

Projet ANR-07-SEST-006-01 - DIPERPHA

Dynamique et Impact des Perturbateurs endocriniens et des composés Pharmaceutiques issus des élevages agricoles

Guillermina Hernandez-Raquet^{1,2} (hernandg@insa-toulouse.fr), Patrick Dabert³ (dabert@cemagref.fr), Patrick Balaguer⁴ (balaguer@montpellier.unicancer.fr), Hélène Budzinski⁵ (h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr), Christian Mougin⁶ (mougin@versailles.inra.fr) et Nicolas Bernet¹ (bernet@supagro.inra.fr).

Avec également les contributions de : Virginie Bellet, Marion Justine Capdeville, Sarah Combalbert, Nathalie Cheviron, Mickael Hedde, Angélique Igel Egalon, Christelle Marraud, et Cédric Repinçay.

¹INRA- UR050 Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, 1100, Narbonne. ²Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés, UMR5504, UMR792, CNRS, INRA, INSA. 31077, Toulouse. ³Cemagref, Unité de recherche GERE - Gestion environnementale et traitement biologique des déchets, 35044 Rennes. ⁴INSERM - U896 UM1-Signalisation Hormonale, Environnement et Cancer ; CRLC - Parc Euromédecine, 34298, Montpellier. ⁵UMR 5805 CNRS- Université de Bordeaux 1-Laboratoire de Physico et Toxicochimie de l'environnement (LPTC). EPOC, 33405, Talence. ⁶INRA-UR251 PESSAC - Physicochimie et Ecotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés, 78026, Versailles.

RESUME

Les rejets issus de l'élevage sont une source avérée de composés perturbateurs endocriniens tels que les hormones et d'antibiotiques pour l'environnement. Les hormones sont naturellement produites par les animaux et excrétées dans les urines et les fèces. Egalement, dans les exploitations agricoles, différents composés antibiotiques sont régulièrement utilisés afin d'améliorer l'état sanitaire des animaux. Ces composés, hormones et antibiotiques, se retrouvent dans les déjections animales qui sont traditionnellement utilisées en agriculture comme fertilisant. A travers l'épandage des déchets agricoles, les hormones et les antibiotiques sont dispersés dans les sols et peuvent donc contaminer notre environnement aquatique et édaphique. Ce projet s'est focalisé sur l'étude du devenir des hormones et des activités endocrines associées, ainsi que des antibiotiques et des bactéries résistantes aux antibiotiques dans des systèmes de gestion des lisiers porcins, à échelle réelle ou contrôlée, en conditions anaérobies ou aérobies. Dans ce projet, nous nous sommes également intéressés au devenir des antibiotiques dans les sols et à leur impact sur la microflore du sol.

INTRODUCTION

Les rejets issus de l'élevage sont une source avérée de composés perturbateurs endocriniens et d'antibiotiques pour l'environnement. Les animaux d'élevage produisent des quantités non négligeables d'hormones, particulièrement œstradiol E2, œstriol E3 et œstrone E1 (Lange et al, 2003). Ces molécules présentent un très haut pouvoir œstrogénique et des concentrations de l'ordre du ng/L sont suffisantes pour induire des troubles de la reproduction chez diverses espèces de poissons et d'autres organismes aquatiques (Desbrow et al., 1998 ; Jobling et al., 1998). En parallèle, dans les exploitations agricoles, des composés pharmaceutiques tels que les antibiotiques, sont régulièrement utilisés afin d'améliorer l'état sanitaire des animaux, notamment en post sevrage (Zuccato et al, 2001). Ces composés et/ou leurs métabolites se retrouvent dans les déjections animales qui sont traditionnellement utilisées dans l'agriculture comme moyen d'enrichir les sols en nutriments (C, N, P). A travers l'épandage des déchets agricoles, les hormones et les composés pharmaceutiques sont ainsi dispersés dans les sols et peuvent donc contaminer à la fois notre environnement aquatique et édaphique. Par exemple, les hormones présentes dans les eaux de surface, dans des zones proches des rejets de stations d'épuration des eaux, sont responsables de la féminisation de certaines espèces de poissons. De même, la persistance des antibiotiques dans les eaux sélectionne des micro-organismes résistants aux antibiotiques.

L'intensification des pratiques d'élevage au cours du XX^{ème} siècle a permis d'augmenter très fortement les rendements et par voie de conséquence la production agricole, et de diminuer corrélativement les coûts de production. Mais la forte concentration du bétail produit localement des quantités conséquentes de déchets chargés en nutriments organiques. Afin de recycler ces nutriments, ces déchets sont généralement destinés à l'épandage sur des sols agricoles. Cependant, les déchets d'élevage contiennent également des hormones stéroïdes, des antibiotiques et d'autres composés pharmaceutiques à forte rémanence. Ainsi, ils constituent non seulement une source potentielle d'un excès de minéraux pour les eaux de surface et souterraines à travers la lixiviation et les ruissellements mais, ils sont en plus une source de composés à action endocrine ou antibiotique. Dans les zones d'excédents structurels, cantons où les effluents apportent une quantité d'azote supérieure aux plafonds de la directive Nitrates (170 kg d'azote/hectare et par an épandus), des systèmes de traitement des effluents peuvent être envisagés. Cependant, ces systèmes n'ont pas été testés pour leur capacité à éliminer les polluants tels que les hormones et les antibiotiques présents dans les déjections animales. Ainsi, cette étude vise à : (a) déterminer le devenir des hormones, et des antibiotiques dans les systèmes de gestion du lisier utilisés en

France (b) dans ces mêmes systèmes, établir quel est le devenir des activités endocrines et d'antibiorésistance ; (c) comprendre, dans des systèmes contrôlés, quels sont les conditions qui favorisent l'élimination des hormones et des antibiotiques présents dans le lisier et, (d) établir quel est le devenir et l'impact des antibiotiques dans les sols.

METHODOLOGIE

Afin de dresser le bilan des mécanismes qui régissent le devenir des hormones et des antibiotiques au cours du stockage et du traitement du lisier, nous avons évalué les concentrations en hormones et en antibiotiques dans le lisier issu des élevages porcins. Le suivi a été effectué à échelle réelle sur des stations de traitement des effluents porcins situées en Bretagne et sur les fractions solide et liquide du lisier (Figure 1).

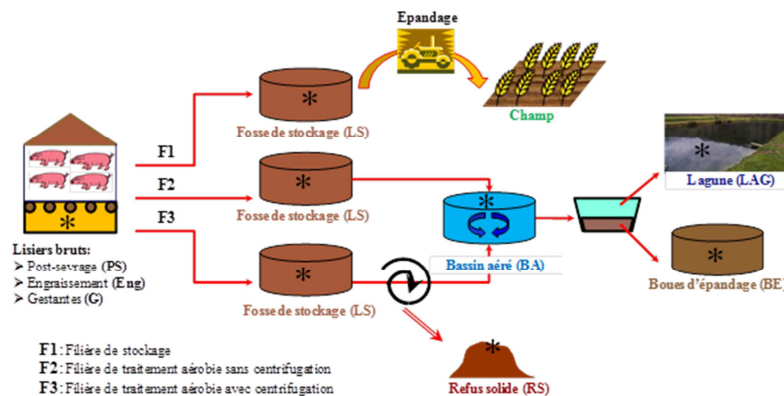


Figure 1. Schéma des filières de gestion des effluents porcins étudiées.

Pour cela, il a été nécessaire tout d'abord de développer la méthodologie analytique nécessaire à l'extraction et à la quantification des antibiotiques présents dans le lisier. Il a également été nécessaire de valider la méthodologie de conservation des échantillons pour préserver les hormones et les antibiotiques dans une matrice complexe telle que le lisier porcine. Une fois ces méthodes établies, des campagnes de prélèvement ont été effectuées au cours du stockage et du traitement du lisier dans différents élevages porcins (Figure 1). Pour les systèmes de stockage, les trois fermes ont été étudiées. Pour les systèmes de traitement, les fermes étudiées disposent d'un bassin de stockage temporaire et d'homogénéisation du lisier brut, suivi d'un réacteur d'aération permettant d'éliminer l'azote, puis d'un ouvrage de décantation du lisier aéré qui permet un stockage séparé des boues (fosse à boues) et de la phase liquide issues du traitement (lagune). Une des fermes étudiées possède en plus un système de séparation physique du lisier brut qui permet d'éliminer une partie des matières en suspension (notamment le phosphore particulaire) en amont du réacteur. Dans ces filières de stockage et de traitement du lisier, les activités endocrines œstrogéniques (ER), dioxin-like (AhR), les activités sur le récepteur nucléaire X des prégnanes (PXR) et sur le récepteur gamma de prolifération de peroxysomes (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma, PPAR γ) ont également été évaluées par des méthodes *in vitro* au travers de l'utilisation de modèles cellulaires bioluminescents (Balaguer et al., 1999; Pillon et al., 2005). L'antibiorésistance a également été suivie dans les systèmes de stockage et de traitement du lisier. Pour cela, il a été nécessaire de mettre en place et valider la méthodologie d'analyse. Dans une deuxième partie de l'étude, les mécanismes responsables de l'élimination des hormones et des antibiotiques ont été précisés à l'échelle de laboratoire. Pour cela, la dégradation des hormones stéroïdes et des antibiotiques sous conditions aérobies, anaérobies et nitrifiantes-dénitrifiantes a été évaluée en réacteurs contenant une matrice de lisier non dopée. Dans ces systèmes, les activités endocrines ont été évaluées ainsi que les concentrations en hormones et antibiotiques. Finalement, dans cette étude nous sommes intéressés à l'impact des antibiotiques sur la microflore du sol (champignons et bactéries) ainsi qu'au devenir des antibiotiques dans les sols. Pour cela, des études en microcosmes recevant différentes doses de lisier ont été effectuées ainsi que le traçage d'une molécule radiomarquée (ciprofloxacine).

RESULTATS ET DISCUSSION

SUIVI DES FILIERES

Filière simple

Les hormones sont majoritairement présentes dans les solides des lisiers bruts (entre 25 et 4 577 ng.g⁻¹ de matière sèche MS) au contraire des données de la littérature sur les boues de station d'épuration urbaine où on les retrouve autour du ng.g⁻¹_{MS} dans les fractions solides (Muller et al., 2008). Dans les lisiers bruts issus de différents stades de développement des porcs, le lisier des gestantes présente les plus fortes concentrations en hormones bien qu'il ne soit pas forcément plus chargé en solides (de 5 g.L⁻¹ à 48 g.L⁻¹). Ces concentrations sont plus élevées dans la

fraction solide, et strictement supérieures à 1 000 ng.g⁻¹. Cette sorption laisse penser à des différences qualitatives de la matrice plutôt que quantitatives. E1, αE2, βE2 et E3 sont les composés majoritaires. La progestérone et la testostérone normalement attendues à des taux comparables aux œstrogènes sont en concentrations bien inférieures (Lange et al., 2002). Les faibles teneurs en testostérone dans le lisier des mâles (engraissement) sont explicables par les pratiques de castration des porcelets à l'âge de 5 semaines. Quant à la progestérone, elle est excrétée majoritairement sous la forme de prégnanediols et prégnanolones, des métabolites non quantifiés dans cette étude. Les concentrations en hormones stéroïdes et en activités endocriniennes ont été suivies au cours du stockage du lisier en fosse extérieure pour les trois fermes porcines étudiées. La diminution des concentrations en hormones au cours du stockage est observable dans les sites 2 et 3. Cependant, les hormones sont majoritairement contenues dans le solide et il y a ici, par comparaison aux lisiers bruts, une très forte corrélation entre la concentration en hormones et la concentration en solides, ce qui laisse penser à des mécanismes de dilution plutôt que de dégradation. La normalisation des concentrations en hormones totales mesurées par les teneurs en solides des échantillons montre une très faible évolution de la concentration en hormones par gramme de poids sec. Le profil de répartition des différentes hormones dans le lisier ne montre pas d'évolution particulière symptomatique d'une dégradation (prédominance de l'E1- métabolite secondaire de l'E2- au cours du temps). Hormis quelques variations, la répartition reste constante au cours du temps avec E1, αE2, βE2 et E3 majoritaires.

La mesure des activités endocriniennes a permis de conclure à l'absence d'activité sur le récepteur aux androgènes AR, PXR et PPARγ. Par contre, une forte activité œstrogénique sur ERα a été mesurée dans la fraction solide du lisier. Par ailleurs, cette activité sur ER ne s'explique pas par la seule concentration en hormones. De même, une forte activité sur le récepteur à la dioxine AhR jusqu'à 60 μg eq_{TCDD}.L⁻¹ a été mesurée. Cette forte activité essentiellement présente dans les solides, permet de soupçonner la présence d'autres composés à activité endocrinienne dans la fraction solide.

Concernant la présence et le devenir des antibiotiques dans le lisier, les résultats qualitatifs montrent que 17 composés ont été détectés au moins une fois. Il s'agit de la spiramycine, de la tylosine, de la lincomycine, de la marbofloxacin, de l'acide oxolinique, de la fluméquine, de la tétracycline, de l'oxytétracycline, de la doxycycline, de la sulfadiazine, de la sulfadiméthoxine, de la sulfanilamide, de la sulfaméthazine, de la sulfamérazine, du triméthoprime, du monensine et de la chlortétracycline mais avec un doute sur l'identification de ce dernier composé. Parmi ces 17 composés, 7 ont été détectés dans plus de 50 % des échantillons. Il s'agit de la lincomycine, de la sulfadiazine, de l'oxytétracycline, de la tétracycline, de la tylosine, de la marbofloxacin et de la monensine. Lors de l'analyse quantitative des lisiers provenant de la fosse de stockage (LS), sur ces 7 composés dosés, tous sont détectés et quantifiés dans chacun des échantillons où ils ont été recherchés. L'oxytétracycline, la lincomycine, la sulfadiazine, la tétracycline, la marbofloxacin, la tylosine et le monensine sont donc présents dans 100% des cas. Selon les élevages, le lisier stocké est soit autant, soit plus, soit moins contaminé que le lisier brut. Par conséquent, la contamination du lisier stocké ne représente ni la moyenne ni la somme de la contamination des lisiers bruts, à moins que des phénomènes de dégradation particulièrement efficaces (élevage 3) et différents d'un élevage à l'autre n'interviennent. Le suivi sur 5 mois du niveau de contamination du lisier stocké ne montre aucune tendance sur l'évolution de la contamination totale (phase liquide et phase solide) du lisier stocké. Il semblerait que dans l'élevage 1 la contamination augmente au cours du remplissage de la fosse, que dans l'élevage 2 elle diminue tandis que dans l'élevage 3 elle reste plus ou moins constante. Ainsi les variations des concentrations totales en antibiotiques sont aléatoires. Si ces résultats sont mis en parallèle avec ceux concernant le niveau de contamination du lisier stocké par rapport à celui des lisiers bruts, il n'est pas possible de conclure sur l'intérêt de stocker le lisier avant épandage afin d'en réduire la pollution par les antibiotiques.

Filières complexes

Le devenir des hormones et des activités œstrogéniques (Er) et dioxin-like (AhR) a été suivi dans deux filières de traitement aérobique qui comprennent une fosse de stockage, un bassin aéré et une lagune (Figure 1). La principale différence entre les deux systèmes étudiés réside dans la présence ou non d'une étape de centrifugation du lisier brut en amont du traitement biologique aérobique. Les deux filières montrent donc un abattement des hormones supérieur à 95 % entre les concentrations relevées dans le lisier stocké et celles mesurées dans la lagune. Par contre, le site avec l'étape de centrifugation en amont du bassin aéré présente une forte accumulation des hormones dans le résidu solide de centrifugation contenant jusqu'à 1 189 μg.kg_{MS}⁻¹. La fraction décantable du bassin aéré constitue les boues d'épandage et contient également des teneurs non négligeables en hormones explicables par la propension que possèdent ces composés à s'adsorber sur la matrice solide organique. Les hormones étant majoritairement présentes dans le solide, les teneurs retrouvées dans les deux compartiments des boues épandues sont donc équivalentes. L'analyse des activités œstrogéniques et « dioxin-like » a montré la même tendance à la diminution au cours du traitement. On observe également une très forte accumulation de ces activités dans les fractions solides. Ainsi, l'abattement est moindre dans le

système dépourvu de centrifugation en amont du traitement aérobie par rapport au système opérant avec une centrifugation.

Concernant les antibiotiques, quelle que soit la saison, dans la ferme sans centrifugation avant traitement biologique, la contamination de la phase dissoute est liée à la présence d'oxytétracycline, de tétracycline, de sulfadiazine, de lincomycine et de marbofloxacin. La monensine est également décelée dans le lisier stocké prélevé en automne. Dans la phase solide, les principales molécules responsables de la contamination sont la tétracycline, l'oxytétracycline et la marbofloxacin. La contamination de la phase dissoute diminue fortement entre le lisier stocké et le bassin d'aération mais elle ré-augmente entre le bassin d'aération et le bassin de décantation. Le niveau de contamination de la lagune est plus faible que celui du lisier stocké mais il n'y a pas de diminution progressive le long de la filière. Dans la phase solide, les variations sont faibles et la lagune est même davantage contaminée que le lisier stocké.

Pour l'élevage avec centrifugation quelle que soit la saison, la phase dissoute est principalement contaminée par de la sulfadiazine et de l'oxytétracycline alors que la phase solide est principalement contaminée par l'oxytétracycline, la marbofloxacin, la tylosine et la sulfadiazine. La contamination de la phase dissoute diminue le long de la filière de traitement avec une chute importante de la concentration en antibiotiques entre la fosse de stockage et le bassin d'aération. A l'inverse, la contamination de la phase solide varie peu. Une diminution générale est observée entre le lisier stocké et la lagune mais la contamination du refus de séparation est supérieure à celle du lisier stocké. La contamination semble être reportée du lisier stocké vers le refus de séparation. L'évolution de la contamination de la phase dissoute est donc probablement liée à la séparation des phases solides et liquides plutôt qu'à des phénomènes de dégradation. Les niveaux de contamination équivalents du bassin d'aération, du bassin de décantation et de la lagune peuvent être expliqués par ces phénomènes de dégradation peu importants.

ANTIBIORESISTANCE

Les données obtenues dans cette étude suggèrent la présence de bactéries potentiellement résistantes à la tétracycline dans la plupart des lisiers des trois élevages. Deux élevages sur trois ne présentent pas ce type de bactéries dans leur lisier d'engraissement, suggérant une utilisation raisonnée des antibiotiques. Ces données sont en accord avec la présence de tétracycline, oxytétracycline et chlortétracycline dans les extraits de lisier. Cependant, les proportions de bactéries potentiellement résistantes dénombrées ne se corrélaient pas directement avec les concentrations en antibiotique mesurées sur les sites. Des bactéries potentiellement résistantes à l'acide nalidixique ou à la ciprofloxacine ne sont observées que dans le lisier stocké de l'élevage du site 2. Leur absence dans les lisiers des bâtiments d'élevage pose question. Le niveau de tolérance observé étant proche du niveau des témoins, il est possible que la résistance potentielle supposée soit un artefact. Une autre hypothèse serait la présence dans la fosse de stockage, de lisier d'animaux ayant été traités avec ces molécules lors des bandes précédentes. Les données obtenues montrent que les lisiers bruts des trois élevages ont des concentrations en entérobactéries similaires, comprises entre $1,9 \times 10^4$ et $3,8 \times 10^4$ ufc / g de matière brut. Cette concentration diminue d'une unité logarithmique dans les bassins de boues activées et les boues épandues. Les concentrations en entérobactéries des eaux de lagune sont inférieures à 100 ufc / mL. Ces valeurs sont la conséquence conjuguée d'une dilution du lisier et d'un abattement des microorganismes fécaux tout au long de la filière de traitement. La présence d'une étape de centrifugation en tête dans deux élevages n'influence pas les données microbiologiques. Ce résultat est logique car les vitesses de centrifugation mises en œuvre ne sont pas suffisantes pour entraîner les microorganismes en suspension dans la phase liquide du lisier. Ces données sont en accord avec les études antérieures sur l'impact sanitaire des procédés de traitement biologique des lisiers (Dabert et al., 2009). La proportion de bactéries se développant en présence d'antibiotiques diffère d'un élevage à un autre. Les proportions de bactéries dénombrées en présence d'antibiotique sont du même ordre pour chaque étape du traitement biologique du lisier dans un même élevage. Ces données suggèrent une absence d'influence du traitement sur l'acquisition ou la perte de résistance. Les proportions en bactéries potentiellement résistantes des différents effluents de la seconde campagne de prélèvements sont comparables à celles de la première, et, plus important, le niveau de résistance rencontré par élevage reste similaire. Il est donc possible que ces différences soient dues aux quantités d'antibiotiques administrées aux porcs

OPTIMISATION DE LA DEGRADATION DES HORMONES, DES ACTIVITES ENDOCRINES ET DES ANTIBIOTIQUES SOUS CONDITIONS CONTROLEES

Les hormones stéroïdes sont totalement récalcitrantes à la dégradation en anaérobiose, que ce soit en conditions mésophiles ou thermophiles, ou avec un inoculum de type « STEP » ou « fumier ». Cette persistance en conditions d'anaérobiose lors de procédés intensifs de digestion anaérobie laisse penser qu'il est peu probable qu'une dégradation ait lieu au cours du stockage du lisier dans la fosse où la digestion anaérobie, si elle a lieu,

n'est pas optimisée. Ces résultats confirment donc la tendance à la persistance des hormones observée précédemment au cours du stockage du lisier dans la fosse non aérée.

Pour les antibiotiques, il apparaît qu'à l'exception de l'oxytétracycline, il n'y a pas de dégradation dans le digesteur anaérobie mésophile. Egalement, aucune dégradation n'est observée dans le réacteur thermophile dont l'inoculum provient d'une boue de STEP. La concentration totale en antibiotiques augmente et l'abattement est négatif (-36 %). Il semblerait que l'augmentation de la sulfadiazine et de la lincomycine dans la phase dissoute et celle de l'oxytétracycline dans la phase solide soient responsables de ce résultat. Aucune dégradation n'est également observée dans le réacteur 2 dont l'inoculum provient d'un fumier équin. La concentration en antibiotique entre l'entrée et la sortie du réacteur reste stable.

Les conditions aérobies/anoxiques permettent de diminuer drastiquement les concentrations en hormones: 83% pour le réacteur aérobie/anoxique couplé avec le digesteur anaérobie mésophile et 41% pour le réacteur aérobie/anoxique alimenté directement avec du lisier stocké (non couplé). Pour les antibiotiques, il apparaît une forte diminution de la concentration totale en antibiotiques à la sortie du réacteur anaérobie couplé au traitement aérobie/anoxie avec une élimination globale de 84%, sauf pour la monensine probablement en raison de la variabilité des analyses. Par contre, quand le traitement aérobie-anoxie est effectué seul, sans pré-digestion anaérobie, l'abattement total est moindre (45%). Il est probable que la pré-digestion anaérobie opérée dans la première expérience influe sur les caractéristiques de la matrice, de telle manière à favoriser l'élimination des hormones et antibiotiques lors du traitement aérobie, même si elle n'élimine pas ces polluants.

DEVENIR ET IMPACT DES ANTIBIOTIQUES DANS LE SOL

Les études sur la souche *Trametes versicolor* en milieu liquide nous ont permis de démontrer que les antibiotiques n'ont aucune influence sur la croissance de ce champignon. Par ailleurs, les activités enzymatiques secrétées sont peu ou pas affectées par la présence des antibiotiques testés. En conséquence, ce microorganisme ne paraît pas être un bon bio-indicateur d'exposition aux antibiotiques.

Les effets des antibiotiques sur les communautés microbiennes des sols montrent que le lisier semble stimuler les activités enzymatiques dans les sols amendés par rapport aux sols témoins non amendés. En revanche, l'apport d'antibiotiques, quel que soit le composé ou sa dose, est sans effet significatif.

Les études concernant le devenir de la ciprofloxacine dans les sols confirment que l'antibiotique est fortement adsorbé, et non dégradé. Ce comportement évolue en présence de vers de terre qui conduisent à une très faible minéralisation du composé. L'ensemble des résultats suggère un risque fort d'accumulation du composé dans le sol, et un transfert partiel vers les végétaux et les eaux souterraines. La faible biodisponibilité de la ciprofloxacine explique l'absence d'effet significatif observé sur les descripteurs microbiens des sols. Enfin, une étude de la transformation de l'antibiotique par le champignon basidiomycète *T. versicolor* pourrait permettre de préciser le schéma métabolique de ce composé, et d'identifier des systèmes enzymatiques potentiellement impliqués dans la biotransformation.

CONCLUSIONS

Cette étude a permis des développements analytiques conséquents pour la détection de 52 antibiotiques et pour la quantification des hormones et des antibiotiques (7) dans la phase particulaire du lisier, protocoles qui n'existaient pas auparavant. Il a été également montré l'influence de la séparation et de la congélation des échantillons dans la préservation de ces composés pour une analyse fiable et précise.

Concernant le devenir des hormones et des antibiotiques dans les filières de traitement, nos résultats ont montré qu'il existe une forte hétérogénéité de composition des lisiers (teneur en matière sèche et organique). Les résultats obtenus montrent que la filière de stockage, utilisée par 85% des fermes porcines françaises, ne permet pas la dégradation des hormones stéroïdes. Egalement, il apparaît clairement que les antibiotiques ne sont pas dégradés en condition anaérobie. La baisse des concentrations totales à l'issue du stockage semble plutôt due à des phénomènes de dilution. Une activité œstrogénique sur ER α est détectable en concentration importante dans le lisier stocké ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et elle est majoritairement contenue dans la fraction solide. Cependant, cette activité n'est pas explicable par l'abondance chimique des hormones ce qui laisse supposer la présence d'autres composés actifs sur ce récepteur. De plus, une activité « dioxin-like » sur le récepteur AhR de l'ordre du $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou du $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d'équivalents TCDD a été détectée principalement dans la fraction solide du lisier.

Dans les filières de traitement du lisier étudiées, incluant un traitement biologique aérobie, avec ou sans séparation de phases en amont, les concentrations en hormones et activité œstrogénique diminuent considérablement (95%). Les hormones, majoritairement présentes dans la fraction solide du lisier stocké (>90 %) sont retrouvées également dans cette fraction à l'issue du traitement aéré. Il semble qu'il n'y ait pas de dégradation supplémentaire dans la fosse de stockage des boues. Dans la filière où la centrifugation est réalisée,

les hormones se retrouvent dans le refus solide à des concentrations élevées de l'ordre du mg.kg^{-1} . L'activité œstrogénique a le même comportement. L'activité « dioxin-like » est également majoritairement présente dans le solide. Au cours de la filière, l'activité « dioxin-like » semble cependant plus récalcitrante à la dégradation que l'activité œstrogénique.

Si les résultats du suivi de la contamination du lisier le long de la filière de traitement dans les systèmes complexes de traitement du lisier sont mis en parallèle avec ceux obtenus lors des études de dégradation en conditions contrôlées, il apparaît que la dégradation des hormones et des antibiotiques dans les lisiers est aérobie. De plus, pour améliorer la dégradation des composés il est important de traiter la phase solide qui concentre une fraction importante des polluants. Il semble dès lors que la meilleure manière de limiter les rejets est de procéder au traitement aérobie sans séparation de phases. Il faudrait toutefois étudier de manière plus précise le devenir de ces composés lors d'un vrai compostage de la fraction solide des lisiers.

Les études en conditions anaérobies contrôlées ont confirmé la persistance des hormones et de la plupart des antibiotiques dans la fosse de stockage puisque ces composés ne sont pas dégradés lors des procédés anaérobies mésophiles ou thermophiles testés. La dégradation des hormones et des antibiotiques est effective lors du traitement aérobie/anoxique mais il semble que les performances du procédé soient améliorées avec un temps de séjour long et une étape de pré-digestion anaérobie, malgré une plus faible durée d'aération. A ce titre, il serait intéressant d'identifier les rôles respectifs de ces trois paramètres dans la dégradation des hormones et des antibiotiques au sein d'une matrice de type lisier: prédigestion anaérobie, temps d'aération et temps de séjour.

Les données sur l'antibiorésistance suggèrent la présence et la persistance d'entérobactéries potentiellement antibio-résistantes dans les effluents d'un élevage sur les trois sites étudiés. Les traitements aérobies du lisier, qui entraînent un abattement des concentrations en entérobactéries, n'ont apparemment aucun effet sur la perte ou l'acquisition de résistance aux antibiotiques. Les proportions de bactéries potentiellement résistantes sont en effet similaires tout au long de la filière.

Les études sur la souche *Trametes versicolor* démontrent que les antibiotiques n'ont aucune influence sur ce champignon. L'apport des antibiotiques au sol est également sans effet significatif sur les communautés microbiennes des sols.

Les études concernant le devenir de la ciprofloxacine dans les sols confirment que l'antibiotique est fortement adsorbé, et non dégradé. L'ensemble des résultats suggère un risque fort d'accumulation du composé dans le sol, et un transfert partiel vers les végétaux et les eaux souterraines.

REFERENCES

- Balaguer P, Francois F, Comunale F, Fenet H, Boussioux AM, Pons M, Nicolas JC, Casellas C (1999) Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci Total Environ* 233: 47-56.
- Dabert P., Pourcher A-M., Bouchez T., Bureau C. (2009) Qualité sanitaire des rejets des élevages porcins : Evaluation des filières de traitement biologique du lisier en bactériologie et microbiologie moléculaire. Rapport final projet AFSSET – ADEME n° 05 75 C 0031.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P. and Waldock, M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environmental Science & Technology* 32(11): 1549-1558.
- Hutchins, S.R., White, M.V., Hudson, F.M. and Fine, D.D. (2007) Analysis of lagoon samples from different concentrated animal feeding operations for estrogens and estrogen conjugates. *Environ. Sci. Technol.*, 41 (3): 738-744.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498-2506.
- Lange, I.G., Daxenberger, A., Schiffer, B., Witters, H., Ibarreta, D. and Meyer, H.H.D. (2002) Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta.*; 473 (1-2): 27-37.
- Muller, M., Rabenoelina, F., Balaguer, P., Patureau, D., Lemenach, K., Budzinski, H., Barcelo, D., De Alda, M.L., Kuster, M., Delgenes, J.P. and Hernandez-Raquet, G. (2008) Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environ. Toxicol.Chem.*, 27: 1649-1658.
- Pillon A, Servant N, Vignon F, Balaguer P, Nicolas JC (2005) *In vivo* bioluminescence imaging to evaluate estrogenic activities of endocrine disrupters. *Anal Biochem* 340: 295-302.
- Zuccato, E., et al., 2001. Environmental loads and detection of pharmaceuticals in Italy., in *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks.*, K. K., Editor. 2001, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York. p. 265.

Résultats marquants

Dans le lisier porcin, les hormones sont principalement contenues dans la fraction solide; dans cette fraction, la présence d'autres composés œstrogéniques a été décelée. Une forte perturbation endocrinienne via l'activation du récepteur aux œstrogènes (ER) et dioxin-like (AhR) a été également détectée. Dix-huit antibiotiques ont été détectés dans le lisier ; sept d'entre eux ont été détectés dans plus de 50% des échantillons analysés. La présence et la persistance d'entérobactéries potentiellement résistantes à la tétracycline a été détectée dans la plupart des lisiers étudiés. Dans les systèmes de traitement sous conditions réelles ou contrôlées, les conditions aérobies sont plus efficaces pour éliminer les hormones, les antibiotiques, les activités œstrogéniques et «dioxin-like» associées, bien que cette dernière semble plus récalcitrante. Les antibiotiques présentent peu d'effet sur les champignons et bactéries du sol. L'antibiotique ciprofloxacine est fortement retenu dans les sols où il est faiblement dégradé.

Le projet a permis de :

- Développer des méthodes analytiques performantes pour l'analyse chimique et la conservation des hormones et des antibiotiques contenus dans le lisier porcin.
- Dresser un bilan global de l'état de contamination avec les hormones et antibiotiques dans diverses fermes d'élevage porcin.
- Déterminer le potentiel d'élimination des hormones et antibiotiques des systèmes de gestion des déchets utilisés couramment en France.
- Développer un procédé de traitement biologique efficace pour l'élimination conjointe de l'azote, des hormones, des antibiotiques et des activités endocrines associées.
- Établir le niveau de résistance bactérienne aux antibiotiques présente dans les systèmes de gestion du lisier.
- Déterminer l'impact des antibiotiques sur la microflore du sol ainsi que la dégradation d'un antibiotique modèle.

Ces résultats serviront à améliorer la gestion des déchets d'élevage porcin vis-à-vis de leur contenu en micropolluants.

Production scientifique

Le projet Dipepha a donné lieu à 5 publications scientifiques (publiées ou acceptées) dans des journaux de rang 1:

- Impact of antibiotics from pig slurry on the basidiomycete *Trametes versicolor* and on soil microbial communities. Environ. Toxicol.
- Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. App. Microbiol. Biotechnol.
- Enhanced methods for the conditioning, storage and extraction of liquid and solid samples of manure for the determination of steroid hormones by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Annal. Bioanal. Chem.
- Removal of Steroid Hormones and Multiple Endocrine Activities in Swine Manure Disposal and Treatment facilities. Water Research.
- Fate of ciprofloxacin in terrestrial model ecosystems amended with contaminated pig slurry. Env. Chem. Letters

Six autres publications sont en cours de préparation. Le projet a également donné lieu à 12 communications dans des conférences nationales et internationales.

Autres informations

Le projet a commencé en novembre 2007 et a duré 42 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 300 000 € et d'un financement de l'ADEME de 200 000 € pour un coût global de l'ordre de 1 200 000 €.

Les résultats du projet ont reçu le Prix des techniques Innovantes pour l'Environnement 2010, prix décerné par l'Ademe-Pollutec.