.J., Färber H.A., Skutlarek D., Goldbach H.E. (2003). Determination of antibiotic residues in manure, soil and surface waters. *Acta Hydrochimica and Hydrobiologica*, **31**: 36-44.

Tolls J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils : A review. *Environmental Science and Technology*, **35**: 3397-3406.