Etude du devenir et de l'impact des antibiotiques à l'échelle d'un bassin versant : application au bassin versant du Katari (Bolivie)

Denisse Archundia Peralta

▶ **To cite this version:**

Denisse Archundia Peralta. Etude du devenir et de l'impact des antibiotiques à l'échelle d'un bassin versant : application au bassin versant du Katari (Bolivie). Environnement et Société. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAU016 . tel-01530466

HAL Id: tel-01530466

https://theses.hal.science/tel-01530466

Submitted on 31 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Sciences de l'environnement

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

DENISSE ARCHUNDIA PERALTA

Thèse dirigée par **CELINE DUWIG**
codirigée par **JEAN MARTINS** et **MARIE-CHRISTINE MOREL**

préparée au sein du **Laboratoire d'étude des Transferts en Hydrologie et Environnement (LTHE)**
dans **l'École Doctorale Terre-Univers-Environnement**

Etude du devenir et de l'impact des antibiotiques à l'échelle d'un bassin versant : application au bassin versant du Katari (Bolivie).

Thèse soutenue publiquement le **« 07 Avril 20016 »**, devant le jury composé de :

Mme. Geraldine Sarret
DR CNRS. ISTerre, OSU Grenoble. Présidente.
Mme. Sylvie Nazaret
CR1 CNRS, HDR. Écologie Microbienne UCB Lyon1. UMR 5557. Rapportrice.
Mr. Yves Perrodin
DR1 MEDDE Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés. UMR CNRS 5023. Rapporteur.
Mr. Pierre Benoit
DR INRA. Ecologie fonctionnelle et écotoxicologie des agroécosystèmes. UMR EcoSys. Examinateur.
Mme. Blanca Prado
Prof. Dr. UNAM, Mexico. Instituto de Geología. Examinatrice.

Thèse soutenue par le Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACyT).

Table des matières

Table des illustrations 5
Table des tableaux 6
Abréviations 7

Remerciements 8

Introduction générale 10

CHAPITRE I. Synthèse bibliographique et questionnement. 14
1. Micropolluants : polluants émergents..... 15
2. Antibiotiques..... 16
2.1 Définition et modes d'action..... 16
2.2 Pollution des milieux naturels par les antibiotiques : voies d'émission. 17
2.2.1 Origine urbaine. 19
2.2.2 Origine vétérinaire. 20
2.2.3 Cadre réglementaire 21
3. Devenir des antibiotiques dans les milieux naturels. 22
3.1 Transfert réactif dans les sols..... 23
3.1.1 Processus physiques. 23
3.1.2 Réactivité des molécules antibiotiques. 25
3.2 Processus de dégradation..... 29
4. Impacts des antibiotiques sur les communautés microbiennes. 30
4.1 Résistance bactérienne aux antibiotiques. 31
4.2 Persistance des gènes de résistance bactérienne aux antibiotiques dans l'environnement..... 33
5. Les sulfonamides : focus sur le Sulfamethoxazole (SMX). 35
5.1 Présence du SMX et devenir dans les milieux naturels. 37
5.2 Résistance bactérienne aux Sulfonamides (SA)..... 39
6. Modélisation du devenir des antibiotiques et évaluation du risque environnemental …… 40
7. Conclusion et questionnements de la thèse..... 42

CHAPITRE II. Matériels et méthodes. 44
1. Description du bassin versant du Katari. 45
1.1 Localisation. 45
1.2 Climat. 45
1.3 Topographie et réseau hydrographique 46
1.4 Sols. 47
1.5 Contexte démographique et social. 49
1.5.1 Socio-économie. 50
1.5.2 Demande hydrique 50
1.5.3 Assainissement. 51
1.5.4 Santé publique et utilisation des antibiotiques. 51
1.6 Problématique environnementale. 53
2. Méthodologies. 54
2.1 Caractérisation de l'état de pollution du BV du Katari. 58
2.1.1 Qualité bactériologique. 58
2.1.2 Nutriments. 58
2.1.3 Eléments trace métalliques (ETM). 58
2.1.4 Antibiotiques. 59
i) Echantillons liquides. 59
ii) Echantillons solides. 62
iii) Méthode analytique. 62
2.1.5 Résistance bactérienne au Sulfamethoxazole. 63
2.2 Etude du devenir du Sulfamethoxazole (SMX). 64
2.2.1 Prélèvements. 64
2.2.2 Principe expérimental et analyses. 65
i) Processus abiotiques 65
i.i) Photodegradation. 65
i.ii) Sorption. 66
i.iii) Mobilité. 67
i.iv) Méthodes analytiques. 68
ii) Processus biotiques. 69
ii.i) Biodégradation du SMX. 69
2.3 Evaluation de l'impact du SMX sur les communautés bactériennes des sols. ……...70
2.3.1 Impacts sur la structure des communautés bactériennes du sol. 70
2.3.2 Développement de résistances bactériennes au SMX. 71

2.4 Evaluation du risque de pollution au SMX du réseau hydrographique du BV par modélisation. 71

2.4.1 Le modelè GREAT-ER. 71

CHAPITRE III. Caractérisation de l'état de pollution du bassin versant. 73

1. Eutrophisation et pollution polymétallique dans le réseau hydrographique du BV du Katari. 75

1.1 Article 1 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats…… 75

1.2 Impacts of anthropogenic activities from the fastest-growing urban center of Bolivia (El Alto, 4000 m a.s.l.) on the contamination and eutrophication of the Milluni – Katari – Lake Titicaca continuum 76

2. Pollution aux antibiotiques et occurrence des gènes de résistances bactériennes. 105

2.1 Validation méthode d'extraction sur phase solide (SPE) 105

2.2 Article 2 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats…….. 106

2.3 Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca Lake: major transformation products and occurrence of resistance genes. 107

2.4 Conclusion 133

CHAPITRE IV. Etude du devenir du Sulfamethoxazole (SMX) et des impacts sur les communautés bactériennes. 135

2. Transfert réactif 138

2.1 Etude de la sorption du SMX dans les sols du BV. 138

2.1.1 Etude préliminaire pour la réalisation des isothermes de sorption. 138

2.1.2 Article 3 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats…… 140

2.1.3 Characterization of sulfamethoxazole sorption in 10 soils of the Katari basin (Lake Titicaca, Bolivia) for evaluating antibiotic reactive transfer at the catchment scale…… 141

2.2 Etude de la mobilité du SMX dans les sols du BV : implications sur les niveaux de pollution par antibiotiques. 157

2.2.1 Article 4 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats…… 157

2.2.2 Experiments and modelling approaches to investigate the mobility of Sulfamethoxazole in ten soils of a Lake Titicaca subcatchment (Bolivia) 158

2.3 Processus de dégradation du SMX et impacts sur les communautés bactériennes.. 183

2.3.1 Photodegradation du SMX dans un environnement d'haute altitude. 183

2.3.2 Processus biotiques et impacts sur les communautés bactériennes. 186

2.3.3 Article 5 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats……..186

2.3.4 Evaluation of Sulfamethoxazole biodegradation and impacts in soils of the Bolivian Highlands (Katari watershed). 188

CHAPITRE V. Application du modèle GREAT-ER pour l'évaluation du devenir et du risque écotoxicologique lie à la présence du SMX dans le réseau hydrographique du BV du Katari. 215

1. Article 6 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats……. 216

2. Application of the GREAT-ER model to assess the environmental fate and the ecotoxicological risk of the Sulfamethoxazole antibiotic on the Katari catchment (Bolivian Altiplano)..... 217

3. Conclusion…..... 233

CHAPITRE VI. Conclusions et perspectives..... 234

References 244

ANNEXE 1 251

Table des illustrations

Figure 1 Modes d'action des antibiotiques et familles de antibiotiques (Ona-Nguema et al., 2015)..... 17
Figure 2 Sources et transfert des antibiotiques dans l'environnement (par Christine Klein dans Mojica and Aga, 2011).. 18
Figure 3 Voies d'entrée des antibiotiques d'origine vétérinaire vers les écosystèmes naturels (modifie d'après Kemper, 2008).. 20
Figure 4 Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.. 32
Figure 5 Voies d'acquisition de résistance bactérienne aux antibiotiques par mutation et transfert du matériel génétique.. 33
Figure 6 Mécanismes impliquées dans la persistance de résistance bactérienne aux antibiotiques.. 34
Figure 7 Structure de base des sulfonamides et différents antibiotiques appartenant à cette famille d'antibiotiques (modifié d'après: Figueroa-Diva et al., 2010).. 36
Figure 8 Structure moléculaire du Sulfamethoxazole (SMX).. 37
Figure 9 Spéciation pH-dépendante du Sulfamethoxazole (Modifie à partir de: Srinivasan et al., 2013). pKa1 : 1.7. pKa2 : 5.6.. 38
Figure 10 Localisation et limites du BV du Katari et ces sous bassins versants (M.M.A.y.A., 2010)..... 45
Figure 11 Topographie et réseau hydrographique du BV du Katari (Archundia 2015, ARC-Gis).. 47
Figure 12 Types du sol du BV Katari (M.M.A.y.A., 2010).. 48
Figure 13 Résumé de la méthodologie mise en œuvre. Bol : réalisé en Bolivie. Fr : réalisé en France. COP: Carbonne organique particulaire. COD: Carbonne organique dissout.. 55
Figure 14 Localisation des points d'échantillonnage.. 56
Figure 15 Méthode de filtration sur membrane.. 58
Figure 16 Etapes constituant une extraction en phase solide. Modifie de : Gilson dans (Humbert, 2010).. 60
Figure 17 Méthodologie utilisé pour l'évaluation de la présence des gènes de résistance bactérienne au SMX.. 63
Figure 18 Principe de l'expérience de photodégradation du SMX.. 65
Figure 19 Principe de l'expérience de sorption du SMX.. 67
Figure 20 Dispositif expérimental utilisé pour les expériences en colonnes..... 68
Figure 21 Appareillage utilisé pour la détermination des teneurs en SMX lors des diverses expériences effectuées dans le cadre de cette thèse.. 69
Figure 22 Principe des expériences pour évaluer la biodégradation su SMX.. 70
Figure 23 Rendements d'extraction SPE a des différents temps de stockage.. 105
Figure 24 Profil d'exactitude pour la validation de la methode HPLC-UV.. 138
Figure 25 Pourcentage adsorbé à l'équilibre (Aeq%) en fonction du rapport sol/solution sur deux sols avec taux de MO contrastés.. 139
Figure 26 Pourcentage adsorbé (A%) en fonction du temps sur deux sols avec taux de matière organique contrasté.. 140

Table des tableaux

Tableau 1 Valeurs de référence des standards (mg L-1) utilisés pour la validation de la méthode HPLC-UV. 69
Tableau 2 Réponses instrumentales (en triplicata : 1, 2 et 3) obtenues par niveau de concentration et série (analyse des mêmes solutions standards a 4 dates différentes). 137
Tableau 3 Coefficients du modèle d'étalonnage pour chaque série. o.o : ordonnée à l' origine de la droite d'étalonnage. P : pente de la droite d'étalonnage 137

Abréviations

AISA : Entreprise Aguas de Illimani SA
Br^- : Ion Bromure
BV : Bassin Versant
CAN : Communauté Andine des Nations
Cl^-: Ion Chlorure
CMe : Cambisol Eutrique
CMx : Cambisol Chromique
CO : Carbone organique
DBO : Demande Biologique en Oxygène
DGGE : Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant
ENSO : El Niño Southern Oscillation
EPSAS : Empresa Pública Social de Agua y Saneamiento S.A.
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations
F^-: Ion Fluorure
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
Kd : Coefficient de partage
LCA : Laboratorio de Calidad Ambiental (La Paz, Bolivie)
LPe : Leptosol Eutrique.
MMAyA : Ministerio de Medioambiente y Agua (La Paz, Bolivie)
mmc : Millions de Mètres Cube
MO : Matière Organique
NH_4^+: Ammonium
NO_3^-: Nitrate
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase
PNMEBOL : Programa Nacional de Medicamentos Esenciales de Bolivia
PO_4^-: Phosphate
qPCR : PCR Quantitative
RGd : Regosol Dystrique.
SA : Sulfonamides
SMX : Sulfamethoxazole
SO_4^- : Sulfate
SPE : Solid Phase Extraction
STEP : Station d'Epuration des Eaux Usées
TDPS : Titicaca-Dedaguadero-Poopo-Salar
TMP : Trimethoprime
UMSA : Universidad Mayor de San Andres (La Paz, Bolivie)
ZCIT : Zone de Convergence Inter-Tropicale

Remerciements

J’aimerais tout d’abord remercier ma directrice de thèse, Celine DUWIG, pour ses conseils, son soutien et son analyse qu'elle a su m'apporter pendant ces trois années passé à mes cotés. Pour son amitié et pour m'avoir donné la possibilité de travailler sur un projet si intéressant et divers que celui-là. Pour les bons moments passés en travaillant avec elle au LTHE, mais aussi sur le terrain, dans ce beau pays qu'est la Bolivie, lequel je n’aurais jamais pu découvrir si elle ne m’avait pas donne cette opportunité.

Il m’est impossible d’oublier Renaud FICHEZ, directeur de mon stage de M2 a l’IRD au Mexique, qui m’a encouragée à continuer en thèse et qui a su faire, de la rencontre avec Celine DUWIG, l’élément déclencheur de cette aventure.

C’est aussi vers mes co-directeurs de thèse, Jean MARTINS et Marie-Christine MOREL que j’adresse ma gratitude. Pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé et aide à finaliser cette partie importante de ma vie. Ainsi que pour la gentillesse et la patience manifestées à mon égard durant cette thèse.

Je veux aussi remercier l’ensemble des membres du laboratoire LTHE, que ce soit chercheurs ou personnels administratifs pour leurs aide si précieuse. Merci à Lorenzo SPADINI pour son instruction, ses conseils et sa gentillesse. Merci à Erwann VINCE pour son aide au laboratoire, sa disponibilité et sa bonne humeur. Merci aussi a Frederick LEHEMBRE, pour son orientation et sa formation sur les analyses en biologie moléculaire.

Je tiens à remercier également les chercheurs qui ont collaborés pour la construction des diverses parties de cette thèse : Gaëlle UZU Stéphane GUEDRON, Blanca PRADO et Serge CHIRON. Pour l’intérêt qu’ils ont porté à mes travaux et pour leurs remarques constructives.

Je remercie également tous les membres du jury d’avoir accepté d’assister à ma soutenance.

Merci à l’IRD qu’ont soutenue les trois belles missions que j’ai eu le plaisir d’effectuer en Bolivie. Merci au personnel de l’IRD en Bolivie qui m’ont reçu lors de mes séjours, spécialement aux chauffeurs pour leurs connaissances sur le terrain.

Ces remerciements s’adressent aussi aux collaborateurs boliviens de la Universidad Mayor de San Andres, le M.M.A.y.A. et le SENHAMI pour son aide précieuse sur le terrain et son accueil.

Je remercie aussi le Consejo de Ciencia y Tecnologia mexicain (CONACyT) pour avoir soutenu la réalisation de ces travaux de thèse.

A mon époux : Julien…je te remercie pour ton soutien quotidien à l'égard de mes objectifs comme de la vie en général. Je sais que ça n'ait pas été toujours facile.. je te remercie pour avoir supporté mes mauvaises humeurs, ma fatigue et mes absences…. Te amo…

A ma famille Mexicaine: Mama, papa, hermanos y cuñados…Gracias por estar pendientes y presentes aun en la distancia… por su amor y apoyo incondicionales en todas las locuras que hago…. Los amo…

A ma famille Française: Merci pour votre soutien, compréhension et réconfort lors des moments difficiles….Je vous aime…..

A Tequila mon petit chien d'amour pour m'avoir fat de la compagnie pendant l'ecriture de cette thèse…

Introduction générale

L'Altiplano Nord bolivien est soumis naturellement à des conditions climatiques et pédologiques contraignantes. Il est particulièrement impacté par des activités humaines variées tels que l'exploitation minière, l'agriculture et plus récemment l'urbanisation.

Le bassin versant (BV) du Katari englobe une variété d'activités anthropiques. Elle prend sa source dans la Cordillère Royale, où des activités minières locales ont lieu depuis 1940. La pollution des eaux de surface du BV par les exploitations minières a déjà été mise en évidence par Salvarredy-Aranguren et al., (2008).

Outre les activités minières, le BV englobe la ville d'El Alto, la plus grande ville de l'Altiplano, laquelle est un exemple typique de centre urbain à croissance rapide. Sa population a augmenté de 95.000 habitants en 1976 à environ 1,2 million en 2012 (Hubert Mazurek, 2012). Elle s'est développée avec un aménagement territorial minime et une réglementation insuffisante. Comme résultat, le réseau de collecte et traitement des eaux usées est actuellement sous dimensionné et la qualité des eaux du BV est fortement détériorée. PNUMA, (2011) ont déjà observé des niveaux élevés en demande chimique en oxygène (DBO) dans ces eaux ainsi que certains métaux à toxicité élevée (Cd, As, Pb). Des niveaux hors normes ont aussi été observés pour les bactéries fécaux et le toluène à la sortie de la ville d'El Alto (Chudnoff, 2006). En aval de la zone urbaine, l'activité agricole est prédominante jusqu'à l'exutoire du BV dans la baie de Cohana située dans le petit lac Huiñamarca du Titicaca. Ici, la qualité des eaux est aussi détériorée et compte parmi les eaux les plus eutrophes de la partie bolivienne du lac Titicaca (Fonturbel, 2005). Des problèmes de santé liés à la mauvaise qualité des eaux de surface ont d'ailleurs déjà été observés dans la localité de Cohana (UAC Batallas, 2010).

A ce jour, peu d'études ont caractérisé les résidus pharmaceutiques et leur devenir dans les conditions extrêmes de l'Altiplano. Les institutions de recherche françaises et boliviennes se sont beaucoup penchées sur l'étude des éléments traces métalliques mais très peu sur les contaminants émergents, car présents dans l'environnement en faibles doses, et dont les effets sont peu connus.

Les antibiotiques sont des micropolluants organiques et comptent aujourd'hui parmi un des groupes les plus importants des polluants émergents. Les principales voies d'émission de ces composés sont les rejets des eaux usées et l'épandage des déjections animales comme

fertilisants des terres agricoles. Ils ont été détectés dans des milieux aquatiques et terrestres par tout dans le monde (Ternes, 1998; Schlüsener and Bester, 2006; Lindberg et al., 2007; Martínez-Carballo et al., 2007; Choi et al., 2008; Walters et al., 2010; Zuccato et al., 2010; Kim et al., 2011; N. Gottschall et al., 2012; Gibs et al., 2013). Par exemple, une étude réalisée dans la Seine a montré l'émission à partir des stations d'épuration (STEP) d'antibiotiques tels que la norfloxacine, l'ofloxacine, le triméthoprime ou le sulfaméthoxazole (Tamtam et al., 2008). Un autre exemple : sept sulfamides, le triméthoprime, cinq macrolides, trois tétracyclines et la lincomycine ont été détectés dans 150 échantillons d'eaux usées urbaines et agricoles, ainsi que dans des eaux superficielles et eaux côtières dans cinq pays asiatiques tropicaux (Shimizu et al., 2013). Cela montre l'ubiquité et la diversité actuelles de la pollution par les composés antibiotiques dans les milieux naturels.

Les concentrations retrouvées dans l'environnement sont très variables en lien d'une part avec les variations dans les modes de consommation (type d'antibiotique et quantité) et à la persistance des différentes composés disséminés.

Segura et al., (2015) ont démontré que les antibiotiques à faible coût, comme le SMX et le TMP, semblent être plus fréquemment observés et à des concentrations plus élevées dans les pays en développement.

D'autre part, les conditions des milieux récepteurs et les caractéristiques chimiques intrinsèques des molécules conditionnent leur persistance (Michael et al., 2013). De ce fait l'étude des processus régissant la persistance comme la sorption, la mobilité et la dégradation des antibiotiques est une étape essentielle.

Les mécanismes les plus importants conditionnant la sorption et donc la mobilité des composés antibiotiques sont les interactions avec la matière organique et les constituants minéraux du sol, ainsi que l'échange d'ions, les liaisons hydrogène et la formation de complexes avec les ions métalliques (Morel et al., 2014a). La dégradation est représentée par les processus de dégradation abiotiques (ex ; photodégradation, hydrolyse) et les processus de dégradation biotique (dégradation par les microorganismes).

Dans le cadre du projet « Evaluation des risques liés à la dissémination des antibiotiques et de leurs impacts sur les fonctions écologiques des sols dans le bassin versant du Katari (Lac Titicaca, Bolivie) » développé par le LTHE en collaboration avec l'Institut de chimie de l'Universidad Mayor de San Andres (UMSA) et le Ministère de l'Environnement et de l'Eau Bolivien (MMAyA), ma thèse doctorale porte sur l'étude de la contamination du bassin du Karati aux antibiotiques, le développement et la dissémination de résistances bactériennes à ces composées et sur l'évaluation du devenir et du risque de pollution dans le contexte de

l'altiplano bolivien. Une évaluation sur l'état général de la pollution du BV a aussi été nécessaire lorsqu'il est connu que les antibiotiques sont susceptibles d'interagir avec d'autres molécules, comme par exemple les éléments métalliques.

Le screening de produits pharmaceutiques effectué en 2012 par le LTHE dans le réseau hydrographique du bassin du Katari (Duwig et al., 2014a) a montré la présence d'antibiotiques de la famille des sulfonamides, principalement le Sulfamethoxazole (SMX).

Le SMX étant un antibiotique utilisé très largement pour le traitement de maladies chez les humains et les animaux est un des antibiotiques détectés couramment dans les effluents de STEP (Karthikeyan and Meyer, 2006; Le-Minh et al., 2010; Watkinson et al., 2007) et par conséquent dans les eaux de surface (Choi et al., 2008; Hirsch et al., 1999; Kümmerer, 2009; Tamtam et al., 2008; Xu et al., 2015) ainsi que dans les eaux souterraines (García-Galán et al., 2010). Il a été choisi comme composé modèle dans cette thèse de par sa présence avérée dans le site d'étude et sa présence généralisée dans les milieux naturels. Faiblement adsorbé dans les sols et les sédiments, il est considérée comme une molécule à mobilité élevée ce qui explique sa présence dans les aquifères (Mojica and Aga, 2011).

Cette pollution importante dont les sources sont largement méconnues, surtout sur l'Altiplano, a des impacts négatifs sur les écosystèmes. Le principal impact de la présence d'antibiotiques dans l'environnement (généralement lors de l'exposition prolongée à de faibles doses) est le développement de résistances bactériennes. La présence de ces molécules peut induire la présence puis la dissémination de gènes de résistance bactérienne aux antibiotiques vers d'autres bactéries et notamment les bactéries pathogènes pouvant donner lieu à des problèmes de santé chez les humains et les animaux. Cependant, la totalité des risques potentiels et leurs effets dans l'environnement restent encore méconnus.

En Bolivie, la présence de résistances bactériennes aux antibiotiques a déjà été identifiée par Infante et al. (2005) qui ont observé des gènes de résistance d'*E. coli* dans des échantillons de matières fécales chez plus des 50% des enfants dans de différents régions de Bolivie (Camiri et Villa Montes) et du Pérou (Yurimaguas et Moyobamba). Les eaux superficielles du BV du Katari présentent des gènes de résistance au SMX, principalement le gène *sul1* (Duwig et al., 2014a).

Le développement de résistances bactériennes aux antibiotiques, est reconnu comme étant l'un des principaux problèmes de santé publique mondial du 21ième siècle (WHO, 2014), il est donc essentiel que la Bolivie puisse évaluer l'ampleur de la dissémination des antibiotiques cet environnement et ensuite prendre les mesures nécessaires en coordination

avec les différentes instances publiques (Ministères de l'Environnement et de la Santé, Agence de l'Eau).

C'est ce travail pionnier qui a été entrepris dans le cadre de cette thèse menée conjointement en Bolivie (collecte des sols et échantillonnage des eaux de surface et souterraines) et en France (analyse des échantillons et étude des processus en laboratoire).

La thèse est ainsi articulée en 4 volets :

I) Synthèse bibliographique et questionnement de la thèse

II) Présentation du site d'étude et des matériels et méthodes

III) Caractérisation de l'état de pollution du bassin versant

IV) Etude du devenir du Sulfamethoxazole (SMX) et des impacts sur les communautés bactériennes

V) Application du modèle GREAT-ER pour l'évaluation du devenir et du risque écotoxicologique lie à la présence du SMX dans le réseau hydrographique du BV du Katari.

VI) Conclusions et perspectives.

CHAPITRE I. Synthèse bibliographique et questionnement.

1. Micropolluants : polluants émergents.

Les micropolluants sont des substances détectables dans l'environnement en très faibles concentrations, de l'ordre du µg L^{-1} ou ng L^{-1}, au moins en partie dues à l'activité humaine, et qui peuvent engendrer des effets négatifs sur les organismes vivants à ces très faibles concentrations (Chèvre and Rossi, 2007).

Les micropolluants comprennent une variété de composés minéraux et organiques. Leurs sources ponctuelles sont par exemple les rejets industriels, les pollutions accidentelles, les rejets des eaux usées tandis que les sources diffuses sont principalement liés aux activités agricoles et aux retombées atmosphériques.

Ils sont regroupés principalement en trois types (Genin, et al., 2003):

- Les micropolluants inorganiques sont essentiellement des éléments traces métalliques (ETM). Même si certains de ces éléments sont présents naturellement dans les roches et sols, les niveaux de concentration dans des BV anthropisés sont généralement liés aux activités anthropiques comme la sidérurgie, la tannerie, le transport routier ou les activités agricoles.
- Les micropolluants organiques qui comprennent de nombreux types de composés présentant un ou plusieurs atomes de carbone. On distingue, entre autres, les pesticides, les hydrocarbures (ex : HAP), les biphényles polychlorés (PCB), les biphényles polybromés (PBB), les détergents (ou surfactants), diverses substances médicamenteuses comme par exemple les antibiotiques. Une des principales différences avec les micropolluants inorganiques c'est que lors de leur dégradation ils peuvent donner naissance à des composés organiques intermédiaires ou métabolites. Ces derniers pouvant aussi avoir un effet toxique.
- La troisième catégorie est constituée des molécules mixtes dans lesquelles un ion métallique est lié à un groupement organique, appelé composés organométalliques.

En général, les micropolluants sont concernés par un cadre réglementaire visant la protection des milieux naturels. Par exemple dans l'union européenne la DCE (directive cadre européenne sur l'eau) fixe des substances prioritaires communes à l'échelle européenne et exige de chaque bassin de déterminer leurs propres micropolluants significatifs complémentaires. Journal officiel n° L 327 du 22/12/2000, 1-73.

Certains de ces micropolluants font partie des *polluants émergents*. Ces derniers regroupent les polluants ou micropolluants sans statut réglementaire défini. Il s'agit souvent de molécules, pas nécessairement d'usage nouveau, pour lesquelles les données sur ces impacts,

toxicité et persistance sont limités. Ils ont été identifiés par la communauté scientifique à partir de l'examen de données (eco)toxicologiques et d'occurrence dans l'environnement (RECORD, 2012).

Parmi les polluants émergents sont notamment concernés les produits pharmaceutiques et plus particulièrement les antibiotiques auxquels nous nous intéreserons dans le cadre de cette thèse.

2. Antibiotiques.

2.1 Définition et modes d'action.

Un antibiotique est une substance (naturelle, synthétique ou semi synthétique) ayant la capacité de détruire les cellules bactériennes ou d'inhiber leur multiplication. Dans le premier cas on parle d'effet bactéricide et dans le deuxième d'effet bactériostatique (Berthet and Amar-Costesec, 2005). Ils sont largement utilisés pour la prévention et le traitement de maladies provoquées par des micro-organismes dans la médecine humaine et vétérinaire (aquaculture incluse). Les modes d'action des antibiotiques sont variés et comprennent des mécanismes tels que (Ona-Nguema et al., 2015) (Figure 1) :

a. Inhibition de la synthèse de précurseurs de la paroi bactérienne
b. Inhibition de la synthèse de la membrane cytoplasmique
c. Inhibition de la synthèse des protéines
d. Inhibition de la synthèse des acides nucléiques
e. Inhibition compétitive (antimétabolites)

Ils sont été detournés de leur fonction principale et utilisés comme facteur de croissance dans l'élevage. Pratique qui est très répandue dans l'élevage industriel depuis près de 60 ans, pour leurs effets bénéfiques sur l'augmentation de la production de la volaille et des porcs. En 1969, le Swann Comité (Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine) a préconisé que les antibiotiques utilisés en médicine humaine et ceux induisant des résistances bactériennes ne soient pas utilisés comme promoteurs de croissance chez les animaux. Comme résultat, l'utilisation des antibiotiques en Europe à ces fins a été interdite en 2006 (European Commision, 2003; Kemper, 2008; Mojica and Aga, 2011; Swann Committee, 1969).

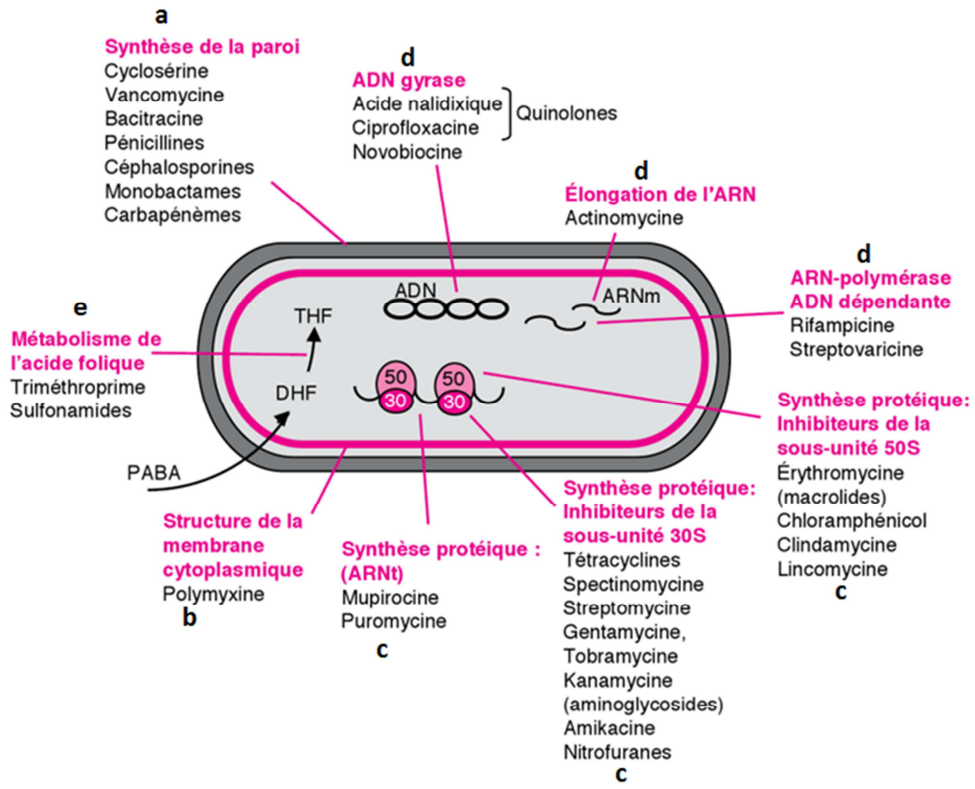


Figure 1 Modes d'action des antibiotiques et principales familles d'antibiotiques (Ona-Nguema et al., 2015).

2.2 Pollution des milieux naturels par les antibiotiques : voies d'émission.

Dans les organismes vivants, les antibiotiques ne sont pas complètement métabolisés. Ainsi, le composé administré pourra se retrouver dans les excrétions soit sous forme inchangée (composé parent) soit comme métabolite. La proportion du composé parent ou métabolite excrété est appelé *taux d'excrétion* et est très variable selon le composé. Par exemple, pour les Sulfonamides (SA) le taux d'excrétion du composé parent varie entre 50% et 100% et pour les tétracyclines il varie entre 70% et 90% (Mojica and Aga, 2011).

Comme le montre la figure 2, les antibiotiques retrouvés dans l'environnement peuvent être d'origine humaine ou vétérinaire. Les principales sources de pollution sont les rejets directs des eaux usées urbaines et hospitalières, les rejets des eaux traitées et l'épandage des déjections animales (fumier, lisier) comme fertilisants à la surface des terres agricoles (Frédéric and Yves, 2014; Kathryn D. Brown, 2004; Kemper, 2008; Michael et al., 2013; Mojica and Aga, 2011).

Les concentrations retrouvées dans les milieux naturels varient considérablement d'un endroit à l'autre, ce qui est corrélé d'une part avec les modes de consommation et les conditions environnementales (Michael et al., 2013). Par exemple, les antibiotiques à faible coût ont une consommation plus élevée dans les pays en voie de développement. Ils sont conséquemment

plus fréquemment retrouvés dans les milieux naturels en comparaison a des antibiotiques a coût plus élevé, comme par exemple les antibiotiques de la famille des macrolides (Segura et al., 2015). D'autre part, les types de procédés employés pour le traitement des eaux usées dans les STEP jouent aussi un rôle dans les concentrations rejetées aux milieux naturels (Michael et al., 2013).

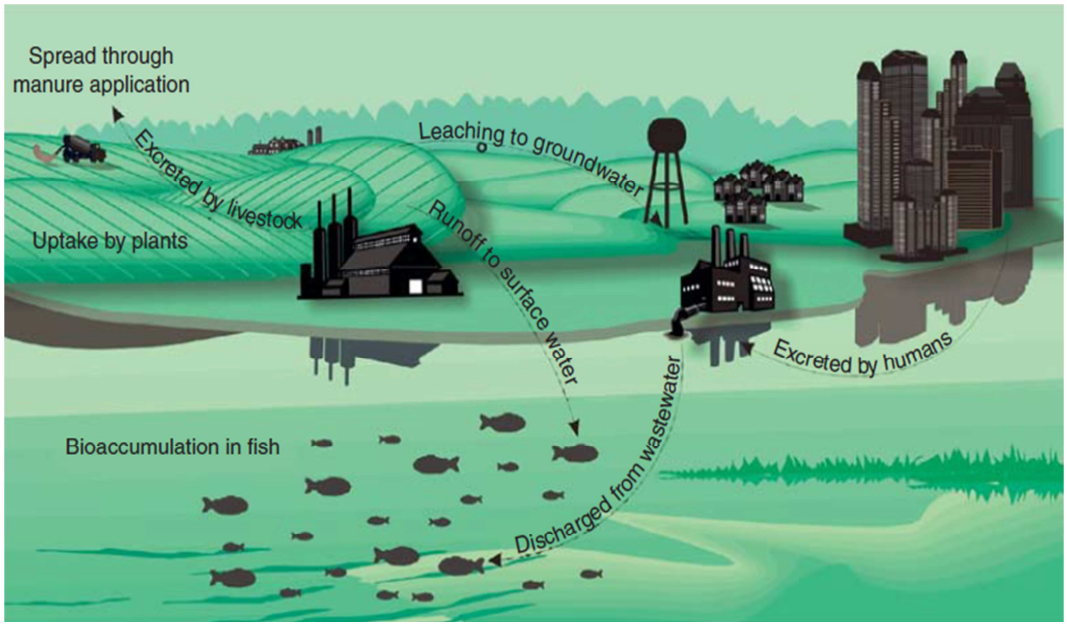


Figure 2 Sources et transfert des antibiotiques dans l'environnement (par Christine Klein dans Mojica and Aga, 2011).

En général, dans les milieux aquatiques les concentrations d'antibiotiques tendent à diminuer au fur et à mesure qu'on se déplace vers l'aval des sources de pollution (par exemple un site de décharge d'eaux traitées). Cette tendance est le résultat du processus d'assimilation naturelle dans les cours d'eau qui dépend de différents processus tels que : la dégradation (biotique et abiotique) et la sorption (Lunestad et al., 1995; Huang et al., 2001; Halling-Sorensen et al., 2002).

La problématique de la pollution des milieux naturels par antibiotiques n'est pas seulement liée à la présence du composé parent, mais aussi à la formation de métabolites dans les organismes ou lors de sa dégradation. Par ailleurs, la toxicité de ces composées de dégradation peut parfois être du même ordre ou plus élevée que celle du composée parent (Han et al., 2016; Hiba et al., 2016).

Ce type de pollution peut induire des problèmes de type:

a) Développement des populations microbiennes résistantes, incluant des organismes pathogènes (Goni-Urriza et al., 2000; Nwosu, 2001; Sengelov et al., 2003; Davies and Davies, 2010; Negreanu et al., 2012)

b) Altération de la structure des populations microbiennes naturelles et de la physiologie des microorganismes, induisant des perturbations des cycles biogéochimiques (Alexy et al., 2004; Martinez, 2009; Schauss et al., 2009).
c) Impacts toxicologiques.

2.2.1 Origine urbaine.

Parmi les différentes sources de pollution urbaine par antibiotiques, le milieu hospitalier est particulièrement important. L'activité médicale effectuée à l'intérieur de ceux-ci conduit généralement à une consommation élevée de molécules pharmaceutiques et à un taux d'excrétion élevée (Frédéric and Yves, 2014; Orias and Perrodin, 2013). Verlicchi et al., (2010) ont réalisé un étude sur des données publies et ont observé que les concentrations en antibiotiques retrouvées dans les effluents hospitaliers sont de cinq à dix fois plus élevées que dans les eaux usées urbaines. Il est important de remarquer que les eaux traites hospitalières sont rarement traites avant de rejoindre le système de collecte des eaux traites municipal.

Une étude sur les rejets en Allemagne a révélé qu'environ 277 antibiotiques et 114 antimycosiques émanant de l'utilisation en médecine humaine (hôpitaux et prescriptions médicales) sont libérés dans les effluents chaque année (calcul au niveau national pour l'année 1998). Les groupes les plus importants sont les pénicillines (54%), suivis par les céphalosporines (19%) et les sulfonamides (18%) (Alexy et al., 2000).

Les antibiotiques d'origine urbaine, milieu hospitalier inclus, rejoignent l'environnement après leur passage par les STEP ou lors des rejets directs des eaux usées. Lors du passage des eaux usées à travers les STEP certains antibiotiques sont partiellement éliminés. Leur élimination dépend de la structure et des propriétés moléculaires du composé, ainsi que du fonctionnement de la STEP (A.L. Batt et al., 2006; Giger et al., 2003; Ternes, 1998).

Typiquement, le traitement des eaux usées comprend les étapes de traitement suivantes : primaire, secondaire et parfois tertiaire. L'élimination des antibiotiques lors de ce traitement dépend principalement de leur adsorption sur les boues d'épuration et de leur dégradation ou transformation. L'hydrolyse peut jouer un rôle pour certains composés, tandis que la photolyse est peu probableen raison de la faible exposition des substances à la lumière pendant le traitement (Michael et al., 2013). Les principaux facteurs opérationnels qui peuvent influencer l'élimination biologique des résidus d'antibiotiques lors de leur traitement sont la demande biochimique en oxygène, la présence et la taille des compartiments anoxiques et anaérobies, la charge et sédimentation des solides en suspension, le temps de rétention hydraulique, le temps

de rétention des boues, le rapport substrats/microorganismes, le pH et la température (Drewes et al., 2006; Kovalova et al., 2012).

Plusieurs auteurs s'accordent à dire que les procédés biologiques (par exemple les boues activées) et ou chimiques utilisés séparément ne sont pas efficaces pour dégrader ou enlever la totalité des antibiotiques présents dans les eaux usées. Cependant, leur combinaison peut donner de meilleurs résultats. D'autres options de traitement telles que l'addition de charbon actif en poudre ou la désinfection par ozone, aux doses utilisées typiquement pendant le traitement, peuvent aussi dégrader en partie certains antibiotiques. Toutefois, des résidus d'antibiotiques ainsi que leurs produits de dégradation peuvent être rejetés et rejoindre les écosystèmes aquatiques (Adams et al., 2002; Garcia et al., 1995; Ingerslev and Halling-Sorensen, 2000). Une étude menée dans des cours d'eau du nord-est de l'Arkansas aux Etats Unis a montré que les rejets de STEP sont une source importante d'antibiotiques. Ainsi, des antibiotiques appartenant aux classes des macrolides, quinolones et sulfonamides ont été détectés dans les trois cours d'eau étudiés et plusieurs de ces antibiotiques ont aussi été retrouvés dans les sédiments du lit des rivières à des quantités significativement plus élevées que celles observées dans la colonne d'eau (Leslie B. Masseya et al., 2010).

2.2.2 Origine vétérinaire.

La figure 3 décrit les voies d'entrée des antibiotiques d'origine vétérinaire vers les écosystèmes terrestres et aquatiques.

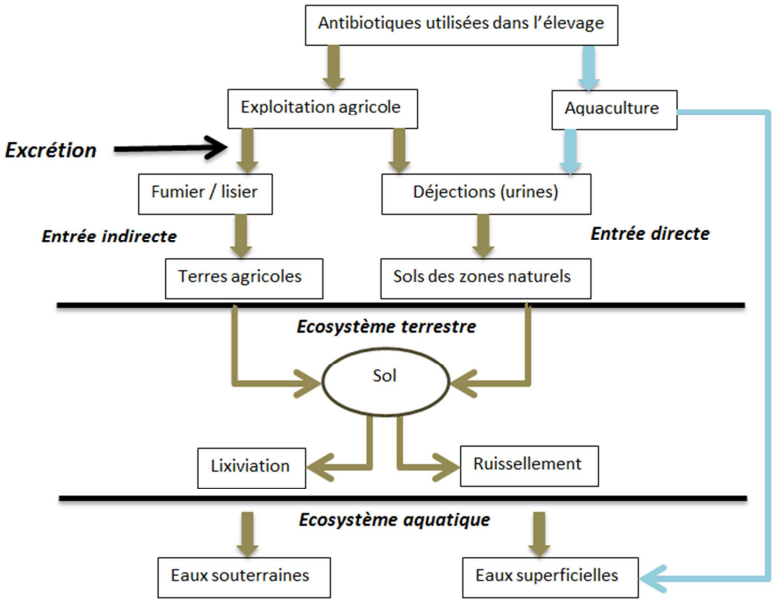


Figure 3 Voies d'entrée des antibiotiques d'origine vétérinaire vers les écosystèmes naturels (modifié d'après Kemper, 2008).

D’une manière générale, les antibiotiques d’origine vétérinaire atteignent les milieux naturels par l’application du fumier ou par les déjections directes des animaux. Une fois dans les sols ils peuvent lixivier ou ruisseler et contaminer ainsi les écosystèmes aquatiques de surface et souterrains. D’autre part, des antibiotiques sont libérés directement dans les milieux naturels lors de son utilisation dans l’aquaculture.

En Europe, plus de 2500 tonnes de tétracyclines sont utilisées chaque année dans le traitement vétérinaire, la famille des tétracyclines étant un des plus largement utilisés à ces fins. Chez les bovins, 75% de la chlortétracycline et 23% de l’oxytetracycline ingérés sont retrouvés dans le fumier (Halling-Sorensen et al., 2002; Mojica and Aga, 2011). Chez les porcs, jusqu'à 72% des tétracyclines sont retrouvés dans les excrétions. Zheng et al., (2012) ont détecté des tétracyclines a des concentrations de 2.8 à 42.4 μg kg^{-1} dans les sols agricoles fertilisés avec du fumier de porc en Chine.

Différentes études ont montré la présence des antibiotiques dans les excrétions des animaux d’élevage. Par exemple des concentrations de 20 mg kg^{-1} de SA ont été trouvées dans du fumier de porc et des concentrations de 300-900 mg kg^{-1} de sulfadiméthoxine ont été détectées dans des matières fécales fraîches provenant de veaux traités (Mojica and Aga, 2011).

2.2.3 Cadre réglementaire

La constitution d’un cadre réglementaire concernant les rejets et les limites des concentrations en antibiotiques et leurs métabolites dans les milieux s’avère difficile en raison des connaissances limitées sur leurs impacts, leur toxicité et leur devenir, ainsi que du grand nombre de composés rejetés. Les réglementations, européenne et française, relatives à la qualité des eaux ne prévoient actuellement pas de limites ou des norme relatives aux teneurs limites pour ces composés.

Cependant des produits pharmaceutiques ainsi que des antibiotiques commencent à être inclus dans la liste de vigilance relative aux substances soumises à surveillance à l'échelle de l'Union Européenne dans le domaine de la politique de l'eau en vertu de la directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil [notifiée sous le numéro C(2015) 1756].

Tel est le cas du stéroïde 17-alpha-éthinylestradiol (EE2), des estrogènes 17-bêta-estradiol (E2) et estrone (E1), de l’anti-inflammatoire Diclofénac et des antibiotiques appartenant à la famille des macrolides. Molécules incluses dans la liste en 2015.

En Suède, une classification environnementale des médicaments a été mise en place par le Stockholm County Council depuis 2005. L’objectif principal de cette classification est la

réduction des risques environnementaux liés à la présence de ces substances dans les milieux. Ce système de classification est utilisé dans l'examen de l'impact environnemental des produits pharmaceutiques inclus sur la liste dite Wise (Kloka Listan). Cette dernière est émise par le Comité Pharmaceutique et Thérapeutique et inclue les produits pharmaceutiques recommandés pour les maladies courantes dans le Stockholm County Council. Les substances pharmaceutiques sont classifiées selon leur persistance, leur potentiel de bioaccumulation, et leur toxicité en regard des organismes aquatiques (Stockholm County Council, 2014).

3. Devenir des antibiotiques dans les milieux naturels.

Les milieux naturels sont constitués de différents compartiments. On distingue principalement les compartiments aquatique, terrestre et aérien. Lesquels interagissent en permanence par le biais des transferts de matière ou énergie. Les constituants organiques, minéraux et biologiques de ces compartiments, mais aussi les conditions climatiques dans lesquels ils évoluent, vont influencer le devenir des molécules. Le terme *devenir* englobe les phénomènes de transport et transformation auxquels ces molécules vont être soumises. Que ce soit dans un compartiment déterminé ou dans l'ensemble des compartiments composant un milieu naturel. Dans ce travail de thèse nous allons nous intéreser plus particulièrement aux compartiments aquatiques continentaux et terrestres.

Les processus de transfert font référence aux processus de base associés au transport physique (convection, diffusion moléculaire et dispersion mécanique). Cependant, le transfert des molécules est aussi affecté par des phénomènes découlant de l'interaction de ces molécules avec les constituants des matrices poreuses et autres molécules présentes dans ces milieux. C'est la combinaison de ces deux processus (physiques et interactions chimiques) que l'on appellera ici « transfert réactif ».

Pour ce qui est des processus de dégradation on distingue deux types : les processus de dégradation chimique (ex ; hydrolyse, photodégradation) et les processus de dégradation biotique (biodégradation).

Il existe évidence sur le potentiel de bioaccumulation des antibiotiques dans les organismes et les chaines trophiques (Puckowski et al., 2016), même si les connaissances à ce sujet sont encore très faibles. Par exemple, Hu et al., (2010) ont observé que la distribution des antibiotiques dans les végétales étudiés était dans la séquence suivante : feuille > tiges> racines. La bioaccumulation des antibiotiques dans des espèces sauvages des poissons a été observé par Valdés et al., (2016). Dans cette étude, vingt produits pharmaceutiques ont été

observés chez *G. affinis* et quinze chez *J. multidentata* en lien avec la pollution de la rivière Suquía, dans la province de Cordoba (Argentina). Chen et al., (2015) ont étudié la bioaccumulation dans six fermes aquacoles marins situés dans l'île Hailing, Chine du Sud. L'Erythromycine a été l'antibiotique observe majoritairement chez le crustacé *Fenneropenaeus penicillatus* au stade adulte, a des concentrations allant de 2 498 au15 090 ng g-1.

D'une manière générale ces processus résultent de plusieurs facteurs interagissant entre eux : les propriétés intrinsèques de la molécule (ex ; charge, structure), les propriétés physico-chimiques (ex ; carbone organique, pH, teneur en eau, force ionique) et les propriétés biologiques du milieu (diversité et activité microbienne et fongique, rhizosphère, etc.). En outre, les conditions locales (ex ; température, précipitations, rayonnement UV) influent aussi sur le devenir des composés.

Les sols étant un lieu d'échanges et de transfert, il est considéré aujourd'hui comme le compartiment clef régulant la dynamique globale des polluants dans les milieux naturels. Ainsi il est détaille ici le processus de transfert réactif dans les sols.

3.1 Transfert réactif dans les sols.

3.1.1 Processus physiques.

Dans les milieux naturels terrestres, l'eau est le principal vecteur de transport des solutés. Le sol se compose d'une zone non saturée ou l'eau remplit incomplètement les interstices (le reste du volume étant occupé par l'air) et d'une zone saturée où l'eau occupe complètement la porosité du sol. La circulation de l'eau dans un milieu poreux tel que le sol est complexe du fait de l'hétérogénéité du milieu, c'est-à-dire sa structure poreuse.

Les hypothèses suivantes sont sous-jacentes aux expérimentations et modélisations dans la suite de la thèse :

- le profil de sol est constitué de couches superposées, chacune étant supposée être un milieu poreux homogène, incompressible et isotrope ;
- l'écoulement est unidirectionnel (vertical) et l'eau incompressible. L'axe des profondeurs (z) sera orienté positivement vers le bas, l'origine étant fixée à la surface du sol ;
- les mouvements sont supposés se passer en conditions isothermes ;
- l'eau dans le sol est toujours en phase liquide, les transferts en phase vapeur sont négligés ;
- les phénomènes d'hystérésis sont négligeables devant la variabilité spatiale du milieu (spécialement pour la relation pression-teneur en eau) ;

- l'existence admise d'un Volume Elémentaire Représentatif (VER) implique que les grandeurs hydrodynamiques ont un caractère continu dans ce volume.

La convection (ou advection), la diffusion moléculaire et la dispersion mécanique sont les phénomènes physiques majeurs influençant le transfert d'un soluté à travers un milieu poreux (Calvet, 2003; De Marsily, 1981).

Lors d'écoulements mono-dimensionnels, d ans un sol homogène, incompressible et isotrope, le flux de l'eau est décrit par la loi de Darcy. La convection d'un soluté correspond à la mobilisation des solutés par l'action du déplacement de l'eau dans le milieu poreux et est décrite par l'équation:

$$J_C = qC = -C\left[K(\theta)\frac{\partial H}{\partial z}\right] \quad (1)$$

Où q est la densité de flux de l'eau (m s^{-1}), C est la concentration résidente du soluté (mg L^{-1}), K (m s^{-1}) est la conductivité hydraulique du sol à la teneur en eau θ (m^3 m^{-3}), H représente la charge hydraulique (m) et J_c est la densité d eflux de convection du soluté étudié.

La diffusion moléculaire est lieé à l'existence d'un gradient de concentration des solutés dans le fluide et correspond à la migration des molécules des zones à fortes concentrations vers celles à faibles concentrations. Elle se produit même en absence d'écoulement et est donc indépendante de la vitesse du fluide. La diffusion moléculaire est représentée par la loi de Fick :

$$J_d = -D_{dif}\theta\frac{\partial C}{\partial z} \quad (2)$$

Où J_d est la densité de flux de difusion moléculaire, D_{dif} est le coefficient de diffusion (m^2 s^{-1}) et $\frac{\partial C}{\partial z}$ le gradient de concentration.

Les variations de vitesse de l'eau qui empruntent des chemins plus ou moins sinueux dans le réseau poral du sol entrainent une dispersion mécanique du soluté à l'intérieur du milieu. La densité de flux de dispersion mécanique J_{dm} est également proportionnelle au gradient de cconcentration et s'exprime par :

$$J_{dm} = -D_{meca}\theta\frac{\partial C}{\partial z} \quad (3)$$

où J_{dm} est la densité de flux de dispersion mécanique, D_{meca} le coefficient de dispersion (m^2 s^{-1}).

L'effet combiné de la dispersion mécanique et de la diffusion moléculaire est décrit par le terme de la dispersion hydrodynamique, D (m^2 s^{-1}), étant la somme du coefficient de dispersion mécanique et du coefficient de diffusion (Kutìlek and Nielsen, 1994).

Les solutés se déplacent à travers le sol essentiellement sous l'effet de la convection et de la dispersion. L'équation de transport de solutés est fondée sur les lois de conservation de la masse et des flux. Le flux total d'un soluté est décrit comme la somme des mouvements passifs de soluté par convection (J_c) et le mouvement de soluté par diffusion et dispersion (J_d), d'où :

$$J = J_d + J_c = qC - D\theta \frac{\partial C}{\partial z} \quad (4)$$

La loi de conservation de la masse est exprimée par l'équation de continuité : devient:

$$\frac{\partial(\theta C)}{\partial_t} = -\frac{\partial_J}{\partial_z} + \varphi \quad (5)$$

Où f est un terme puits.

Pour un soluté conservatif, l'équation de convection-dispersion (CDE) est obtenue à partir des équations 4 et 5 :

$$\frac{\partial(\theta \ C)}{\partial_t} = -\frac{\partial}{\partial_z}\left[-\theta D \frac{C}{\partial_z} + qc\right] \quad (6)$$

3.1.2 Réactivité des molécules antibiotiques.

Comme évoqué précédemment, les phénomènes de transport physique sont couplés à des phénomènes de nature chimique découlant de l'interaction des molécules avec les constituants du sol. La réactivité des molécules dépend à la fois de ses propriétés chimiques et des caractéristiques du milieu récepteur et se traduit principalement par des phénomènes de sorption/désorption. Les processus de sorption conditionnent ainsi l'aptitude des molécules à être mobilisées par l'eau dans le sol (Van Genuchten and Wierenga, 1976; Martins and Mermoud, 1998).

Les capacités de sorption des composées antibiotiques sont très variables. Par exemple, le métronidazole est très mobile tandis que la tylosine est fortement adsorbée (quelque soit le type de sol) (Díaz-Cruz et al., 2003).

Le coefficient de sorption K_d (rapport entre la concentration du composé dans le sorbant et en solution à l'équilibre) est souvent utilisé pour quantifier la sorption des molécules organiques. Il a été démontré que le K_d de nombreux produits chimiques organiques varie en fonction de la teneur en carbone organique (CO) du sorbant (Díaz-Cruz et al., 2003; Jacobsen and Berglind, 1988).

L'augmentation des phénomènes de sorption sur la phase solide provoque la diminution du transfert du polluant (Kurwadkar et al., 2011; Srinivasan et Sarmah, 2014). De la sorte, les composés à forte sorption auront tendance à s'accumuler, tandis que les composés peu réactifs

auront tendance à être transportés par ruissellement et drainage et même s'infiltrer vers les eaux souterraines (Díaz-Cruz et al., 2003). Srinivasan et Sarmah (2014) et Kodešová et al. (2015) ont montré que les antibiotiques de la famille des sulfonamides et spécialement le SMX ont un potentiel élevé de migration à travers le sol et sont donc susceptibles de polluer les eaux de surface, ainsi que les eaux souterraines. Cependant, un composé peut aussi se déplacer sous forme particulaire car adsorbé sur des colloïdes mobiles (argiles, matières organiques particulaires, oxydes metalliques) ce qu'on connait sous le nom du transport facilité (Amiard, 2011).

i) Mécanismes impliqués dans la sorption des molécules organiques.

Un certain nombre de mécanismes sont impliqués dans la sorption des composés organiques, tels que les antibiotiques, dans le sol (Calvet, 1989, 2003):

a) Liaisons ioniques :

Ce sont des liaisons formées entre des cations ou des anions et, respectivement, des charges négatives ou positives situées à la surface de l'adsorbant (matière organique, surface des constituants minéraux). Elles sont particulièrement importantes lorsqu'il s'agit de molécules ionisables. Pour les molécules sensibles aux changements de pH celui joue un rôle important puisque sa charge dépend du pH du milieu. Lorsque les charges du polluant organique et de l'adsorbant sont de même signe, des ions compensateurs de charge opposée, peuvent constituer des ponts ioniques entre les polluants et le sol.

b) Liaisons hydrogène :

Ce sont des liaisons électrostatiques établies entre les atomes possédant un ou plusieurs doublets électroniques libres (essentiellement l'oxygène, l'azote ou le soufre) et un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (tel que N ou O). Elles peuvent se former soit avec les groupements chimiques de l'adsorbant, soit indirectement sur l'adsorbant par l'intermédiaire de molécules d'eau présentes en surface.

a) Interactions avec des cations métalliques :

Deux types de liaisons sont possibles entre les ions métalliques (ex ; Ca^{2+}, Cu^{2+} Mg^{2+}, Fe^{3+} ou Al^{3+}) et les polluants organiques, les interactions dipôle-cation et liaisons de coordination avec des cations métalliques de transition.

b) Liaisons de London-Van der Waals :

Dans ce type de liaisons se trouvent impliquées les interactions dipolaires entre la phase liquide, les solutés et les surfaces solides. Il s'agit de forces électrostatiques dues aux mouvements des électrons qui changent d'orbitales atomiques.

c) Interactions hydrophobes :

L'adsorption par liaison hydrophobe est un mécanisme lié à la nature hydrophobe de certains polluants organiques, non ionisables, peu polaires et peu hydrosolubles. Ces molécules ont une plus grande affinité envers les éléments du sol de nature hydrophobe que pour l'eau présente dans le sol. Le coefficient de partition octanol-eau (Kow) utilisé en forme logarithmique est une mesure de l'hydrophobie des composés. Il s'ecrit:

$$\log Kow = \log (Co/Cw) \text{ .....(7)}$$

Où Co est la concentration du composé dans l'octanol, et Cw la concentration du composé non ionisé dans l'eau.

Le coefficient de distribution octanol-eau (D) est le ratio des concentrations à l'équilibre de toutes les espèces (ionisées et non ionisées) dans l'octanol et des mêmes espèces dans l'eau a une température donnée. Il diffère du Kow dans le fait que toutes les espèces et la forme neutre de la molécule sont considérées. Il est exprimé en forme logarithmique Log D. Ainsi, le Log D reflète le comportement des composés ionisables en solution a un pH donné. Cette propriété est utile dans l'évaluation des propriétés dépendantes du pH des molécules et le processus d'adsorption (Sangster, 1997).

d) Liaisons covalentes :

Elles résultent d'interactions interatomiques entre des sites spécifiques du composé organique et des sites spécifiques de l'adsorbant. Ces liaisons caractérisées par des énergies de liaison très élevées s'établissent essentiellement avec la matière organique du sol.

i.i) Transport avec interactions sol/soluté.

En raison des interactions entre le soluté et le milieu poreux (sol), la loi de conservation de la matière n'est pas respectée dans la phase aqueuse.

Dans le cas le plus simple on peut considérer que le processus d'adsorption est à l'équilibre, c'est-à-dire, linéaire, réversible et instantané. Les modèles le plus utilisés pour décrire la sorption à l'équilibre sont les modèles : linéaire, Freundlich ou Langmuir.

L'équation d'isotherme d'adsorption linéaire s'écrit de la manière suivante:

$$S = K_d \mathrm{C} \qquad (8)$$

où S est la concentration adsorbée sur la phase solide, $c$est la concentration en solution à l'équilibre et K_d est le coefficient de partage solide/soluté en question.

Le modèle de Freundlich est un modèle non linéaire défini par l'équation :

$$S = K_f C^m \qquad (9)$$

ou ; K_f et m sont des constantes.

Si *n* =1, l'équation se linéarise et on retrouve la relation exprimée par le modèle linéaire.

Le modèle de Langmuir fait l'hypothèse que le nombre de sites potentiels de sorption est limité, il s'exprime selon la relation suivante :

$$S = (\alpha\beta C)/(1 + \alpha C) \quad (10)$$

où α représente la concentration adsorbée maximale possible et β le coefficient d'adsorption.

L'équation de transport par convection-dispersion doit alors être complétée par un terme exprimant l'adsorption du soluté sur la phase solide. Ainsi, l'équation de convection-dispersion pour un soluté réactif peut être écrite comme suit :

$$\frac{\partial}{\partial_t}(\theta C + \rho_d S) = -\frac{\partial}{\partial_z}\left[-\theta D \frac{\partial C}{\partial_z} + qc\right] \quad (11)$$

ou, ρ_d est la masse sèche volumique du sol et *S*.

Si l'on considère que l'écoulement d'eau est en régime permanent et qu'on inclue l'équation d'isotherme d'adsorption linéaire dans l'équation de convection-dispersion (J Martins and Mermoud, 1999), on obtient:

$$R\frac{\partial C}{\partial_t} = D\frac{\partial^2 C}{\partial_{z^2}} - v \quad (12)$$

ou ; *v* est la vélocité moyenne de l'eau dans les pores et R le facteur de retard donnée par :

$$R = 1 + \frac{\rho_d K_d}{\theta} \quad (13)$$

Cependant, l'hypothèse d'équilibre ne permet pas toujours de simuler correctement le transport des composés organiques. Il est donc nécessaire de considérer les cinétiques d'adsorption/désorption ainsi que la possibilité de réversibilité incomplète de l'adsorption.

Dans ce cas, on utilise le modèle de convection-dispersion à deux sites de sorption où on considère que la sorption est instantanée dans le premier type de sites et dans les autres elle est gouvernée par une cinétique du premier ordre ; ce modèle est donné par l'équation suivante :

$$\beta R\frac{\partial C_1}{\partial_T} + (1-\beta)R\frac{\partial C_2}{\partial_T} + \mu_1 c_1 = \frac{1\partial^2 C_1}{P\partial z^2} - \frac{\partial C_1}{\partial_z} \quad (14)$$

où C_1 et C_2 sont les concentrations du soluté dans les sites 1 et 2 respectivement ; $T = vt/L$ est le temps adimensionnel ; $z = x/L$ est la coordonnée spatiale adimensionnelle ; $P = vL/D$ est le numéro de Peclet ; μ_1 est la constante de dégradation et ß le coefficient de partition entre les deux types de sites de sorption. Ce dernier est donné par :

$$\beta = \frac{\theta + \rho_d f K_d}{\theta + \rho_d K_d} \quad (15)$$

où *f* est la fraction des sites à l'équilibre.

3.2 Processus de dégradation.

Les processus impliqués dans la dégradation des antibiotiques dans les milieux naturels peuvent être de deux types : abiotiques et biotiques.

La ***photodégradation*** est un processus abiotique intervenant dans le devenir des produits pharmaceutiques comme le démontrent plusieurs études (De la Cruz et al., 2012; Niu et al., 2013; Ryan et al., 2011; Trovó et al., 2009a; Wu et al., 2011). En raison des différences de sensibilité à la lumière entre les différents composés, l'importance du processus de photolyse dans leur persistance est très variable. La photodégradation peut se produire par absorption directe des rayons solaires (photolyse directe) ou par réaction avec des réactifs intermédiaires transitoires tels que l'oxygène singulet (état excité de l'oxygène fondamental), des radicaux hydroxyles ou d'autres espèces très réactives retrouvées dans les eaux naturelles (photolyse indirecte) (Trovó et al., 2009b). Cependant, dans les milieux naturels, la photolyse peut être diminuée par la turbidité dans les milieux aquatiques.

Il a été démontré que les antibiotiques peuvent être dégradés sous l'action des rayonnes ultra violète (UV), l'ozone et sous conditions d'oxydation avancée (Andreozzi et al., 2003; Boreen et al., 2004; Trovó et al., 2009b; Wu et al., 2011; Yang Wu and Rai, 2011). Cependant, les voies de transformation et dégradation sous des conditions naturels ont été moins étudies. Les ions inorganiques et la matière organique dissoute (MOD) présents dans les milieux naturels peuvent conduire à l'absorption d'énergie lumineuse (Tong et al., 2011) et inhiber le taux de photolyse des composes antibiotiques. En outre, les molécules peuvent être soumises à une phototransformation dite indirecte, par laquelle le polluant est soumis à l'attaque d'espèces actives générées au cours de l'irradiation de substances photosensibles présents dans le milieu (par exemple les acides humiques très répandus dans les milieux aquatiques) (Andreozzi et al., 2003). Des autres substances présentes dans les milieux naturels, comme par exemple les acides humiques, peuvent absorber le rayonnement solaire et réduire ainsi le taux de photodégradation.

Une autre voie pour la décomposition abiotique des substances organiques dans les milieux est l'***hydrolyse***. Cependant, tous les composés ne sont pas sensibles à ce processus de dégradation. Par exemple, les sulfonamides et quinolones sont connues pour être résistantes à l'hydrolyse (Cetecioglu et al., 2013).

En ce qui concernent les processus biotiques, la ***biodégradabilité*** des composées antibiotiques s'est révélée être faible pour la plupart des composés étudiés (Alexy et al., 2004; Cristobal

Girardia et al., 2011; Zhang et al., 2012). Alexy et al., (2004) ont étudié la biodégradation de 18 antibiotiques en condition anaérobie, leurs résultats ont montré qu'il n'y a pas de biodégradation pour 17 des 18 molécules étudiées dont l'érythromycine, la tétracycline, le triméthoprime, le sulfaméthoxazole, l'ofloxacine et la vancomycine. Cependant, le potentiel de biodégradabilité entre les différentes molécules et les différentes études reste très variable. Par exemple, Bertelkamp et al. (2014) ont observé que le trimethoprime était une molécule biodégradable tandis que le SMX était plus persistant avec des coefficients de biodégradabilité nuls ou très faibles. Des etudes ont été amenées pour comprendre la biodegradation du SMX mais dans des boues d'epuration (Collado et al., 2013; P. Drillia et al., 2005, 2005; Müller et al., 2013; Yang et al., 2011). Cependant existe tès peu d'information sur sa biodegradabilité dans des conditons naturelles. A ce propos, Srinivasan and Sarmah (2014) and Xu *et al*, (2011) ont sugéré que la biodegradation peut etre un facteur important influençant le devenir du SMX dans des conditions naturels.

4. Impacts des antibiotiques sur les communautés microbiennes.

Les cellules procaryotes sont des organismes ubiquitaires présents dans les sols, les eaux, l'air, les organismes vivants ainsi que dans les environnements extrêmes. Parmis elles, les bactéries ont une importance considérable dans les cycles biogéochimiques, et sont utilisées par l'homme dans l'industrie alimentaire et la santé. D'autre part, il existe une multitude d'organismes bactériens pathogènes d'importance médicale. C'est sur les bactéries que se focalise la présente étude.

Les bactéries peuvent être visualisées et étudiées au niveau de leurs communautés; dans cette optique, une communauté bactérienne est un groupe de différentes espèces bactériennes, lesquelles coexistent dans un lieu et à un moment déterminé. Les principaux attributs d'une communauté sont la richesse spécifique, l'abondance de ses espèces, sa diversité, sa dominance et sa structure.

Une caractéristique essentielle des communautés est que les différents organismes qui la composent interagissent entre eux et établissent des relations horizontales et verticales.

Les communautés ne sont pas figées ni dans l'espace ni dans le temps et leurs attributs sont le résultat d'une multitude de processus endogènes (interactions intra et interspécifiques) et exogènes (conditions environnementales). Notamment, lors d'un événement de pollution, ces attributs peuvent être modifiés en provoquant, entre autres, l'émergence de nouvelles populations bactériennes dominantes, jusqu'à la dormantes ou minoritaires.

La pollution des milieux naturels par les antibiotiques peut avoir principalement deux types d'impacts. Le premier porte sur la composition et la structure des communautés bactériennes et peut conduire à la perturbation des cycles biogéochimiques. Le deuxième porte sur le développement de résistances bactériennes aux antibiotiques (emergence des populations resistantes, transferts horizontaux de gènes de résistance..), ce qui est d'autant plus préoccupant lorsque les bactéries résistantes sont aussi des bactéries pathogènes. Dans le cadre de cette thèse je m'intérese aux impacts de la pollution par antibiotiques dans les sols sur la structure des communautés et au développement de résistances bactériennes, notament par le suivi de deux gènes modèles, les gènes sul1 et sul2.

4.1 Résistance bactérienne aux antibiotiques.

La résistance bactérienne est contrôlée par des mécanismes tels que des modifications de perméabilité dans les parois bactériennes, la modification enzymatique de l'antibiotique, la modification de la cible des antibiotiques et l'expulsion du composé par des pompes à efflux (Figure 4).

Elle peut être *naturelle* ou *acquise*. La résistance *naturelle* fait référence à un caractère intrinsèque d'une espèce, elle est stable et transmise à la descendance. Au contraire, la résistance *acquise* résulte d'une modification du capital génétique bactérien et confère une tolérance à des concentrations plus élevées que celles qui inhibent les souches sensibles de la même espèce (Davies and Davies, 2010; van Hoek et al., 2011).

Dans le cas de la résistance acquise, les bactéries peuvent acquérir des nouveaux mécanismes de résistance par mutation ou par transfert de matériel génétique entre différentes cellules bactériennes. Dans le cas de la résistance par mutation, une fois la résistance développée elle est transférée directement à la progéniture lors de la réplication de l'ADN (Figure 5).

Pour ce qui est du transfert horizontal, les gènes de résistance bactérienne sont fréquemment contenus dans les éléments génétiques mobiles tels que, les plasmides ou les transposons. Ces derniers pouvant être transmis horizontalement (transmission de gènes entre espèces différentes) ce qu'on connait sous le nom de ***conjugaison*** (Davies and Davies, 2010). Les bactéries peuvent aussi absorber des parties de l'ADN se trouvant dans l'environnement lors de la mort et de la lyse des bactéries, processus appelé ***transformation***. Il a aussi été proposé que la bactériophagie (virus pathogènes pour les bactéries) peut agir comme mécanisme de transfert de résistance (Nwosu, 2001) ce qu'on connait sous le nom de ***transduction***. Ces mécanismes sont illustres sur la figure 5.

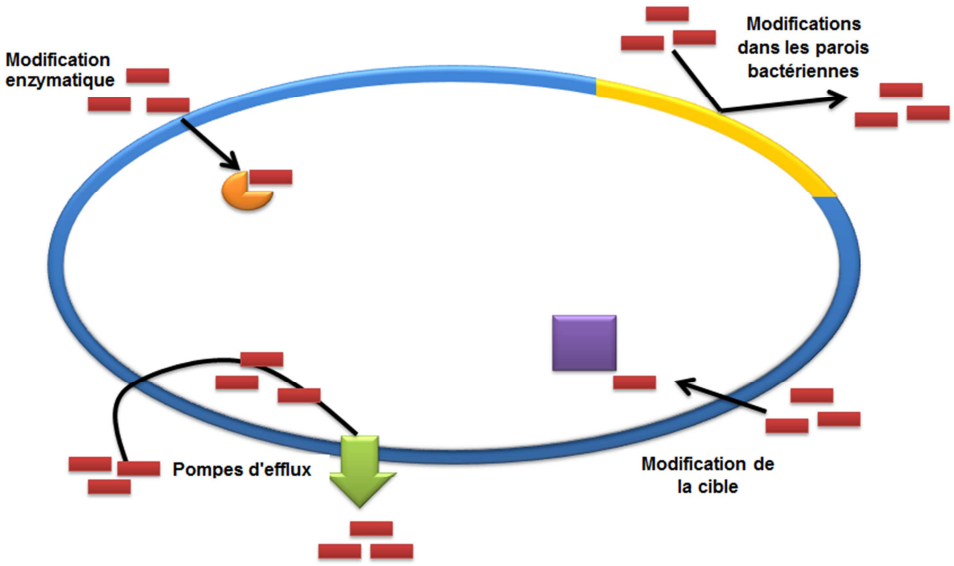


Figure 4 Principaux mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.

Il est bien documenté que l'utilisation des antibiotiques dans le traitement médical (humain et vétérinaire) et comme facteur de croissance dans l'élevage a mené au développement de souches bactériennes résistantes (Binh et al., 2008; Blanco et al., 2009; Kümmerer and Henninger, 2003; Lee et al., 2001; Negreanu et al., 2012).

Les bactéries résistantes peuvent être sélectionnées soit au sein de l'hôte traité soit dans les milieux pollués (Schauss et al., 2009; Sengelov et al., 2003; Top et al., 1990). Les effluents et résidus provenant des zones urbaines et des élevages animaux, ainsi que le fumier utilisé à des fins agricoles, peuvent non seulement contenir des antibiotiques mais aussi porter des bactéries résistantes (Kemper, 2008; Martinez, 2009; Rizzo et al., 2013). Sengelov et al. (2003) ont constaté qu'un grand nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques sont disséminés dans les terres agricoles lors d'amendements avec du fumier de porc. Schmitt et al. (2005) ont aussi observé que l'amendement des sols avec du fumier de porc favorise le développement de résistances. Cependant, la présence d'antibiotiques n'est pas toujours corrélée à la présence et sélection de résistances (Sengelov et al., 2003). Par ailleurs, des gènes de résistance bactérienne ont déjà été retrouvés dans des environnements n'ayant jamais été en contact avec des antibiotiques (Pallecchi et al., 2008). Par exemple, les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent migrer entre les systèmes aquatiques connectés, dans ce cas, la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans des écosystèmes jamais exposés est le résultat de la migration des bactéries résistantes (Martinez, 2009).

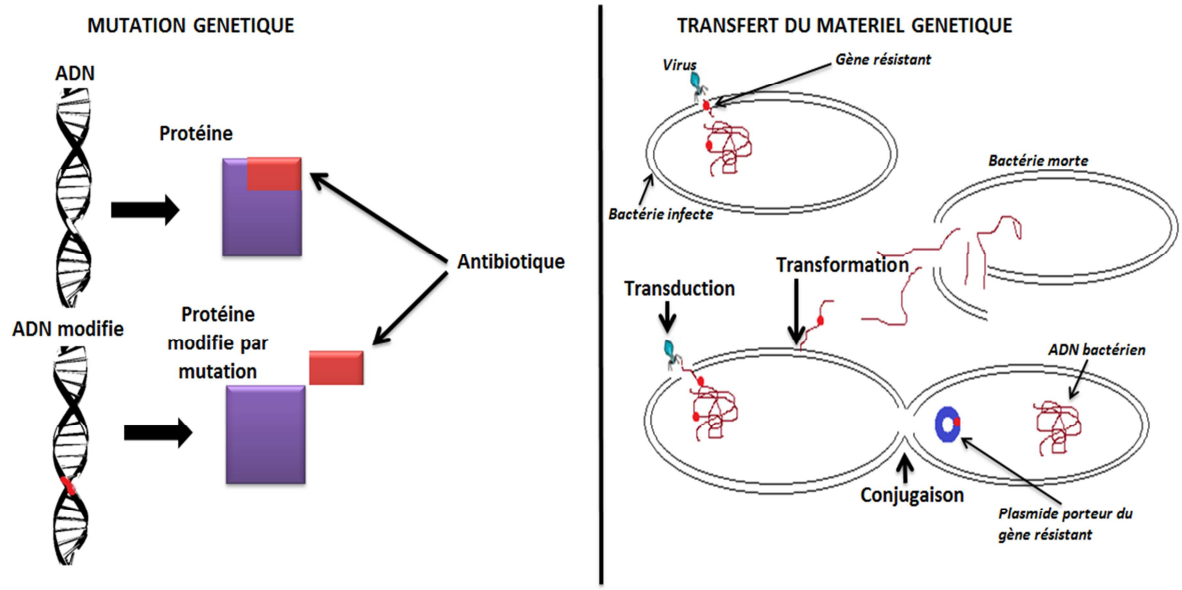


Figure 5 Voies d'acquisition de résistance bactérienne aux antibiotiques par mutation et transfert du matériel génétique.

4.2 Persistance des gènes de résistance bactérienne aux antibiotiques dans l'environnement.

La dissémination et la prévalence des gènes de résistance bactérienne aux antibiotiques dans l'environnement dépendent d'une variété de mécanismes génétiques et des facteurs de sélection/co-sélection (Nazaret and Aminov, 2014). Parmi les différents mécanismes impliqués dans la persistance des gènes de résistance aux antibiotiques, certains sont corrélés à la physiologie bactérienne (coût métabolique) et d'autres aux processus génétiques impliqués dans le transfert des déterminants de la résistance (Figure 6).

Lors de la présence d'antibiotiques (pression sélective), les bactéries portant des gènes de résistance seront sélectionnées naturellement et confèreront ces gènes de résistance à leur descendance ou eventuellement les transféreront à d'autres espèces bactériennes (transfert horizontal), ce qui augmentera progressivement le nombre de bactéries résistantes au sein de la communauté. Il a été supposé que la résistance aux antibiotiques représente un coût métabolique, raison pour laquelle, en absence de pression sélective les bactéries résistantes seraient désavantagées face à leurs homologues de type sauvage (Rysz et Alvarez, 2004). Cependant ceci n'est pas toujours vrai. En effet, dans certains cas même si l'incidence de résistance diminue cette diminution est lente et une partie de la population résistante perdure. Cela a été d'ailleurs prédit par certains modèles mathématiques (Andersson, 2003; Levin, 2002; Martinez, 2009).

En fait, le coût métabolique de la résistance bactérienne n'est pas toujours le même, comme l'ont montré Balsalobre et de la Campa, (2008) chez la bactérie *Streptococcus pneumoniae* résistante à la ciprofloxacine. Par ailleurs, Zhang et al. (2006) et Luo et al. (2005) ont observé que certains mécanismes de résistance n'ont aucun coût métabolique.

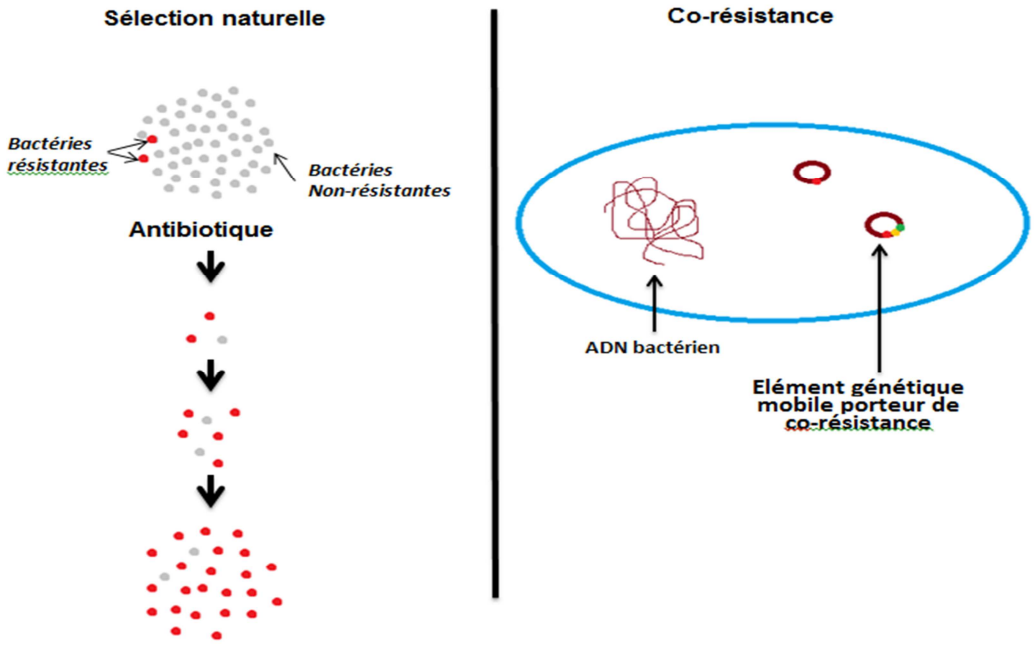


Figure 6 Mécanismes impliquées dans la persistance de résistance bactérienne aux antibiotiques.

D'autre part, étant donné que les gènes de résistance aux antibiotiques sont généralement localisés dans les éléments génétiques mobiles (ex ; transposons, intégrons, plasmides), la structure et la dynamique de ces éléments a aussi un impact sur sa persistance. Ces éléments mobiles peuvent contenir d'autres gènes conférant des avantages adaptatifs divers à leurs hôtes et ils seront donc transférés simultanément (Martinez and Perez-Diaz, 1990; Rodríguez-Martínez et al., 2011). Cela a été observé dans le cas des intégrons (Chen et al., 2009; Luo et al., 2005; Ploy et al., 2005) et des plasmides (Martinez and Perez-Diaz, 1990; Rodríguez-Martínez et al., 2011). Par exemple, l'existence des gènes de résistance aux antibiotiques et des gènes de résistance aux métaux lourds dans le même plasmide (co-résistances) peut permettre le maintien de la résistance aux antibiotiques, en l'absence d'antibiotiques dans les milieux pollués aux métaux lourds (Baker-Austin et al., 2006). De cette manière, le mécanisme de co-sélection peut jouer un rôle important dans la persistance de la résistance aux antibiotiques en l'absence de l'antibiotique correspondant (Figure 6).

5. Les sulfonamides : focus sur le Sulfamethoxazole (SMX).

Les sulfonamides sont des composés organosulfurés, c'est-à-dire qu'ils comportent au moins un atome du soufre, contenant le radical amine SO_2NH_2. Les membres de cette famille diffèrent par la substitution de différents groupes R. La figure 7 montre la structure de base des sulfonamides et différents antibiotiques appartenant à cette famille ainsi que ses groupes R.

Leur usage remonte aux années 1930. Les sulfonamides ont une structure similaire à l'acide p-aminobenzoïque et inhibent la synthèse d'acides nucléiques en bloquant la transformation de l'acide p-aminobenzoïque en acide dihydrofolique (une forme réduite de l'acide folique) (Sköld, 2000). Leur action est principalement bactériostatique. Elles ont un large spectre d'action, mais le développement généralisé de leur résistance et les effets secondaires occasionnés ont considérablement réduit son utilisation (Cetecioglu et al., 2013; Schauss et al., 2009).

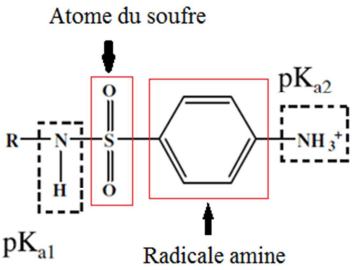
Les SA sont mal absorbées dans l'intestin, de sorte qu'entre 50% et 100% de la dose administrée est excrétée sous forme inchangée dans les urines et les matières fécales (Mojica and Aga, 2011; Schauss et al., 2009). La composition des SA excrétées peut contenir environ 30 - 95% des composés de base, et entre 5% et 60% des conjugués acétylés (métabolites). De plus, les métabolites des SA peuvent être reconvertis en leurs composés parents pendant le stockage et l'épandage de fumier sur le sol (Mojica and Aga, 2011).

La sorption des SA dans le sol est complexe. A ce propos, Bialk et Pedersen, (2008) ont montré que les SA sont capables de former des liaisons covalentes avec les substances humiques, en formant ce qu'on appelle une fraction résiduelle. Leur sorption devient plus prononcée avec un temps de contact prolongé avec l'adsorbant. Elle est également influencée par divers facteurs tels que le pH, la force ionique du sol et la présence de métaux (Mojica and Aga, 2011; Morel et al., 2014a; Schauss et al., 2009).

La présence de matière organique présente par exemple dans le fumier ou les boues d'épuration pourrait aussi influer sur son devenir. La matière organique dissoute (MOD) présente dans le fumier, réduit l'affinité des SA avec le sol et induit un transport colloïdal facilité (Mojica and Aga, 2011). Les SA peuvent être immobilisées en raison de leurs liaisons avec des matières organiques comme le compost, les acides humiques et des adsorbants inorganiques tels que les 'hydroxydes de fer ou des minéraux argileux.

En général, les SA ont une grande solubilité dans l'eau et des faibles valeurs de Kd (coefficient de partage sol-eau). Les valeurs signalées de K_d pour cette famille d'antibiotiques

vont de 0.6 à 4.9 L kg^{-1}. Ce qui indique qu'ils peuvent être mobiles dans les sols et sont susceptibles d'être présents dans les écosystèmes aquatiques de surface et les eaux souterraines. Ainsi, des SA ont déjà été détectées dans les eaux des rivières, les eaux souterraines, les eaux usées, les eaux de puits, et même dans l'eau potable (Kümmerer, 2009; Mojica and Aga, 2011; Tamtam et al., 2008). Plusieurs auteurs ont observé que le K_d des SA varie selon la texture et les caractéristiques minéralogiques et chimiques des sols (Boxall et al., 2002; Lertpaitoonpan et al., 2009; Thiele-Bruhn S and Aust MO, 2004).



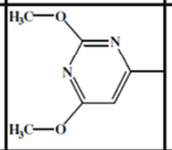
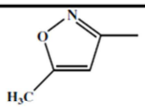
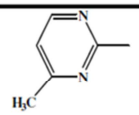
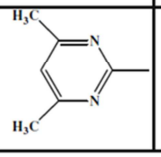
Compound	R_1	Log K_{ow} [d]	pK_a [c]
Sulfadimethoxine (SDM)		1.63	1.87 5.86
Sulfamethoxazole (SMX)		0.89	1.83 5.57
Sulfamerazine (SMR)		0.14	2.17 6.77
Sulfamethazine (SMT)		0.28	2.28 7.42

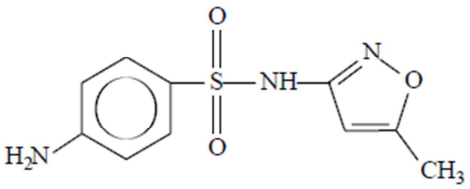
Figure 7 Structure de base des sulfonamides et différents antibiotiques appartenant à cette famille d'antibiotiques (modifié d'après: Figueroa-Diva et al., 2010).

Cependant, d'autres auteurs ont observé que les SA peuvent persister pendant de longues périodes dans les sols (Schauss et al., 2009) en raison d'une biodégradabilité lente, et cela même dans des substrats ayant une communauté microbienne élevée (Mojica and Aga, 2011). Concernant ces effets, il a été signalé que certaines SA ont une incidence sur l'activité microbienne en général et sur la structure des communautés bactériennes. Par exemple, un incrément de la biomasse des champignons au détriment des bactéries a été observé en présence de cette famille d'antibiotiques (Thiele-Bruhn and Aust, 2004; Zielezny et al., 2006). Parmi les SA, le SMX est couramment détecté dans les milieux naturels (aquatiques et terrestres) (Hoa et al., 2011 ; Alighardashi et al., 2008; Gibs et al., 2013; Giger et al., 2003; Hoa et al., 2011; Hu et al., 2010; Karthikeyan and Meyer, 2006; Kemper, 2008; Kim et al., 2011; Leung et al., 2012; Li et al., 2013; Martínez-Carballo et al., 2007; Michael et al., 2013; Mojica and Aga, 2011; Tamtam et al., 2008; Zuccato et al., 2010). Ce qui est en lien avec ses propriétés intrinsèques mais aussi à sa consommation assez courante en médicine humaine et animale.

5.1 Présence du SMX et devenir dans les milieux naturels.

En thérapie humaine le SMX (en association avec le TMP) est une des prescriptions les plus couramment utilisées en raison de son large spectre d'action et son faible coût. Le nom systématique du SMX est la 4-amino-N-(5-méthylisoxazole-3-yl)benzènesulfonamide (Figure 8).

Environ 45-70% de la dose administrée est excrétée sous forme inchangée dans l'urine dans les 24h suivant le traitement (McEvoy, 2006). Pour ce qui est des métabolites, environ 50% de la dose administrée chez les humains peut être excrété comme le métabolite N_4-acetylsulfamethoxazole (Michael et al., 2013).



$C_{10}H_{11}N_3O_3S$ Relative molecular mass: 253.28

Figure 8 Structure moléculaire de l'eantibiotique Sulfamethoxazole (SMX).

Le SMX est partialement dégradé dans les STEP. Ainsi, Peng et al., (2006) ont observé un taux d'élimination de 100% dans une STEP en Chine. Tandis que, Yu et al., (2009) ont observée des taux d'élimination de l'ordre de 65 à 96% dans une STEP taïwanaise.

Sa sorption dépend principalement de ses propriétés moléculaires (structure, potentiel d'ionisation, solubilité, K_d), des propriétés de l'adsorbant (contenu en argile, hydroxydes, oxydes, matière organique (MO)) et des caractéristiques de la phase liquide (notamment le pH, la teneur en eau du milieu adsorbant et la force ionique).

Le SMX est une molécule ionisable (Figure 10) qui présente un comportement variable en fonction du pH de la solution dans laquelle elle se retrouve ce qui affecte sa sorption dans les sols. Elle contient deux protons échangeables (pKa1 =1.6; pKa2 = 5.7) (Srinivasan et al., 2013). La figure 9 montre la spéciation pH-dépendante du Sulfamethoxazole.

Dans l'environnement, le SMX est présent le plus souvent sous des formes neutre (non chargée) et anionique (déprotonée), cette dernière étant plus abondante à des valeurs de pH plus élevées. Les mécanismes d'interaction possibles de cette molécule organique chargée sont : les échanges ioniques, les interactions polaires et les transferts de charge ainsi que les interactions de van der Waals (Calvet, 1989; Díaz-Cruz et al., 2003; Kim et al., 2011; Srinivasan et Sarmah, 2014; Srinivasan et al., 2013; Srinivasan et al., 2014).

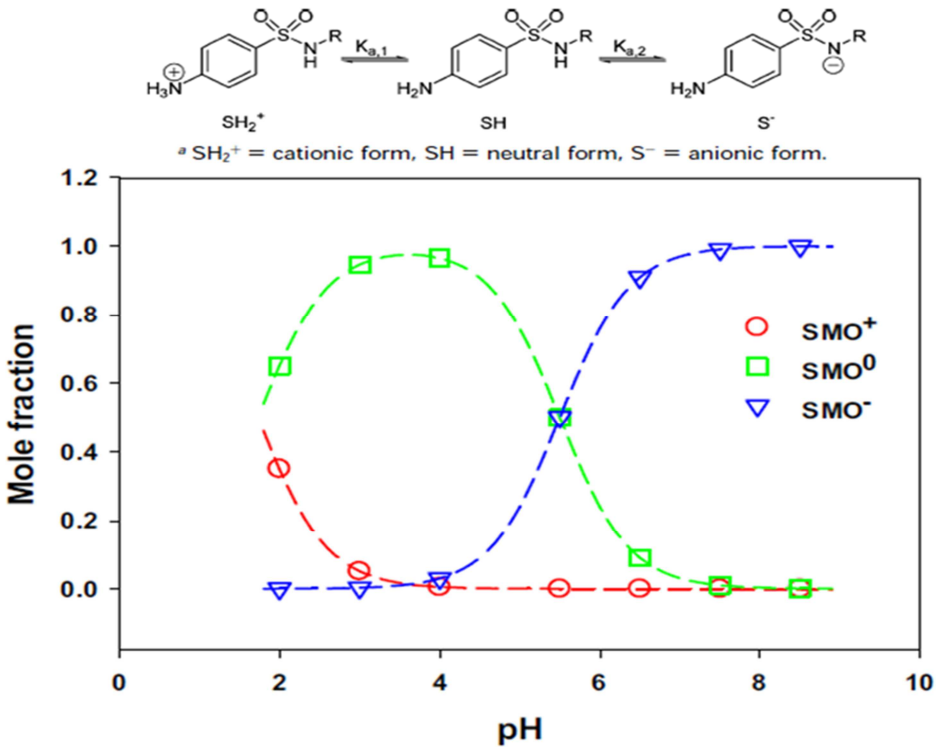


Figure 9 Spéciation pH-dépendante du Sulfamethoxazole (Modifié à partir de: Srinivasan et al., 2013). pKa1 : 1.7. pKa2 : 5.6.

La teneur en MO, le pH et la capacité d'échange cationique sont des paramètres du sol qui influent fortement sur l'adsorption du SMX. Il a aussi été observé que l'adsorption du SMX tend à être supérieure dans les sols avec des teneurs élevées en oxydes d'Al et Fe (Leal et al., 2013). En outre, Morel et al., (2014) ont montré que la sorption du SMX augmente fortement en présence du cuivre due à la formation de complexes SMX-Cu. La partition hydrophobe peut aussi jouer un rôle important dans la sorption du SMX. Srinivasan et al., (2014) ont observé que la sorption du SMX dans les sols est due principalement à des interactions hydrophobes médiées par le carbone organique du sol.

A part la sorption, les processus de dégradation abiotique et biotique peuvent aussi influencer le devenir du SMX. En effet, cette molécule étant photosensible (dans la gamme entre 240 et 310 nm) elle pourrait être soumise au processus de photodégradation (Abellán et al., 2009). Cela a été observé par Andreozzi et al., (2003) et Trovó et al., (2009).

Boreen et al., (2004) ont constaté que le SMX est dégrade principalement par photolyse directe. Tandis que Ryan et al., (2011) ont observé un taux de photolyse directe d'environ 48% dans des eaux usées. Il a été montré qu'à des valeurs de pH environnementaux le SMX est plus stable à la dégradation photochimique. Boreen et al., (2004) et Moore et Zhou, (1994) ont observé que le SMX se dégrade plus rapidement dans sa forme neutre et cationique, tandis que la forme anionique (forme la plus répandue à des valeurs de pH environnementaux) se

dégrade beaucoup plus lentement. Bahnmüller et al., (2014) ont observé (sous lumière naturelle simulé) que le SMX réagi principalement par phototransformation directe mais avec une certaine contribution de phototransformation indirecte. Ryan et al., (2011) ont constaté que la photolyse indirecte était un processus de dégradation importante pour le SMX dans les eaux usées. Niu et al., (2013) ont montré que les acides fulviques diminuent le taux de photodégradation du SMX. Le même effet a été observé pour les sédiments en suspension, les valeurs de pH plus élevées et la présence de substances synthétiques (Niu et al., 2013).

D'autre part, certains auteurs ont observé que la biodégradation pourrait jouer un rôle important dans sa dissipation en conditions naturelles (Srinivasan and Sarmah, 2014b; Xu et al., 2011). Cetecioglu et al., (2013) ont étudié la biodégradabilité anoxique du SMX dans des boues et sous différents conditions (nitrato-réductrices, sulfato-réductrices et méthanogéniques). Le taux d'élimination observé dans la phase liquide a été de 70%, la plupart de l'antibiotique étant éliminé pendant les 60 premiers jours. Au contraire, Bertelkamp et al., (2014) ont montré que le SMX est peu ou non biodégradable dans le sol.

5.2 Résistance bactérienne aux Sulfonamides (SA)

La résistance bactériene aux SA peut être gouvernée par une variété de mécanismes comme par exemple (Huovinen, 2001) :

i) perméabilité des parois bactériennes et ou pompes à efflux,
ii) insensibilité des enzymes cibles
iii) modifications des enzymes cibles par mutation ou recombinaison
iv) résistance acquise (grâce à des enzymes cibles résistantes)

Köhler et al., (1996) ont démontré que le pompes à efflux sont un mécanisme conférant de la résistance au SMX chez *Pseudomonas aeruginosa*. La résistance aux sulfonamides contrôlée par mutation ou recombinaison a été observée chez de nombreuses bactéries d'importance clinique tels que *Escherichia. coli*, *Staphylococcus. aureus*, *Staphylococcus. pyogenes*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori* (Huovinen, 2001). Le transfert des gènes de résistance aux sulfonamides entre les bactéries *E. coli* et *Shigella* est un exemple de résistance acquise. Akiba et al., (1960) l'ont prouvé lors de la mise en contact de différents souches de *Shigella* (non-résistants) avec des souches multi-résistants de *E. coli* ce qui a produit l'apparition des clones multi-résistants de *Shigella*.

La résistance acquise aux SA est contrôlée par les gènes « *sul1* », « *sul2* » et « *sul3* » codant pour le Dihydropteroate synthase (DHPS) et conférant une insensibilité aux sulfamides. L'origine exacte de ces gènes reste inconnue (Perreten and Boerlin, 2003; Sköld, 2000). L'identité en acides aminés entre les DHPS codées par les gènes « *sul1* » et « *sul2* » est de seulement 57% (Huovinen, 2001; Huovinen et al., 1995). L'existence du gène « *sul3* » a été mis en évidence par Perreten and Boerlin, (2003).

Les gènes « *sul1* » et « *sul2* » ont été retrouvés en grande quantité dans les milieux naturels par certains auteurs (Binh et al., 2008; Heuer et al., 2008). En outre, Bartoloni et al., (2006) ont observé ces mêmes gènes de résistance chez des enfants en bonne santé en Bolivie, ce qui prouve l'existence d'une problématique de résistance bactérienne aux sulfonamides dans le pays où se trouve notre site d'étude. .

6. Modélisation du devenir des antibiotiques et évaluation du risque environnemental.

Cette synthèse montre que le transport des composés organiques est lié à des processus physiques, chimiques et microbiologiques complexes et couplés. Pour décrire ces processus, différents modèles ont été développés qui servent comme outils de prédiction du devenir des molécules chimiques et d'évaluation des risques environnementaux correspondants (Koormann et al., 2006). La modélisation nous permet aussi d'identifier et hiérarchiser les facteurs de contrôle (physico-chimiques, environnementaux, ou d'origine anthropique) du devenir des contaminants (He et al., 2016). On distingue généralement les modèles déterministiques et les modèles stochastiques. Ici, on s'intérese aux modèles déterministiques qui supposent qu'un système réagit à un évênement d'une seule façon.

Le modèles géo-référencées (GIS) ont été proposés comme des outils appropriés pour l'étude du devenir et du risque environnemental car ils permettent de mieux comprendre la variabilité spatiale des concentrations à l'échelle de bassin versant (Feijtel et al., 1997; Keller, 2006).

A ce jour d'aujourd'hui, un large éventail de modèles ont été développés à ces fins. Ces modèles varient principalement dans leur complexité. Parmi les modèles géo-référencés, on distingue principalement deux types de modèles : les modèles multi-compartiments et les modèles de qualité de l'eau (in-stream water quality models) (Keller, 2006).

Dans les modèles multi-compartiments, l'environnement est divisé en différents compartiments, par exemple, air, eau, sol, sédiments, sédiments en suspension, biota, dans lesquels les concentrations chimiques sont estimées. Ces modèles sont basés sur l'approche de la fugacité : on part d'un flux diffus émis dans un environnement standard pour établir les

caractéristiques à l'équilibre de la répartition du produit entre les différents compartiments du milieu, en prenant en compte la sorption, la volatilisation, le dépôt, la lixiviation, ainsi que la dégradation. Les concentrations à l'équilibre sont calculées en fonction des flux émis (Mackay D., 2001). Les concentrations ainsi obtenues sont comparées avec des doses journalières moyennes (DJM) admissibles pour évaluer la toxicité pour l'homme ou aux concentrations maximales sans effets observés (PNEC) pour estimer l'impact du polluant sur les écosystèmes terrestres et aquatiques. La principale limite de cette méthode est la nécessité d'un grand nombre de données, propres à chaque substance chimique et chaque compartiment (Van der Werf, 1997). Parmi les nombreux modèles multi-compartiments disponibles, les plus couramment utilisés sont les modèles Mackay et le modèle EUSES (European Union System for the Evaluation of Substances) (Keller, 2006).

Les modèles de qualité de l'eau consistent en l'intégration des processus auxquels sont soumis les polluants (par exemple ; sédimentation, dégradation, sorption) et les approches hydrologiques et hydrauliques. Ces modèles sont très utilisés pour la prédiction des concentrations environnementales (PEC) en polluants. Les plus courants de ces modèles sont Mike 11, QUAL2E, TOMCAT et GREAT-ER (Hüffmeyer et al., 2009; Jagiello et al., 2015). Ces modèles peuvent être appliqués avec des données relativement limitées pour fournir une estimation (valeur unique) du risque au sein du compartiment (Keller, 2006).

L'évaluation des risques est la détermination scientifique de ces caractéristiques, par exemple, l'ampleur, l'échelle spatiale, la durée, l'intensité des conséquences et ça probabilité, la description des liens de cause à effet. Pour cela on peut avoir recours à la modélisation, la surveillance, le dépistage et le diagnostic (Fisher, 1980).

Les méthodes d'évaluation des risques peuvent être qualitatives, quantitatives et semi-quantitatives. Les méthodes qualitatives comprennent l'analyse S-P-R (Source-pathway-receptor), des méthodes de classement et des arbres d'événements qualitatifs. Cependant ces sont inévitablement plus subjectives que les méthodes quantitatives. Les méthodes quantitatives comprennent des évaluations quantitatives d'exposition, l'analyse quantitative arbre de défaillance, l'estimation du risque simple déterministe et des techniques de simulation de Monte Carlo. Les méthodes semi-quantitatives comprennent le classement, la notation, l'indexation, les critères de causalité et des systèmes basés sur la logique. Ces procédés sont également subjectives, semblables aux procédés qualitatifs (Gormley et al., 2011).

Dans de nombreuses évaluations des risques écotoxycologiques, le rapport des concentrations environnementales mesurées ou estimées (PEC) / la concentration estimée sans effet (PNEC)

est utilisé pour évaluer l'importance du risque pour les écosystèmes cibles (Grill et al., 2016; Kehrein et al., 2015; Keller, 2006). Cette approche nécessite également une prise en compte des incertitudes dans les estimations de l'exposition lors de l'interprétation du rapport.

7. Conclusion et questionnements de la thèse.

Cette synthèse bibliographique a permis de mettre en évidence la problématique actuelle liée à la pollution des milieux naturels par les molécules antibiotiques. Avec d'une part, la diversité des molécules retrouvées dans les milieux et d'autre la complexité des mécanismes intervenant dans leur devenir. Principalement, sa réactivité et sa dégradabilité vis-à-vis des conditions des milieux récepteurs et vis-à-vis d'autres molécules se retrouvant aussi dans l'environnement (ex : métaux).

On a aussi souligné les effets potentiels sur le développement de résistances bactériennes. Cependant, faute des connaissances sur leur devenir, leur persistance et leurs effets écotoxicologiques, l'étendue des risques environnementaux et sanitaires associés à la présence des antibiotiques dans les milieux naturels reste encore méconnue et non predictible. Cela explique pourquoi un cadre réglementaire pour la protection des milieux vis-à-vis des antibiotiques est encore aujourd'hui inexistant alors qu'ils sont considérés comme un des groupes le plus importants parmi les polluants émergents.

Dans le cadre de cette thèse je m'intéresse à l'étude, la compréhension et l'identification des processus majeurs intervenant dans le devenir des molécules antibiotiques dans l'environnement, à leurs effets possibles sur les populations bactériennes (cibles principales de ces composés) et à l'évaluation du risque lié à la présence de ces composées dans l'environnement (risque écotoxicologique). Plus particulièrement on s'intéressera au cas d'un environnement de haute altitude : l'Altiplano bolivien, où ce type de pollution reste aujourd'hui très peu étudié. Un modèle numérique sera appliqué pour l'étude du devenir de cette molécule dans les eaux de surface du site d'étude, a fin de prédire les concentrations environnementales de ces molécules. La modélisation s'est révélé un outil indispensable pour l'étude du devenir des antibiotiques dans l'environnement a fin de permettre la prédiction des concentrations environnementales et par conséquent les risques associés.

Vue la grand variété des produits pharmaceutiques retrouvés dans les milieux naturels, et pour permettre une étude approfondie sur les processus impliqués, ces travaux de thèse s'appuient sur l'étude du Sulfamethoxazole (SMX) comme composé modèle. Cette molécule a été choisie car elle est fréquemment détectée dans les milieux naturels, ansi que dans le site

d’étude (Duwig et al., 2014a), pour ses propriétés moléculaires qui la rendent hautement mobile, et pour son potentiel du développement de résistances bactériennes.

Ainsi, les questions de base de ces travaux de thèse sont les suivantes :

- Quel est l’état actuel de pollution du site d’étude (molécules antibiotiques et autres contaminants possiblement complexantes)?
- Quels sont les sources de pollution par les antibiotiques?
- La résistance bactérienne aux antibiotiques est-elle présente? Si oui, y a-t-il un lien entre la présence d’antibiotiques et la présence de résistances bactériennes aux mêmes composées ?
- Quelles sont les facteurs majeurs influençant le devenir et la persistance du composé modèle dans un environnement de haute altitude?
- Quels sont les impacts de la présence du composé modèle sur la structure des communautés bactériennes ainsi que sur le développement de résistances bactériennes?
- Quel est la mobilité du composé modèle dans le sol et a l’échelle du bassin versant (BV) ?
- Existe-t-il un risque de pollution des eaux souterraines par les antibiotiques?
- Un modèle numérique existant peut-il être envisagé comme outil de simulation et prédiction des concentrations en antibiotiques dans les eaux de surface du bassin versant ?

CHAPITRE II. Matériels et méthodes.

1. Description du bassin versant du Katari.

1.1 Localisation.

Le site d'étude est le bassin versant (BV) du Katari situé dans la partie ouest de la Bolivie avec une superficie d'environ 2,022 km^2. Le BV est constitué de 10 sous bassins versants (Figure 10) compris à l'intérieur de 5 provinces du département de La Paz (Murillo, Los Andes, Ingavi, Aroma et Pacajes). Ainsi, il traverse 13 municipalités: El Alto, Viacha, Laja, Pucarani, Puerto Pérez, Achocalla, Collana, Comanche, Colquencha, Calamarca, Jesús de Machaca, La Paz y Mecapaca. Le BV débouche dans la baie de Cohana dans la partie bolivienne du lac Titicaca (M.M.A.y.A., 2010).

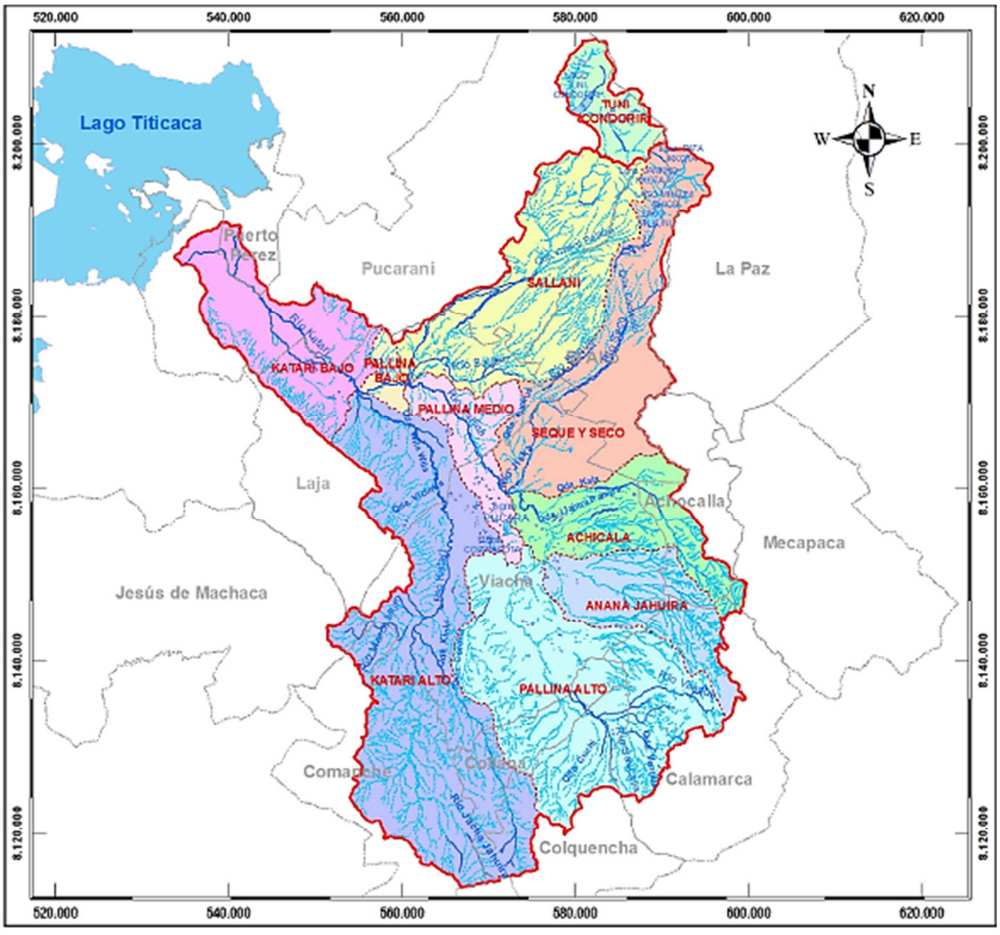


Figure 10 Localisation et limites du BV du Katari et ces sous bassins versants (M.M.A.y.A., 2010).

1.2 Climat.

Le climat est principalement déterminé par le mouvement saisonnier de la Zone de Convergence Inter-Tropicale (ZCIT) et par son altitude supérieure à 3800m. Durant l'hiver austral la ZCIT se déplace vers le nord et les anticyclones du pacifique sud entrent dans le continent sud-américain et la saison sèche s'installe. A la fin de l'hiver, le front polaire

antarctique se retire vers le sud, la ZCIT se dirige vers le centre du continent amenant avec elle de l'air humide et chaud, c'est l'été austral et la saison des pluies. Il faut aussi considérer le phénomène El Niño Southern Oscillation (ENSO) qui conduit à des périodes de sécheresse sur l'Altiplano (Delemasure, 2012).

La région de l'Altiplano bolivien présente des variations diurnes extrêmes des facteurs climatiques comme le rayonnement solaire, la température et l'humidité, configuration appelée le « puna andina » (PNUMA, 2011).

Les précipitations sont faibles sur le BV du Katari avec une précipitation moyenne annuelle de 492 à 620 mm an^{-1}, concentré entre les mois de décembre à mars, l'hiver austral étant très sec (M.M.A.y.A., 2010).

1.3 Topographie et réseau hydrographique

Au nord-est du BV on trouve la Cordillère Royale, qui compte de très hauts sommets, comme le Huayna Potosi (6088m), le Chacaltaya (5421m) ou encore le Tuni Condoriri (5648m). L'altitude générale de cette région du bassin est comprise entre 4200m et 5720m, pour des pentes comprises entre 4 et 90%. Elle correspond aux sources des sous-bassins Río Sallani et Río Seco et Seke, et du sous-bassin Tuni-Condoriri. Les « Serranías Inter-altiplánicas » se trouvent au Sud-Ouest et délimitent l'Altiplano Nord de l'Altiplano Sud. Elles correspondent aux sources des sous-bassins Katari Alto et Pallina Alto. On y retrouve également des altitudes élevées, de 3900m à 4700m et de fortes pentes, de 4 à 90%. Au Sud-Est, il existe aussi quelques terrains élevés, jusqu'à 4400m, qui correspondent aux sources des sous-bassins Achicala et Anana Jahuira et la partie orientale du sous-bassin Pallina Alto. La partie centrale et basse, caractérisée par de faibles pentes (moins de 4%) et des altitudes inférieures à 4200m, descend jusqu'à 3800m, au niveau de l'embouchure du Katari dans le Lac Titicaca (Figure 11).

Le cours d'eau principal est le Katari de 90km de long qui débouche dans le lac Titicaca au niveau de la Baie de Cohana. Il a comme affluent principal le cours d'eau Pallina, qui traverse la ville de Viacha, lui-même grossi par les eaux des cours d'eau Seke et Seco qui traversent la ville d'El Alto. Le volume d'eau déchargé du BV Katari vers le lac Titicaca pour l'année 2008 est de 242.42 mmc (millions de mètres cubiques), ce qui représente un débit moyen du cours d'eau Katari d'environ 7.7 $m^3\ s^{-1}$ (M.M.A.y.A., 2010). La partie aval du BV (municipalités de El Alto, Viacha, Laja y Pucarani) est exposée a des inondations lors des événements pluvieux extrêmes (M.M.A.y.A., 2010).

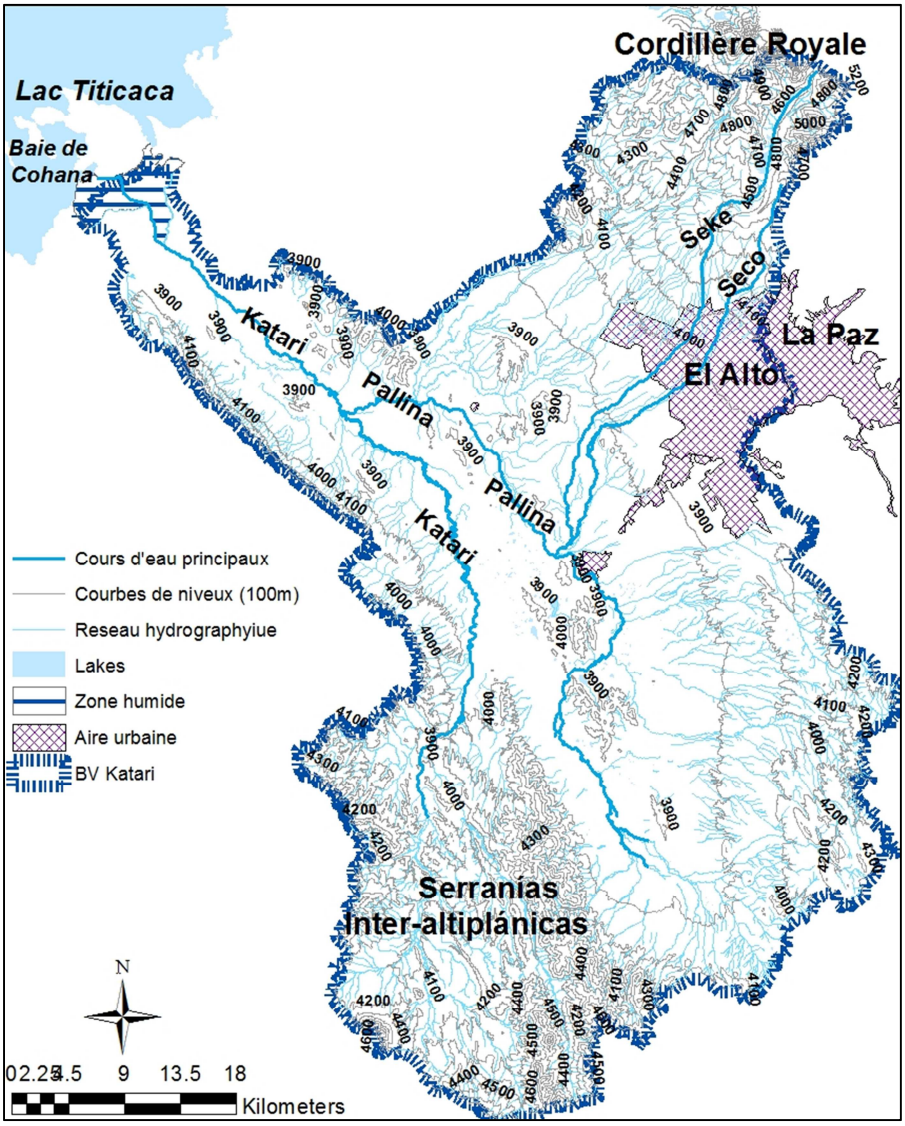


Figure 11 Topographie et réseau hydrographique du BV du Katari (Archundia 2015, ARC-Gis).

Du point de vue hydrologique, le site d'étude s'intègre dans le système hydrique appelé Titicaca-Dedaguadero-Poopo-Salar (TDPS) qui comprend des territoires appartenant à trois pays : Perou, Bolivie et Chili. Cette unité géographique s'étend entre les latitudes 14 ° 03 'et 20 ° 00' de latitude sud et les méridiens 66 ° 21 et 71 ° 01 ' de longitude ouest. Le système TDPS comprend le BV endoréique de l'altiplano avec une superficie d'environ 143.900 km^2. Le BV du Katari appartient au sous bassin versant Titicaca d'une superficie de 56.270 km^2 (PNUMA, 2011).

1.4 Sols.

D'après la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2005), sur l'ensemble du bassin versant on retrouve 4 types de sols (Figure 12) :

i) CMe : Cambisol eutrique.

ii) CMx : Cambisol chromique.

iii) LPe : Leptosol eutrique.

iv) RGd : Regosol dystrique.

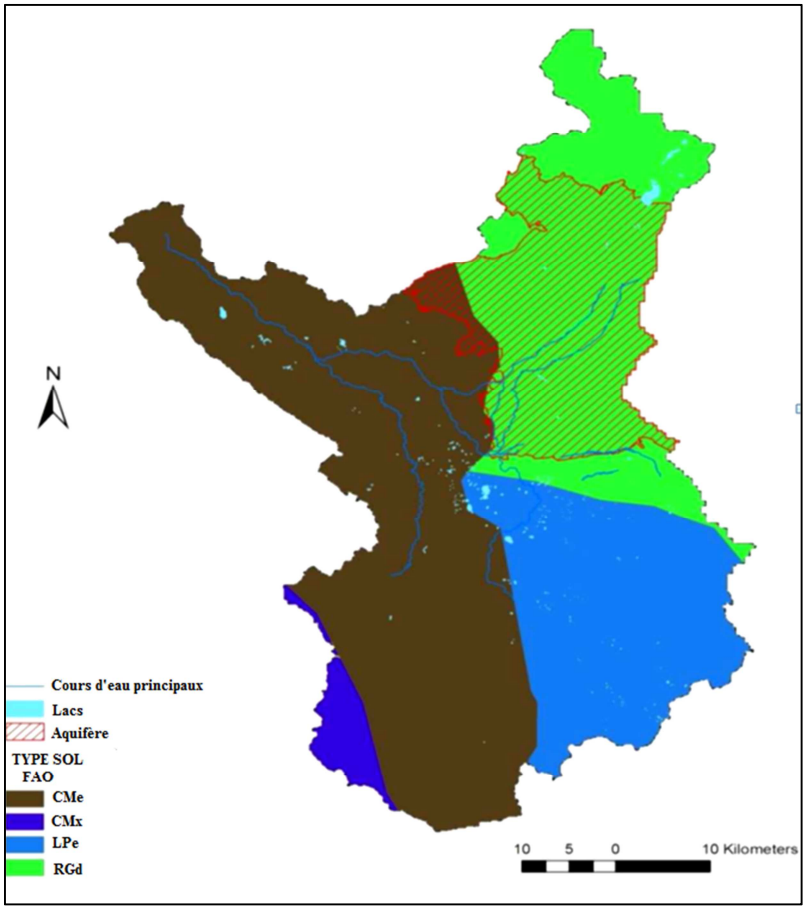


Figure 12 Types du sol du BV Katari (M.M.A.y.A., 2010).

Les sols localisés à proximité de la Cordillère Royale à la source du cours d'eau Seke sont organiques peu profonds et sont formés par des matériaux morainiques de type colluvion-alluvion. En général ils sont argilo-limoneux et poreux. Ces sols sont fortement acides. Les sols localisés plus en aval du Seke avant la ville de El Alto sont aussi des sols organiques peu profonds mais formés à partir de matériaux de type colluvion-alluvion. Ils sont sableux et acides, cependant, le contenu en argiles s'incrémente à partir de 10 cm de profondeur. A la source du cours d'eau Seco les sols sont aussi organiques avec également un pH acide.

Dans la ville de El Alto, les sols sont d'origine colluvion-alluviale et sont peu développés. Avec des taux faibles en matière organique et une prédominance en sable et limons (susceptibles a l'érosion éolienne en saison sèche) et moyennement acides.

Les sols sur les berges du cours d'eau Pallina reposent sur des sédiments d'origine colluvion-alluvion. Ils sont en général peu profonds et dominées par des argiles et limons. Cette couche

repose sur un horizon avec prédominance de sables, et à partir de 50cm de profondeur, les particules fines (argiles et limons) augmentent de nouveau. Ces sols sont de pH neutres et les contenus en phosphore sont élevés dans la couche superficielle.

Les sols localisés sur le cours d'eau Katari avant son embouchure avec le cours d'eau Pallina reposent sur une terrasse non inondable et sont formés à partir des matériaux sédimentaires d'origine alluviale, sont profonds avec une prédominance de limons et sables, ce qui les rend susceptibles à l'érosion éolienne en saison sèche. En raison de ces faibles contenus en argile et matière organique ces sols ont une capacité faible de rétention des nutriments. A partir de 15cm de profondeur les taux en limons et argiles augmentent et à partir de 50cm les argiles prédominent. Ils sont de pH basique avec des contenus élevés en azote.

Les sols localisés sur la plaine du cours d'eau Katari (localité de Quiripujo) sont des sols non inondables de type sédimentaire avec des matériaux alluvionnaires-colluviaux. En général ils sont profonds et sableux. A partir de 15cm de profondeur les contenus en argiles et limons augmentent. Ils présentent des taux faibles en matière organique et sont légèrement alcalins.

Les sols localisés dans la baie de Cohana (au bord du lac Titicaca) sont des sols peu développés (Entisols) à cause des apports continus de matériaux (colluvions) en provenance de la partie amont du BV. Ils sont moyennement profonds avec une prédominance de sables et limons et de pH alcalin.

1.5 Contexte démographique et social.

Le BV du Katari connaît une très forte augmentation de sa population depuis les années 1980. A l'origine, c'est l'événement de sécheresse survenue dans le nord de l'Altiplano bolivien pendant les années 82 et 83 et la fermeture de mines nationales dans la Cordillère Royale en 1985 qui a forcé des milliers de ruraux à chercher du travail en ville conduisant à l'expansion de El Alto, devenue aujourd'hui une commune à part entière. Ainsi, les activités urbaines sont concentrées sur l'axe El Alto-Viacha.

En conséquence, les sous bassins versants ayant la concentration démographique la plus importante sont Seke et Seco où se trouve la ville de El Alto. La population de El Alto est passée de 95000 habitants en 1976 à environ 1,2 millions selon le dernier recensement (Hubert Mazurek, 2012). Selon le MMAyA, en 2010 85% des habitations étaient raccordés au réseau d'alimentation en eau et 72.42% au réseau de collecte d'eaux usées (Instituto Nacional de Estadística de Bolivia, 2001; M.M.A.y.A., 2010). Cependant, la ville a continué à

se développer et le pourcentage de raccordement au réseau de collecte et traitement des eaux usées a certainement diminué, probablement au-dessous du 50%.

1.5.1 Socio-économie.

L'économie précolombienne a été fortement liée à l'utilisation diversifiée et durable des ressources naturelles de la région (PNUMA, 2011). Pendant la période coloniale, avec l'arrivée des Espagnols en 1532, les communautés ont été dépossédées de leurs terres et l'exploitation des métaux précieux a été privilégiée avec une forte mobilisation de main-d'œuvre indienne pour l'exploitation minière. La dépossession des terres aux communautés autochtones a été augmentée de façon significative durant la période républicaine, pour former de grands domaines « haciendas » pour les riches créoles. Ce système a continué jusqu'à la mise en œuvre des lois de réforme agraire de 1953 en Bolivie. Dans les dernières décennies, la région de l'altiplano est formée majoritairement par des unités de production communales et familiales avec une activité essentiellement agricole et / ou de l'élevage à petite et moyenne échelles (PNUMA, 2011).

Traditionnellement, il existe trois types de régimes fonciers: sayana, aynuqa et des pâturages. Actuellement l'agriculture et l'élevage sont des activités économiques présentes dans le site d'étude, même si cela reste à des échelles familiales et communautaires. Les sous bassins versants avec la plus grande superficie à vocation agricole sont Katari Alto et Pallina Alto. La patate et l'orge sont les produits agricoles prédominants sur l'ensemble du site d'étude. Le type d'élevage dominant est l'élevage ovin, même si on retrouve aussi, dans l'ordre d'importance, de l'élevage bovin, porcin et de camélidés. Outre les activités agricoles et d'élevage on retrouve des activités industrielles (concentrées principalement dans les centres urbains de El Alto et Viacha) et minières (M.M.A.y.A., 2010).

1.5.2 Demande hydrique

L'approvisionnement en eau potable pour les villes de La Paz et El Alto a comme source principale le système aquifère d'El Alto, pour lequel les connaissances hydrogéologiques sont fractionnées. Un plan de gestion est actuellement mis en place (MMAyA, 2010). Il est complémenté par le site de captage du barrage de Tuni Condori, situé au nord du BV et une partie du captage de Milluni. L'infrastructure hydrique présente dans le BV est composée principalement de puits, réservoirs, 3 barrages, 1 station d'épuration des eaux usées (STEP)

située en aval de la Ville de El Alto (STEP Puchukollo) et 1 station de potabilisation d'eau située en amont de la ville de El Alto (M.M.A.y.A., 2010).

Dans l'ensemble du BV, ainsi que dans le pays, l'agriculture est l'activité économique avec la demande hydrique la plus élevée. De la sorte, le sous bassin versant présentant la demande hydrique la plus importante est Pallina Alto, qui compte avec la plus grande zone de production agricole (> 7000 ha) et le plus grand nombre de têtes de bétail (71.000). La demande en eau de ce sous bassin est de 38 mmc, suivie par Katari Alto (33 mmc) et Seke-Seco (29 mmc). Dans les deux premiers la demande est principalement pour l'irrigation, tandis que dans le sous-bassin de Seke-Seco qui abrite la ville de Alto, ce sont les demandes urbaine et industrielle qui dominent (deux tiers du total) (M.M.A.y.A., 2010). Une autre pression hydrique, cette fois ci externe, correspond à la demande en eau d'une partie de la ville de La Paz (nord, centre et pentes occidentales Achachicala) qui est alimentée à partir du BV du Katari (M.M.A.y.A., 2010).

1.5.3 Assainissement.

Le processus de privatisation de l'accès à l'eau potable et collecte des eaux usées a débuté en 1996. La gestion du système d'assainissement et d'alimentation en eau potable de La Paz et El Alto a été en charge de l'entreprise Aguas de Illimani SA (AISA), filiale de la Lyonnaise des Eaux. Celle-ci devait étendre les réseaux de la ville d'El Alto et La Paz, ce qui n'a jamais été réalisé. Après de nombreux conflits, entre autres à cause d'une augmentation tarifaire de 20%, et une révolte en 2006 le contrat a finalement été rompu (Robert Grosse et al., 2006). Depuis 2007 c'est l'entreprise à caractère publique et social Empresa Pública Social de Agua y Saneamiento S.A. (EPSAS) qui est en charge de la gestion de l'eau courante et de son traitement dans les deux villes. Cependant, après plus de trois ans de gestion par cette entreprise et selon une publication en Septembre 2009, la distribution d'eau potable et la collecte des eaux usées de la ville de El Alto n'ont pas été améliorés comme attendu (Erico Navarro Agreda, 2011).

La seule STEP existante dans l'ensemble du BV est la STEP de Puchukollo, située en aval de la ville de El Alto et qui est vraisemblablement insuffisante pour les nécessités d'assainissement d'un centre urbain de telle envergure et en pleine croissance (M.M.A.y.A., 2010; PNUMA, 2011).

1.5.4 Santé publique et utilisation des antibiotiques.

Selon la Constitution Politique de l'État Bolivien, la santé est un droit fondamental. Par conséquent, c'est la responsabilité de l'État de la protéger et la promouvoir. L'axe central de la politique nationale de santé est la « Ley del Medicamento (la loi du Médicament) » (Ley 1737), qui établit une série d'objectifs qui visent à améliorer la situation sanitaire en Bolivie.

Les autres axes majeurs sont:

- *Programa Nacional de Medicamentos Esenciales de Bolivia* (PNMEBOL) (Programme National des Médicaments Essentiels de Bolivie).
- *Seguro Universal Materno Infantil* (Assurance Universelle Maternelle et Infantile), qui finance l'accès aux médicaments des femmes et des enfants jusqu'à l'âge de 5 ans.

La politique de santé actuelle vise la convergence avec les politiques pharmaceutiques régionales comme la Communauté Andine des Nations (CAN) ou le Mercosur. Un des principaux objectifs du gouvernement Bolivien depuis quelques années est d'assurer la disponibilité et l'accès aux médicaments efficaces, surs, de qualité et a prix raisonnables. Cependant, environ 50% de la population n'a pas accès aux médicaments en raison de l'inaccessibilité à certaines zones géographiques, la culture bien ancrée de la médecine traditionnelle et la situation économique de la majorité de la population qui empêchent l'accès à une « certaine forme » d'assurance (Martin, 2013).

Le marché pharmaceutique en Bolivie est reparti de la façon suivante : 33% production locale, 42% importation et 25% contrefaçon. Le pays compte avec une puissante production nationale laquelle pourrait satisfaire sa demande interne, les importations sont réalisées pour l'approvisionnement des produits complexes, récente ou de coût trop élevé. Actuellement, il existe 27 compagnies pharmaceutiques dans le pays, dont deux sont du domaine public et sont dédiées exclusivement à la production de vaccins et spécifiquement de vaccins contre la rage.

Les 25 autres sont des sociétés privées principalement concentrées dans la ville de La Paz/El Alto, Cochabamba et Santa Cruz (dans l'ordre décroissant). Dans le pays il y a environ 7.000 pharmacies privées dont 1800 sont illégales (Martin, 2013).

En théorie l'établissement distributeur des produits pharmaceutiques doit être géré par un chimiste pharmaceutique ou un biochimiste lequel doit informer et guider le patient. Cependant, ce n'est pas une pratique courante en Bolivie, on constate que les médicaments et spécialement les antibiotiques sont en libre accès. Cette situation est à l'origine d'une utilisation de médicaments sans contrôle avec des durées de traitements généralement réduites et inappropriées.

1.6 Problématique environnementale.

La problématique principale dans le BV est la détérioration de la qualité des ressources en eau en raison des rejets d'eaux usées dans le réseau hydrographique, le traitement inadéquat des eaux usées, la présence des déchets dans les cours d'eau et l'accumulation de fumier dans la zone rurale en aval du BV. Ainsi, l'eau déchargée dans la baie de Cohana (exutoire du BV) est fortement polluée, ce qui affecte aussi les zones environnantes à la baie et qui se trouvent en dehors du BV (M.M.A.y.A., 2010).

Les sources de pollution des eaux superficielles sont diverses. Par exemple, avant la ville d'El Alto, les cours d'eau Seke et Seco drainent une région minière, le long de la Cordillère Royale, au pied du Huayna Potosi et de la Laguna Milluni. Sur le cours d'eau Seke on trouve une décharge publique et un abattoir (qui rejette directement les déchets animaliers dans les cours d'eau). En outre des camions et des vêtements sont lavés directement dans la rivière. Sur le cours d'eau Seco, on retrouve une cimenterie (Cimenteria Viacha) laquelle ne dispose pas de système de traitement d'eaux usées et qui déverse ses rejets directement dans ce cours d'eau. On trouve également diverses industries comme par exemple ; des tanneries, métallurgies et de transformation d'aliments (Ribera Arismendi, 2010)

Ainsi, la pollution des eaux superficielles est due principalement aux rejets organiques et industriels originaires des villes d'El Alto et Viacha qui se développent de façon accélérée. L'activité industrielle d'El Alto est la source principale des fortes concentrations en métaux lourds : cadmium, chrome, arsenic, plomb, et nickel entre autres. Le rejets d'eaux usées domestiques des centres urbains (rejets de la STEP de Puchukollo inclus) et les activités d'élevage (municipalités de Viacha, Laja y Pucarani) sont aussi à l'origine d'une pollution organique et bactériologique (PNUMA, 2011).

La demande biologique en oxygène (DBO) des eaux provenant du Seke et du Seco et qui rejoignent le cours d'eau Pallina varie entre 700 à 800 mg/l, même après le passage par la STEP de Puchukollo (PNUMA, 2011).

En conséquence, la baie de Cohana se trouve fortement polluée avec un processus d'eutrophisation bien installé ce qui rend ces eaux inaptes à l'usage humain (Fonturbel Rada, 2005). Le cours d'eau Katari est la source la plus importante de pollution dans la baie de Cohana mais on trouve aussi une pollution locale par les communautés vivant directement au bord du Lac. L'arrivée de fortes concentrations de nutriments, associée à la faible profondeur de la baie de Cohana et du petit lac en général (< 9 m) est propice à l'eutrophisation. Cette

eutrophisation favorise le développement des hydrophytes utilisées comme fourrage pour l'élevage familial, les animaux sont alors directement installés dans le lit de la baie pour leur alimentation. La présence de ces animaux dans le lit de la baie est une autre source de pollution et est à l'origine de la remise en suspension de nutriments se trouvant dans les sédiments (PNUMA, 2011).

Il existe aussi une pollution des sols qui semble être intimement liée à celle de l'eau et qui se situe principalement à proximité des cours d'eau : Seke, Seco, Pallina et dans la partie aval du Katari. Les zones le plus exposées à une pollution des sols sont les zones où le risque d'inondation est élevé, à savoir les municipalités de El Alto, Viacha, Laja y Pucarani (M.M.A.y.A., 2010).

2. Méthodologies.

La réalisation de ces travaux de thèse a nécessité l'utilisation d'une variété des techniques d'échantillonnage sur le terrain, de méthodes analytiques et leur validation ainsi que d'expérimentation en laboratoire. Une synthèse des méthodologies utilisées se trouve sur la figure 13.

Pour les parties de la thèse faisant objet d'un article seulement sont détaillés les principes des techniques et les moyens opératoires, les spécificités des outils ainsi que les sites d'échantillonnage étant décrits dans les articles des Chapitres 3, 4 et 5.

Cette partie est divisée en quatre parties :

a) Caractérisation de l'état de pollution du BV
b) Etude de la mobilité du composé modele (SMX)
c) Etude de l'impact du SMX sur les communautés bactériennes du sol.
d) Modélisation du devenir du SMX dans le réseau hydrographique du BV.

La stratégie d'échantillonnage adopté a été un échantillonnage en amont avale du BV en prenant en compte les différentes types du sol du BV ainsi que les différents usages de sol présents. La localisation des sites de collecte ainsi que les principaux traits du BV sont présentés dans la figure 14, l'identifiant peut varier selon les différents articles de cette thèse. Dans ce cas les sites d'echantillonage sont presentés dans la partie materiel et methodes de chaque article. Le tableau 1 récapitule les informations sur l'analyse réalisée sur chaque échantillon et son utilisation dans les différentes expériences de laboratoire réalisées.

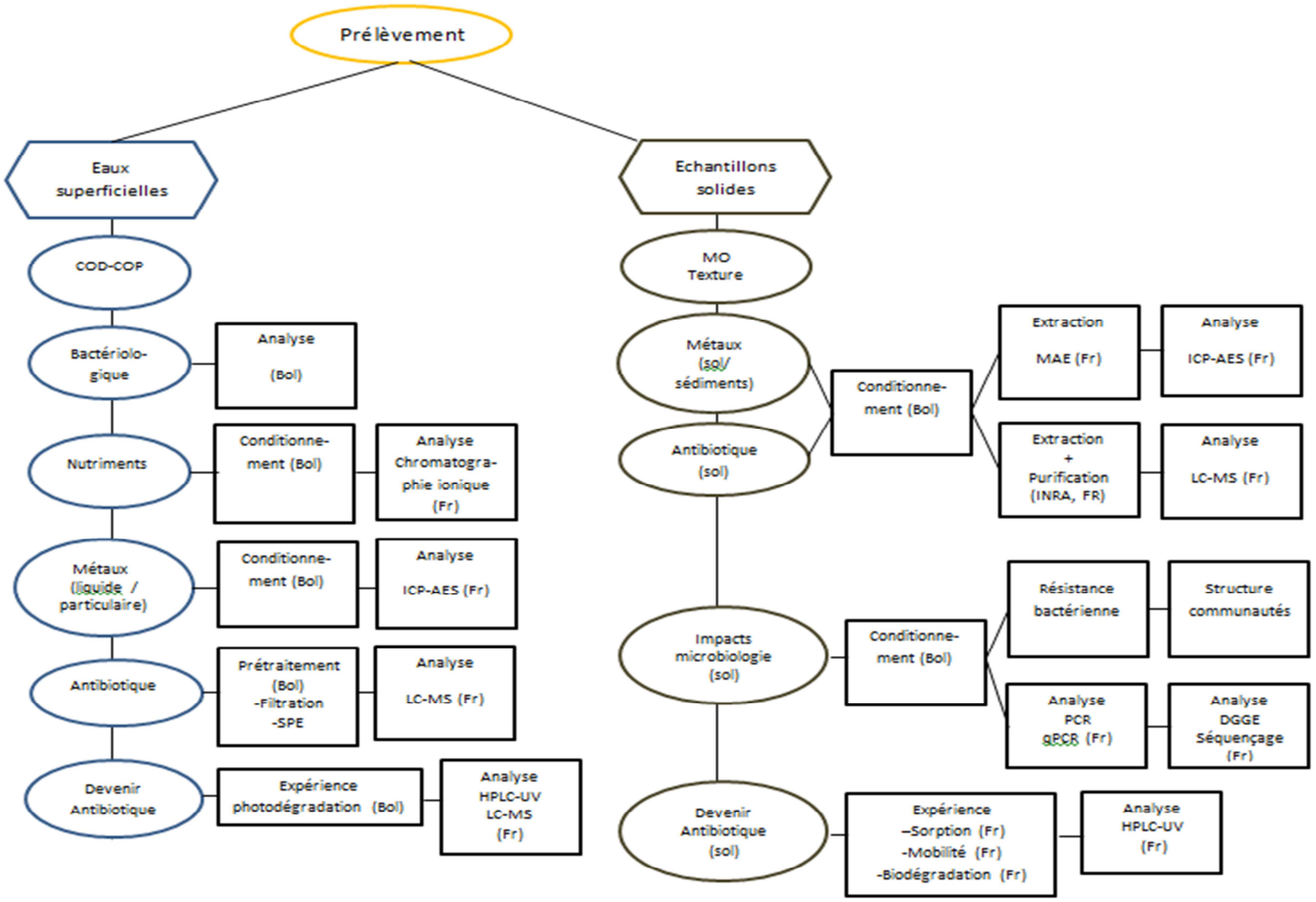


Figure 13 Vue globale des méthodologies mises en œuvre dans la thèse. Bol : réalisé en Bolivie. Fr : réalisé en France. COP: Carbonne organique particulaire. COD: Carbonne organique dissout.

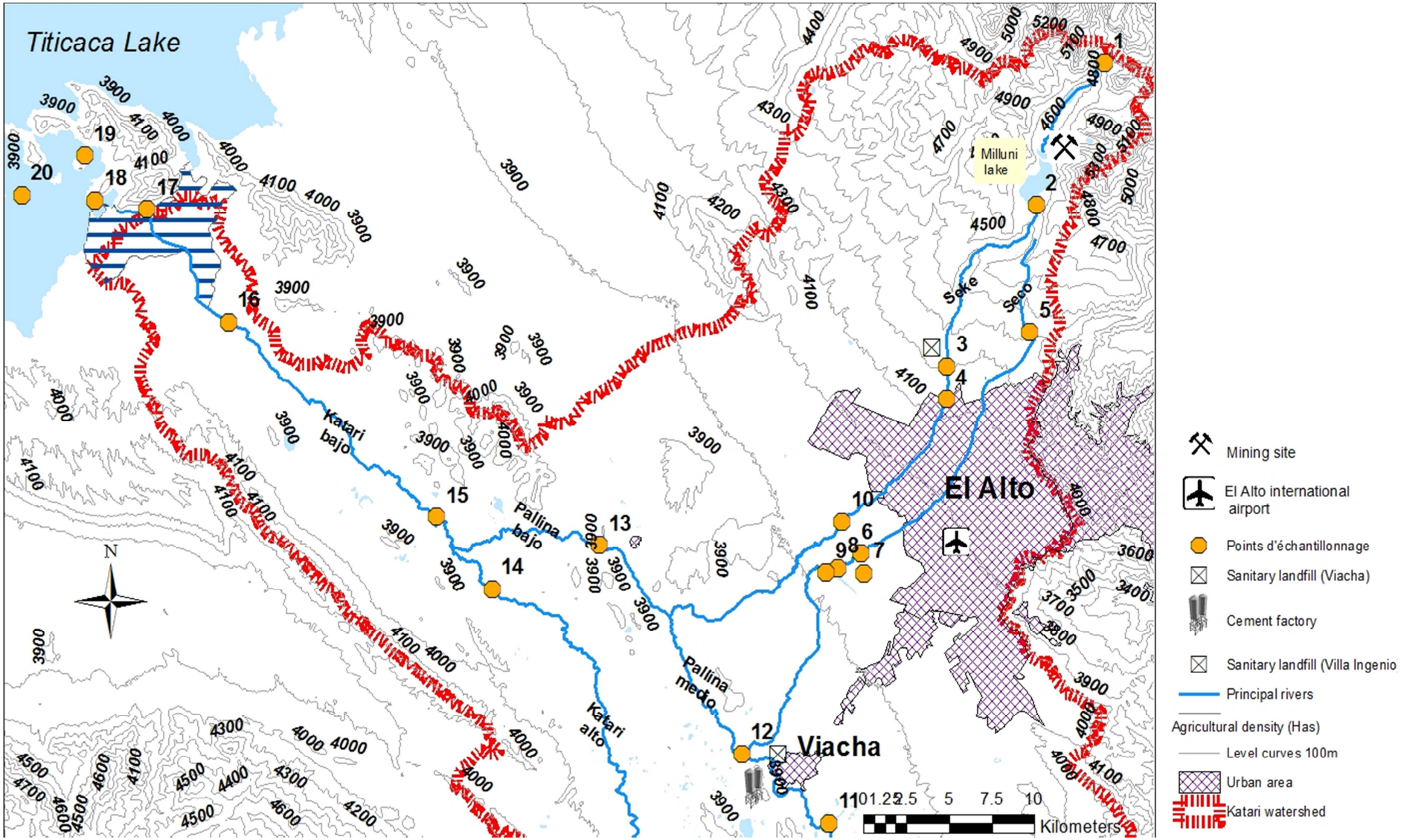


Figure 14 Localisation des points d'échantillonnage sur le BV du Katari (Bolivie).

Tableau 1 Récapitulatif global des points d'échantillonnage et des analyses efectués dans les différentes expériences réalisées.

ID	COD	POC	QB	ND	PPCE	PPCS	MO s	Ts	RBA	M				A		Pho	Sor	Mob	B
										D	P	Se	So	D	So				
1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
2	*	*	*	*	*				*	*	*	*							
3	*	*	*	*	*					*	*	*							
4	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*				*	*	*
5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
6	*	*	*	*	*				*	*				*					
7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*		*	*	*
8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
9	*	*		*	*					*						*			
10	*	*	*	*	*				*	*	*	*		*					
11									*					*					
12	*	*		*	*				*	*				*					
13	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
14	*	*		*	*	*	*	*	*	*			*	*	*		*	*	*
15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
16	*	*		*	*					*									
17	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
18	*	*		*	*					*									
19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
20	*	*		*						*		*							

COD : Carbone organique dissout.
POC : Carbone organique particulaire.
QB : Qualité bactériologique eaux.
ND : Nutriments dissout.
PPCE : Propriétés physicochimiques eau.

PPCS : Propriétés physicochimiques so
MOs : Matière organique du sol.
Ts : Texture sol
RBA : Résistance bactérienne antibiotiques

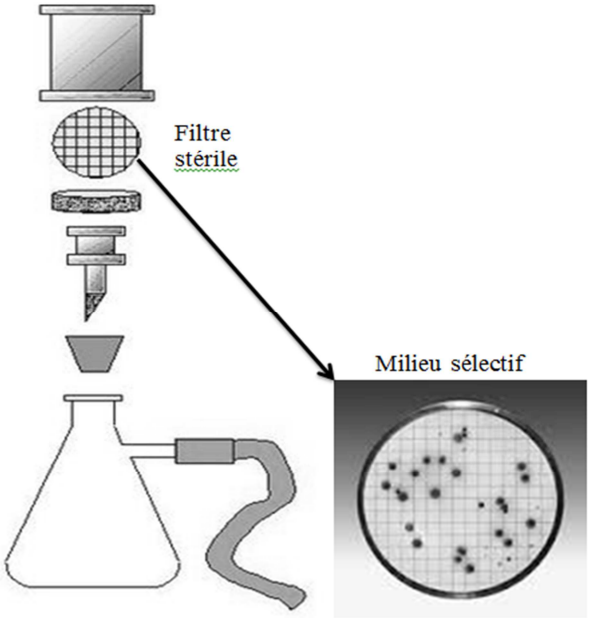
M : Métaux
A : Antibiotiques
D : Dissout
P : Particulaire
Se : Sédiments
So : Sol

Pho : Photodegradation
Sor : Sorption
Mob : Mobilité
B : Biodégradation

2.1 Caractérisation de l'état de pollution du BV du Katari.

2.1.1 Qualité bactériologique.

Des volumes d'eaux de surface d'environ 50ml ont été prélevés dans des flacons stériles et conservés à -4°C jusqu'à leur analyse au laboratoire en Bolivie (±24h).



La détermination du nombre de bactéries coliformes totales ainsi que du nombre total des bactéries *Escherichia coli* reconnues comme indicateurs de pollution fécale (WHO, 2001a) à été realisée à l'aide d'un milieu de culture sélectif (ENDO NPS, SARTORIUS) et par la méthode de filtration sur membrane (en suivant les recommandations de la norme ISO 9308-1:2014) (Figure 15). Les analysés ont été réalisés en duplicata avec trois niveaux de dilution par échantillon.

Figure 15 Méthode de filtration sur membrane.

2.1.2 Nutriments.

Des volumes de 15ml d'eaux de surface ont été filtrés sur le terrain (filtre seringue en acétate de cellulose 0,45 µm). Les filtrats ont été congelés (-20°C) jusqu'à son analyse en France. Les concentrations en nutriments (F^-, Cl^-, Br^-, NO_3^-, PO_4^- and SO_4^- et NH_4^+) ont été quantifies par Chromatographie ionique suivant la norme USEPA 300.0.

2.1.3 Eléments trace métalliques (ETM).

Les concentrations en ETM dans la ***phase dissoute*** ont été déterminées à partir d'échantillons d'un volume de 15ml, prelevées filtrés sur le terrain (filtre seringue en acétate de cellulose 0,45 µm). Les filtrats ont été conservés dans des flacons en polyéthylène (préalablement rincés avec du HNO_3) et acidifiés avec 150µl (ou 10% du vol total de l'échantillon) d'acide nitrique (HNO_3) ultra-pur puis conservés à 4°C jusqu'à leur analyse en France.

Pour l'analyse des teneurs dans la ***phase particulaire*** des volumes variables d'eau (jusqu'au colmatage du filtre) ont été filtrés au laboratoire avec un filtre en téflon (0,45 μm). Les filtres ont ensuite été séchés à l'étuve à 45°C pendant 5 jours puis pesés et conservés dans un porte filtre jusqu'à leur analyse en France.

Pour l'analyse des ***teneurs en ETM dans les sols*** les échantillons ont été prélevés en surface (0-10cm) à l'aide d'une spatule en polyéthylène et placés dans des sachets en plastique. Une fois au laboratoire (Bolivie), ils ont été séchés à l'étuve à 50°C et transportés à température ambiante pour leur traitement et analyse en France.

Une Extraction Assistée par Microondes (MAE) a été réalisée sur les échantillons solides selon la méthode US EPA 3052. Pour cela, 200 mg du matériel (sol ou sédiment) broyés et séchés ou les filtres (pour des concentrations dans la phase particulaire) ont été digérés avec 9 ml de HNO_3 à 65% (Fisher, Trace analyse Grade), 3 ml de HF 47 à 51% (Fluka, qualité Traceselect) et HCl 2 mL à 37% (Fisher, Trace analyse Grade).

Les concentrations ont été déterminées par ICP Spectroscopie à torche à plasma (ICP-AES) suivant la méthode USEPA1669 (1996b). Les analyses (ICP-AES) ont été réalisées à l'Institut des Sciences de la Terre (ISTerre) de Grenoble.

2.1.4 Antibiotiques.

L'analyse des antibiotiques dans un échantillon environnemental s'avère complexe en raison du grand nombre de produits chimiques retrouvés dans l'environnement et des très faibles concentrations retrouvées dans les milieux naturels. La méthode d'analyse des antibiotiques nécessite ainsi différentes étapes de préparation de l'échantillon avant analyse: filtration, extraction et ou purification et concentration. Ces étapes influencent directement la qualité des analyses à savoir la répétabilité et la reproductibilité.

Les capacités d'analyse des antibiotiques nécessaires étant absentes sur le site d'étude (en Bolivie), une des principales difficultés de la thèse a été le transport des échantillons aqueux en quantité suffisante pour leur analyse en France. C'est pourquoi dans le cadre de cette thèse un des objectifs du point de vue technique, a été de tester et mettre en point la réalisation de 'extraction en phase solide (SPE) en Bolivie pour l'expatriation des cartouches chargées en échantillon et non des échantillons liquides en grande quantité.

i) Echantillons liquides.

Des volumes d'environ 1L d'eaux superficielles ont été prélevés dans des flacons en cristal ambré préalablement rincés avec de l'eau du site (et préalablement rincés avec du MeOH 5% puis eau MilliQ). Les échantillons ont été transportés au laboratoire à 4°C ou ils ont été

préfiltrés avec des filtres PVDF 0.45µm pour ensuite être concentrés par extraction sur phase solide (SPE).

Extraction sur phase solide SPE

L'extraction en phase solide (SPE) permet de purifier et concentrer efficacement l'échantillon avant l'analyse et est la méthodologie la plus couramment employée actuellement pour la pré-concentration des antibiotiques (Choi et al., 2007; Humbert, 2010; Raich-Montiu et al., 2007, 2007; Tamtam et al., 2008; Tong et al., 2009). Elle permet soit d'extraire de façon ciblée les composés d'intérêt pour des dosages spécifiques soit dans le cadre d'une recherche non ciblée, d'extraire un grand nombre de substances. Il existe deux types de SPE : la SPE classique et la SPE on-line ou la SPE est couplée à l'appareillage analytique. Ici on détaillera la SPE classique qui a été utilisée pour les échantillons liquides. Le principe de base est analogue à celui de la chromatographie de partage (partage des composés entre une phase liquide, l'échantillon, et une phase stationnaire, l'adsorbant) (Humbert, 2010). Sur la Figure 16 on observe les étapes constituant cette méthode d'extraction.

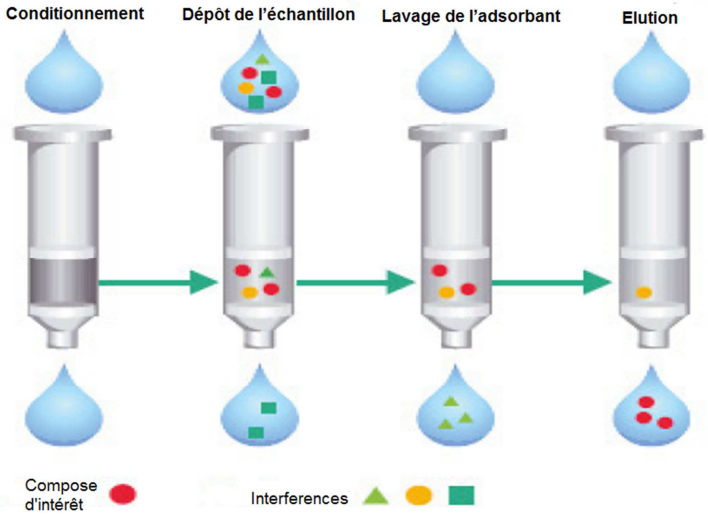


Figure 16. Etapes constituant une extraction en phase solide. Modifie de : Gilson dans (Humbert, 2010).

a) Conditionnement : Il assure les interactions de la phase solide (adsorbant) avec l'analyte. Il consiste à humecter l'adsorbant en produisant ainsi un environnement convenant à l'adsorption de l'analyte. Les adsorbants apolaires (comme celui utilisé dans cette thèse) sont généralement conditionnés avec 2-3 volumes de colonne d'un solvant miscible à l'eau (méthanol, THF, 2-propanol etc.), suivi du solvant dans lequel l'analyte est dissout (matrice pure, par ex. eau, tampon).

a) Dépôt de l'échantillon : Cette étape peut être réalisée avec une pression positive ou négative. Dans la littérature les débits de dépôt varient entre 1 et 10 ml min^{-1} (Choi et

al., 2007; Humbert, 2010; Raich-Montiu et al., 2007, 2007; Tamtam et al., 2008; Tong et al., 2009). Le volume de l'échantillon celui-ci peut varier en fonction des concentrations environnementales et des limites de détection des méthodes analytiques employées.

b) Lavage de l'adsorbant : L'objet est de sélectionner le composé d'intérêt. Il est réalisé avec une solution adaptée au composé d'intérêt. Le séchage de l'adsorbant après l'étape de lavage est recommandé si la différence de polarité entre la solution de lavage et l'éluant est très grande, ou si les deux ne sont pas miscibles.
c) Elution : Le composé d'intérêt est élué avec un faible volume de solvant approprié. Cette étape ne doit pas être trop rapide pour être sûr d'avoir récupéré tout le composé retenu dans l'adsorbant. La vitesse d'élution dépend de la dimension de la colonne ou de la cartouche et de la quantité de l'adsorbant (environ 1 ml min^{-1})

Validation de la méthode d'extraction sur phase solide

Les objectifs ont été :

i) D'évaluer le taux de récupération du composé étudié.
ii) De tester la stabilité du composé au cours du temps en dans les conditions de transport entre la Bolivie et la France (±4°C).

Les paramètres qui vont influencer le taux de récupération et l'extraction sont en général le conditionnement de la cartouche, le choix de l'adsorbant, le pH de l'échantillon, le volume de l'échantillon et son débit de chargement, la phase de lavage de la cartouche et le débit pendant la phase de désorption avec l'éluant.

A partir d'un travail bibliographique (Choi et al., 2007; Humbert, 2010; Raich-Montiu et al., 2007, 2007; Tamtam et al., 2008; Tong et al., 2009), les conditions expérimentales retenues ont été les suivantes :

a) Adsorbant utilisé : OASIS HLB 30mg (WATERS).
b) Conditionnement : 3ml MEOH suivis de 3ml eau acidifiée (0.1% CH2O2).
c) Dépôt de l'échantillon : Dépôt de 10ml d'une solution étalon à 0.1$mg.L^{-1}$ de SMX (triplicata par temps d'élution).
d) Lavage : 3ml MeOH (5%)
e) Séchage de la cartouche : Environ 40 min.

Les cartouches ainsi préparées ont été conservées à 4°C et éluées à différents temps : 0 (à la fin du séchage) et 1, 2, 3 et 4 semaines. Apres élution, les extraits ont été évaporés avec du N2 gazeux et reconstitués dans un mélange eau-MeOH 10% avant analyse par HPLC-UV.

ii) Echantillons solides.

Les concentrations en SMX ont été déterminées dans les sols du bassin versant (BV). Des échantillons de sols composites ont été prélevés dans la couche superficielle (0-15 cm) en prenant, avec une spatule en en polyéthylène, environ la même quantité de sol à 5 points différents à une distance de 5 m dans la même parcelle. Les échantillons composites ont été placés dans des sachets en plastique et protégés du soleil. Une fois au laboratoire (Bolivie) ils ont été séchés à l'aire libre à l'abri de la lumière et transportés à température ambiante en France à l'Institut National de la Recherche Agronomique nomique (INRA, UMR Ecosys), pour leur traitement et quantification en SMX. Le traitement a consisté en l'ajout d'une molécule d'SMX deutéré (la veille de l'extraction) pour la quantification par étalonnage interne, suivi d'une extraction par ultra-sons en deux étapes successives (première étape acétonitrile-tampon McIlvaine pH 9, deuxième étape acétonitrile-tampon McIlvaine pH 2 contenant de l'EDTA) et purification par la méthode QuEChERS (Deschamps, pas publié). Apres purification, une évaporation a été réalisée (pour enlever l'excédent en solvant) puis l'échantillon a été repris dans un mélange eau pH 2.5 - acétonitrile (95:5, v:v).

iii) Méthode analytique.

Le principal outil utilisé pour la détermination des teneurs en antibiotiques dans les eaux et les sols est la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à différents dispositifs de détection. Les détecteurs couplés à l'HPLC utilisés pour quantifier les antibiotiques sont surtout ceux de type spectromètre de masse (MS), absorption aux ultraviolets (UV), fluorescence et de type barrette de diodes (DAD) (Malviya et al., 2010; Paré and Bélanger, 1997).

La quantification des concentrations en antibiotiques dans les eaux de surface a été effectuée au laboratoire HydroSciences de Montpellier (UMR 5569) par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (pour le détail de la méthode voir l'article 2 du Chapitre 3). L'analyse des teneurs en SMX dans les sols du BV à été effectuée à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) par SPE online-UHPLC-MS-MS. Le détail de la méthode ainsi que les conditions appliqués se trouvent dans Bourdat-

Deschamps et al., (2014) et dans l'article 2 du Chapitre 3. Les analyses ont été réalisées en double.

2.1.5 Résistance bactérienne au Sulfamethoxazole.

Des echantillons des échantillons de sol composites ont été prélevés dans la couche superficielle (0-15 cm) en prenant, avec une spatule en en polyéthylène, environ la même quantité de sol à 5 points différents à une distance de 5 m dans la même parcelle (en enlevant la partie visible de la végétation). Les échantillons ont été placés dans des sachets plastique zippés (en évitant une aération excessive) jusqu'à leur arrivé au laboratoire en France. Des échantillons d'eaux superficielles de 100ml ont été filtrées dans le laboratoire (en Bolivie) sur des filtres stériles (Sartorius) ils ont été congelées (-4°C) jusqu'à son analyse en France.

La méthode analytique utilisée est la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) après extraction de l'ADN sur les 0.5 g de sol ou les filtres congelés (Extraction Kit for Soil) dont l'efficacité est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 17). Une amplification d'ADN par PCR est composée principalement de trois étapes i) une première dite de bruit de fond où le nombre de produits PCR est en dessous de la limite de détection ; ii) une seconde de phase exponentielle de croissance (doublement du nombre de produits PCR à chaque cycle) et iii) une phase plateau, lorsque les composants de la PCR, en particulier la Taq polymérase, deviennent limitants.

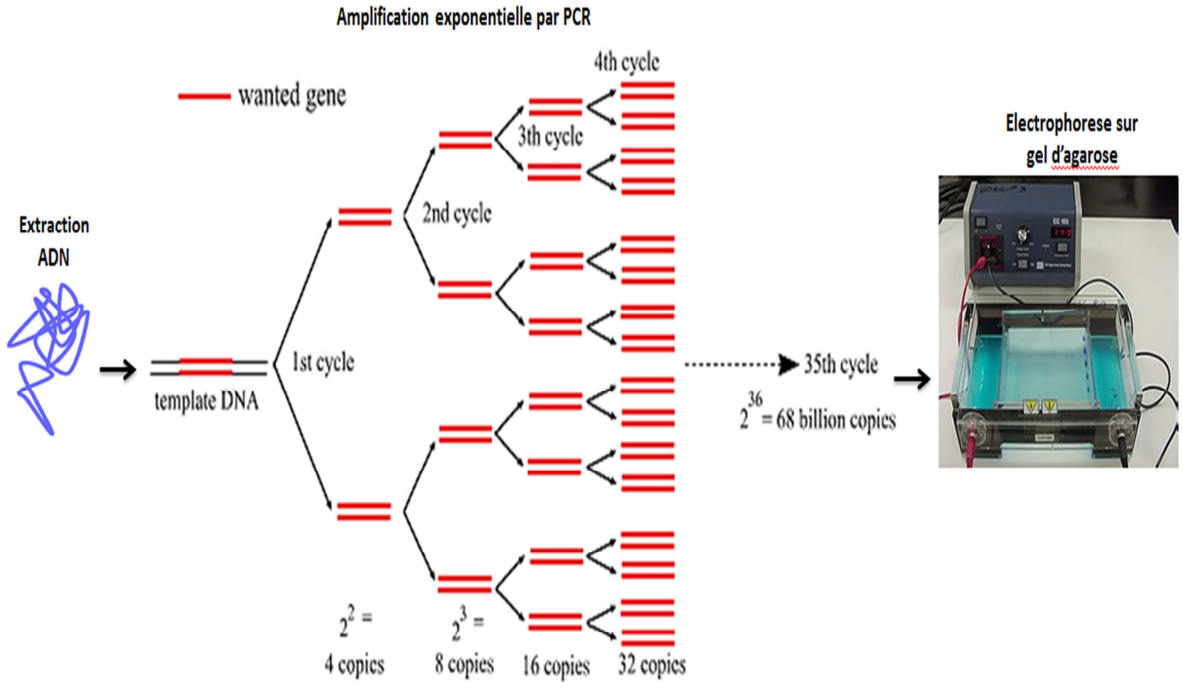


Figure 17 Méthodologie utilisée pour l'évaluation de la présence de gènes de résistance bactérienne au SMX.

Après extraction de l'ADN bactérien, le nombre de gènes de résistance a été étudié par PCR quantitative en temps réel (qPCR). La qPCR permet de suivre en continu le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR. La qPCR en temps réel est basée exactement sur les mêmes étapes que un PCR classique à la différence qu'on enregistre une augmentation de fluorescence qui correspond au nombre de produits PCR au cours du temps. Ainsi on quantifie un type d'ADN initialement présent dans un échantillon donnée. En suivant la fluorescence au cours du temps d'une qPCR on observe une augmentation de cette fluorescence en 3 phases distinctes : de bruit de fond, exponentielle et de plateau ou de saturation. Les échantillons ont été étudies en triplicata aven le SyBr green comme fluorophore. Pour plus de détails voir l'article 2 du Chapitre III.

2.2 Etude du devenir du Sulfamethoxazole (SMX).

Ce travail a nécessité la réalisation de différentes expériences en laboratoire pour évaluer l'impact des différents types de processus susceptibles d'interagir avec le composé dans des conditions naturelles dans les compartiments sol et eaux superficielles. Les détails des conditions expérimentales et méthodes analytiques sont décrits dans les articles 3, 4 et 5 du Chapitre IV. Les processus abiotiques étudiés sont : la photodégradation, la sorption et la mobilité. Les processus biotiques ont été pris en compte par la réalisation d'une étude sur la biodégradation dans les sols pour une approche en microcosmes (batchs). La photodégradation quant a elle a été étudiée en milieu aqueux tandis que les autres processus ont été étudiés dans des échantillons de sol.

2.2.1 Prélèvements.

Pour les expériences de ***photodégradation*** du SMX des eaux de surface ont été prélevées sur le cours d'eau Seco après le rejet des eaux traitées par la STEP Puchukollo. L'échantillon a été maintenu au frais (4°C) jusqu'à son arrivée au laboratoire (Bolivie). L'expérience a débuté un jour après l'échantillonnage.

Pour les expériences de ***sorption***, ***mobilité*** et ***biodégradation***, des échantillons de sol composites d'environ 1kg ont été prélevés dans la couche superficielle (0-15 cm) en prenant, avec une spatule en en polyéthylène, environ la même quantité de sol à 5 points différents à une distance de 5 m dans la même parcelle. Ils ont été placés dans des sachets en plastique et protégés du soleil. Une fois dans le laboratoire (Bolivie) ils ont été séchés partiellement à l'air libre et transportés à température ambiante en France.

2.2.2 Principe expérimental et analyses.

i) Processus abiotiques

i.i) Photodegradation.

En raison de ses propriétés physicochimiques, le SMX est une molécule photosensible (Abellán et al, 2009). De plus, le rayonnement UV est plus important dans un environnement d'haute altitude comme notre site d'étude qui se trouve aussi en zone tempérée. Ainsi, l'objectif de cette expérience a été d'évaluer le comportement de photolyse du SMX sous lumière naturelle dans trois matrices différentes : a) eau pure, b) eau avec un fond ionique reconstitué et c) eau de rivière.

L'eau de rivière a été prélevée sur le cours d'eau Seco après la sortie des eaux usées traitées en provenance de la STEP Puchukollo en aval de la ville d'El Alto. Environ 5L d'eau ont été prélevées dans des bouteilles en verre ambré préalablement rincés avec du MeOH (5% v :v) et de l'eau pure. Avant échantillonnage les bouteilles ont été rincées avec de l'eau sur site à trois reprises. L'expérience a été réalisée en Bolivie sur le toit du Laboratorio de Calidad ambiental (LCA) La Paz, Bolivie (16°32'15,44''S ; 68°04'00,09''O, élévation: 3417m).

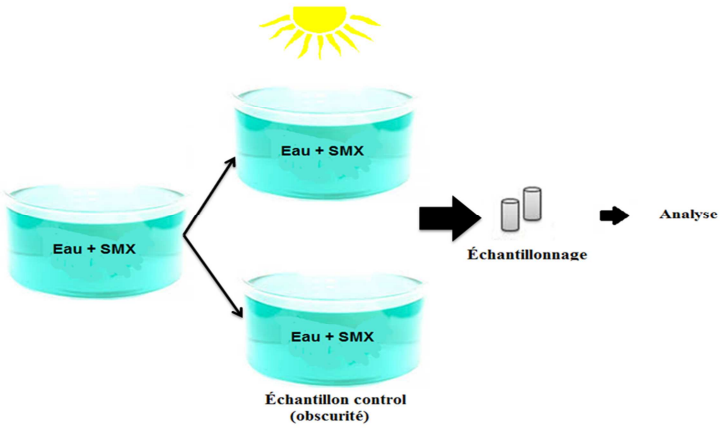


Figure 18 Principe de l'expérience de photodégradation du SMX.

L'expérience a consisté en l'ajout d'un volume connu d'une solution mère à 1000 mg L^{-1} pour une concentration finale d'environ 10 mg L^{-1}. Les matrices ainsi préparées ont été exposées à la lumière naturelle (dans les heures du jour), pour une durée totale d'exposition de 56h. Des échantillons contrôles ont été réalisés (dans les mêmes matrices d'eau) et maintenus dans l'obscurité avec pour objectif de prendre en compte les processus autres que la photodégradation entrainant la disparition du SMX de la phase liquide. Des échantillons de 500µl ont été prélevés (en duplicata) à différents intervalles du temps. Le pH a été mesuré au début et à la fin de l'expérience. Les échantillons ont été ensuite congelés et envoyés (±4°C)

au LTHE (Grenoble, France) pour analyse selon la méthode HPLC-UV décrite plus loin. Le principe de l'expérience est illustré dans la figure 18.

Le SMX (98%) a été obtenu chez LKT Laboratoires, le méthanol chez ROTH (HPLC Ultra Gradient ROTISOL®) et les sels ioniques (Br_2Mg, Cl_2Mg, MgF_2, $MgSO_4^-$ and $Na_3PO_4^-$) auprès de Sigma-Aldrich. L'eau ultra pure a été obtenue à partir d'un système de purification d'eau Millipore Direct-Q 3 UV.

Les constantes de dégradation (*k*) ont été calculées comme étant la pente de la courbe Ln (Ct / C0) en fonction du temps. Où Ct est la concentration du composé à un moment donnée et C0 est la concentration initiale. Les temps de demi-vie ont été calculés comme étant le temps auquel la concentration diminue de moitié, selon la formule suivante:

$$T_{1/2} = \frac{ln2}{k} \qquad \text{Eq (16)}$$

i.ii) Sorption.

L'objectif était d'étudier l'adsorption du SMX dans 10 sols du BV du Katari par des expériences de sorption en batch. La méthodologie utilisée a été adaptée de la méthode proposée par l'OECD (OECD, 2000). Le test visait à évaluer la sorption d'une substance chimique dans différents types de sol avec des propriétés physicochimiques variées (%MO, texture et pH). La méthode comprend trois étapes :

Optimisation du ratio sol/solution: Il est nécessaire de connaitre les rapports sol/solution qie permettront le mieux d'observer la cinétique de sorption en fonction des limites de détection de la méthode d'analyse. Dans la pratique, il est utile de choisir un rapport pour lequel le pourcentage adsorbé est supérieur à 20%, et de préférence >50%, tout en veillant à ce que la concentration de la substance étudiée dans la phase aqueuse soit suffisamment élevée pour être mesurée avec précision par la méthode analytique.

Cinétiques de sorption : Cette étape comprend l'étude de l'adsorption du composé modèle à 1 seule concentration mais à différents pas de temps. Cela nous permet de déterminer principalement le temps d'équilibre. En outre, elle nous permet d'évaluer l'existence d'une dégradation biotique ou abiotique au cours des études de sorption de courte durée.

Isothermes de sorption : Ici on détermine l'influence de la concentration sur le phénomène de sorption ainsi que le coefficient de sorption qui décrit le comportement de sorption de la matrice solide testée. Le principe consiste à mettre en contact des échantillons de sol (d'un poids sec connu et pré-équilibrés dans du CaCl2 (0.01 M) avec des volumes connus de solutions de la substance étudiée. Le mélange est agité pendant un temps approprié et les suspensions de sol sont ensuite séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration.

Finalement, la phase aqueuse est analysée (Figure 19). L'analyse a été effectuée par la méthode HPLC-UV décrite plus loin. Les étapes pour l'étude préliminaire (optimisation du ratio sol/solution et cinétique de sorption) ont été effectués sur deux sols du BV ayant des taux de MO contrastés (A :14.2% et B : 0.8%) comme le recommande l'OECD.

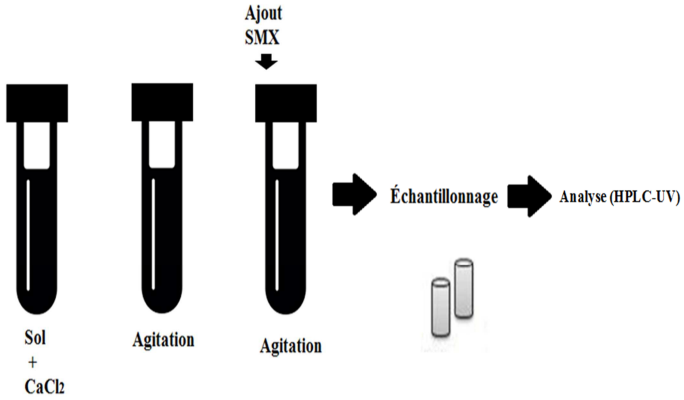


Figure 19 Principe des essais de sorption du SMX dans les sols en batches.

i.iii) Mobilité.

Cette partie de la thèse a été effectuée sur les mêmes sols que l'expérience de sorption. L'objectif principal etait d'étudier le transport vertical du SMX au travers des expériences en colonnes de sol en laboratoire. La figure 20 montre le dispositif utilisé lors des expériences. En principe, un volume (pulse) de solution avec une concentration connue du composé étudié est appliqué à l'entrée de la colonne de sol (ici en régime permanent d'écoulement) et un échantillonnage des lixiviats est réalisé dans le temps. Dans un premier temps on étudie les propriétés hydrodynamiques du sol à l'aide d'un traceur de l'eau, c'est-à-dire, un soluté conservatif qui n'interagit pas avec le milieu. On utilise souvent des anions (ex ; Cl^-, Br^-) pour leur faible coût d'analyse. On détermine ainsi temps nécessaire pour qu'un soluté (non réactif) traversé la colonne et les caractéristiques hydrodynamiques du sol (vitesse de pore, dispersion). Le traceur utilisé ici a été le Br^- dans sa forme KBr^-. Dans un deuxième temps on injecte le composé étudié (SMX). Les concentrations du traceur ainsi que celles du composé étudié sont analysées en sortie de colonne et permettent de tracer leurs courbes d'élution. L'analyse du Br- a été réalisée par chromatographie ionique (décrite plus haut) et celui du SMX par HPLC-UV (méthode décrite plus bas). Les courbes de sortie (concentration en fonction du temps) du traceur (Br^-) ont été analysées en ajustant l'équation de convection dispersion par modélisation inverse à l'aide du programme CXTFIT (N Toride et al., 1999) afin d'obtenir les paramètres hydrodynamiques tels que la dispersion, et vérifier l'existence d'équilibre physique. Les courbes de sortie du SMX ont été modélisées avec le programme

HYDRUS (Simunek et al., 2008) pour déterminer les paramètres de transport tels que l'isotherme de sorption, et les paramètres associés à la sorption avec cinétique et irréversibilité. Pour le détail sur la méthodologie utilisé voir l'article 4 du Chapitre IV.

Figure 20 Dispositif expérimental utilisé pour les expériences en colonnes.

i.iv) Méthodes analytiques.

La méthode analytique utilisée pour l'analyse des échantillons générés lors de ces expériences est l'HPLC-UV. Les analyses ont été réalisées en triplicat par échantillon. L'appareillage utilisé est un dispositif Spectra system UV 100 (Thermo Separation Products) équipé d'une colonne C-18 (EC 125/3 NUCLEOSIL 100-5 C18, 5 µm). Le choix de la colonne a été fait suite à une étude bibliographique (Díaz-Cruz et al., 2003; Gibs et al., 2013; Hoa et al., 2011; Minh et al., 2009). La composition de la phase mobile a été de 15% MeOH, 15% ACN et 0.02% d'acide formique et est restée la même tout au long de l'analyse (mode isocratique). Le flux a été de 0.5 ml/min^{-1}. Le temps d'analyse pour chaque échantillon à été de 8 min (3 injections par echantillon) avec un volume d'injection de 20 ul. La quantification a été effectuée par étalonnage externe.

La figure 21 montre l'appareillage utilisé qui est constitué de : deux pompes Gilson (1), une chambre de mélange (2), un détecteur UV spectra physique (3) un passeur (spark Holland marathon (4) et un purificateur d'air (5). Il est piloté par le logiciel Clarity.

En raison du grand nombre d'échantillons générés (~ 1500 avec analyses en triplicat), la validation de la méthode a été nécessaire pour s'assurer de la fiabilité et reproductibilité des

analyses en routine. La méthode utilisée pour cette validation est le profil d'exactitude de Feinberg (2010).

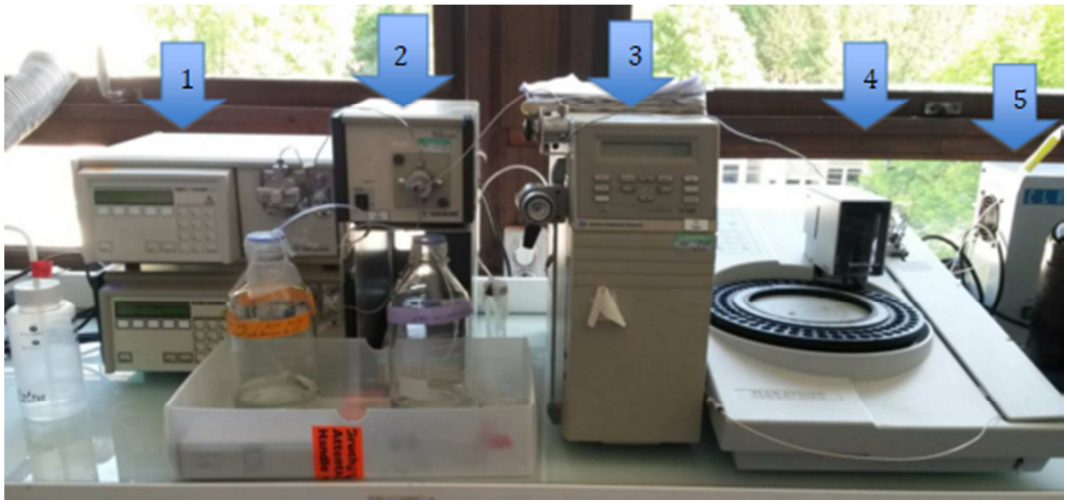


Figure 21 Vu du système HPLC-UV pour les analyses de SMX en solution.

La quantification pour les essais de validation a été réalisée par étalonnage externe, en utilisant 6 points de gamme. La méthode a été caractérisée dans sa linéarité, répétabilité, fiabilité, limite de détection et limite de quantification. La gamme de concentrations visée est celle de 0,5 mg L^{-1} à 25 mg L^{-1}. Les limites d'acceptabilité ont été fixées à ±10% (définies en fonction de l'objectif de la méthode) et l'intervalle de tolérance (β) à ±80 % (valeur généralement choisie entre 80 % et 95 % (Feinberg and Laurentie, 2010). Les solutions standards utilisées ainsi que ces valeurs de référence sont consignées dans la table 2.

Standard	Niveau de concentration	Valeur de référence (mg L^{-1})
1	1	0,01
2	2	0,5
3	3	5
4	4	10
5	5	15
6	6	25

Tableau 2 Valeurs de référence des standards de SMX (mg L-1) utilisés pour la calibration de la méthode HPLC-UV.

Quatre séries de mesures ont été réalisées (4 dates différentes) avec trois injections par niveau de concentration. Les concentrations, solutions standards et l'opérateur ont été identiques pour toutes les séries. Les résultats sont présentes dans le Chapitre IV.

ii) Processus biotiques.

ii.i) Biodégradation du SMX.

L'objectif de cette expérience était d'évaluer la biodégradation du SMX dans les différents sols du BV du Katari. Le principe de l'expérience a consisté à ajouter une concentration

connue du composé étudié à une masse de sol et à suivre sa cinétique de dissipation par des échantillonnages à différents intervalles de temps (méthodologie détaillée dans l'article 5 du Chapitre IV). L'expérience a été réalisée sur une durée totale de 90 jours, en duplicata pour chaque sol. Des échantillons contrôles avec du sol stérile ont été également suivis pour pouvoir différencier l'effet de la biodégradation des autres processus abiotiques (Figure 22). Les microcosmes étaient ouverts (dans un environnement stérile) régulièrement pour son aération.

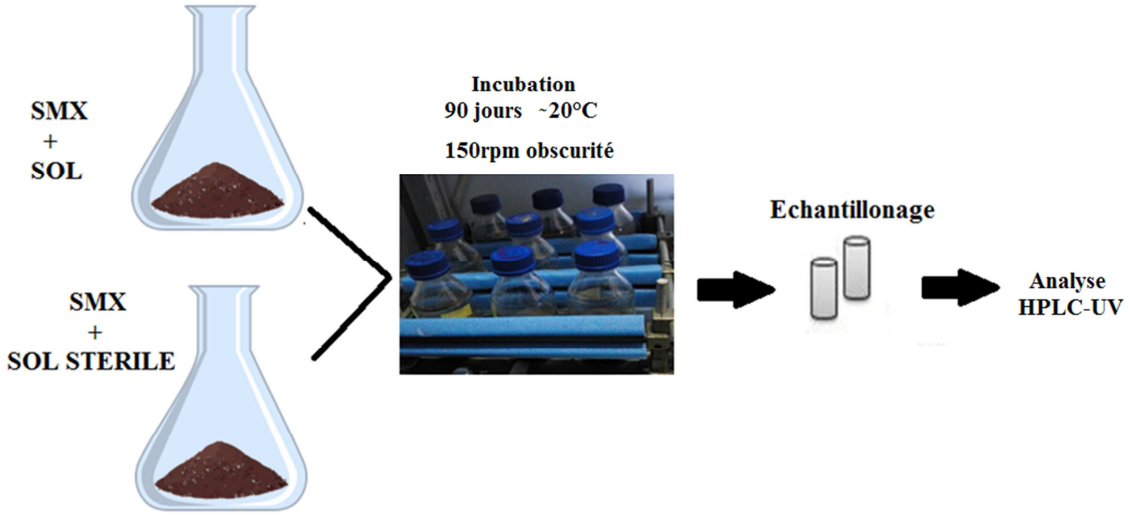


Figure 22 Principe des expériences de biodégradation du SMX en microcosmes de sols du BV du Katari.

2.3 Evaluation de l'impact du SMX sur les communautés bactériennes des sols.

2.3.1 Impacts sur la structure des communautés bactériennes du sol.

L'impact du SMX a été évalué à partir des échantillons de sols issus de l'expérience biodégradation (préalablement décrite) et jusqu'à un mois après la contamination avec du SMX. Des contrôles ont été réalisés (sol+eau) pour vérifier que les changements observés ne soient pas reliés avec les conditions expérimentales mais bien à la présence du SMX. Les impacts ont été évalués par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) (Green et al., 2010) et par séquençage à haut débit de l'ADNr 16S. Ceci a aussi permis de comparer la sensibilité des deux méthodes pour evaluer l'impact de l'antibiotique.

L'objectif de la DGGE était d'évaluer la diversité d'une communauté complexe de microorganismes sur la base de leur génotype. Cette méthode conduit à la séparation de fragments d'ADN de tailles identiques mais de séquences variables lors d'une migration des fragmentsd'ADN préalablement amplifiés par PCR. La migration de l'ADN sous l'effet d'un champ électrique s'effectue à travers un gel vertical de polyacrylamide avec un gradient

linéaire de substances dénaturantes de l'ADN. Le fragment adopte alors une conformation simple brin, partielle ou totale, selon le dégré de dénaturation qui dépend des liaisons hydrogènes du fragment d'ADN. La séparation des fragments dépend de leur degré de mobilité (migration) dans le gel qui est fortement affectée par son degré de dénaturation. En fin d'analyse les fragments sont visualisés par coloration fournissant ainsi ce qu'on appelle une empreinte génétique de l'échantillon. Une bande est considérée comme appartenant à un seul génotype (Boon et al., 2002; Duarte et al., 2012; Green et al., 2010; Hoshino and Matsumoto, 2007).

Le séquençage a été réalisé par pyroséquençage. Avec cette méthode, l'ADN subit après extraction une étape d'amplification par PCR specifique de l'ADN 16S. Le mélange obtenu est ensuite déposé sur une plaque ou chaque emplacement ne peut contenir qu'une seule molécule d'ADN amplifiée. La réaction de séquençage par synthèse est alors initiée base par base. La lecture de chaque base incorporée est révélée à l'aide d'une réaction de chimioluminescence et détectée par une caméra. Ces analyses ont été soustraitées à la plateforme GET de Toulouse. Pour plus des details voir l'article 5 du chapitre IV.

2.3.2 Développement de résistances bactériennes au SMX.

Cette étude a aussi été effectuée à partir des échantillons de sols issus de l'expérience de biodégradation. Les impacts du SMX ont été évalués jusqu'à 3 mois après contamination par SMX comme pour l'expérience de biodégradation. Les analyses ont été effectués en triplicat par échantillon. La méthode analytique utilisée est la qPCR (voir section *2.1.5* de ce chapitre).

2.4 Evaluation du risque de pollution au SMX du réseau hydrographique du BV par modélisation.

L'objectif principal de cette étude était de simuler les concentrations en antibiotiques dans les eaux superficiels du BV ainsi que d'évaluer l'effet de plusieurs scenarii sur ces concentrations. Les simulations ont été réalisées avec les données in situ obtenues lors des expérimentations précédemment décrites. Le modèle retenu pour cette étude est le modèle GREAT-ER qui est un modèle déterministe avec une approche stochastique en amont, permettant ainsi de prendre en compte la variabilité hydrologique au sein du BV.

2.4.1 Le modelè GREAT-ER.

Le modèle GREAT-ER (Geo-referenced Regional Exposure AssessmentTool for European Rivers) est un outil « open source » pour l'évaluation de l'exposition des milieux aquatiques à

la pollution par des produits chimiques. Il a été développé pour être utilisé avec le système d'évaluation des risques environnementaux de l'UE. L'objectif principal est de calculer la distribution des concentrations environnementales prédites en aval des sources de pollution dans les eaux de surface européenes à l'échelle du cours d'eau et du BV. Le modèle est basé sur un système d'information géographique (SIG) pour le stockage des données et sa visualisation, ainsi que sur des modèles mathématiques pour la prédiction du devenir des molécules chimiques dans l'environnement (Feijtel et al., 1997).

Les cours d'eau sont classés par ordre d'importance (ex ; cours d'eau principaux ou secondaires) et segmentés en tronçons. Les aires de drainage sont fractionnées en unités géographiques, lesquelles sont liées à des points de décharge dans la rivière.

Les éléments de base du modèle sont les points de décharge (sources) et les tronçons de cours d'eau, dans lesquels le débit est modélisé en condition stationnaire. Les concentrations émises sont calculées par le modèle à partir des données sur la consommation (kg/(cap.année) du composé d'intérêt, la population, et la consommation en eau (L/(cap.jour)). La prédiction des concentrations dans les différents tronçons est effectuée en tenant compte des valeurs d'émission ainsi calculées et les informations d'entrée sur le débit et de la vitesse d'écoulement à l'intérieur de chaque tronçon.

GREAT-ER est défini comme un modèle déterministe avec une approche stochastique en amont (en utilisant une méthode de Monte Carlo). La simulation stochastique permet de prendre en compte la saisonnalité des facteurs environnementaux et l'incertitude des paramètres. Pour cela, le modèle nécessite l'introduction de la valeur moyenne et le percentile à 5% du débit et de la vitesse d'écoulement. Le devenir des composés peut être modélisé avec des modèles de différent niveau de complexité 1, 2 ou 3. Le modèle le plus simple permet des simulations avec un minimum des données chimiques d'entrée. L'élimination dans la STEP est décrite par une efficacité d'élimination déterminée, qui dépend du type de traitement. L'élimination dans les cours d'eau est décrite pour une cinétique du premier ordre, en supposant un coefficient de taux fixe avec la formule suivante :

$$R_{RIVER} = 1 - e^{-HTR*k} \quad (17)$$

où k est la constante de dégradation dans le cours d'eau (h^{-1}) et HRT le temps de trajet calculé à partir de la longueur du tronçon et la vitesse moyenne de l'eau.

CHAPITRE III. Caractérisation de l'état de pollution du bassin versant.

Introduction

Ce Chapitre concerne l'évaluation de l'état de pollution du bassin versant du Katari. Il regroupe l'enssemble de mes résultats sous forme d'articles en anglais.

Le premier article porte sur l'eutrophisation et la pollution polymétallique dans le réseau hydrographique du BV depuis la tête du BV (Milluni) jusqu'à son exutoire dans la baie de Cohana (Lac Titicaca). L'étude géochimique du réseau hydrographique a été réalisée afin d'évaluer son état de contamination, comprendre les processus de transport et d'échanges entre les différentes phases (eau, particules en suspension et sédiments), ainsi que d'identifier les contributions des différentes composantes naturelles et des activités anthropiques sur la qualité des eaux du BV. Ceci a permis de mieux comprendre le fonctionnement de ce système naturel de haute montagne (abritant une variété d'activités anthropiques) et d'établir ainsi un bilan sur son état de pollution. Il a été soumis au journal : Journal of Geochemical Exploration.

Le deuxième article s'intéresse plus particulièrement à l'étude de la pollution par les antibiotiques des eaux de surface et souterraines ainsi que des sols du BV. On s'intéresse aussi à l'étude de la présence de résistances bactériennes. Le SMX a été choisi comme composé modèle en raison de sa présence avérée sur le site d'étude (Duwig et al., 2014a), pour son potentiel de mobilité dans les écosystèmes naturels et pour son potentiel d'induction de résistances bactériennes. La présence du Trimethoprime (composé avec lequel le SMX est communément administré) ainsi que des deux principaux produits de transformation humains du SMX (acetyl-sulfamethoxazole et sulfamethoxazole-N1-glucuronide) ont ainsi été déterminées dans les eaux (de surface et souterraines). Tandis que dans les sols seulement le SMX été déterminée. Les objectifs ont été principalement d'identifier les sources de pollution en antibiotiques dans le BV (anthropique ou vétérinaire) et de déterminer la présence de résistances bactériennes au SMX.

1. Eutrophisation et pollution polymétallique dans le réseau hydrographique du BV du Katari.

1.1 Article 1 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats

Les villes en croissance rapide et dans des pays en voies de développement sont spécialement exposées à des problématiques de pollutions multiples liées à la présence de produits organiques synthétiques ou métalliques dans l'air, la nourriture ou l'eau, ainsi qu'à l'absence de conditions sanitaires appropriées. Cette étude propose une approche synthétique et intégrative pour l'évaluation de l'état de pollution du BV dans son contexte rurale, urbaine et minier. Une compilation et analyse compréhensive des données hydrologiques, physico-chimiques, chimiques (nutriments et métaux de trace) et bactériologiques est ici présentée.

Le système du réseau hydrographique étudié s'est avéré être hautement dynamique en rapport au régime hydrologique. Ce qui est en lien avec la remobilisation de polluants contenus dans les sédiments à partir des zones urbaines / minières vers les zones rurales (lac Titicaca inclus). Les resultats montrent que eaux de surface se trouvent fortement impactées en termes de concentrations en nutriments et éléments métalliques, ainsi qu'en termes de qualité bactériologique. La problématique des polluants métalliques est liée aux zones urbaines (ville d'El Alto) et minières avec une diminution des flux de ces éléments en saison sèche due à la sédimentation des particules et à l'augmentation du pH.

En résumé, la qualité de l'eau le long du bassin versant Katari est fortement détériorée et n'est pas compatible avec des usages du type irrigation et encore moins consommation. Par exemple, les concentrations dissoutes en Cd, Mn et Zn (pour les deux saisons) sont au-delà des valeurs limites établies pour les normes européennes et boliviennes. Le risque pour les populations est très élevée dans la baie Cohana, la quel est utilisé comme zone d'abreuvoir pour les bovins et ou la population utilise cette eau pour boire et cuisiner.

1.2 Impacts of anthropogenic activities from the fastest-growing urban center of Bolivia (El Alto, 4000 m a.s.l.) on the contamination and eutrophication of the Milluni – Katari – Lake Titicaca continuum

D. Archundia[a], C. Duwig[a,b],*, L. Spadini,[a], G. Uzu[a],[b], S. Guédrond,[e], M.C. Morel[a,f], R. Cortez[g], O. Ramos Ramos[h], J. Chincheros[i], and J.M.F. Martins[a,c].

Soumis au journal Journal of Geochemical Exploration

[a]Université Grenoble Alpes, LTHE, F38000 Grenoble, France
[b]IRD, LTHE, F38000 Grenoble, France
[c]CNRS, LTHE, F38000 Grenoble, France
[d]Université Grenoble Alpes, ISTERRE, F38000 Grenoble, France
[e]IRD, ISTERRE, F38000 Grenoble, France
[f]CNAM, Laboratoire d'analyses chimiques et bio analyses, Paris Cedex 3, France
[g]Instituto de Geología y Medio Ambiente (IGEMA), Universidad Mayor de San Andrés, 303 La Paz, Bolivia
[h]Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), Universidad Mayor de San Andrés, 303 La Paz, Bolivia
[i]Instituto de Biología, Laboratorio de Calidad Ambiental (LCA), Universidad Mayor de San Andrés, 303 La Paz, Bolivia
*Corresponding author

Keywords: *America Latina, hydrodynamics, coliforms, E. Coli, nutrients, trace metals.*

Highlights:
- *Contrasted hydrodynamics affects mining trace metal loads.*
- *Nutrient pollution from El Alto city induces eutrophic state of surface waters.*
- *Trace metal pollution is linked with both urban and mining activities.*
- *Fecal contamination prevents the use of surface water downstream the urban area.*

Abstract:
Cities from developing countries encounter the rapid waves of social transformation and economic development where the environment is mostly a neglected aspect. The Katari watershed encompasses mining areas, El Alto city (one of the fastest growing urban areas in South America and the biggest in the Altiplano) as well as agricultural areas. Its outlet is the Cohana bay, one of the most polluted areas of lake Titicaca. Here we propose an integrative approach (hydrological, physicochemical, chemical and bacterial data) to understand the pollution problem of this developing area, in which a variety of anthropogenic activities takes place. Both mining and urban areas appear as sources of metal pollution. Nutrient and bacterial ccontaminations are mainly related to urban and industrial discharges. These situations cause impacts in the basin until the Cohana bay of Lake Titicaca. Pollutant concentration patterns were highly influenced by seasonal hydrology variations. The poor quality of surface waters in the basin represents a risk for human and animal populations as well as for the quality of aquifers located underneath El Alto city.

1. INTRODUCTION

As stated by McMichael (2000), cities have multiplied and expanded rapidly worldwide over the past two centuries. In some expanding cities from developing countries, residents often face the worst of both the traditional and modern worlds. They encounter a wide spectrum of pollution ranging from a lack of sanitation (with exposure to human excrement and unsafe drinking-water) to exposure to hazardous synthetic organic or metallic chemicals in their air, food and water. Latin American cities are also exposed to the same phenomenon (Miguel, 1991 ; Anton, 1993), with fast growing megacities (e.g. Mexico, Sao Paulo, Buenos Aires) in the last three decades, leading to critical environmental problems and irreversible losses of natural resources such as water, soil, biodiversity.

Since the last 30 years, the city of El Alto, the highest city in the world and the biggest city in the Altiplano, has undergone drastic changes due to an important mining crisis and the application of structural adjustment programs (Jiménez, 1996) provoking an important migration of rural population to urban centres, as well as the application of modern agriculture practices with the use of agrochemicals. El Alto is one of the fastest growing urban areas in South America with a population increase from 95,000 habitants in 1976 to around 1.2 million according to the last census (H Mazurek, 2012) with minimal land planning, insufficient regulation and undersized waste water treatment facilities. Contamination of surface water in El Alto watershed (namely the Katari), was already identified in the years 1990 by la Paz University (Chiqui, 2001).

The Katari watershed takes its source in the Royal Cordillera (Fig. 1), where local mining activities (i.e., mainly Sn and Ag mines) take place since 1940 (Salvarredy-Aranguren et al. 2008). Recently, Salvarredy-Aranguren et al. (2008) studied the related inorganic contamination in the Milluni valley and highlighted the strong contamination of surface waters by acid mine drainage (AMD).

Downstream, the Katari watershed encompasses El Alto city, which includes many facilities, manufactures and small scale industries located along the margins of the Katari River tributaries (PNUMA, 2008; Ribera Arismendi, 2010). Amongst the Katari River tributaries (e.g., Seke and Seco and Pallina Rivers), PNUMA (2011) already noted that the Pallina River was extremely contaminated, consequences of organic and industrial discharges from urban centers (El Alto and Viacha). They measured high levels of DBO (700-800 mg/L) and some metals (Cd, As, Pb). According to Chudnoff (2006) fecal coliforms and toluene downstream of the city strongly exceeded the minimum concentrations stated in the safe drinking water act in the US (Mason et al., 2005).

Finally, the Katari watershed ends in the Cohana bay (Fig. 1), located in Lake Huiñamarca (the small Lake of Titicaca Lake). Fonturbel (2005) showed that Cohana Bay carries amongst the most eutrophic waters of the Bolivian side of the lake due to the uncontrolled discharge of untreated wastewater all over the watershed. Detrimental water quality might lead to illnesses that can be fatal, especially to young children, elderly and immuno-depressed individuals (WHO, 1996), likewise the Catholic Bolivian University (UAC Batallas., 2010) observed that the population of Cohana bay suffers health diseases linked to poor quality of surface waters. This poor quality of surface waters was recently confirmed by Duwig et al. (2014) who evidenced important levels of pharmaceuticals such as antibiotics in the Katari surface waters. Recently (03/04/2015), a large eutrophication event (bloom of Carteria green algae) affected

the entire Lake Huiñaimarca (Acha et al., 2015 in prep) leading to a long anoxic phase of surface waters and to a massive death of living biota (e.g. fish and frogs) highlighting the fragility of this ecosystem. The case of Cohana bay is not unique since for example, the Puno Bay, in the Peruvian side of the great Lake Titicaca, was identified as contaminated by urban and industrial effluents since the 80's (NorthCote et al., 1989). In addition, the edges of Lake Titicaca have been subject for millennia to intense mining leading to trace metal elements contamination (M.M.A.y.A., 2010; Monroy et al., 2014).

Up to now, very little information is available concerning water quality in the Bolivian side of Lake Titicaca including the Lake Huiñamarca and its tributaries. The few studies that exist in this area are disjointed studies handling a subject at a time. We provide here an integrative and synthetic approach to understand the whole pollution issue of the surrounding area of the biggest city in the Altiplano in a mining and rural context. A comprehensive compilation of hydrological, physicochemical, chemical (nutrients and trace metals concentrations) and bacterial data along the river network in the Katari watershed is presented to draw a first inventory of its water quality with considerations of this particular and fragile ecosystem in the context of rapid and hazardous societal and industrial developments.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study site

Climate

The climate of the region is semi-dry and cold as determined by the Intertropical Convergence Zone (ITCZ) and by its high altitude (over 3800 m). During the austral winter, the ITCZ goes north and Pacific anticyclones enter the South American continent with a dry climate. At the end of the winter, the ITCZ moves above the South American Continent bringing moisture. The region has extreme diurnal variations of climatic factors such as solar radiation, temperature and moisture. Daily variations of temperature are important, with temperature varying from -1 to 16°C (Airport, El Alto), controlled by solar radiation. Amplitude of daily temperature variation is higher than annual ones (Condom, 2002). Average annual temperature varies between 11 ° C (at El Alto) and 7.7 ° C (at Tiwanaku near the Titicaca lake) (IDH – UMSA, 2013). Rainfall is low with an average annual precipitation of 532 mm/year (490 to 620 mm/year, Data from 1999 to 2008 - SENAMHI, 2015; see Appendix A), concentrated from December to March: over 70% of rainfall occurs during the austral summer, from December to March, when moist air from the Amazon enters the Altiplano and

discharges in the form of convective rainfalls (M.M.A.y.A., 2010; PNUMA, 2011). Maximum evaporation occurs in summer (November to March) with average values of 300 mm and the minimum in winter (May-August) with average values of 114 mm (IDH – UMSA, 2013).

Geology and pedology

The Katari watershed is about 2,022 km^2. It is dominated by summits reaching more than 6000 m a.s.l. in the Cordillera Real (Huayna Potosi, 6088 m asl). The watershed is characterized from North to South by: (i) the Royal Cordillera, composed of granitic, granodiorite and diorite rocks (Hercynian construction), partially covered by glaciers (Soruco, 2012) and sedimentary/metamorphic rocks (e.g, metaquartzite, metasiltstone and quartzite) (Ahlfeld and Schneider – Scherbina, 1964; Jauregui, 1969; Muriel, 1967); (ii) the Milluni Glacial Valley, characterized by thick Quaternary glacial (till) and fluvioglacial loose sediments (GEOBOL, 1995b); (iii) the El Alto - Viacha plain composed of fluvio-glacial and alluvial sediments eroded from the Royal Cordillera (GEOBOL, 1995a; Tícona et al., 2012) (iv) the Viacha shallow valleys – Lake Titicaca plain composed of Devonian siltstone, sandstone and shale, Tertiary sandstone and tuff and quaternary alluvial and lacustrine fine granulometry sediments until the flooding lake Titicaca area (M.M.A.y.A., 2010) and (v) Colquencha sub-basin located in the Katari Alto and composed by alluvial and colluvial sediments (Zeballos, 2009). For detailed information about rock types and abundant mineral occurrences see Appendix B. According to (FAO, 2005), the dominant soils are: upstream, Dystric Regosol, and downstream, Eutric Cambisol.

Hydrological network

Four main rivers flow through the considered part of the watershed: Seco, Seke, Pallina and Katari rivers (Fig. 1). Seke and Seco rivers take their source in the Cordillera Real above the Milluni Valley where a network of diffuse runoff and wetlands can be observed. Upstream part of Seke river discharges into Milluni lake, which receives mining drainage (Salvarredy-Aranguren et al., 2008) and serves as the main reservoir of drinking water for the city of La Paz. The rest of Seke river as well as Seco river flows through El Alto (1.2 million habitants), and receive both treated and untreated urban waters (M.M.A.y.A., 2010, 2013).

Seke and Seco rivers discharge into the Pallina River, which flows through Viacha city. Approximately 18 km downstream of Viacha city, Pallina River flows into Katari River. The lower Katari River flows through agricultural (1788 Ha) and breeding areas (41072 Ha) and discharges into Lake Titicaca in the Cohana bay located in the lower Lake Titicaca (also called Huiñaimarca). Titicaca in the Cohana bay located in the lower Lake Titicaca (also

called Huiñaimarca). Lake Titicaca constitutes the most important water resource of the Bolivian Altiplano and the highest of the world's large lakes.

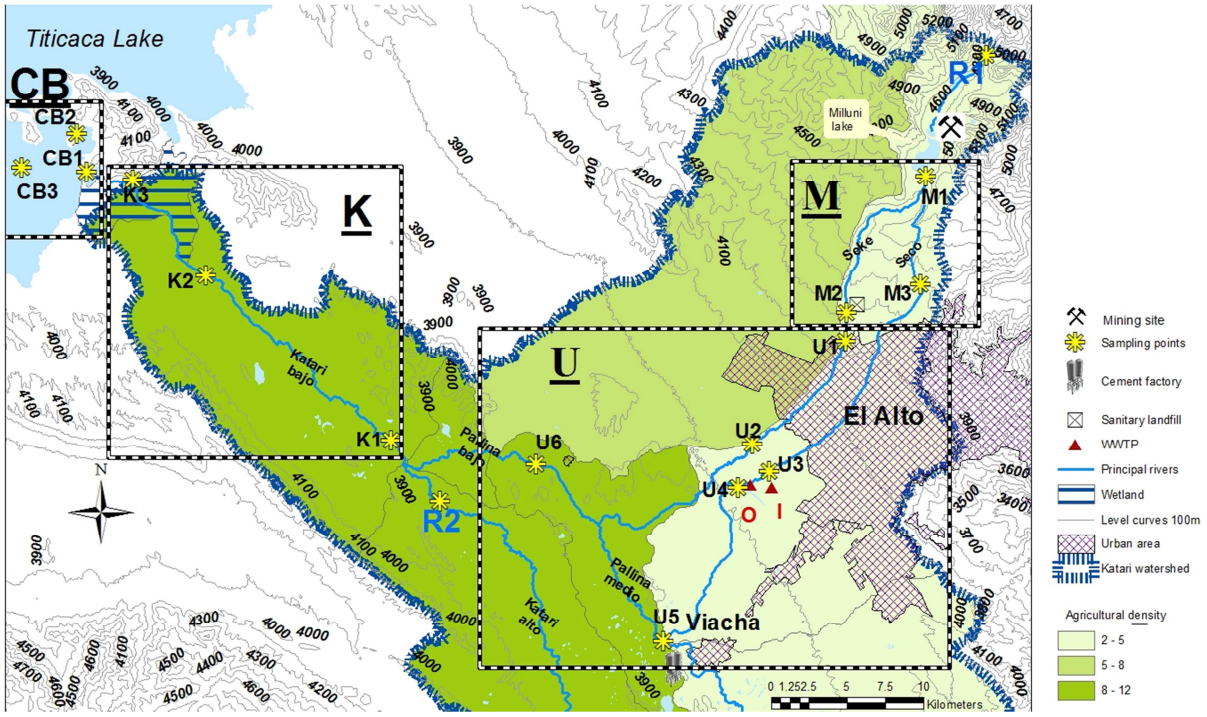


Figure 1. *Study site and sampling points (I : inflow of WWTP ; O : outflow of WWTP) along the Katari Catchment. R1 refers to reference point of the crystalline rock from the Royal Cordillera, R2 refers to the reference point of the sedimentary deposits from fluvio-glacial erosion, M refers to the downstream of the mining area (points M1 to M3). U refers to the urban area (points U1to U6, I refers to the inlet of the Puchokollo WWTP and O to the outlet. K refers to the Rio Katari bajo area (points K1 to K3) and CB to the Cohana bay area (points CB1 to CB3).*

Geographical settings (Watershed and Alto city)

The city of El Alto is Bolivia's largest and fastest-growing urban center (Arbona and Khol, 2004). With a population of over 1.1 million at an altitude of around 4000 meters a.s.l., it is also one of the highest major cities in the world. El Alto depends at 75% on the Purapurani aquifer for its drinking water, which is just below the city (M.M.A.y.A., 2013, 2010).

El Alto is also a major industrial city with more than 5000 industries the majority of them being micro-entreprises, legal or illegal. 71% of them deal with fabrication of textiles, tanneries, furniture's, painting and metallurgic industries, laundry and dry cleaning facilities and food processing (PNUMA, 2008; Ribera Arismendi, 2010). Most of the industries have no wastewater treatment plant. The wastewater collection system and the wastewater treatment plant of Puchukollo covers less than 50% of the wastewater generated by this urban area (PNUMA, 2008). The WWTP plant treats around 500 L s^{-1}, officially providing a secondary type treatment (filtration through grills and percolating filters, and organic matter removal through anaerobic ponds). The rest of waste waters goes directly to soils or rivers.

South of El Alto city, Viacha (80'000 inhabitants) includes one of the biggest cement factories in Bolivia and discharges its wastewaters in the Pallina River. Landfills also potentially generate water contamination as the two major landfills (Villa Ingenio North of El Alto and Viacha landfills) are located near Seke River and Pallina River, respectively.

2.2. Sampling and analytical procedures

2.2.1. Sampling strategy

Sampling was conducted during campaigns in June 2012 (dry season) and February 2013 (wet season) and focused on the Rivers Seke, Seco, Pallina (upstream and downstream), and Katari, which represent about 40% of the Katari watershed and the most affected by anthropic activities. Surface waters were sampled at 16 points (Fig. 1) in the river systems and at the inlet (I) and the outlet (O) of WWTP of Puchukollo (Fig.1, I and O respectively).

To facilitate the readability, sampling points are grouped in 4 specific areas according to their respective location from the sources, (i) the mining area (M) combining Lake Milluni outflow and the downstream area located above El Alto city (sampling point M1 to M3), (ii) the urban area (U) comprising El Alto and Viacha cities, Pallina (uspstream and downstream) as well as the WWT Puchukollo (sampling point U1 to U6, I and O), (iii) the Katari River (K) (sampling point K1 to K3) and the Cohana Bay (CB) (sampling point CB1 to CB3).

Two reference points (R) were sampled upstream the mining and the urban area; R1 (in the upper part of Seke river) being typical of the crystalline rock from the Royal Cordillera and R2 (in the Katari river upstream the confluence with the Pallina river) being typical of the sedimentary deposits from fluvio-glacial erosion. It is important to notice than Reference R2 cannot be considered as a pristine site since it crosses an agricultural area which is however weakly affected by urban discharges (around 10 000 habitants, MMAyA 2010).

2.2.2. On site analysis and water sample collection and conditioning

Water samples were analyzed on-site for physicochemical parameters; i.e., dissolved oxygen (D.O), pH and electrical conductivity (EC) using a multi-parameter probe (Eijkelkamp system, model 18.52.01). Water samples were collected in the middle of the water course using acid cleaned glass bottles, subsampled for filtered (*in situ*) and bulk solutions and stored at 4°C until filtration. All details of the filtrations and conditioning are given in **Appendix C.**

Briefly, water samples for dissolved organic carbon (DOC), major elements, and metals were filtered on site using 0.45µm cellulose acetate syringe filters (Millipore) and stored in pre-cleaned (burnt borosilicate vials for 4h at 550°C for DOC and acid washed (HCl 10%, v/v; 5

days) falcon tubes for metals and majors elements) vials. Filtrates used for anion and alkalinity analysis were frozen in unwashed falcon tubes, while filtrates for DOC and metal measurements were acidified with ultrapure HCl (1%, v/v) and 2% HNO3 (1%, v/v), respectively and stored at 4°C until analysis. Samples for alkalinity, DOC, POC, ammonium and bacterial water quality were only collected during the wet season. Sites M1, M2, U1, CB3 and I were sampled only during the wet season; inversely points U5, K2 and CB1 were sampled only during the dry season. River bed sediments were sampled only at sampling points R1, M1 to M3, U1, U2, U6, O, K1, K3 and CB2. They were air dried, sieved at 2 mm and milled in an agate mortar at LCA and stored for later analysis of trace metals concentrations. Particulate samples for total suspended sediments (TSS), particulate organic Carbon (POC) were collected after filtration of bulk water using filtration units (Nalgene) and pre-weighted quartz filters (Whatman GF/F, 0.7µm – pre calcinated at 550°C) within 18 h after sampling. Then, filters were dried at 105°C during 24h, weighted and stored for later POC analysis.

2.2.3. Chemical analysis.

All details for the analytical procedures and Quality assurance and control (QA/QC) are given in **Appendix C**. The following sections give a brief description of the analytical procedures.

Filtered solution analysis.

DOC was determined by 680°C Combustion Catalytic Oxidation (TOC-V CSN device, Shimadzu). Anions (Fl^-, Cl^-, Br^-, NO_3^-, PO_4^- and SO_4^-) and ammonium (NH_4^+) concentrations were quantified by Ion Chromatography (Metrohm 732/733 separation center, Metrosep A Supp 16 – 150mm, and Metrosep C2-150 mm anion and cation columns). Quantification limits (QL) were between 6 and 8 µg L^{-1} for Cl^- and Br^-, 17 µg L^{-1} for F^- and SO_4^- and between 30 and 34 µg L^{-1} for NO_3^- and PO_4^-. Major elements and metals were analyzed using an ICP-AES (Varian 720ES). Detection limits (DL) were between 0.5 and 1µg L^{-1} for Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn, and Sr and between 1 and 5µg L^{-1} for Cd, Pb, As and Sn.

Particulate analysis.

POC was determined on total suspended sediments (TSS) using an Elemental Analyzer (CE Instruments NA2100 Protein) after decarbonation (HCL vapor exposition). Major and trace elements concentrations in sediments and TSS were measured after digestion of ~ 200 mg of milled and dried solid samples or filters in a mixture of Trace grade HNO_3 (9 ml, 65%), HF (3

ml 47-51%) and HCl (2 ml 37%). Digestion was conducted in a Novawave (SCPscience, Canada) at 180° for 10 min and evaporated in PTFE vessels (Savillex®, 30mL) on a heating plate at 70°C. Residues were then dissolved in HNO_3 (2 ml, 10%) at 60°C for 30 min and diluted with 8 ml of ultrapure water. Finally suspensions were filtered at 0.45µm before analysis by ICP-AES (Varian 720ES) with external calibration. Quality assurance and control (QA/QC) of the analysis were performed with NIM GBW07323 Tibet sediment certified reference material (CMR). DL are identical as those given for filtered water solutions (see previous section).

2.2.4. Microbiological analysis.

Enumeration of culturable bacterial (BE) from surface waters were performed from 200 ml bulk samples stored no longer than 16h after sampling in sterile bottles at 4°C. In the laboratory, samples were diluted in sterile NaCl solution (8%), and filtered in duplicate (100 mL samples) with sterile cellulose nitrate filters (0.22µm, SARTORIUS). Filters were carefully placed on Petri dishes containing ENDO Nutrient Pads (SARTORIUS), allowing the selective growth of coliforms and the discrimination of *Escherichia coli* bacteria (a fecal contamination indicator). The number of bacteria per mL of diluted sample was calculated with Eq. 1:

CFU/ml of water sample= CFC.DF/Plated volume ……Eq. 1.

where DF is the sample dilution factor and CFU is the number of bacteria commonly expressed as Colony Forming Units.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 General hydro-geochemical settings along the continuum under anthropogenic influence

3.1.1 Hydrological regime: a highly seasonal contrasted system

Stream flows were monitored only during sampling campaigns and are presented as specific fluxes for each studied area at sampling time (Table 1 and figure 2). As previously reported (see section 2.1) rain events are concentrated over 3 to 4 months along the year (wet season from December to March), the rest of the year being of dry climate with important evaporation of surface waters (PNUMA, 2011). Monthly rainfall for each sub-watershed is given in Apendix A.

In the upstream mining area (i.e., Milluni between points R1 and M4), the Seke river flow is low, being always below 0.01 m3 s^{-1} during the dry season and between 0.07 and 2.3 m3 s^{-1} during the wet season. The hydrological regime in the upstream part of the watershed is controlled by slope deposits, namely moraines and bofedales (Harou, 1995), which are wet

zone in the bottom of the valley (Caballero et al., 2002) and act as water reservoir (Loza Herrera et al., 2015) being natural water supply in dry season. The continuous surface flow is established at least one month after the beginning of the rainy season (summer), and becomes discontinuous about one month after the end.

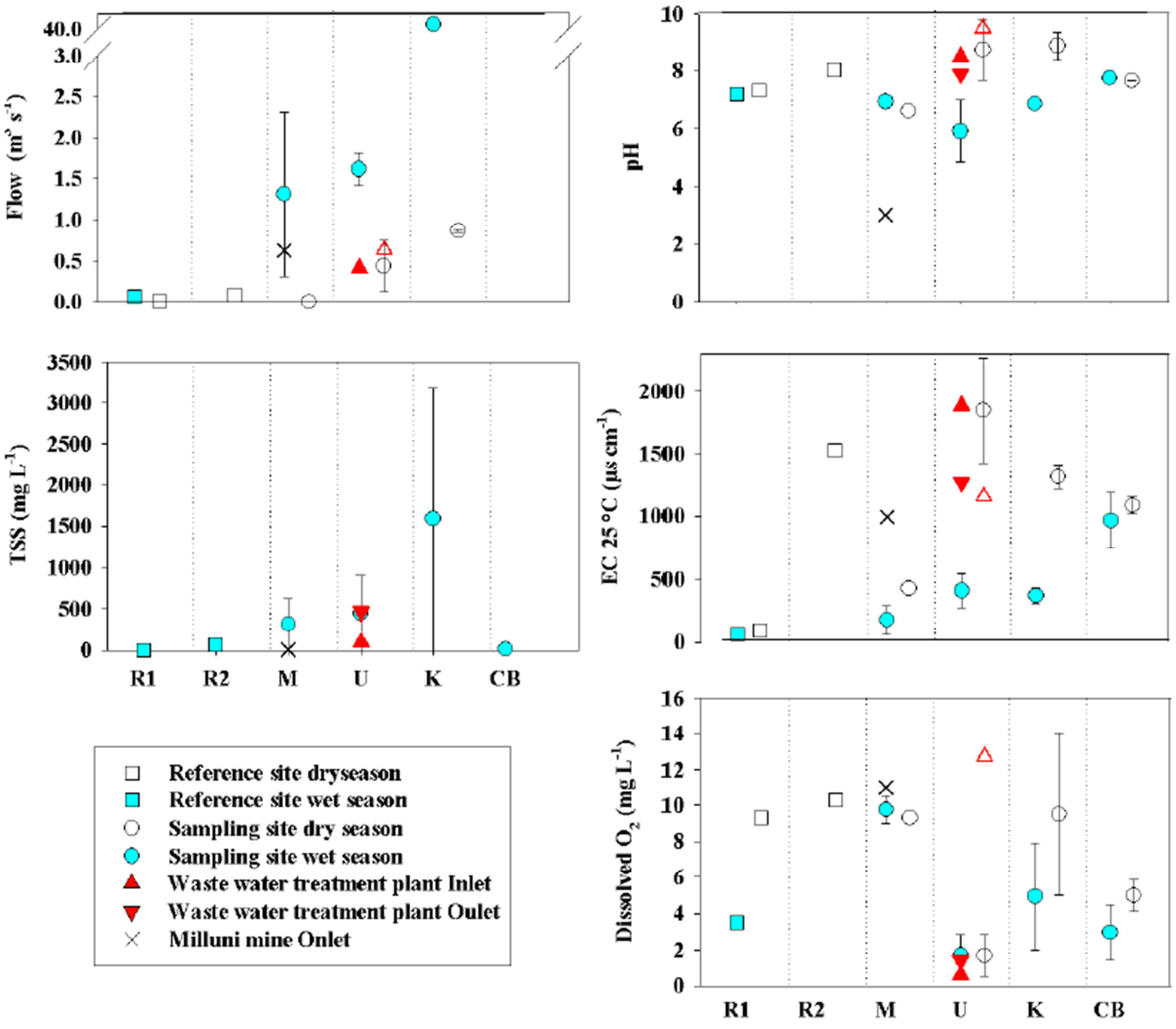


Figure 2. *Stream flows, Total suspended solids, pH, electric conductivity and dissolved oxygen in the 4 sampling zones and the two reference sites for both dry (empty symbols) and wet (filled symbols) season along the continuum. R1 refers to reference point of the crystalline rock from the Royal Cordillera, R2 refers to the reference point of the sedimentary deposits from fluvio-glacial erosion, cross symbol refer to the outlet of Lake Milluni receiving AMD, M refers to the downstream of the mining area (points M2 and M3). For the urban area (U) triangle up refers to the inlet of the Puchokollo WWTP and triangle down to the outlet.*

Downstream in the urban area (i.e., El alto city), Seco River fluxes rise by a factor 2 to 10 compared to that of the mining area reaching from 0.02 and 1.4 m3 s^{-1} at point U2 during the dry and wet season, respectively. Such strong increase in stream flux (whatever the season) originates mainly from the important waste water discharges of El Alto city (M.M.A.y.A., 2010). In dry season, outflux of the Puchukollo WWTP (0.63 m3 s^{-1}, point O) reflects these

urban emissions which dominate the Seco River water flux downstream: discharges represents 7 times the natural river flow. Stream flow of the Pallina River receiving waters from Seke and Seco Rivers was not significantly different (~0.7 m3 s^{-1}, points U5 and U6) in dry season. After the confluence with the Katari River down to Lake Titicaca the water flux only slightly increased (0.9 m3 s-1 at points K1 and K2) during the dry season. Comparatively, during the wet season, these fluxes increased over the entire river transect from 10 to 100 times, and the flux increased continuously until the confluence of the Katari and the Pallina Rivers where the Katari reached its maximum flow (41 m3 s-1 at point K1, Fig. 2). In wet season the Pallina river flow could not be measured because of the river level, which shows that flow increases strongly at this point of the watershed.

These extremely contrasted stream fluxes have a strong impact on particulate fluxes and resuspensions. TSS concentrations were low upstream Seke and Seco rivers despite strong slopes because of coarse bed sediments of crystalline origin. TSS concentrations increased (almost 20 times) when entering the urban area as effect of steep slopes and high particulate loads from urban origin. During the wet season TSS were maximal after the confluence of Pallina and Katari rivers (3000 mg L^{-1}; point K1). This is related with high stream flows as well as with lacustrine fine sediments in the Viacha-Lake Titicaca plain.

3.1.2 Basic geochemical parameters of water geochemistry

Reference point R1 located in the upstream Milluni area (Fig. 1) is typical of crystalline mountain areas with very low electrical conductivity (EC) values (< 100 µS/cm). Then, downstream at the mining area of Milluni (i.e., Seke River at the outlet of the Milluni lake reservoir), EC rise sharply (e.g., point M1: 994 µS cm^{-1}, wet season), due to AMD flowing from the mines and characterized by extremely acid waters (pH ~3). Indeed, the oxidation of the sulfide ores (acid generating) present in the tailings of the tin (Sn) mine located upstream the Milluni lake (Johnson and Hallberg, 2005; Salvarredy-Aranguren et al., 2008) generates a drop in pH and an associated strong increase of the solubility of trace elemental cations. Downstream Lake Milluni (samples M2 and M3), pH increase sharply to ~ 7 accompanied with a decrease of EC and associated filtered elements (e.g., sulfate and aqueous Fe) (present in filtered surface waters). This pH re-equilibration (neutral to basic values) results from the buffering effect of the minerals in contact with flowing water, which causes precipitation of the filtered and reduced species through oxidation and/or a drop in solubility due to the pH rise. Wetlands (“Bofedales”) present at this point of the watershed further contribute to this

pH re-equilibration: depending on the present vegetation, Loza Herrera et al. (2015) measured water pH between 5.7 and 6.2 in “Bofedales” from the Cordillera Real.

Across the urban area, EC strongly increased from 216 µS cm-1 at point U1 (wet season) to values of 502 and 2560 µS cm-1 at point U2 (wet and dry seasons, respectively) and to values of 2019 and 506 µS cm-1 at point U6 (wet and dry seasons, respectively). Along the urban area EC mean values are of 1847 ± 422 for dry season and 408 ± 136 for the wet season µS cm-1 (points U1 to U6). Such rise in EC is due to an increase of all major cations and anions concentrations and is accompanied with sharp rise of filtered organic matter (DOC = 9.5 ± 2.1 and 30.5 ± 2.1 mg L-1 in dry and wet season, respectively) and a drop of DO (dissolved oxygen) (mean = 1.7 ± 1.3 and 6.05 ± 2.9 mg L-1 for the dry and wet season, respectively) being typical of eutrophic urban waters (Tekile et al., 2015). Samples collected at the outlet of the Puchukollo WWTP (point O) showed high EC (1153 (dry) and 1883 (wet) µS cm-1) and alkaline pH (9.5 (dry) and 8.5 (wet) clearly illustrating the anthropogenic loads originating from this urban area.

In the downstream Katari River, EC remained stable during the wet season and slightly decrease during the dry season, while pH remains stable during both seasons. This slight decrease in EC downstream the confluence with upstream Katari stream is due to little chemical dilution effect since upstream Katari also have high EC as characterized by the reference point R2. High EC values at R2 reference point are related with geological factors as the Altiplano region is primarily composed of sedimentary deposits laid down in several large palaeo-lakes that formerly covered large portions of the Altiplano (Clapperton, 1993).

Finally, EC and pH of the eutrophic Cohana Bay remained stable around 1000 µS cm-1 and pH 8 in both seasons with low DO concentrations (i.e., 5 and 3 mg L-1 in dry and wet seasons, respectively) showing the strong buffering power of Lake Titicaca with high levels of biological respiration.

3.2 Impact of a rising urban area through nutrient loads and bacterial contamination of surface waters.

Figure 3 shows nutrients and dissolved oxygen concentrations recorded during field sampling campaigns. $SO4^{-2}$ concentrations remained in the same range of concentrations for both seasons in the entire watershed, except at point R1. This is likely due to the elevated local geochemical background (i.e., substrate rich in sulfate minerals such as gypsum) as illustrated by the reference point R2 (only sampled during the dry season) and to emissions from the mining area (Fig. 3).

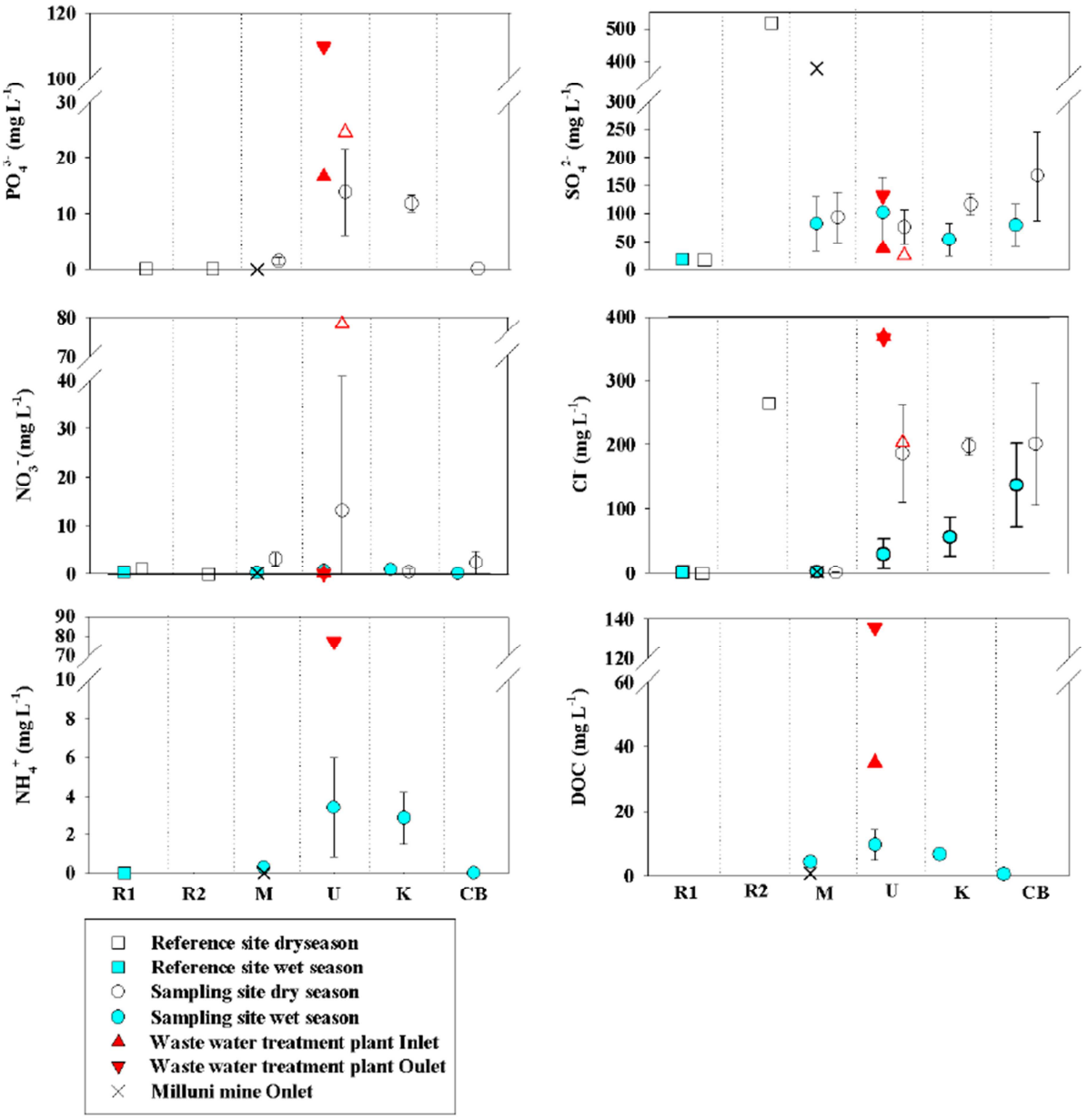


Figure 3. *Dissolved nutrients and dissolved organic carbon (DOC) in stream water for both dry (empty symbols) and wet (filled symbols) season along the continuum. R1 refers to reference point of the crystalline rock from the Royal Cordillera, R2 refers to the reference point of the sedimentary deposits from fluvio-glacial erosion, cross symbol refer to the outlet of Lake Milluni receiving AMD, M refers to the downstream of the mining area (points M2 and M3). For the urban area (U) triangle up refers to the inlet of the Puchokollo WWTP and triangle down to the outlet.*

Very low nutrient concentrations (i.e., PO_4^{-3} < LD, NO_3^- < 1 mg L^{-1} and NH_4^+ <0.2 mg L^{-1} – Fig. 3) were measured in surface water sampled in the mining area (i.e., R1 and M points – fig. 3). Only SO_4^{2-} concentrations remained elevated due to the mining of sulfide ores. Such concentrations are comparable with those found by Strosnider et al. (2011) at Cerro Rico in Potosi (Bolivia) and Antequera sub-basin (Ramos Ramos et al (2014) in Oruro (Bolivia) where intensive mining and processing of Ag, Sn, Pb and Zn ores have occurred. Concerning

bacterial indicators measured at points R1, M1 and M3 concentrations were about <10 UFC/100ml for *E. coli* and <5000 UFC/100ml of total coliforms indicating that water is suitable only for irrigation (MEEDD & Agences de l'eau, 2003) (Fig 4). At point M2 the bacterial quality of water decreased as total coliform concentrations were about 10500 UFC/100ml, typical of medium quality waters (MEEDD & Agences de l'eau, 2003), in relation with the proximity of a sanitary landfill located on the shore of Seke river.

The water geochemical composition strongly changed downstream the mining area (M) when entering the urban area (U) in both Seke and Seco Rivers due to large nutrient loads from El Alto city. Indeed, the sharp increase of EC for both Seke and Seco Rivers from and downstream El Alto city is illustrated by a 10 to 40 fold rise of PO_4^{-3}, NO_3^-, DOC and POC, and a rise of 70 to 240 fold of Cl^- concentrations (Fig. 3). This increase in nutrient concentrations was accompanied with a sharp drop in DO (Fig. 2) reflecting a high bacterial activity and respiration. For example, NH_4^+ concentrations (measured during the wet season) were high and above standard values (2.8 mg L^{-1}) (MEEDD & Agences de l'eau, 2003) indicative of strongly reducing conditions, with consequently low NO_3^- concentrations. The particular case of Puchukollo WWTP (red triangles – Fig. 3) illustrates well the bad water quality discharged from this urban area since maximum PO_4^{-3} (24.5 mg L^{-1}) and DOC (65 mg L^{-1}) concentrations measured at the outlet of the WWTP (point O) largely surpassed European guidelines for highly polluted river waters (2 mg L^{-1} PO_4^{-3}, and 15 mg L^{-1} DOC - MEEDD & Agences de l'eau, 2003). Although, the treatment plant permitted to decrease by ~ 75 % PO_4^{-3} levels, its efficiency appears limited regarding DOC, NO_3^- and NH_4^+ emissions, especially in wet season.

The excessive amount of nutrients and low DO concentrations are characteristic of eutrophic ecosystems (Mason, 2002). This bad quality status of the Katari surface waters is exacerbated by the contrasting hydrological conditions of the basin and the dominance of waste waters in the river channel in dry season. In addition to high nutrient loads and eutrophic state of waters, a sharp rise in *E. coli* and total coliforms cells in river water is clearly highlighted in the urban area (Fig. 4). Sewage discharge throughout the city is undoubtedly the cause of this rise in concentration of these bacteria, since highest concentration were measured at the entrance (point I) and at the outlet (O) of Puchukollo WWTP. In terms of quality, treated waters outflowing Puchukollo WWTP (point O) appeared not suitable for any type of use even for irrigation. This is in agreement with Chudnoff (2006) who also found important fecal coliform concentrations in many along Pallina and Katari rivers.

In the upstream Katari River (R2) other nutrients typical of urban area (e.g., PO_4^{-3}, NO_3^-) are very low or close to DL. Downstream the confluence with Pallina River, in the Katari River and down to Lake Titicaca, a general decrease in nutrients (PO_4^{-3}, DOC, NO_3^- and NH_4^+) concentration is observed for both seasons likely due to dilution and water oxygenation along the plateau. Such dilution with fresh waters is more pronounced during the wet season and characterized by a gradual rise in Cl^- and SO_4^{-2} being typical of the upstream Katari waters (e.g., R2). Natural high contents of Cl^- and SO_4^- in places without mining activities as R2 point could be due to dissolution of lacustrine sediments in some places with halite, gypsum and anhydrite evaporates from the Quaternary period as discussed previously by others researchers in the Bolivian Altiplano (Banks et al., 2004; Coudrain-Ribstein et al., 1995; Mourguiart et al., 1992; Ramos Ramos et al., 2014).

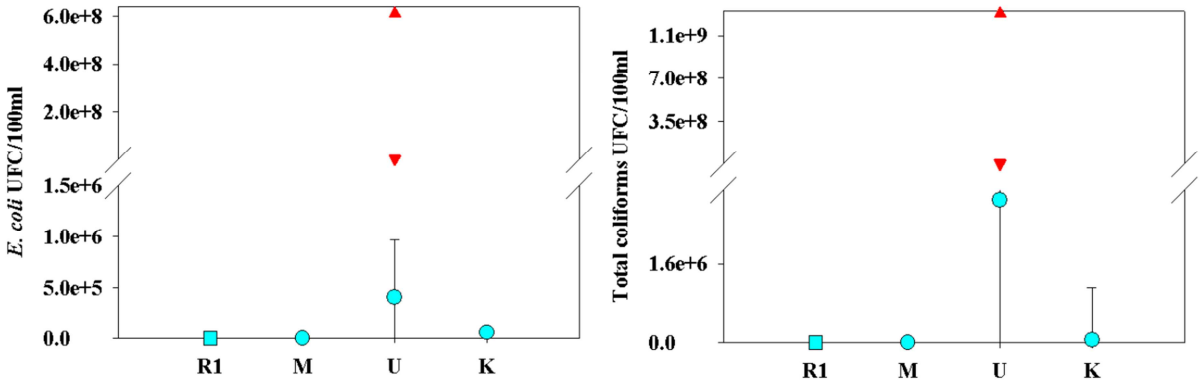


Figure 4. *E. Coli and total coliforms counts (number of UFC per 100ml of river water) in wet season (filled symbols) along the continuum. R1 refers to reference point of the crystalline rock from the Royal Cordillera, M refers to the downstream of the mining area (points M2 and M3). For the urban area (U) triangle up refers to the inlet of the Puchokollo WWTP and triangle down to the outlet*

NO_3^- concentrations were globally low in the entire watershed, although a slight increase in NO_3^- was found at the entrance of the Cohana Bay (4.3 mg L^{-1}, sample CB1, dry season) suggestively related to agricultural activities observable in the surrounding area of Lake Titicaca. Although *E. Coli* and coliforms counts gradually decrease to the Lake, levels still remain elevated at the entrance of the Cohana bay (point K3) and are not adapted for drinking water, irrigation, watering or direct usage for fish farming (Blumenthal et al., 2000; MEEDD & Agences de l'eau, 2003). These concentrations reflect the eutrophic state of Cohana bay waters which is mostly related to bad quality water inputs from the upstream watershed.

The presence of fecal contamination with elevated nutrients and metal concentrations in surface waters of the basin (principally areas U, K and CB) represents elevated health risks for humans and for animals. Risks includes gastrointestinal illness, skin, ear, respiratory, eye, neurologic, and wound infections (Fewtrell and Bartram, 2001; WHO, 2011). In the Cohana

bay, local population uses these waters sometimes without further appropriate disinfection for drinking, as well as animals. Thereby, population already suffers of gastrointestinal, skin and central nervous system disorders (UAC Batallas, 2010).

3.3 Polymetallic contamination of surface water and sediment related to mining and urban areas.

The principal component analysis (PCA) for filtered elements for dry and wet season (Appendix D.1 (A)) allowed us to discriminate two main groups of elements namely, (i) the trace metal(loid)s (Cd, Pb, Cu, Ni, Pb, Zn, As, Al and Co) and redox sensitive elements (As, Fe, and Mn) associated with DO and (ii) major elements (Ca, Na, Cl..) and Cr associated with the variation in EC, DOC and pH (only sulfate remains in a separate vector associated with water flow). Same ACP performed with particulate elements (only for the wet season) (Appendix D.2) gave the same trends although Cd and POC switched in the second pool. In opposition, the PCA for sediments collected for both seasons (Appendix – D.3(A)) shows three different groups being (i) Mn and Sr (ii) As, Pb and Sn and (iii) Cd, Cr, Cu, Ni, Co and Zn.

Therefore, amongst the 17 analyzed metals and metalloids, we chose to present only (i) Mn and Fe for the redox sensitive elements, (ii) Cr, Pb and Sn for the trace metals and (iii) As for the oxyanions (Figure 5). All the other elements are presented in Appendix E for filtered, particulate and sediments phases in dry and wet seasons.

In the mining area of Milluni, highest filtered concentrations of trace metals and metalloids (i.e., Sn, Fe, Cd, Cu, Al, Zn, Cu and As) originating from extracted iron sulfide ores are measured at the outlet of the Milluni reservoir (sampled only in wet season) downstream the Ag/Sn mines. They likely result from the presence of AMD and to the leaching (e.g., rain) of upstream rocks since highest concentrations are monitored during the wet season. For example, at the outlet of the Milluni reservoir (cross symbol in Fig. 5 and Appendix E), filtered Sn, As and Zn concentrations raised up to 15000 $\mu g\ L^{-1}$, 25 $\mu g\ L^{-1}$ and 13000 $\mu g\ L^{-1}$, respectively. Such high values are in the range of concentrations reported by Salvarredy-Aranguren et al. (2008) (As = 17 $\mu g\ L^{-1}$ during the wet season in Milluni) and by Strosnider et al. (2011) in the AMD of the Cerro Rico in Potosi, Bolivia. Particulate concentrations (determined only in wet season) at the outlet of the Milluni Lake reservoir are amongst the lowest measured along the continuum, in agreement with higher metal solubility's commonly measured at low pH and in a lesser extent to their sedimentation in the lake. Downstream the mining area, as evidenced with the rise in pH (Fig 2), the mixing of acid water from the

mining area with downstream alkaline waters leads to the rapid drop of the entire set of filtered trace metals (i.e., Sn, Fe, Cd, Cu, Al, Zn, Pb and Cu) through sorption or/and (co)precipitation. This significant drop in filtered elements is mirrored by the highest concentrations for the same elements measured in sediments (Fig.5) and a significant rise in particulate concentrations which are in the range of Zn, Cu and Pb concentrations reported by Smolders et al. (2002) in the mine impacted Pilcomayo river (Bolivia) during the same season.

Across the urban area, filtered, particulate and sediment trace metal(oid) concentrations originating from mining ores (i.e., Sn, Cd, Co, As, Cu, Ni, Pb, Zn and Mn – Fig. 5 and Appendix E) remain in the same range or higher than at the outlet of the mining area for both seasons. Such high levels are in the range of concentration measured in wastewater emissaries of Mexico city defined as the world's largest wastewater irrigation system (Guédron et al., 2014). These high concentrations can be attributed to (i) the drop in DO resulting from the high OM inputs from the urban area (Figs. 2, 3 and 5) which is generally accompanied with the reductive disolution of most of the Mn and Fe oxy(hydr)oxides and the associated solubilization of trapped trace metals and (ii) to the contribution of urban area as trace metal source as supported by the concomitant rise of elements concentrations in the filtered (ie., Zn, Ni, Cr, an Pb Fig. 5 and appendix C) and particulate (ie., Mn, Cr, Pb, Cd, As, Sn, Cu and Zn Fig. 5 and Appendix E) phases. Indeed, Hardy et al. (2015) and Ribera Arismendi (2010) reported that a significant part of the extracted ores were treated and transformed inside the El Alto area explaining such high metals loads that are typical of mining areas. In addition, the high variability of metal concentrations measured in this urban area, reflects the point source influence of the multiple manufactures and industries spread in this area and underlines the difficulties to localize and quantify their respective contributions.

During the wet season, filtered metals concentration in the urban area increases in comparison to those of the dry season although a dilution effect is expected (mean river flow increase by a factor 4 – Fig. 2). Such rise in filtered metals is suggestively attributed to the combined contribution of the upstream mining area (e.g., leaching of mine tailings) with the leaching of the urban area and the remobilization of its sediments and their associated pore waters. The significant decrease in total metal concentrations in sediments between the dry and wet season likely supports their resuspensions in relation with the rise of water flow.

Besides identified metals originating from mining ores, a particular and significant rise in concentration is observed for Cr, which is likely attributed to emissions for tanneries located in the urban area (Hardy et al., 2015). The particular case of the Puchokollo WWTP,

underlines such activities since highest Cr concentrations were measured at the inlet and outlet of the plant for both seasons (60 and 16 $\mu g\ L^{-1}$ in dry and wet seasons, respectively). In opposition to the other metals originating from ores, Cr concentrations decrease during the wet season illustrating the dilution of these industrial effluents by the upstream inflows.

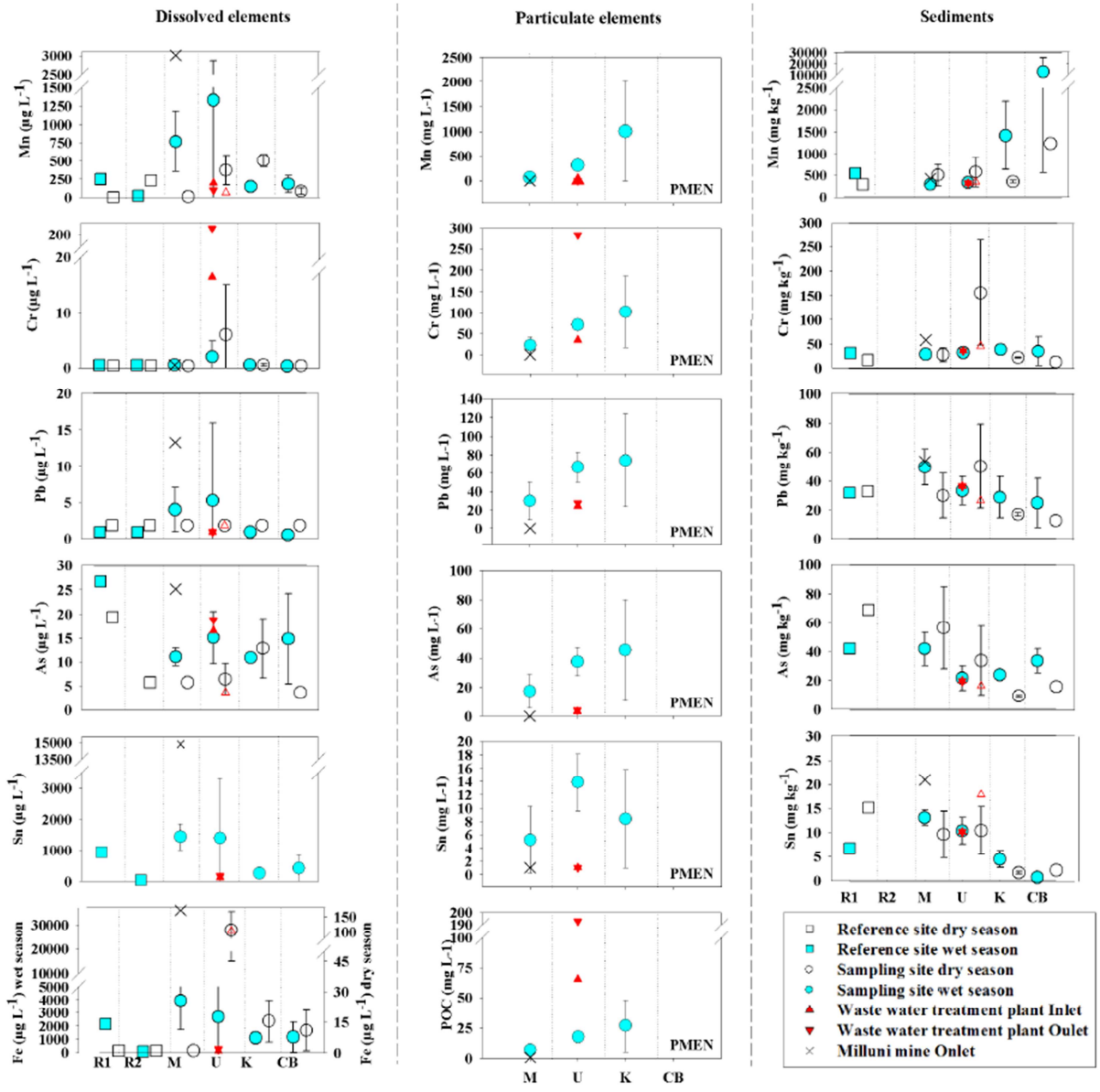


Figure 5. *From left to right: Dissolved, particulate and sediment concentrations for Mn, Cr, Pb, As and Sn, for both dry (empty symbols) and wet (filled symbols) season along the continuum. Filtered organic carbon (DOC) and Particulate organic carbon (COP) (bought were only determined in wet season). R1 refers to reference point of the crystalline rock from the Royal Cordillera, R2 refers to the reference point of the sedimentary deposits from fluvio-glacial erosion, cross symbol refer to the outlet of Lake Milluni receiving AMD, M refers to the downstream of the mining area (points M2 and M3). For the urban area (U) triangle up refers to the inlet of the Puchokollo WWTP and triangle down to the outlet). Particulate concentrations were only determined in wet season.*

Compared to the urban area, in the downstream Katari River filtered and sediment trace metal concentrations generally decrease in both, wet and dry season. This relates primarily to

dilution with fresh and oxygenated waters incoming from the upstream Katari River. Only the redox sensitive Mn sediment concentration shows in the wet season a significant opposite trend, i.e. an increasing concentration. This concentration pattern suggests precipitation of Mn oxides in the water column (as illustrated by the strong increase of particulate Mn) and to sediments. Such Mn (and Fe) oxide precipitation potentially may further depress filtered trace metal concentration through sorption and/or coprecipitation. Such concentration patterns are not observed in the dry season, probably due to the extreme trophic state prevailing in that season in the Katari river waters and potentially more reducing conditions leading to enhanced dissolved Mn, Fe and As concentrations. Then, approaching Cohana Bay, the particulate loads strongly decrease. At the limit with the Cohana bay Mn particulate concentrations decrease by a factor of ~8000 Cr, Pb and As concentrations decrease by a factor of ~10 and Sn decreases by a factor of ~20. Generally, the flat topography and the long length (~ 30 km) of the downstream plateau of the Katari River favors the dilution of sedimentary loads as supported by the significant decrease of total metals concentrations in sediments.

		M			U			K			CB			EU	B	DW
Element	Season	Concentration	SD	N	Concentration	SD	N	Concentration	SD	N	Concentration	SD	N			
As	W	15.8	6.8	2	15.09	5.42	5	10.9	0.61	3	14.84	9.34	2	25	50	10
	D	5.8	0	2	6.51	3.2	3	12.87	6.15	2	3.74	0	2			
Cd	W	21	13.6	2	9.19	11.32	5	0.25	0	3	0.13	0.12	2	2	5	3
	D	7.12	0	2	0.25	0	5	0.25	0	2	0.25	0	2			
Cr	W	0.5	0	2	1.95	2.9	5	0.5	0	3	0.31	0.19	2	50	50	50
	D	0.5	0	2	7.05	10.46	5	0.68	0.25	2	0.5	0	2			
Cu	W	110.8	80	2	18.27	26.36	5	0.25	0	3	6.3	6.05	2	50	50	200
	D	20.06	0	2	0.25	0	5	0.25	0	2	0.25	0	2			
Mn	W	1515.7	1112	2	1327.64	1538	5	147.77	19.09	3	183.97	115	2	250	500	400
	D	9.89	0	2	375.69	203.5	5	507.19	84.95	2	85.27	44.98	2			
Ni	W	30.2	11.14	2	27.47	28.44	5	10.08	4.07	3	7.84	6.96	2	40	50	20
	D	0.25	0	2	0.25	0	5	0.25	0	2	0.25	0	2			
Pb	W	7.1	5.05	2	5.27	10.69	5	0.91	0	3	0.47	0.43	2	20	50	10
	D	0.91	0	2	0.91	0	5	0.91	0	2	0.91	0	2			
Zn	W	7.08	5.05	2	2572.36	3356.31	5	15.85	15.6	3	0.77	0.52	2	300	200	300
	D	442.61	0	2	8.98	3.62	5	2.46	0.81	2	4.16	0.47	2			

Table 1. *Mean metal and metalloïd filtered concentrations in wet and dry season (µg L^{-1}) in surface waters. W: wet season. D: dry season. N: refers to the number of samples. B refers to Bolivian guidelines refer to the Bolivian regulations concerning water pollution values (1996). EU refers to European guidelines for surface waters (2009).*

At Cohana Bay, filtered Mn, Fe and As concentrations during the wet season increase again slightly. This pattern is likely related to reducing conditions in the eutrophic CB, and/or to the occurrence of filtered colloidal Mn and As. Indeed, in submerged soil incubation experiment

Masscheleyn et al, (1991) evidenced that at pH of 8 (same pH that in CB) a considerable increase in soluble Mn was followed by the desorption of arsenate due to the decreasing positive surface charge of the oxides. During the dry season, the inverse pattern is observed for filtered Mn, As and Fe concentrations suggesting an homogenizing diluting and settling effect of this water body explaining the reduction in the concentrations of these elements. Regarding the sediment trace metal concentrations, most of determined elements remained similar between dry and wet seasons with higher concentrations than in the rest of the lake being in the range of highest reported concentrations for polluted bays of Lake Titicaca specially for Cu and Zn (Monroy et al., 2014).

Considering the entire set of metal concentrations, Cd (wet season), Mn (wet season) and Zn (wet and dry season) exceed European (E.U., 2009) and Bolivian guidelines (N512) (Reglamentos a la ley de medio ambiente, 1996) for surface waters in M and U areas (Table 1). As (in M, U, K and CB areas), Cd, Ni and Mn (in M and U areas) and Zn (in U area) concentrations in wet season exceed health based guidelines for drinking water (WHO, 2011). In dry season As (in K area), Cd (in M area), Mn (in M and U areas) and Zn (in M area) also exceed health based guidelines for drinking water (WHO, 2011). Considering that population of the Cohana bay use and drink surface waters of the lake, such metal(oid) concentrations represent an significant health risk.

4. CONCLUSIONS

The Katari river system is highly dynamic. The great variations in its discharges between the rainy and dry period are responsible for the important removal of river bed sediment to the downstream Katari plateau. In addition to its highly contrasted hydrodynamic, adds the complex anthropogenic implantation combining mining, urban, industrial and agricultural activities. Such complex urban system combined with current and historical activities – typical of rising southern cities (e.g., Johanesburg) with ores treatments inside the city - results in a strong impact on water quality (Naicker et al., 2003).

Firstly, high nutrients loads (especially phosphate) from El Alto city induce a high eutrophic state of surface waters. In addition, high E. Coli concentrations measured in and downstream the urban areas highlights the bad efficiency and inappropriate water treatment system of El Alto city. Although a significant decrease in both bacterial and nutrient loads is observed downstream the Katari plateau, the water quality arriving in Lake Titicaca remains bad and favors the eutrophication of Cohana bay.

Secondly, both the mining and the urban area are highlighted as sources of filtered and particulate metal(oid) elements for surface waters especially during the wet seasons. These emissions are significantly reduced along the long Katari plateau during the dry season since, the rise in pH and the particle settlement reduce their emissions through the Lake. However, flooding episodes might severely contribute to particulate metal emissions through the Lake since highest metal concentrations associated with high TSS load were measured during the wet season. A special attention should be paid to As, since high concentrations being often above health based guidelines for drinking water (WHO, 2001) were measured in the Cohana bay.

In summary, water quality along the whole Katari watershed, downstream Milluni valley to the Cohana Bay is no suitable for any activity, whether for drinking water supply for human or cattle, or irrigation purposes. As the Cohana bay is used for cattle breeding area (eating local reed named Totora) and population use the water for drinking and cooking, population and animals are highly exposed to the contraction of diseases linked to poor water quality. In addition, high filtered and particulate metal concentrations may enhance potential health risks of trophic transfer and biomagnification to aquatic organisms, since the Titicaca Lake is the main resource for fish (wild and fish farming) for the surrounding communities and La Paz/El Alto urban area.

Finally, the poor quality of surface waters also represents a risk of pollution for groundwaters which are the main source of drinking water in the watershed (especially for El Alto city). Both bacterial (e.g., coliforms), nutriments and polymetall(oid)ic pollutants may reach the underlying aquifer between 30 and 80 m depth : The Purapurani aquifer of fluvio-glacial origin, located below El Alto city, is composed of gravels, sand and clay layers and has an average hydraulic conductivity of 18 m d-1 (Limpias Camacho, 2010). Gomez et al. (2012) demonstrated the impact of El Alto/Viacha on the quality (high nitrate concentration) of the Purapurani aquifer.

With regard to the results of this first inventory of the Katari watershed water quality, further developments would be necessary for a better management of water resources including (i) the improvement and extension of waste water collection and treatment system adapted to the seasonal contrasted flows and (ii) the development of systems for nutrient and particulate loads abatements such as sedimentation basins followed by filtering gardens which could be easily set up and efficient in the downstream Katari plateau. Such systems must ensure a good oxygenation to restrict the occurrence of reducing conditions and favor precipitation and settlement of contaminants.

Acknowledgments
This project was partly funded by LABEX OSUG@2020, ANR grant # ANR-10-LABX-56" (financed on the Future Investments program launched by the French government and implemented by the ANR). We thank the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the support given to the first author. We thank the Bolivian Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI, La Paz) for their technical assistance.

References

- Ahlfeld, F., Schneider – Scherbina, 1964. Los Yacimientos Minerales y de hidrocarburos de Bolivia. Boletin No. 5. Departamento Nacional de Geología; Ministerio de Minas y Petróleo. La Paz, Bolivia.
- Anton, D.J., 1993. Thirsty cities: urban environments and water supply in Latin America. IDRC.
- Arbona, J.M., Khol, B., 2004. City profile La Paz–El Alto. Elsevier 21, 255–265.
- Banks, D., Markland, H., Smith, P.V., Mendez, C., Rodriguez, J., Huerta, A., Sæther, O.M., 2004. Distribution, salinity and pH dependence of elements in surface waters of the catchment areas of the Salars of Coipasa and Uyuni, Bolivian Altiplano. J. Geochem. Explor. 84, 141–166. doi:10.1016/j.gexplo.2004.07.001
- Chiqui, F.R.R., 2001. Evaluación del Río Pallina, en relación a su calidad de aguas en la zona urbana de Viacha. La Paz, Bolivia.
- Chudnoff, S.M., 2006. A Water Quality Assessment of the Rio Katari River and its Principle Tributaries, Bolivia (B.S. Earth and Environmental Science (Geology Option)). The University of New Mexico.
- Condom, T., 2002. Dynamiques d'extension lacustre et glaciaire associées aux modifications du climat dans les Andes Centrales. (PHD Science of earth). Docteur de l'Université Paris VI, Paris.
- Coudrain-Ribstein, A., Olive, P., Quintanilla, J., Sondag, F., Cahuaya, D., 1995. Salinity and isotopic dynamics of the groundwater resources on the Bolivian Altiplano. IAHS Publ.-Ser. Proc. Rep.-Intern Assoc Hydrol. Sci. 232, 267–276.
- Duwig C., D. Archundia, F. Lehembre, L. Spadini, M.C. Morel, G. Uzu, J. Chincheros, R. Cortez, J.M.F. Martins. Impacts of Anthropogenic Activities on the Contamination of a Sub Watershed of Lake Titicaca. Are Antibiotics a Concern in the Bolivian Altiplano? Procedia Earth and Planetary Science. 10: 370-375. 2014.
- FAO, 2005. FAO, Land and Water Digital Media Series n5; Soil and Terrain Database for Latin America and the Carribean - 1:5 Million scale.
- Fewtrell, L., Bartram, J., 2001. Water quality guidelines, standards, and health: assessment of risk and risk management for water-related infectious disease. IWA Pub., London.
- Fonturbel, F., 2005. Evaluación preliminar de la calidad hídrica, mediante indicadores fisicoquímicos y biológicos, en la Bahía de Cohana, Lago Titikaka,(Departamento de La Paz, Bolivia).
- GEOBOL, 1995a. Hoja geológica La Paz, #5944; escala 1:100000. Carta Geológica de Bolivia, Servicio Geológico de Bolivia.
- GEOBOL, 1995b. Hoja geológica Milluni, #5945; escala 1:100000. Carta Geológica de Bolivia, Servicio Geológico de Bolivia.
- Gomez, E., 2012. Caracterisacion hidrogeoquimica del sistema acuífero Purapurani (El Alto). Master thesis, Universidad Mayor Real Pontificada de San Francisco Javier de Chuquisaca.
- Guédron, S., Duwig, C., Prado, B.L., Point, D., Flores, M.G., Siebe, C., 2014. (Methyl)Mercury, Arsenic, and Lead Contamination of the World's Largest Wastewater Irrigation System: the Mezquital Valley (Hidalgo State—Mexico). Water. Air. Soil Pollut. 225. doi:10.1007/s11270-014-2045-3
- Hardy, S., Valton, C., Guislain, S., Larrazãbal Cãrdova, N., 2015. Atlas de la vulnerabilidad de la aglomeración de La Paz., IRD, La Paz. ed. Plural editores.
- Harou, P., 1995. Wetlands economics and land use. In: Environmental and Land Use Issues, CIHEAM-EAAE. 540 p. Harou, P. 1995.
- IDH, 2014. Proyecto IDH, Manejo de la Caracterización del Recurso Suelo Agrícola y Agua para el Consumo Humano/Riego del Municipio de Colquencha,.
- Jauregui, J., 1969. Estudio geológico minero de la región Milluni - Zongo. Tesis de grado, Facutlad de Ciencias Geológicas U.M.S.A. (T-406).
- Jiménez, L.F., 1996. La experiencia de ajuste durante la década de los ochenta en Latinoamérica, sus consecuencias distributivas y el diseño de políticas sociales. Desarrollo con Equidad. CEPAL. Santiago de Chile.
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2005. Acid mine drainage remediation options: a review. Sci. Total Environ. 338, 3–14. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.09.002

- Lassabatere L., L. Spadini, C. Delolme, L. Février, R. Galvez Cloutier, T. Winiarski. 2007. Concomitant Zn-Cd and Pb retention in a carbonated fluvio-glacial deposit under both static and dynamic conditions. Chemosphere 69:1499-1508.
- Loza Herrera, S., Meneses, R., Anthelme, F., others, 2015. Comunidades vegetales de los bofedales de la Cordillera Real (Bolivia) bajo el calentamiento global. Ecol. En Boliv. 50, 39–56.
- Martins J.M.F., S. Majdalani, E. Vitorge, A. Desaunay, A. Navel, V. Guiné, J.F. Daïan, E. Vince, H. Denis and J.P. Gaudet. Importance of macropore flow for the transport of Escherichia coli cells in undisturbed cores of a brown leached soil. Environ. Sci.: Processes Impacts, 15: 347-356. 2013
- Mason, C., 2002. Biology of freshwater pollution., 4th Edition. Longman Ed.Ville??? .
- Mason, J.P., Sebree, S.K., Quinn, T.L., 2005. Monitoring-well network and sampling design for ground-water quality, Wind River Indian Reservation, Wyoming. US Department of the Interior, US Geological Survey.
- Mazurek, H., 2012. El censo en Bolivia, una herramienta de desarrollo. T'inkazos 32: Coordination du numéro spécial sur les recensements.
- MEEDD & Agences de l'eau, 2003. Systeme d'evaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau. Rapport de presentation SEQ-Eau (Version 2).
- Miguel, A., 1991. Environmental Pollution Research in South America. TechnolEnviron Sci 25, 590–594. doi:10.1021/es00016a603
- M.M.A.y.A., 2013. Planes Maestros Metropolitanos de Agua Potable y Saneamiento de Cochabamba, La Paz y El Alto, Santa Cruz y el Valle Central de Tarija (Bolivia).
- M.M.A.y.A., 2010. Plan Director de la Cuenca Katari.
- Monroy, M., Maceda-Veiga, A., de Sostoa, A., 2014. Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. Sci. Total Environ. 487, 233–244. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.134
- Mourguiart, P., Wirrmann, D., Fournier, M., Servant, M., 1992. Reconstruction quantitative des niveaux du petit lac Titicaca au cours de l'Holocene. CR Acad Sci Paris 315, 875–880.
- Muriel, C., 1967. Estudio geológico y mineralógico de la región de Milluni. Tesis de grado, Facutlad de Ciencias Geológicas U.M.S.A. (T-80).
- Naicker, K., Cukrowska, E., McCarthy, T.., 2003. Acid mine drainage arising from gold mining activity in Johannesburg, South Africa and environs. Environ. Pollut. 29–40. doi:0.1080/10934529.2015.1019804
- NorthCote, T.G., Morales, S.P., Zea, W., Vazquez, M.E., 1989. Effects of eutrophication on physical conditions., in: Pollution in Lake Titicaca, Peru. Westwater Research Centre, Univ. Dril. Columbia, Vancouver, pp. 19–31.
- PNUMA, 2011. Perspectivas del medio ambiente en el sistema hidrico Titicaca-Desaguadero-Poopo-Salar de Coipasa (TDPS). PNUMA.
- PNUMA, 2008. GEO El Alto. Perspectivas del Medio Ambiente Urbano. Proyecto GEO ciudades.
- Ramos Ramos, O.E., Rötting, T.S., French, M., Sracek, O., Bundschuh, J., Quintanilla, J., Bhattacharya, P., 2014. Geochemical processes controlling mobilization of arsenic and trace elements in shallow aquifers and surface waters in the Antequera and Poopó mining regions, Bolivian Altiplano. J. Hydrol. 518, 421–433. doi:10.1016/j.jhydrol.2014.08.019
- Reglamentos a la ley de medio ambiente., 1st ed, 1996. . Gaceta oficial de Bolivia., La Paz, Bolivia.
- Ribera Arismendi, M.A., 2010. La Bahía de Cohana. Actualización 2009-2010. –La Paz: Serie de estudios de caso sobre problemáticas socio ambientales en Bolivia No 1. LIDEMA. 78p.
- Salvarredy-Aranguren, M.M., Probst, A., Roulet, M., Isaure, M.-P., 2008. Contamination of surface waters by mining wastes in the Milluni Valley (Cordillera Real, Bolivia): Mineralogical and hydrological influences. Appl. Geochem. 23, 1299–1324. doi:10.1016/j.apgeochem.2007.11.019
- SENAMHI, 2015. Servicio nacional de hidrologia y metrologia.
- Smolders, A.J.P., Guerrero Hiza, M.A., van der Velde, G., Roelofs, J.G.M., 2002. Dynamics of discharge, sediment transport, heavy metal pollution and Sabalo (Prochilodus lineatus) catches in the lower Pilcomayo river (Bolivia). River Res. Appl. 18, 415–427. doi:10.1002/rra.690
- Soruco, A., 2012. Medio siglo de fluctuaciones glaciares en la Cordillera Real y sus efectos hidrologicos en la ciudad de La Paz. Institute de recherche pour le developpement, IRD, La Paz.
- Strosnider, W.H.J., Llanos López, F.S., Nairn, R.W., 2011. Acid mine drainage at Cerro Rico de Potosí I: unabated high-strength discharges reflect a five century legacy of mining. Environ. Earth Sci. 64, 899–910. doi:10.1007/s12665-011-0996-x
- Tekile, A., Kim, I., Kim, J., 2015. Mini-review on river eutrophication and bottom improvement techniques, with special emphasis on the Nakdong River. J. Environ. Sci. 30, 113–121. doi:10.1016/j.jes.2014.10.014
- Tícona, W., Blanco, M., Ticona, J., Cabrera, S., 2012. INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MATERIALES ARCILLOSOS PARTE I: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA, MINERALÓGICA Y ESTRUCTURAL DE ARCILLAS DE VIACHA Y KELLANI. Rev. Boliv. Quím. 29, 139–146.

- UAC Batallas, 2010. Diagnostico de salud de la poblacion de las comunidades de Cohana. Municipios de Pucarani y Puerto Pérez Provincia Los Andes.
- WHO, 2011. Guidelines for drinking-water quality. WHO (World Health Organization)al de la Salud), Ginebra.
- WHO, 2001. Water Quality: Guidelines, Standards and Health. L Fewtrell and J Bartram, Geneve.
- WHO, 1996. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva.

APPENDIX.A: Annual mean rain (mm) in the Katari watershed.

Sub watershed	Annual mean (mm)												Annual mean
	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Abr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	
Katari alto	34.58	48.67	72.00	138.50	86.14	74.69	24.20	4.13	5.05	5.80	11.71	18.88	524.35
Katari bajo	36.27	45.70	70.33	130.28	84.06	71.45	24.60	5.18	5.69	6.60	11.62	18.08	509.86
Pallina alto	35.64	53.34	71.84	135.81	81.17	75.40	22.66	3.79	5.21	5.92	11.85	20.85	523.48
Pallina medio	38.65	51.69	72.68	139.28	84.67	74.69	24.99	5.73	5.32	5.80	11.78	20.90	536.18
Pallina bajo	37.98	48.00	72.42	136.82	85.80	74.10	25.26	5.64	5.70	6.78	11.70	19.84	530.04
Seke and Seco	43.21	54.94	80.16	138.93	85.59	80.21	29.19	6.69	6.93	6.76	11.91	22.81	567.33

APPENDIX.B: Detailed geology and mineralogy of the Katari watershed by areas.

Area	Rock type	Mineralogy	References
Royal Cordillera	Granitic, granodiorite and diorite of the Hercynian construction. Sedimentary/metamorphic rocks such as metaquartzite, metasiltstone, metasandstone, quartzite, pyritized diamictite, slate, shale, sandstone and siltstone of Ordovician and Silurian ages.	Bismuth (Bi), Cassiterite (SnO_2), Quartz (SiO_2), Arsenopyrite (FeAsS), Pyrite (FeS_2), Pirrotine ($Fe_{0.8\text{-}1}S$), Chalcopyrite ($CuFeS_2$), Bismuthinite (Bi_2S_3), Galena (PbS), Sphalerite (ZnS), Stibnite (Sb_2S_3), Magnetite (Fe_3O_4), Tourmaline $(Na,Ca)(Al,Fe,Li)(Al,Mg,Mn)_6(BO_3)_3(Si_6O_{18})(OH,F)_4$, Fluorite ($CaF_2$), Iron oxides (Limonita, goethita), Wolframite $(Fe,Mn,Mg)WO_4$, Siderite ($FeCO_3$) y Schellite ($CaWO_4$) of Tertiary age neumatholitic and hydrothermal mineralization.	Soruco (2012); Jauregui (1969); Muriel (1967); Ahlfeld et al., (1964) and GEOBOL (1995 a y b).
Milluni	Quaternary glacial (till) and fluvioglacial loose sediments with local alluvial, colluvial deposits, composed of rocks and minerals eroded from the Royal Cordillera, and lacustrine deposits.	Gypsum (CaSO4x2H2O), Pyrite (FeS2), Marcasite (FeS2), Pyrrhotite (Fe1 xS), Sphalerite (ZnS), Arsenopyrite (FeAsS), Cassiterite (SnO2), Galena (PbS), Wolframite (Fe,Mn [WO4]2), and Stannite (Cu2FeSnS4), Quartz (SiO2), Siderite (FeCO3), Hematite (Fe2O3), Apatite (Ca5(PO4)3F2) and Monazite ([Ce,La,Nd]PO4).	GEOBOL (1995a); Salvarredy-Aranguren et al., (2008).
El Alto - Viacha plain	Fluvio-glacial and alluvial sediments (alluvial fans and terraces) eroded from the Royal Cordillera.	Vermiculite((Mg,Fe,Al)3((Al,Si)4O10)(OH)2 · 4H2O), Illite (K,H3O)(Al,Mg,Fe)2(Si,Al)4O10[(OH)2,(H2O)], Albite (NaAlSi3O8), Quartz (SiO2) and Kaolinite (Al2Si2O5(OH)4).	GEOBOL (1995a), Tícona et al., (2012).
Viacha shallow valleys – Lake Titicaca plain	Devonian siltstone, sandstone and shale, Tertiary sandstone and tuff on its margins with very local limestone occurrence, and quaternary alluvial and lacustrine fine granulometry sediments in the riverbeds until the flooding lake Titicaca area	No information.	M.M.A.y.A. (2010).
Colquencha-Katari alto	Quaternary alluvial and colluvial sediments. Ludlovian shale, siltstones and sandstones from Llallagua Fm. Devonian siltstones, shale and quartzite. Tuffs, claystones , siltstones and volcanic ash from Plioceno-Mioceno	Natural high contents of Cl^- and SO_4^- due to dissolution of lacustrine sediments in some places with Halite (NaCl · 2H2O), Gypsum(CaSO4x2H2O) and Anhydrite ($Ca(SO_4)$) evaporates from the Quaternary.	Banks et al., (2004); Coudrain-Ribstein et al., (1995); Mourguiart et al., (1992); Ramos Ramos et al., (2014).

References

- Ahlfeld, F., Schneider – Scherbina, 1964. Los Yacimientos Minerales y de hidrocarburos de Bolivia. Boletin No. 5. Departamento Nacional de Geología; Ministerio de Minas y Petróleo. La Paz, Bolivia.
- Banks, D., Markland, H., Smith, P.V., Mendez, C., Rodriguez, J., Huerta, A., Sæther, O.M., 2004. Distribution, salinity and pH dependence of elements in surface waters of the catchment areas of the Salars of Coipasa and Uyuni, Bolivian Altiplano. J. Geochem. Explor. 84, 141–166. doi:10.1016/j.gexplo.2004.07.001
- Coudrain-Ribstein, A., Olive, P., Quintanilla, J., Sondag, F., Cahuaya, D., 1995. Salinity and isotopic dynamics of the groundwater resources on the Bolivian Altiplano. IAHS Publ.-Ser. Proc. Rep.-Intern Assoc Hydrol. Sci. 232, 267–276.
- GEOBOL, 1995a. Hoja geológica La Paz, #5944; escala 1:100000. Carta Geológica de Bolivia, Servicio Geológico de Bolivia.
- GEOBOL, 1995b. Hoja geológica Milluni, #5945; escala 1:100000. Carta Geológica de Bolivia, Servicio Geológico de Bolivia.
- Jauregui, J., 1969. Estudio geológico minero de la región Milluni - Zongo. Tesis de grado, Facutlad de Ciencias Geológicas U.M.S.A. (T-406).
- M.M.A.y.A., 2010. Plan Director de la Cuenca Katari.
- Mourguiart, P., Wirrmann, D., Fournier, M., Servant, M., 1992. Reconstruction quantitative des niveaux du petit lac Titicaca au cours de l'Holocene. CR Acad Sci Paris 315, 875–880.
- Muriel, C., 1967. Estudio geológico y mineralógico de la región de Milluni. Tesis de grado, Facutlad de Ciencias Geológicas U.M.S.A. (T-80).
- Ramos Ramos, O.E., Rötting, T.S., French, M., Sracek, O., Bundschuh, J., Quintanilla, J., Bhattacharya, P., 2014. Geochemical processes controlling mobilization of arsenic and trace elements in shallow aquifers and surface waters in the Antequera and Poopó mining regions, Bolivian Altiplano. J. Hydrol. 518, 421–433. doi:10.1016/j.jhydrol.2014.08.019
- Salvarredy-Aranguren, M.M., Probst, A., Roulet, M., Isaure, M.-P., 2008. Contamination of surface waters by mining wastes in the Milluni Valley (Cordillera Real, Bolivia): Mineralogical and hydrological influences. Appl. Geochem. 23, 1299–1324.
- Soruco, A., 2012. Medio siglo de fluctuaciones glaciares en la Cordillera Real y sus efectos hidrologicos en la ciudad de La Paz. Institute de recherche pour le developpement, IRD, La Paz.
- Zeballos 2009; Aplicación de los recursos no-metálicos de la localidad de Micaya, Provincia
- Aroma, Departamento de La Paz. Tesis de grado, Facultad de Ciencias Geológicas, Carrera de Ciencias Geológicas, Universidad Mayor de San Andrés

APPENDIX.C: Detailed information for *in situ* and chemical analysis

C.1 River flow rates and water physicochemical parameters

River flow rates were assessed based on the recommendations of Bartram et al., (1996) for Water Quality Monitoring. Basically, the method is based on the measurement of the cross-sectional area of the stream and the average water velocity, determined with a current meter OTT C31(Numero 3-194423).

Physicochemical parameters, i.e., dissolved oxygen (DO), pH and electrical conductivity (EC) of surface waters were determined *in situ* using a multiparameter probe (Eijkelkamp system, model 18.52.01). Calibration was performed with standard solutions provided with the multiparameter probe with a minimum of 5 points (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 mg L-1) depending on parameter.

C.2 Filtered samples analyses

Surface waters for *filtered metals (FMe)* were filtered on site through 0.45µm cellulose acetate syringe filters (Millipore) and stored in 15mL HCl-cleaned tubes previously rinsed with an aliquot of the filtrates. Filtrates were subsekently acidified with 0.1% HNO_3 (Fisher ultrapure grade 67-69%) and stored in the dark at 4°C until analysis in France.

Anions (Fl^-, Cl^-, Br^-, NO_3^-, PO_4^- and SO_4^-) and ammonium (NH_4^+) analysis

Surface waters for anion analysis were sampled and filtered on site through 0.45µm cellulose acetate syringe filters (Millipore)and frozen until analysis (in LTHE laboratory, Grenoble, Fr). Concentrations were quantified by Ion Chromatography (Metrohm 732/733 separation center, Metrosep A Supp 16 – 150mm, and Metrosep C2-150 mm anion and cation columns) based on the USEPA Method 300.0. Calibration standards were prepared from an Anion Multi-Element Standard (IC) (Carl ROTH). Limits

of detection (LD) and quantification (LQ) were determined based on signal to noise ratio of 3 for both LD (between 2 and 6 µg L^{-1} for Fl^-, Cl^-, Br^-, SO_4^- and between 9 and 11 µg L^{-1} for NO_3^-, PO_4^-) and LQ (between 6 and 8 for Cl^-, Br^-; 17 for Fl^- and SO_4^- and between 30 and 34 for NO_3^-, PO_4^-).

Dissolved organic carbon (DOC) analysis

DOC analysis were only determined for samples collected during the wet season. Surface waters for DOC determination were sampled, filtered (the same day) in Nalgene filtration units (filters: Whatman GF/F, glass microfiber; 0,7µ) and placed in to glass tubes previously cleaned by immersion in a bath of 20% HCl (Fisher, Trace Grade analysis) during 3 days, rinsed with demineralized water, dried and calcined for 4h at 550°C. Samples were then acidified with 1% ultrapure HCl (Fisher, Trace Grade analysis) and stored at 4°C until analysis. DOC was determined by the NPOC (Non Purgeable Organic Carbon) method by **680 °C Combustion Catalytic Oxidation** in a Shimadzu TOC-V CSN device coupled to a non-dispersive infrared NDIR detector. Standards solutions were prepared from potassium biphthalate and ultrapure water (MilliQ). Detection limit was of 0.31 ppm.

Trace element concentrations in surface waters

For trace element sampling all materials in contact with samples were handled using ultra-clean techniques (Cossa and Gobeil, 2000). Vials for filtered trace element analysis were washed in a 20% HCl solution (Fisher, Trace Grade analysis) during 3 days and stored in double plastic bags until use. Analyses were based on USEPA 1669 (1996b) Method for surface waters and in US EPA SW846 Method for solid samples.

Analysis was carried out by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (715-ES ICP-AES) with external calibration. Standards were prepared with a Multi-Element Standards for ICP (Roth) solution. LD and LQ were measured based on signal to noise ratios of 3. LD were between 0.5 and 1µg L^{-1} for Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn, and Sr and between 1 and 5µg L^{-1} for Cd, Pb, As and Sn. LQ were between 1 and 5µg L^{-1} for Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Sn, Sr, and Zn and between 6 and 15µg L^{-1} for As, Pb and Fe.

C.3 Solid samples analyses (suspended particles and sediment)

Sediment granulometry

Granulometry analyses were performed by laser granulometry based on the ISO 13320 method. Sediment samples were prepared as follows: drying (at 105°C for about 18h), sieving (<2mm) and destruction of organic matter by attack with hydrogen peroxide (H_2O_2). Then samples were analyzed using a MASTERSIZER 2000 laser granulometer (MALVERN instruments) after dispersion with 15% sodium hexametaphosphate ($NaPO_3$) and 20% ammoniac (NH4OH). Grain size distribution and statistics were examined with the GRADISTAT (2001) package.

Particulate organic carbon (POC) and total suspended sediments (TSS).

For POC, surface waters were sampled and filtered with previously calcined and weighted filters (Whatman GF/F, glass microfiber, 0.7µm) in Nalgene filtration units. *POC* determination was obtained by CHN analyze carried out with an Elemental Analyzer (CE Instruments NA2100 Protein) using acetanilide as carbonaceous standard, ultra pure O_2 as combustion gas and helium as carrier gas. Before analyze, the filters were dried and exposed for 4 hours to HCl vapor for decarbonatation (LD=0.3mg).

Trace element extraction from solid samples (particulate and river bed sediments)

Extraction was performed based on the US EPA 3052 method by Microwave Assisted Extraction (MAE). For that, 200mg of milled and dried sediments or the filters (for particulate concentrations) were placed in specific microwave extraction vessels containing 9mL HNO_3 65% (Fisher, Trace Grade analysis), 3ml HF 47-51% (Fluka, Traceselect grade) and 2mL HCl 37% (Fisher, Trace Grade analysis). Digestion was conducted in a Novawave (SCPscience, Canada) with the following steps: linear increase of the temperature from 25 to 180°C in 10min, 180°C for 10 min, cooling to 25°C in 20min, evaporation (using PTFE vessels (Savillex®, 30mL) on a heating plate (24 reactors) at 70°C (to avoid tin loss) before dissolution in 2mL HNO_3 10% at 60°C for 30min and dilution with 8mL of ultrapure water.

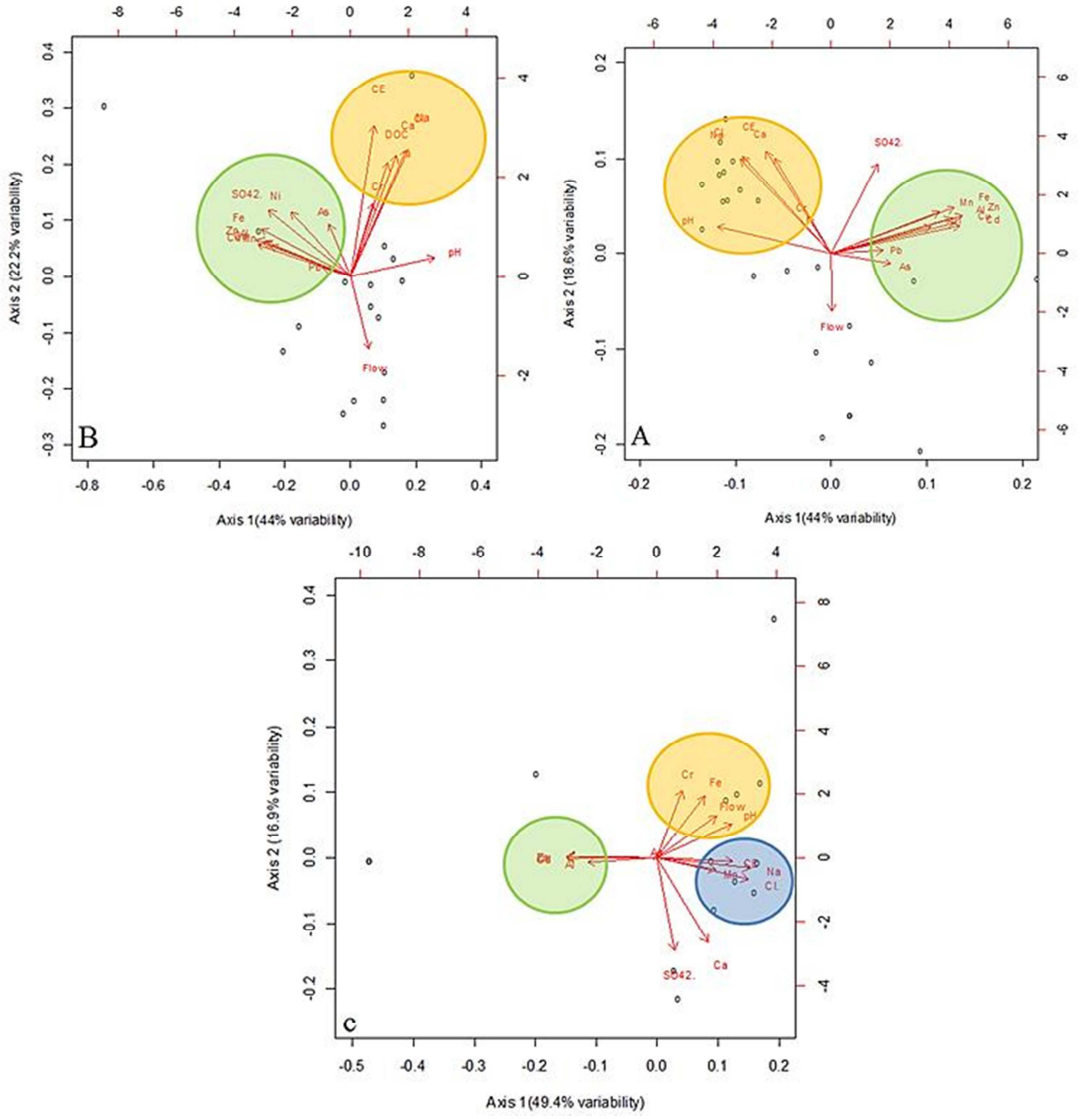
Quality assurance and control (QA/QC) of the analysis were performed with TIBET SEDIMENT (NIM GBW07323) certified reference material (CMR). Recoveries ranged between 71.6 and 104.3% (As: 80.4%, Cd: 104.3, Cr: 82.4, Cu: 71.6%, Mn: 94.1%, Ni: 71.5%, Pb: 104%, Zn: 85%). Finally suspensions were filtered at 0.45µm before analysis.

References

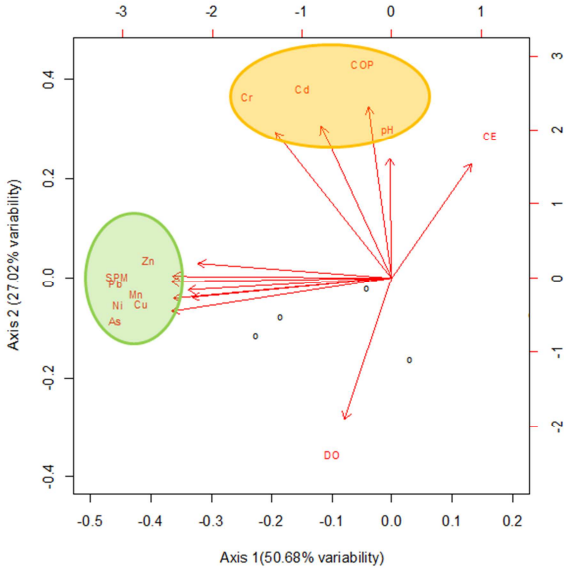
- Bartram, J., Ballance, R., United Nations Environment Programme, World Health Organization, 1996. Water quality monitoring a practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes. E & FN Spon, London; New York.
- Cossa, D., Gobeil, C., 2000. Mercury speciation in the lower St. Lawrence Estuary. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 138–147.

APENDIX.D: PCA of trace metal(loid)s and redox sensitive elements in filtered, particulate and sediments phases and their association with major elements and physicochemical characteristics by season.

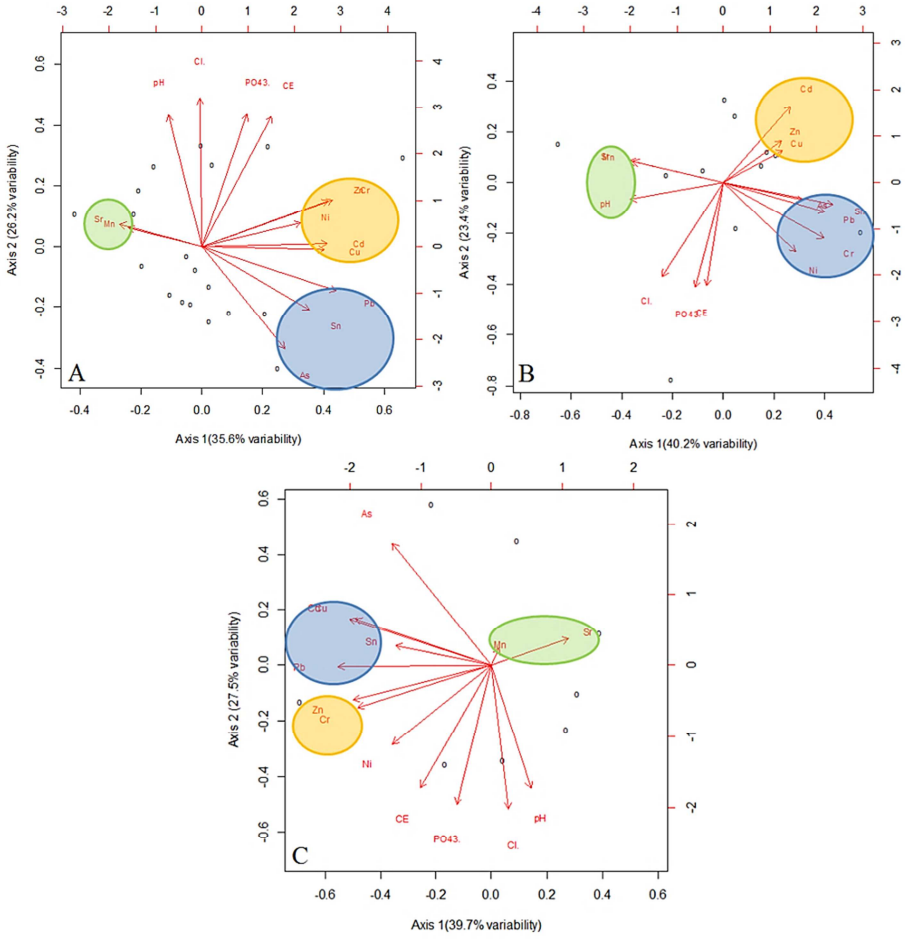
D.1 PCA for filtered elements (A) dry and wet season here mainly we discriminate two groups (in circles). (B) PCA for filtered elements in wet season; we observe similar relationships than in A, with the sulfate associated with the second group. In the PCA performed for for filtered elements in the dry season (C) we observe four groups (i) Zn, Cu and Al, (ii) Mn associated with major elements (Cl and Na) and CE, (iii) Cr and Fe associated with the variation in flow and ph and finally (iv) sulfate associated with Ca.



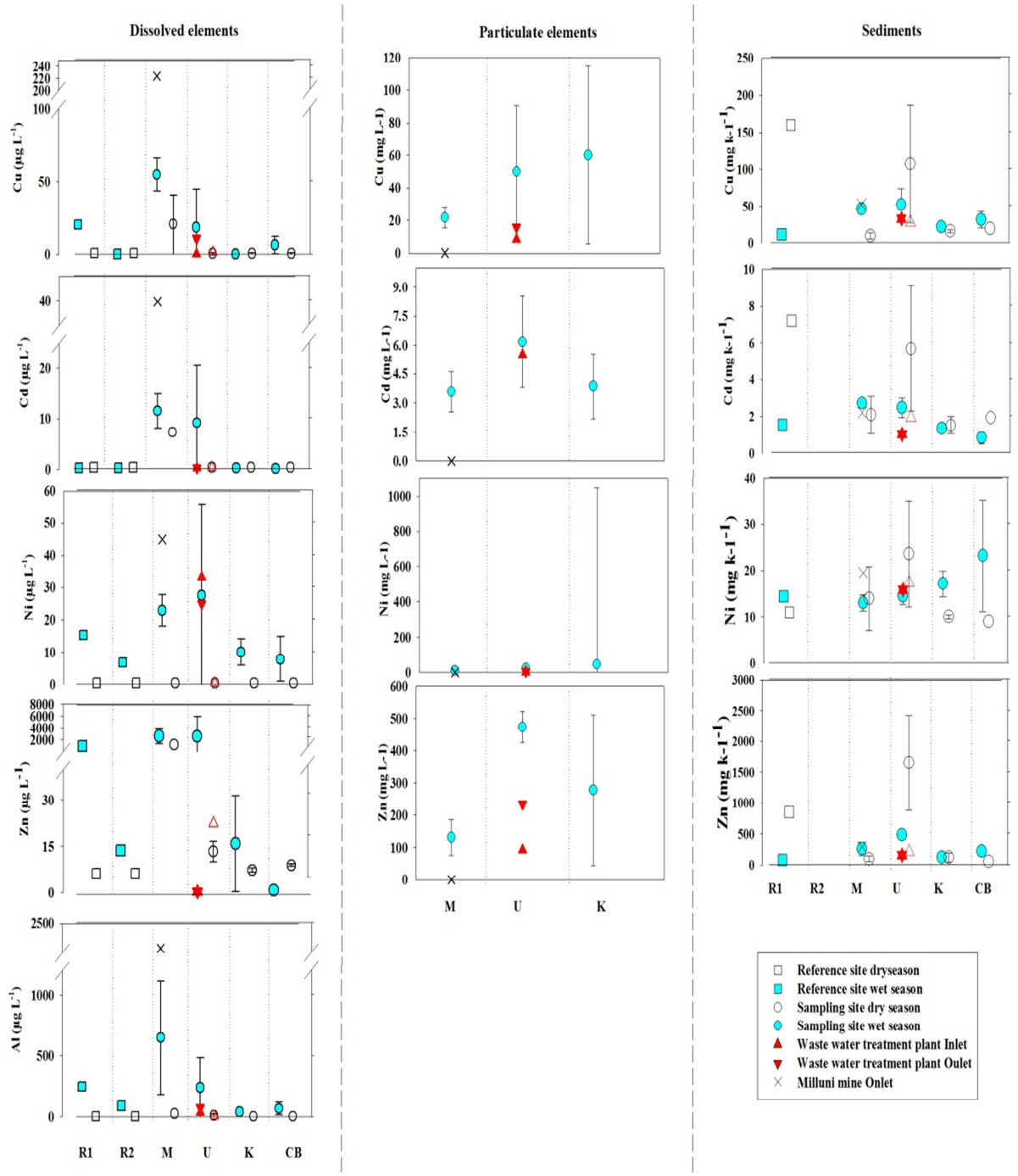
D.2 PCA for particulate elements in wet season. Showing the two identified principal groups of variables (circles).



D.3 PCA for sediments elements (A) dry and wet season. (B) wet season (same groups than in (A) although Cr and Ni switched in the first pool) in dry season. (C) dry season (we found also the same trends although As and Ni remains in a separate vector).



APENDIX.E: Filtered, particulate and sediment concentrations for Cu, Cd, Ni, Zn and Al.
From left to right: Filtered (Al was only determined in filtered phase due to analytical problems), particulate (particulate concentrations were only determined in wet season at CB and R1 areas collected particular matter was not enough to determine concentrations) and sediment concentrations for Cu, Cd, Ni, Zn, and Al, for both dry (empty symbols) and wet (filled symbols) season along the continuum. R1 refers to reference point of the crystalline rock from the Royal Cordillera, R2 refers to the reference point of the sedimentary deposits from fluvio-glacial erosion, cross symbol refer to the outlet of Lake Milluni receiving AMD, M refers to the downstream of the mining area (points M2 and M3). For the urban area (U) triangle up refers to the inlet of the Puchokollo WWTP and triangle down to the outlet.



2. Pollution aux antibiotiques et occurrence des gènes de résistances bactériennes.

2.1 Validation méthode d'extraction sur phase solide (SPE)

Les rendements d'extraction obtenus sont consignés dans la figure23. Les pourcentages de récupération ont varié entre 84 et 97 %. Les pertes dans les cartouches SPE sont inférieures à 16.6% avec une moyenne de perte de 10.9%. Llorca et al. (2014) ont observé des % de récupération inferieurs à 80% pour le SMX après stockage des cartouches SPE pendant 12 semaines à -20°C. Carlson et al. (2013) ont observé des pertes inférieures à 19% avec une moyenne de 9% pour 24 composées chimiques, produits pharmaceutiques inclus, après 20 jours de stockage des cartouches SPE à -20°C. Les % de récupération n'ayant pas diminué au cours du temps on en déduit que le SMX est stable pendant son stockage dans des cartouches SPE pendant 1 mois. Cependant, on observe des pertes liées au procédé SPE raison pour laquelle un facteur de correction devra être appliqué pour corriger ces pertes.

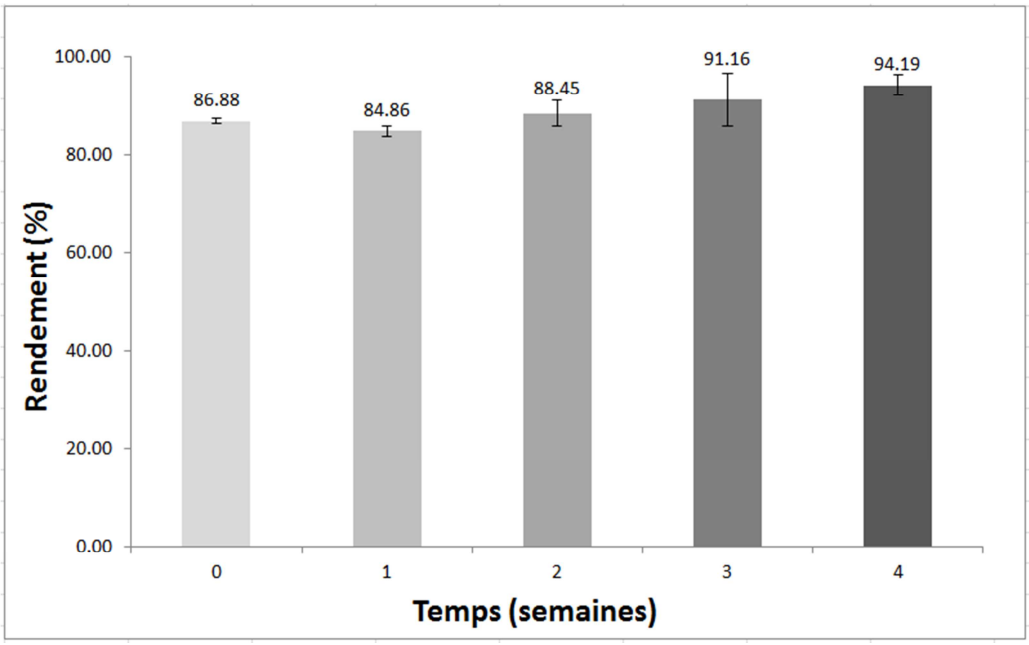


Figure 23 Rendements d'extraction SPE a des différents temps de stockage.

2.2 Article 2 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats

Dans l'article précédent il a été montré que la qualité des eaux de surface du BV est dégradée en lien principalement avec les décharges des eaux usées (traitées ou pas) dans le réseau hydrographique ainsi qu'une présence des éléments trace métalliques liée aux rejets miniers mais aussi aux activités industrielles urbaines de la ville d'El Alto.

Dans cet article je m'intéresse aux molécules antibiotiques dites « polluants émergents », lesquels sont très peu étudiés en Bolivie. La présence des composés antibiotiques dans le réseau hydrographique du site d'étude a été observée dans une étude récente (Duwig et al., 2014) dans laquelle le SMX était la molécule retrouvée dans les plus fortes concentrations suivie par le Trimethoprime (TMP).

C'est pourquoi dans cette thèse les concentrations environnementales de cette molécule dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les sols ont été determinées. Les concentrations en TMP et des deux principaux produits de transformation humains du SMX (N-acetyl-SMX et Gluc-SMX) dans les eaux de surface et souterraines ont egalement été determinées.

L'objet principal de cette étude était d'évaluer le degré de dissémination de ces antibiotiques dans l'ensemble du BV. Le deuxième objectif a été celui d'étudier la dissémination des gènes de résistance au SMX dans le réseau hydrographique et dans les sols.

Le SMX a été detecté dans les trois compartiments étudiés. Le TMP a aussi été détecté dans les eaux de surface et souterraines. Tandis que les produits de transformation du SMX ont été détectés seulement dans les eaux de surface et pas dans le compartiment souterrain. Probablement lié à la re-transformation de ces produits de dégradation dans le composé parent ou a une mobilité plus reduite des produits de transformation. Nos résultats indiquent que les eaux usées sont la principale source de pollution par les antibiotiques ainsi que la principale cause d'apparition et dissémination des gènes de résistance bactérienne. Ils suggèrent aussi que des mécanismes de co-sélection entre métaux et antibiotiques ou une fitness (coût metabolique) nulle des gènes de résistance sont liés à la prévalence des gènes de résistance observés.

2.3 Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca Lake: major transformation products and occurrence of resistance genes.

D. Archundia[a], C. Duwig[a,b], F. Lehembre[a], S. Chiron[d], B. Prado[e], G. Flores Aviles[f], M-C Morel[g], J.M.F. Martins[a,c]

[a]*Université Grenoble Alpes, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[b]*IRD, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[c]*CNRS, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[d]*UMR HydroSciences 5569, Montpellier University, 15 Avenue Ch. Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France.*
[e]*Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México*
[f] *MMAyA, Ministerio de Medio Ambiente y Agua (Ministry of Water and Environment of Bolivia)*
[g]*CNAM, Laboratoire d'analyses chimiques et bio analyses, Paris Cedex 3, France*

Keywords: Water, soil, sulfamethoxazole, trimethoprim, bacterial resistance.

To be submitted in Environmental Health & Public Health

Abstract.
An increasing number of studies pointed out the ubiquitous presence of medical residues in surface and ground water as well as in soil compartments. Not only antibiotics can be found in the environment but also its transformation products on which little information is often available. The development of bacterial resistance to antibiotics is particularly worrying as It can lead to the appearance of sanitary problems. Studies about the dissemination of antibiotics and associated resistances in the Bolivian Altiplano are scarce. We provide baseline information on the occurrence of SMX and TMP antibiotics as well as on most common human SMX TPs as well as on the occurrence of SMX bacterial resistance. Studied compartments showed high levels of antibiotic pollution, situation mainly linked with discharges of treated and untreated waste waters resulting on the presence of antibiotics in the Titicaca Lake. SMX TPs were only detected on surface waters (not studied on soils). SMX bacterial resistance (SulI and SulII genes) is ubiquitous on the basin hydrological network. Co-selection of antibiotic and metal resistance is a possible mechanism explaining the prevalence of ARG's in areas where anthropogenic activity is almost nonexistent and free of antibiotic pollution.

1 Introduction

Direct waste water discharges and rejects of waste water treatment plants (WWTP) are among the main sources of medical and personal care products residues release into the environment. Among this, antibiotics are considered as one of major group of emerging contaminants (Kemper, 2008; Michael et al., 2013; Mojica and Aga, 2011). An increasing number of studies pointed out the ubiquitous presence of medical residues in water and soil reservoirs (Ternes, 1998; Martínez-Carballo et al., 2007; Choi et al., 2008; Walters et al., 2010; Zuccato et al., 2010; Kim et al., 2011; N. Gottschall et al., 2012; Gibs et al., 2013). Antibiotic concentrations vary considerably from one location to another, in relation with consumption patterns, environmental conditions and antibiotic molecular properties (conditioning their retention and degradation in relevant environments). Batt et al. (2006) detected sulfamethoxazole, trimethoprim, ciprofloxacin, tetracycline, and clindamycin in the effluents of three WWTPs (in Erie County, New York) at concentrations ranging from 0.1 to 6.0 $\mu g\ L^{-1}$. Similarly, Gibs et al. (2013) detected sulfamethazine, sulfamethoxazole, and trimethoprime downstream a WWTP discharge (in Hohokus Brook and Saddle Rivers, New Yersey USA) at

concentrations ranging from 0.015 µg L^{-1} to 0.25 µg L^{-1}. Duwig et al. (2014) found that Sulfamethoxazole (SMX) and Trimethoprim (TMP) were present in the surface waters of the Katari watershed (Bolivia). Observed concentrations ranged from 0.63 to 14.6 µg L^{-1} for SMX and from 0.031 to 4.5 µg L^{-1} for TMP. Generally, among the large variety of antibiotics used in human and veterinarian medicine those given above appear to be specifically often detected in natural environments. Moreover, low cost antibiotics as SMX and TMP appear to be more frequently observed and in higher concentrations in lower income countries (compared with more expensive macrolides) due to its lower cost (Segura et al., 2015).

Similarly, the presence of antibiotics in groundwater was reported in different case studies (Hirsch et al., 1999; Lindsey et al., 2001; López-Serna et al., 2013; Sui et al., 2015), sulfonamides being the most extensively studied antibiotics and presenting a relatively high frequency of detection. Summarized by Sui et al. (2015), SMX had been observed at concentrations ranging between 0.1 to 124.5 ng L^{-1} in groundwaters from China, Spain, Switzerland and USA.

Antibiotics are excreted as a mixture of the parent compound and its transformation products (TPs) on which relatively little information is often available (Mojica and Aga, 2011; Evgenidou et al., 2015). After excretion both parent compounds and TPs can undergo biotic or abiotic degradation (Cha et al., 2006; Maia et al., 2014; Solliec et al., 2016). Moreover, it has been showed by several authors that some TPs can potentially be retransformed to the parent compound. Such is the case of the two most common SMX human metabolites: acetyl-sulfamethoxazole (Ac-SMX) and the sulfamethoxazole-N1-glucuronide (SMX-Glu) (García-Galán et al., 2008; Radke et al., 2009; Nödler et al., 2012).

Antibiotic pollution is considered as particularly worrying, principally due to their inherent potential to generate resistant bacterial populations. The prolonged exposure to low doses in natural environments can lead to selective proliferation of resistant bacteria, which can transfer resistance genes to other bacterial species, including pathogenic bacteria. WWTP has been pointed as potential hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment (Rizzo et al., 2013). In Bolivia, Infante et al. (2005) and Bartoloni et al. (2008) detected *Escerichia Coli* genes coding for antibiotic resistance in fecal samples from healthy children in Camiri and Villa Montes cities and similar results were observed in Peru. Rodas et al. (2011) found SMX *Escherichia coli* resistant strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. Moreover, Duwig et al. (2014) in the same study on the Katari watershed in Bolivia detected the presence of SMX resistance genes, principally *sulI* in surface waters. The presence of antibiotics in groundwater also raises concerns about

potential effects on microbial communities, including the development of antibiotic resistance. Regarding impacts in groundwater compartment, Underwood et al. (2011) reported that subtherapeutic levels of SMX could modify microbial community structure and inhibit nitrate reduction process. Moreover, antibiotic TPs can be toxic and in some cases more toxic than the parent compound (Boxall et al., 2004; Solliec et al., 2016): its toxicity can differ from the toxicity of their parent compound in their bioconcentration (toxicokinetics) and/or their mode of toxic action (toxicodynamics) (Michael et al., 2014). Antibiotic compounds can also reach soils by manure application or sludge utilization to fertilize agricultural fields. The persistence of antibiotics in soil mostly depends on its degradation, its adsorption capability, and leaching in water (Díaz-Cruz et al., 2003). Boxall et al., (2005) had observed the lincomycin, sulphadiazine, trimethoprim and oxytetracycline antibiotics in different soils across the UK at concentrations ranging from 1 to 500 ng kg^{-1}. Recently, Zhang et al., (2016) detected antibiotics from the tetracycline, fluoroquinolone and sulfonamide families in surface agricultural soils in China where fertilizers are applied in large quantities. Furthermore, antibiotic resistant genes had also been observed in soils linked whit manure application and waste water discharges (Blanco et al., 2009; Forsberg et al., 2012; Chen et al., 2014).

This study is the first of its kind to evaluate the dissemination of antibiotics and associated resistances in a subwatershed of the Lake Titicaca. In the study site, antibiotics are available without medical prescription and therefore treatment, dose and duration are sometimes inappropriate. We provide baseline information on the occurrence of SMX and TMP antibiotics as well as on most common human SMX TPs (N-acetyl-SMX and Gluc-SMX), in surface and groundwaters as well as in soils (only SMX). We also investigate the occurrence of SMX bacterial resistance. Data were analyzed in the light of the local anthropogenic activities in their urban and rural context.

2 Sampling and analytical procedures.

2.1 Study site and sampling points.

The climate of the region is semi-dry and cold with extreme diurnal variations of climatic factors (solar radiation, temperature and moisture). Precipitations are low and concentrated from December to March (average annual precipitation of 490 to 620 mm $year^{-1}$). Studied basin area is about 2,022 km^2. From North to South the watershed encompasses the Cordillera Real, the Milluni Glacial Valley, the El Alto - Viacha plain and the Colquencha sub-basin located in the Katari Alto. Dominant soils are Dystric Regosol and Eutric Cambisol (FAO, 2005). Principal rivers of the studied site are Seco, Seke, Pallina and Katari (Fig. 1). Seke and

Seco rivers take their source in the Cordillera Real and flow through El Alto city (1.2 million of habitants) downstream. Seque and Seco rivers discharge into the Pallina River, which flows through Viacha city (80'000 inhabitants) and then joins the Katari River. Katari river discharges then into the Cohana bay (in Lake Titicaca) after passing through agricultural areas. El Alto and Viacha Cities are sitting on top of an unconfined fluvioglacial outwash aquifer. It is made of moderately heterogeneous, fine to coarse grained sand and gravel sediments together with clay and silt lenses characterized by an hydraulic conductivity around 2 10^{-4} m s^{-1} and the groundwater flows to the southwest at an approximate velocity of 0.6 m d^{-1} (MMAyA, 2015). El Alto city has a population of about 1.2 million habitants and is the largest and fastest-growing urban center of the Altiplano (Arbona and Khol, 2004). It has an undersized network of collection and treatment of waste waters (M.M.A.y.A., 2010, 2013).

The WWTP is 127 ha, the wastewater enters the plant through a main inlet pipe (1000 mm diameter). Wastewater pretreatment is performed through two separate parallel bars for sand and grit removal. Then the wastewater passes through 2 lagoon series each one composed by 6 lagoons. The first ones are anaerobic and the second ones are of maturation. Finally, treated water is evacuated to the Rio Seco at an average flow rate of 0.7 m^3 s^{-1}.

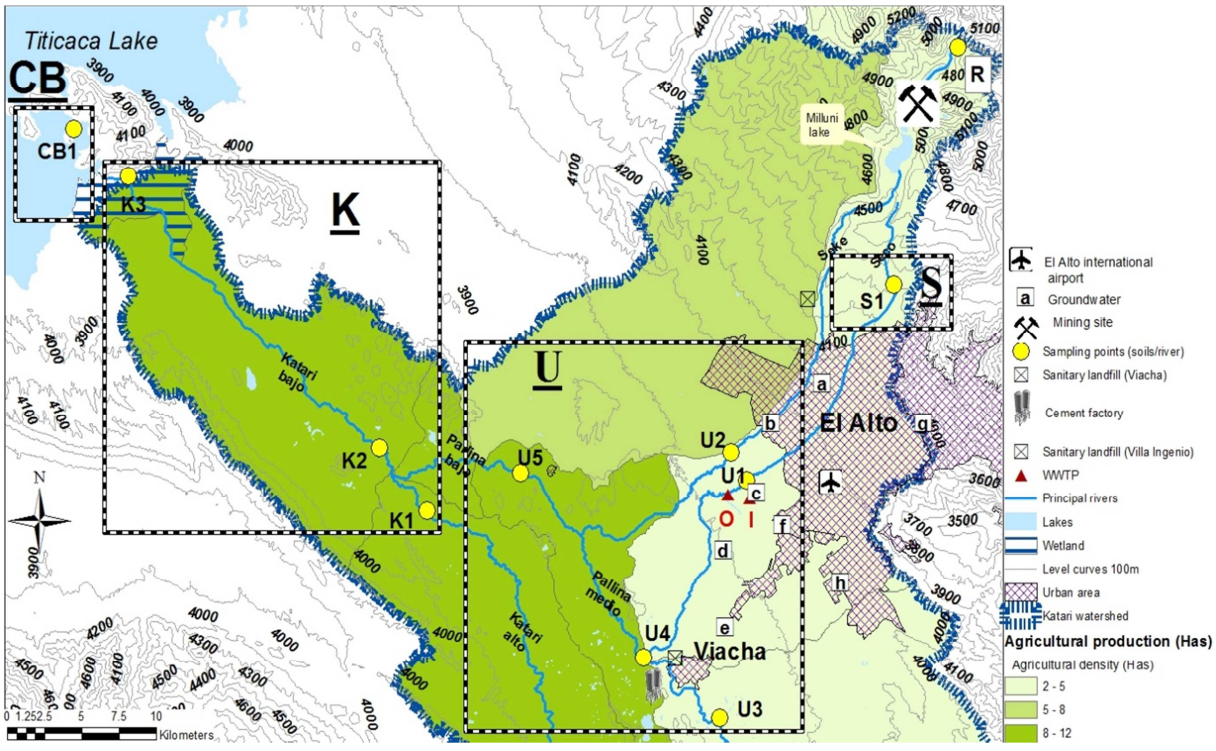


Figure 1. *Study site and sampling points. I refers to the input of the WWTP. O refers to the outlet of the WWTP. S refers to the Seco area, U refers to the urban area, K refers to the Katari river area and CB refers to the Cohana bay area.*

El Alto is a major industrial city including for example, textile fabrication, tannery, furniture, food, painting and metallurgic industries (Ribera Arismendi, 2010). It also comprises pharmaceutical industries (ex; INTI, VITA, LAFAR). Bolivia has a strong pharmaceutical internal production to satisfy its local demand. Imports are only for complex new products. About 20% of products on the market are illegal, either by product adulteration or counterfeiting (Montes, 2012). All pharmaceutical products including antibiotics are of free access, with inadequate dose and/or duration of the treatment. For more detailed information about the study site see (Archundia et al., submitted).

Surface and groundwater sampling points are showed in Figure 1. Two sampling campaigns were conducted for the determination of antibiotic concentrations in surface waters, the first in March 2014 (wet season) and the second in June 2015 (dry season). SMX concentrations in groundwater were determined only for the dry season. SMX concentrations in soils were determined from soil samples of March 2014 (wet season). Bacterial resistance to SMX in surface waters and soils was evaluated from two sampling campaigns conducted on February (2013) and March 2014 (both in wet season).

Surface waters were sampled at 11 points (Fig. 1) on the Rivers Seke, Seco, Pallina, and Katari (representing about 40% of the Katari watershed and were most of anthropic activities take place) as well as at the Cohana bay in Titicaca Lake. Wastewaters were sampled at the inlet (I) and the outlet (O) of the WWTP of Puchukollo (Fig.1). Groundwater was sampled from 7 wells (a, b, c, d, e, f, h) and a spring (g) within the El Alto and Viacha cities, located downstream the Seco and Seque subcatchment (urban area) at depths varying from 11 to 40 m depth. All wells are production wells for drinking water and the spring is also collected for drinking water supply.

Surface and wastewater sampling points are grouped in 4 specific areas according to their respective location: (i) the head waters of the Seco River (S) located above El Alto city (sampling point S1), (ii) the urban area (U) comprising El Alto and Viacha cities, and the Pallina River (sampling points U1 to U5) as well as the WWTP of Puchukollo (sampling points I and O), (iii) the farming area including the Katari River (K) (sampling points K1 to K3) and the Cohana Bay (CB) (sampling point CB1). One reference point (R) was sampled in the headwaters of the Seke river where no or little human activity takes place.

Physicochemical parameters were determined in situ using an Eijkelkamp multi-parameter probe (Eijkelkamp system, model 18.52.01) as well as the water flow which was measured only during dry season.

2.1.1 Sampling for determination of antibiotic and TPs concentrations

For surface, waste and ground waters, sampling was conducted in methanol-cleaned amber glass bottles (previously rinsed with water from the site), transferred at ±4°C in cooled boxes to the laboratory (in Bolivia) and maintained at ±4°C until treatment. Sampling point K3 was only sampled during the dry season. TPs were determined only on waters at sampling points O, U2, U4, U5 and K3 for the dry season.

SMX concentrations in soils were determined in samples R, S1, U5, K1, K2, K3 and CB1. Composite soil samples were taken at the superficial layer (0-15 cm) by taking with a spatula about the same amount of soils at 5 different points at a distance of 5 m in the same plot. They were stored in plastic bags and maintained in darkness at 4°C until their treatment in the laboratory (Bolivia). Once in the laboratory, samples were air-dried and passed through a 2-mm sieve.

2.1.2 Sampling for determination of bacterial resistance to SMX

Sampling points U1, U3, U4 and K1 were only analyzed in 2014 campaign; other sites were analyzed for both seasons. Approximately 500mL of surface waters were sampled in sterile bottles (previously rinsed with water from the site), cooled at 4°C and transported to the laboratory. Soils were sampled at points I, U2, K2, K3 and CB1 in the same way as for the determination of antibiotic concentrations.

2.2 Analytical procedures

2.2.1 Sample pretreatment

Antibiotic and TPs concentrations

Preservation of SMX in Solid Phase Extraction (SPE) cartridges was validated through an experiment involving SPE of an SMX standard solution and its elution at different conservation times (1, 2, 3 and 4 weeks). For that, cartridges (HLB 60mg; Oasis, WATERS) were conditioned with 3ml of methanol (MeOH) (HPLC gradient, Carl Roth) followed by 3mL of ultra-pure water at pH 3.5. 10 mL of SMX standard solution (0.1mg L^{-1}) were loaded (by triplicate for each conservation time). Cartridges were then washed with 3mL of 5% MeOH solution and dried (~40min). Prepared cartridges were then conserved at ±4°C (in the dark) until its elution and analysis at different conservation times. Obtained recoveries varied between 83.5 and 97%, no influence of storage time was observed on the stability SMX.

Prior to SPE, surface, waste and groundwater samples were filtered through PVDF filters (47 mm; 0.45µm; MERCK) in a stainless steel water filtration system (in Bolivia). They were then treated by SPE (as described above) with an automatic solid phase extractor (AutoTrace

SPS Workstation, Caliper). Loading of the sample was performed at a flux ≤ 1 mL min^{-1}. Cartridges were then stocked at 4°C in the dark until its arrival in France. The SPE cartridges were addressed to the laboratory of HydroSciences of Montpellier (UMR 5569). Prior to analysis, analytes were eluted from SPE cartridges with 2 x 4 mL of methanol containing 1% acetic acid (v:v). Extracts were then evaporated to dryness with a gentle N2 gas stream, reconstituted in 1 mL of water acetonitrile (90/10, v:v) containing 2.5 mM acetic acid and finally spiked with 100 ng deuterated internal standards (SMX-d4 and TMP-d9). Because of analytical problems TMP was not determined (ND) for the Cohana bay area in both seasons.
Soil samples were air dried, sieved (2 mm), stored in plastic bags (in Bolivia) and maintained in darkness until their arrival in France. Once in France they were subjected to a process of extraction and purification at the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Methodology for extraction and purification is described in Deschamps et al, (in preparation). Briefly, a volume of deuterated SMX (sulfamethoxazole-d4; Pointe-Claire Canada) was added to weighted samples 18 h before extraction process. Extraction was carried out by an ultrasonic bath with two successive cycles involving different extractants (extractant 1: McIlvaine buffer pH 9 + acetonitrile (ACN); extractant 2: McIlvaine buffer + M EDTA + ACN). Resulting supernatants were collected and pooled after two extraction cycles for QuEChERS purification. Purified extracts were then concentrated under a nitrogen flow and redissolved in ACN and acidified water for analysis.

Bacterial resistance to SMX

Surface waters samples of 100 mL were filtered in triplicate for each sample through sterile cellulose nitrate filters (SARTORIUS, 0.45 µm porosity). Filters were fold, placed in sterile recipients and frozen until analysis in France. Soils were treated and stored in the same way as for the determination of antibiotic concentrations.

2.2.2 Analysis

Antibiotic and TPs concentrations

Determined antibiotics in surface, waste and ground waters where TMP, SMX and SMX TPs (N-acetyl-SMX (A-SMX) and Gluc-SMX (G-SMX)). Analysis was carried out at the Montpellier University (UMR HydroSciences 5569). SPE extracts were analyzed by LC-HRMS equipped with an electrospray source operating in the positive mode of ionization and using an Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA) coupled to a Waters Xterra C-18 analytical column (150 x 2.1 mm i.d., 3.5 µm particle size) with a mobile

phase consisting of a binary mixture of water + 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B) in the gradient mode of elution: from 5% B to 100% B in 15 min, held for 5 min and back to 5% B in 0.1 min at a flow rate of 0.2 mL min^{-1}. Chromatograms were acquired in the full scan mode of detection from 90 to 400 m/z with a nominal resolving power of 50,000 and an automatic gain control of 5 x 10^5 by continuously alternating two scan events: one without and one with fragmentation into the Higher-Energy Collisional dissociation (HCD) cell (15 eV). Quantification was performed by an isotope dilution method using SMX-d_4 and TMP-d_9 as internal standards (IS). SMX-d_4 was also used to correct for extraction losses and matrix effects of the targeted SMX TPs. Based on spiked sample in wastewater at 100 ng L^{-1} level, recoveries (n = 5) were 93 ± 12 and 76 ± 13 for SMX, A-SMX and TMP, respectively. For G-SMX, the analytical method was less reproducible with an average recovery rate of 128 ± 32. This high recovery value was probably due to matrix effects during the LC/MS analysis which could not be properly corrected due to the lack of deuterated G-SMX standard. Analytical results are reported after corrections for recoveries. Method quantification limits (MQLs) according to a signal-to-noise ratio (S/N) of 10 ranged from 1 to 3 ng L^{-1} for all targeted compounds which were suitable for real water samples analysis.

In soils only SMX was determined. Determination was carried out at the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) by online SPE-UHPLC-MS-MS. Analysis was performed in the same way as described by Bourdat-Deschamps et al., (2014). First, online SPE was carried out on an Oasis HLB support, then the UHPLC separation was conducted with a BEH C_8 column (Waters) using a water-acetonitrile-0.1% acetic acid gradient and finally detection was done by mass spectrometry on a triple quadrupole mass spectrometer (TQD, Waters). Concentrations were determined by internal quantification-isotope dilution (coefficients of determination (r^2) better than 0.97, residues below 20%) with the Quanlynx Software v4.1 (Waters). Detection limits (LD) were between 0.1 and 0.23 ng L^{-1}, while quantification limits (LQ) were between 0.3 and 0.7 ng L^{-1} depending on soils.

Bacterial resistance to SMX

Bacterial resistance to SMX in surface waters and soils was evaluated in triplicate for each sample by the detection of genes *Su*lI, *SulII* and *SulIII* coding for SMX resistance. These genes were amplified by PCR using the couple of primers presented in Table 1.

Before PCR, genomic DNA was extracted from samples using the FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals). For surface waters a first step was added to the manufacturer's protocol to properly smash the filter inside the lysing matrix tube. Filters were fold and placed

into the lysing matrix tube that was immersed in liquid nitrogen to freeze the filter which was then blended inside the tube using a sterile spatula. The quality of extracted DNA was checked through agarose gel electrophoresis (1%) in Tris–Borate–EDTA buffer (1x) and UV visualization of gels stained with ethidium bromide with a Gel Doc^{TM} XR Molecular imager (Biorad, France).

Gene	Primer	Sequence 5' to 3'	Reference
sulI	SulI-F	TCACCGAGGACTCCTTCTTC	Chen et al., 2004
	SulI-R	CAGTCCGCCTCAGCAATATC	
sulII	SulII-F	CCTGTTTCGTCCGACACAGA	Chen et al., 2004
	SulII-R	GAAGCGCAGCCGCAATTCAT	
sulIII	SulIII-F	GAGCAAGATTTTTGGAATCG	Perreten V. et Moerlin
	SulIII-R	CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	P., 2002

***Table 1**. Couple of primers used in PCR assays for the detection of SMX resistance genes (SulI, SulII and SulIII) in surface waters and soils.*

PCR reactional medium (25µL) was composed of 12.5 µL of water; 5 µL of Green GoTaq® Flexi (Promega) buffer (5X); 2 µL of $MgCl_2$ (25mM); 2 µL of dNTP (2.5 mM); 0.5 µL of each primer (10 µM); 0,625 µL of BSA (10 mg mL^{-1}), 0.125 µL de DMSO et 0.125 µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase à 5U μL^{-1}. This reactional medium, supplemented with one microliter of metagenomic DNA crude extract (10 ng μL^{-1}), was then placed in a thermocycler (Biorad) and subjected to the following program for genes *sulI* and *sulII*: 95 °C for 10 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. A final extension was performed at 72 °C for 7 min. For *sul*III gene program conditions were: 95 °C for 10 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 30 s, 51 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. A final extension was performed at 72 °C for 7 min. PCR amplification was verified similarly to DNA extraction. If ARG's were present in the sample its number of gene copies was determined by qPCR (real time PCR). Primer sets used for the qPCR assays are listed in Table 2.

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')	Tm (°C)	Reference
SulI	Sul1-653F	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	60	Heuer and
	Sul1-719R	TTGCCGATCGCGTGAAGT		Smalla, 2007
SulII	Sul2-595F	CGGCTGCGCTTCGATT	53	Heuer et al.,
	Sul2-654R	CGCGCGCAGAAAGGATT		2008

***Table 2.** qPCR primer and probe sequences. Tm refers to optimal melting temperature.*

The reactional medium was of about 20 µl containing 10 µl of SsoADV Univer SYBR Green Supermix 200 (Bio-Rad), 0.5 µl of each primer, 1 µl of template, and 8 µl of H_2O. The

thermocycler was programmed for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 seconds at appropriate annealing temperatures (60°C for *sul1* and 53°C for *sul2*). The product specificity was confirmed by melting curve analysis (5 s at 95°C and 1 min 65°C – 97°C). Calibration curves were generated with plasmids carrying target genes: *sul1*, *sul2* and 16SrDNA. They were generated using the PROMEGA pGEM®-T easy vector systems method (réf.A1360) with a laboratory strain of *Escherichia coli* (commercial competent cells pGEM®-T) harbouring the recombinant plasmids. For that 2µl of plasmid were put in contact with 50µl of *e. coli* cells, the mix was incubated in glass for 20min and subject to a heat shock at 42 °C for 45-50 s and maintained in ice for 2 min. Then, 950 µL of Super Optimal Broth medium were added to the reactional medium at room temperature and incubated for 1 and a half hour at 37 ° C in agitation at 150 rpm. Prepared *E. coli* cells were grown in liquid culture (LB-agar) in the presence of kanamycine (50 ng μL^{-1}) as selective element of kan-resistant plasmid at 37 °C for 3 h. After that 170µg/mL of chloramphenicol where added to improve amplification of the plasmid. Transformed cells were aliquoted in 15-30% glycerol and stored at -20 ° C for further utilization. The qPCR efficiencies were between 91.9 and 105.6%, the R^2 values were between 0.99 and 1 for all calibration curves.

3 Results and discussion.

3.1 Water physicochemical parameters, river and groundwater flows

Generally, pH of surface water were neutral to basic and varied between 6.6 and 9.0 for both season, with a slight increase in the dry season. Only sampling point U2 showed an acidic pH (4) during dry season, which could be related with industrial wastewater discharge. pH at the entrance of the Puchukollo was 11.8 in dry season and decrease to 8.9 in wet season. Electrical conductivity (EC) in rivers varied between 50 and 1580 µs cm^{-1} for both season, with an increase in dry season. The highest values were recorded at the entrance (I, 2643 µS cm^{-1}) and at the outlet (O, 1696 µS cm^{-1}) of the WWTP. The EC values remain high in the Katari river and in the Cohana bay (between 670 and 1580 µs cm^{-1}) indicating pollution (or salinization, as the upper Katari is also with high EC and not really contaminated) of surface waters. Groundwater had a basic pH varying between 7.4 and 8.5 and EC between 292 and 380 µs cm^{-1}.

Rivers flows were low as expected for the dry season. They were of ~0.03 $m^3 s^{-1}$ upstream the urban area (sampling points R and S1). They increases across the urban area, with 0.4 $m^3 s^{-1}$ at sampling point U1 and 1 $m^3 s^{-1}$ at sampling point U5. Discharge of the WWTP (0.7 $m^3 s^{-1}$) is almost twice the upstream Seco river flow, leading to almost no dilution of WWTP discharge at the exit of El Alto city during dry season. Higher flow rate was observed at

sampling point K2 (Katari bajo) due to contributions of Pallina and Katari alto rivers. During raining season (Archundia et al., submitted), flow rate increases to around 1 m^3 s^{-1} upstream the watershed to 40 m^3 s^{-1} in the lower Katari river. Results from an integrated study based on hydrogeological, hydro-chemical and isotopic data (MMAyA, 2015) show the existence of groundwater surface water interactions from the Seco and Seque rivers (b, c, d wells, Figure 1) explaining some of the river flow rate during the dry season. The same study revealed high nitrate concentrations from different sampling events showing that leakage from sewage system from the northeast area (urban area, well a and surroundings, Figure 1) could contribute to the aquifer recharge.

3.2 Antibiotic and TPs concentrations.

3.2.1 Surface waters

Figure 2 shows SMX and TMP mean concentrations by area for wet and dry seasons. At the reference site (R), SMX and TMP concentrations were under detection limits (LD) for both seasons. This confirms that the head of the watershed is not subject to antibiotic pollution (at least for these two antibiotics). Generally, SMX and TMP concentrations show the same trend along the basin. That means, no or lower concentrations above the urban area (R and S areas), highest concentrations within the urban area, a decrease in the lower Katari river area and similar SMX concentrations levels in the Katari river and the Cohana bay areas (at K area TMP was only determined at sampling point K3 while it was not determined at the CB area).

SMX concentrations along the basin were comparable between seasons (Figure 2). At the Seco (S) area, concentrations were between 12 and 13 ng L^{-1} (wet and dry season respectively). Concentrations rise strongly in the urban area and decrease in the low Katari River area (sampling point K1: 18 and <LD ng L^{-1} for the wet and dry season respectively) as effect of dilution, sorption to particulate organic matter or of sorption process facilitated by the presence of dissolved and particulate metals as Cu+ (Archundia et al., 2016 submitted; Morel et al., 2014). SMX concentrations tend to increase again as we approach the Cohana Bay (wet season: 31 ng L^{-1} at sampling point K2; dry season: 118 ng L^{-1} at sampling point K3), which reflects local pollution. Finally, SMX is still detected in the Cohana bay at concentrations of about 11.5 and 26 ng L^{-1}, wet and dry season respectively. Hypothetically, this is linked to a high mobility and low degradation of this antibiotic or with local pollution from agricultural origin.

TMP was only detected in the urban area (U) and in the Katari area (K) in both seasons (Figure 2, no data was available for the CB area). In wet season, observed concentrations

varied between 46 and 106 ng L^{-1} and between 145 and 312 ng L^{-1} in dry season, with higher concentrations in dry season. TMP concentrations were only determined at the outlet of the WWTP and they were of about 271.5 ng L^{-1} and 336.5 ng L^{-1}, wet and dry season respectively. In the Katari (K) area, TMP concentrations decrease to values of 28 ng L^{-1} in wet season (sampling point K2) and of 135 ng L^{-1} for the dry season (Sampling point K3). TMP concentrations in the Cohana bay were not determined. To summarize, TMP concentrations in surface waters varied between 28 and 106 ng L^{-1} in wet season and between 135 and 312 ng L^{-1} in dry season. Generally, they were lower than SMX concentrations in the wet season and slightly higher during the dry season.

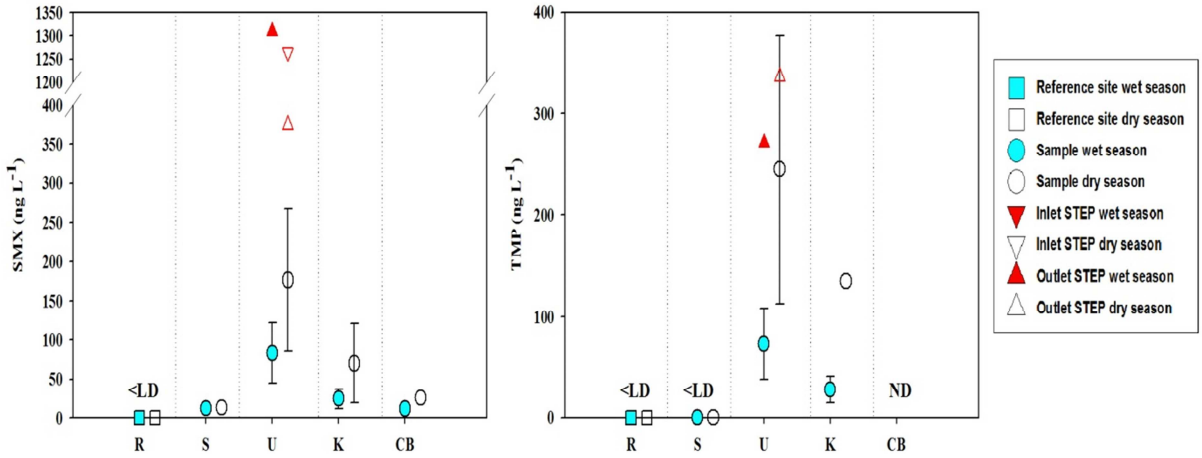


Figure 2. *SMX (left) and TMP (right) mean concentrations in surface waters (ng L^{-1}) by area (wet and dry season).* ***R*** *refers to reference site.* ***S*** *refers to sampling point in the Seco area.* ***U*** *refers to the urban area.* ***K*** *refers to the Katari area.* ***CB*** *refers to the Cohana bay area. Triangles refer to sample sites at the Puchukollo STEP inlet and outlet. <LD means under detection limits. ND stands for Not Detected. The error bars represents standard deviations: R (N=1), S (N=1), U (N=5), I and O sample points are shown apart, K (N=2) and CB (N=1).*

Measured SMX concentrations in surface waters (between 12 and 134 ng L^{-1} in wet season and between 13.2 and 218 ng L^{-1} in dry season) were lower than those found by Duwig et al., (2014) at the study site in 2012 (between 63 and 14624 ng L^{-1}). Similarly, rejected SMX concentrations at the WWTP in wet season were ~6 fold lower than those observed by Duwig et al., (2014) (Duwig et al., (2014): 8832 ng L^{-1} ; this study: 1309.5 ng L^{-1}). Supposedly, difference in observed concentrations could be related with differences in quantification method employed or with a change in consumption patterns and modification in treatment processes by EPSAS, the Public Water and Sanitation Enterprise. Nevertheless, this hypothesis remains difficult to prove because consumption data of antibiotics are not available at the study site.

If we compare observed concentrations with those found by Segura et al. (2015) in various African lower income countries (Table 3) our SMX and TMP mean concentrations are lower. Observed SMX concentrations are more comparable with those found by Tamtam et al.

(2008) in the Seine River (France) and Shimizu et al. (2013) in the Mekong River (Vietnam) (Table 3). However, population, number of cities discharging its treated or untreated waste waters and river flows are much more important for these watercourses (Table 3). Those, the dilution factor should play an important role on similarities. This suggests that antibiotic inputs are more important for the Seine and Mekong rivers in accordance with higher urban influence. Nevertheless, our observed concentrations attest for a high consumption of SMX and TMP antibiotics as our study rivers are only under the influence of two cities (El Alto and Viacha) which together count with a population of about 1,280000 habitants. TMP maximal concentrations were higher than those observed by Tamtam et al., (2008a) in the Seine River (12 to 50 ng L^{-1}) attesting also for a higher consumption of this antibiotic in the study site.

The major trend in the distribution of determined antibiotics on surface waters suggests that its presence is mainly related to urban activities as higher concentrations were recorded at the proximity of the WWTP and the urban area (Figures 1 and 2).

Regarding SMX human transformation products (only determined in dry season), concentrations varied between <LD and 290.3 ng L^{-1} for A-SMX and between <LD and 233.7 for G-SMX. Generally, they remained in lower concentrations that their parent compound. This contradicts observations made by Ashton et al. (2004). The two TPs concentrations decreased gradually until the lower Katari river (sampling point K3; concentrations <LD) where SMX could still be detected (118 ng L^{-1}). This may imply the possible retransformation of TPs to the parent compound. Ashton et al. (2004) also observed that A-SMX concentrations found in effluents from WWTPs were higher than those found downstream.

3.2.2 Wastewaters

SMX highest concentrations were recorded at the inlet (I) and the outlet (O) of the WWTP of Puchokollo (I: not determined and O: 1309.3 ng L^{-1} for the wet season; I: 1265.2 ng L^{-1} and O: 375.3 ng L^{-1} for the dry season). Although a dilution effect was expected during the rainy season, observed SMX concentrations at the outlet of the WWTP were lower (375.3 ng L^{-1}) in dry season than in wet season (1265.2 ng L^{-1}). This is suggestively attributed to the leaching of urban area surfaces during wet season.

Our observed SMX concentration at the outlet of the WWTP was higher than observed concentration by Zuccato et al., (2010) in the Milan WWTP (40 ng L^{-1}; 1,250000 inhabitants) in Italy (Table 3), attesting for a higher SMX consumption on the study site. Our observed concentration is comparable with observed concentration by – Tamtam et al., (2008b) at the

Table 3. Comparison of observed SMX and TMP concentrations (ng L^{-1}) in surface, waste and groundwaters with literature data.

Author	Country	Study site	Population	Mean Flow (m^3 d^{-1})	SMX			TMP		
					mean	Min	max	mean	min	max
This study	Bolivia	Urban area (surface waters)	1,280 000 (El Alto and Viacha cities)	60480	130	15	218	159	46	312
		Katari area (surface waters)	-	108000	24.2	18	31	NA	-	-
		Cohana bay (surface waters)	-	-	18.8	11.5	26	-	-	-
		WWTP Puchukollo (O)	480000 [a]	57024	842.4	374.3	1309.5	304	271	336.5
		Urban area (groundwater)	1,280 000 (El Alto and Viacha cities)	-	106	47.8	251.4	154.2	108	200.2
Hirsch et al., (1999)	Germany	Germany (groundwater)	-	-	-	-	470	-	-	-
Lindsey et al., (2001)	United States	United States (groundwater)	-	-	220	-	-	-	-	-
Tamtam et al., (2008a)	France	Seine river (surface waters)	12,341 418 (at Paris)	26784000 [b]	63	20	544	18.4	12	45
Tamtam et al., (2008b)	France (Seine basin)	WWTP (Noisy)	-	30000	190	-	-	350	-	-
		WWTP (Elbeuf)	-	11000	370	-	-	390	-	-
		WWTP (Rouen)	-	85000	1170	-	-	70	-	-
		WWTP (Tanc)	-	70	3110	-	-	460	-	-
Zuccato et al., (2010)	Italy	River Po (surface waters)	Receiving discharges of Milan WWTP	68515200	2.1	1.83	2.39	-	-	-
		River Arno (surface waters)	-	725760	5.3	1.7	11.4	-	-	-
		Milan WWTP (O)	1,250000	374000	16	-	-	-	-	-
		Varese WWTP (O)	229000	94000	11	-	-	-	-	-
García-Galán et al., (2011)	Spain (Ebro basin)	Ebro river	3,000000	2626560	89	-	-	-	-	-
		WWTP1 (O)	42000	11121.5	90.25	42.5	138	-	-	-
		WWTP2 (O)	171024	60000	40	20	60	-	-	-
		WWTP3 (O)	37300	23660	46	30	62	-	-	-
		WWTP5 (O)	650000	173700	650	600	650	-	-	-
Shimizu et al., (2013)	Vietnam	Mekong delta (urban samples)	-	-	111	25	313	-	-	-
		Mekong river (surface waters)	-	1183680000 [c]	26	7	56	-	-	-
		Can Tho (urban drainage)	1,237 000	-	1094	103	4030	-	-	-
Peng et al., (2014)	China	Pearl River Delta (groundwater)	-	-	-	28.7	124.5	-	33	105
Segura et al., (2015)	Ghana	Ghana (surface waters)	-	-	2102	5	9640	338	14	1374
	Kenya	Kenya (surface waters)	-	-	13136	1	49562	2294	2	11383
	Mozambique	Mozambique (surface waters)	-	-	11420	511	53828	1864	289	6223
	South Africa	South Africa (surface waters)	-	-	2090	3	10568	603	4	5875

[a] 40% of El Alto city population. [b] Interannual mean flow at Paris (http://sigessn.brgm.fr/spip.php?article175). [c] Smajgl and Ward, (2013). O:outlet of the WWTP.

Noisy WWTP located in the Seine basin. SMX concentrations data at the inlet (I) and at the outlet (O) of the WWTP were only available for dry season (1265.2 ng L^{-1} and 375.3 ng L^{-1}, inlet and outlet respectively), from these data we could say that the removal SMX efficiency was of about 70%. Xu et al. (2015) observed SMX removal efficiencies of 27% in a WWTP in China and García-Galán et al., (2011) observed SMX removal efficiencies ranging from 26 to 88% in 6 WWTP in the Ebro River basin (northeast Spain) (differences related to variabilities in WWTP retention times and treatment). Our SMX observed concentrations at the outlet of the WWTP (sampling point O: 1309.3 ng L^{-1} and 375.3 ng L^{-1}, wet and dry season respectively) were higher than those observed in these studies (García-Galán et al., 2011 and Xu et al., 2015) (Table 3), supporting our hypothesis that SMX consumption is greater on the studied site as observed removal efficiency (70%) is greater or near of removal efficiencies observed by these authors.

The highest concentrations of SMX human TPs were observed at the outlet (O) of the WWTP Puchukollo as these two TPs are related with human metabolism (Vree et al., 1994).

3.2.3 Ground waters

Observed SMX and TMP concentrations in ground waters are listed in Table 4. SMX was detected in all samples at concentrations ranging from 47.8 to 251.5 ng L^{-1}. SMX TPs were not detected in ground waters which could be related with its retransformation on the parent compound or with a lower mobility. SMX observed concentrations in surface waters from the urban area (U) and on wells located in its vicinity were not significantly different (*p-value*: 0.1). Higher concentrations were recorded in samples taken below El Alto city, downgradient from the WWTP (sampling points d and e: 251 - 190 ng L^{-1}). Sampling point c which is close and upgradient to the WWTP shows an intermediate SMX concentration of 61 ng $L^{-}1$. SMX concentrations in groundwater increase gradually downgradient from the WWTP to the southwest of the city in the direction of the groundwater flow, showing that the WWTP and probably irrigation with wastewater effluents have a greater impact on groundwater contamination than other sources. Other sources might leakages of the wastewater collection network or from septic tanks and interactions between surface and groundwater.

There is evidence that SMX is frequently detected in groundwaters all around the world (Sui et al., 2015), reflecting the great mobility of SMX. For example, SMX was the second pharmaceutical compound most frequently detected in groundwater samples from the Rhône-Alpes region, France (maximum concentration: 11 ng L^{-1}) (Vulliet and Cren-Olivé, 2011). Avisar et al., (2009) studied the SMX contamination of a deep phreatic aquifer from the

Mediterranean Sea, their results suggested that SMX may penetrate into relatively deep subsurface environments and be transported over relatively long distances (about 1.3 km) in saturated porous media. Various authors found that SMX concentrations in groundwater are related with the presence of waste disposal areas or sewage discharges (Table 3) (Hirsch et al., 1999; Lindsey et al., 2001; Peng et al., 2014). Furthermore, Barber et al., (2009) found that SMX is a useful tracer of subsurface contamination by WWTP effluent.

Contrary to SMX, TMP seems to have less potential to reach groundwater compartment. Barber et al., (2009) and Fram (2011)mentioned that trimethoprim undergoes significant attenuation between wastewater sources and adjacent groundwater as the water passes through the vadose zone and aquifer materials. TMP was detected only in samples c and d (108 and 200 ng L^{-1} respectively) and it remained under detection limits in other sampling points. It should be noticed that samples c and d are the closest to the WWTP and they are upgradient and downgradient it. This suggests that WWTP discharges are linked to observed TMP concentrations in groundwater. TMP was already observed in wells by some authors. Concentrations of about 21 to 55 ng L^{-1} were determined in wells from different villages at Panchateru, India (Fick et al., 2009). Peng et al., (2014) observed concentrations ranging from 3.3 to 10 ng L^{-1} in China (table 3). These observations were linked to insufficient waste water management in the first case and to leaching from a sanitary landfill in the second case.

Sampling point	Sampling depth (m)	SMX (ng L^{-1})	TMP (ng L^{-1})
A	68	51.2	<LD
B	30-40	77.3	<LD
C	30-40	61.4	108
D	32	251.5	200.2
E	11	190	<LD
F	<5	88.7	<LD
G	30-40	47.8	<LD
H	25	80.8	<LD

Table 4. *Determined SMX concentrations on ground water samples (ng L^{-1}) from wells within El Alto city. <LD refers to concentrations under detection limits.*

3.3 SMX pollution in soils

SMX concentrations in soils are showed in table 5. SMX was not detected in all soil samples. Soils located in the upper part of the basin (sample points R and S1) and in the upper transect of Katari River (sample point K1), where no or little human activity takes place, do not appear to be polluted with SMX. Sample point K3 also shows SMX levels under quantification limits. Higher concentration (18 µg Kg^{-1}) was observed in the soil sampled in the surrounding area of the WWTP discharge (sample point I). This is related to two facts. Firstly, WWTP

inlet pipe overflows during wet season when WWTP capacity is overcome and secondly, the same inlet pipe is drilled to irrigate nearby crops with raw wastewaters.

SMX concentrations gradually decrease as we move away from the WWTP. At the outlet (O) of the WWTP SMX is present but in lower concentrations (0.64 µg Kg^{-1}). Observed concentrations in Pallina river (sampling point U5) were < 0.5 µg Kg^{-1} (under quantification limits). Upper Katari river (sampling point K1) also showed SMX concentrations under quantification limits. Concentrations increases again at sampling point K2 (0.5 µg Kg^{-1}) corresponding to an agricultural field. This is probably linked with irrigation with polluted SMX surface waters or to soil fertilization with SMX treated cows manure.

Sampling point	**Mean (µg Kg^{-1})** N=2	**SD** N=2
R	ND	0
S1	ND	ND
I	18	1.22
O	0.64	0.018
U5	0.5*	0
K1	0.05**	0.005
K2	0.5	0.096
K3	0.2*	0.025
CB1	0.8	0.559

Table 5. *Determined SMX concentrations in soils (µg Kg^{-1}). * refers to concentrations under quantification limits (<LQ). ** refers to concentrations under detection limits (<LD).*

At the outlet of the basin (sampling point K3) measured concentration was <QL. SMX concentration increases again (0.8 µg Kg^{-1}) in agricultural soils sampled at the Cohana bay (sampling point CB1) which could be linked to local pollution by rural settlements, manure application and periodic soil inundation during the wet season due to Titacaca Lake level variations. Observed concentrations in agricultural soils (K2 and CB1) were lower than those observed by Karcı and Balcıoğlu, (2009) (between 50 and 100 µg Kg^{-1}) in various agricultural soils in Turkey. SMX maximal concentrations were higher than those found by García-Galán et al., (2013) (2.58 µg Kg^{-1}) and Hu et al., (2010) (0.9 µg Kg^{-1}), in soils from Catalonia, Spain and Northern China respectively. Variances on SMX concentrations found by authors (including us) are surely related with differences on soil management (irrigation with waste waters or manure application), differences on soil sorption properties (resulting on different mobility behavior of SMX) but also with differences on used methodology's (i.e. extraction methods).

SMX observed concentrations in soils seem to be directly related with input of waste waters and SMX polluted surface waters but also with manure application supposedly contaminated

with SMX on agricultural soils. The relation of irrigation with raw waste waters and observed SMX concentrations in agricultural soils was evidenced by Chen et al., (2014), which found SMX concentrations between 0 to 11 µg Kg^{-1}, 0 to 39 µg Kg^{-1} and 0 to 90 µg Kg^{-1} in agricultural soils being no, previously and currently irrigated with waste waters respectively. On the other hand, antibiotic presence in manure and its importance as contributor to antibiotic pollution on agricultural soils was already stated by several authors (Frey et al., 2015; Hu et al., 2010; Martínez-Carballo et al., 2007; Meersche et al., 2015).

3.4 Presence of SMX bacterial resistance genes in surface waters

The presence of SMX specific resistance genes *SulI*, *SulII*, and *SulIII* was evaluated. Table 4 summarizes qualitative data obtained by PCR assays for 2013 and 2014 sampling campaigns (both in wet season).

Sampling campaign	Gene	Sampling point												
		R	**S1**	**U1**	**I**	**O**	**U2**	**U3**	**U4**	**U5**	**K1**	**K2**	**K3**	**CB1**
2013	***sul1***	+	-	NA	+	+	+	NA	NA	+	NA	+	+	+
	sul2	+	-	NA	+	+	+	NA	NA	+	NA	+	+	+
	sul3	-	-	NA	+	+	+	NA	NA	+	NA	+	-	-
2014	***sul1***	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	sul2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	sul3	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-

Table 5. *Presence (+) and absence (-) of SMX resistance genes in surface waters (results were identical between triplicates).*

Generally, all surface water sampled points present SMX resistance genes (*SulI*, *SulII* and *SulIII*) except sampling point S1. These genes were already observed in large quantities in surface waters by a variety of authors (Chen et al., 2015; Hoa et al., 2011; Hsu et al., 2014; Xu et al., 2015). In our study, S*ulI* and *SulII* were the SMX resistance genes most frequently observed. This is consistent with Hsu et al. (2014), who observed a similar prevalence of *SulI* gene in natural water bodies of the surroundings of a swine farm in northern Taiwan.

These results suggest that SMX bacterial resistance is linked to urban discharges but also highlights the existence of other pollution sources as ARG's were observed at the reference site. The last could be related to the sporadic presence of possible treated antibiotic farm animals (such as lamas) as well as with sporadic human presence. Nevertheless, this does not explain its prevalence as no SMX concentrations were found in surface waters. In this case, its prevalence could be related with co-selection mechanisms as this area present natural high levels of trace metals (Archundia et al., 2016 (submitted); Salvarredy-Aranguren et al., 2008).

The relation between metal tolerant bacteria and antibiotic tolerant bacteria in surface waters was already observed by Das et al., (2013) and Wright et al., (2006).

Number of gene copies was only determined for genes *SulI* and *SulII* results are showed in Figure 3. Observed *SulI* gene copies varied between 4.9E+02 and 4.0E+05 in 2013 and between 4.4E+01 and 1.3E+05 in 2014. *SulII* gene copies varied between 9.5E+01 and 1.5E+05 in 2013 and between 3.0E+01 and 6.7E+04 in 2014. Generally, gene copies of *SulI* gene were greater than those of *SulII* gene in both sampling campaigns. Not much difference in gene copies (*SulI* and *SulII* genes) was observed regardless the sampling campaign, except for sampling point R. We notice that higher numbers of *SulI* and *SulII* genes were recorded among the urban area sampling points. Nevertheless, the reference site (R) presents similar number gene levels than sampling points at the entrance and the outlet of the WWTP (I and O) for the 2013 sampling campaign. Hypothetically, this could be related as said before with co-selection process, more specifically co-resistance, between metals and antibiotics. If this is true, the natural presence of metals at this point of the basin is responsible of the transfer of metal resistance genes but also of antibiotic resistance genes as they are often present together on mobile genetic elements (Baker-Austin et al., 2006). Other explanation for the persistence of antibiotic resistance genes in sampling point R, where no antibiotic pollution is present, could be related with a null fitness cost of antimicrobial resistance genes as observed by (Luo et al., 2005; Zhang et al., 2006).

Regarding the number of gene copies for the *SulI* gene at the inlet and outlet of the WWTP, we observe that levels tends to increase at the outlet for two sampling campaigns, supporting the statement that WWTP's can act as hotspot spreading bacterial resistance to antibiotics.

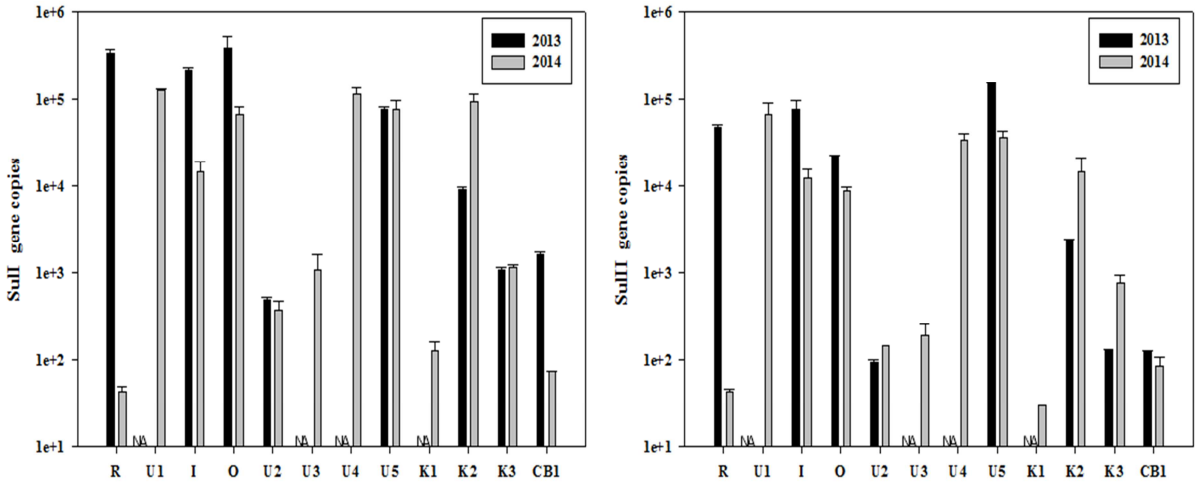


Figure 3. *SulI (left) and SulII (right) number of gene copies in surface waters for both sampling campaigns (2013 and 2014). Error bars represents standard deviation (N= 2 or 3). NA refers to not sampled.*

3.5 Presence of SMX bacterial resistance genes in soils

Presence of SMX resistance genes in soils was evaluated at sampling points I, U2, K2, K3 and CB1. S*ulI* and *SulII* genes were only observed at the sampling point located in the surrounding area of the input of the WWTP (point I), *SulIII* gene was not observed in soils. High altitude and extreme environmental conditions (cold and semi-arid climate) could be responsible of the absence of SMX resistant genes in soils U2, K2, K3 and CB1by significantly reducing microbial activity and thus the development of resistance genes, even in presence of SMX. The absence of specific SMX resistance genes (*Sul* genes) could also be related with the presence of less specific mechanisms, as multidrug efflux pumps, conferring protection against a wide range of chemical compounds including antibiotics. Relation between multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance to antibiotics has already been observed by various authors (Lin et al., 2015; Schindler and Kaatz, 2016).

S*ulI* and *SulII* number of genes copies in sampling point I are shown in figure 4. Observed levels were higher in 2013. Gene copies number in 2013 was of 1.2E+04 and 1.1E+04 for *SulI* and *SulII* genes respectively, while in 2014 they were of 4.9E+03 and 5.6E+03 for *SulI* and *SulII* genes respectively.

The presence of *sul* genes on studied soils seems thus to be more related with high amounts of waste water discharges (WWTP waste water overflow and irrigation of nearby plantations with wastewaters) than with the presence of SMX concentrations. It has already been advanced that WWTP are hotspot for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment (Rizzo et al., 2013; Xu et al., 2015). Chen et al., (2014) studied the relation between ARG and irrigation waste waters irrigation in agricultural soils. They observed that the relative abundance of SMX resistance genes (*SulI* and *SulII*) was significantly higher in wastewater-irrigated soils than in non-irrigated soils.

4 Conclusion

This study shows that surface waters and soils of the Bolivian highlands are subjected to high levels of antibiotic pollution. This situation appears to be mainly linked with discharges of treated and untreated waste waters. This situation testifies about the importance of the improvement of decontamination techniques of these drugs during waste water treatment processes and a decrease of sources by the regulation of antibiotics usage. Nevertheless, agricultural practices as manure application of antibiotic-treated animals could also play a role on observed concentrations.

Concentration trend observed along the river network was the same for both determined antibiotics but with lower concentrations for TMP supposedly related with a lower

consumption of this antibiotic as concentrations at the entrance of the WWTP were lower than for SMX. That trend appears to be related with both urban and local contamination in the lower part of the basin, resulting to the presence of antibiotics in the Titicaca Lake. The presence of both antibiotics in groundwater samples confirms the potential for these compounds to reach deep water bodies, especially for SMX as it was detected in all sampled wells, all of them used for public drinking-water supply. A better understanding of the major factors affecting the mobility of these molecules is of vital significance to prevent its spreading and impacts on fragile, high altitude ecosystems as well as to understand the spatial distribution of observed concentrations in the groundwater compartment.

Overall, type and concentration of determined antibiotics appeared to be linked with consumption patterns. Lacks on pharmaceutical consumption policies and social-economic factors at the study site had led to a high consumption of low cost antibiotics (SMX and TMP) as already observed in other lower income countries. A survey about consumption patterns is underway in the Katari watershed to better understand the sources of this contamination and latter give advices to local and national decision makers.

This uncontrolled consummation had not only given way to antibiotic pollution of natural ecosystems, but also to the presence of ARG's. Our results showed that SMX bacterial resistance (S*ulI* and *SulII* genes) is ubiquitous on the basin hydrological network, even in areas where anthropogenic activity is almost nonexistent and free of antibiotic pollution. Here co-selection of antibiotic and metal resistance (co-resistance) or a null fitness of ARG's appears as viable explanation of SMX ARG's observed prevalence levels. The absence of studieg ARG's in soils suggest the presence of multidrug efflux pumps conferring antimicrobial resistance to antibiotics in the study site. These results clearly deserve more investigations, since it is now accepted that the acquisition of ARG by pathogens has become one of the most important public health problem (WHO, 2014).

Acknowledgements

This work was supported by the French national program EC2CO "Ecosphère Continentale et Côtière", the LABEX OSUG@2020, ANR grant # ANR-10-LABX-56" **(**financed on the Future Investments program launched by the French government and implemented by the ANR), the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) and by grants from Région Ile-de-France for UHPLC–MS–MS analyses. We thank Jimena Yupanqui (student from the Chemical Institute of the Universidad Mayor de San Andrès, La Paz) for her help in the antibiotics filtration and pre-concentration.

References

- Archundia, D., Duwig, C., Spadini, L., Uzu, G., Guédron, S., Morel, M.C., Cortez, R., Ramos Ramos, O., Chincheros, J., Martins, J.M.F., submitted. Eutrophization and polymetallic contamination in the continuum Milluni - Katari - Lake Titicaca : Impact of anthropogenic activities from the fastest-growing urban center of Bolivia (El Alto, 4000 m a.s.l.). Geochem. Explor. Submitted.
- Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. Sci. Total Environ. 333, 167–184. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.04.062
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends Microbiol. 14, 176–182. doi:10.1016/j.tim.2006.02.006
- Barber, L.B., Keefe, S.H., LeBlanc, D.R., Bradley, P.M., Chapelle, F.H., Meyer, M.T., Loftin, K.A., Kolpin, D.W., Rubio, F., 2009. Fate of sulfamethoxazole, 4-nonylphenol, and 17β-estradiol in groundwater contaminated by wastewater treatment plant effluent. Environ. Sci. Technol. 43, 4843–4850.
- Bartoloni A, Pallecchi L, Fiorelli C, Di Maggio T, Fernandez C, Villagran AL, Mantella A, Bartalesi F, Strohmeyer M, Bechini A, Gamboa H, Rodriguez H, Kristiansson C, Kronvall G, Gotuzzo E, Paradisi F, Rossolini GM, 2008. Increasing resistance in commensal Escherichia coli, Bolivia and Peru. Emerg. Infect. Dis. 14, 338–40. doi:10.3201/eid1402.070138
- Batt, A.L., Bruce, I.B., Aga, D.S., 2006. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. Environ. Pollut. 142, 295–302. doi:10.1016/j.envpol.2005.10.010
- Blanco, G., Lemus, J.A., Grande, J., 2009. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. Environ. Res. 109, 405–412.
- Bourdat-Deschamps, M., Leang, S., Bernet, N., Daudin, J.-J., Nélieu, S., 2014. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction–ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction. J. Chromatogr. A 1349, 11–23. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.006
- Boxall, A.B.A., Fogg, L.A., Baird, D.J., Lewis, C., Telfer, T.C., Kolpin, D., Gravell, A., 2005. Targeted monitoring study for veterinary medicines in the UK environment. Final Report to the UK Environmental Agency.
- Boxall, A.B., Sinclair, C.J., Fenner, K., Kolpin, D., Maund, S.J., 2004. Peer reviewed: When synthetic chemicals degrade in the environment. Environ. Sci. Technol. 38, 368A–375A.
- Cha, J.M., Yang, S., Carlson, K.H., 2006. Trace determination of β-lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1115, 46–57. doi:10.1016/j.chroma.2006.02.086
- Chen, B., Liang, X., Nie, X., Huang, X., Zou, S., Li, X., 2015. The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the Pearl River and Pearl River Estuary, South China. J. Hazard. Mater. 282, 61–67. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.06.010
- Chen, C., Li, J., Chen, P., Ding, R., Zhang, P., Li, X., 2014. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistances in soils from wastewater irrigation areas in Beijing and Tianjin, China. Environ. Pollut. 193, 94–101.
- Choi, K., Kim, Y., Park, J., Park, C.K., Kim, M., Kim, H.S., Kim, P., 2008. Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. Sci. Total Environ. 405, 120–128. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.06.038
- Das, S., Patnaik, S.C., Sahu, H.K., Chakraborty, A., Sudarshan, M., Thatoi, H.N., 2013. Heavy metal contamination, physico-chemical and microbial evaluation of water samples collected from chromite mine environment of Sukinda, India. Trans. Nonferrous Met. Soc. China 23, 484–493. doi:10.1016/S1003-6326(13)62489-9
- Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. TrAC Trends Anal. Chem. 22, 340–351.
- Duwig, C., Archundia, D., Lehembre, F., Spadini, L., Morel, M.C., Uzu, G., Chincheros, J., Cortez, R., Martins, J.M.F., 2014. Impacts of Anthropogenic Activities on the Contamination of a Sub Watershed of Lake Titicaca. Are Antibiotics a Concern in the Bolivian Altiplano? Procedia Earth Planet. Sci. 10, 370–375. doi:10.1016/j.proeps.2014.08.062
- Eurin, J., Ollivon, D., Tiphagne, K., Chevreuil, M., n.d. Contamination des eaux superficielles par les substances pharmaceutiques: Diffusion d'antibiotiques par la médecine humaine et les activités d'élevage.

- Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D.A., 2015. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. Sci. Total Environ. 505, 905–926. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.10.021
- FAO, 2005. FAO, Land and Water Digital Media Series n5; Soil and Terrain Database for Latin America and the Carribean - 1:5 Million scale.
- Feijtel, T., Boeije, G., Matthies, M., Young, A., Morris, G., Gandolfi, C., Hansen, B., Fox, K., Holt, M., Koch, V., others, 1997. Development of a geography-referenced regional exposure assessment tool for European rivers-GREAT-ER contribution to GREAT-ER# 1. Chemosphere 34, 2351–2373.
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, D.G., 2009. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. Environ. Toxicol. Chem. 28, 2522–2527.
- Forsberg, K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O.A., Dantas, G., 2012. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. Science 337, 1107–1111. doi:10.1126/science.1220761
- Fram, M.S., Belitz, K., 2011. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. Sci. Total Environ. 409, 3409–3417. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.05.053
- Frey, S.K., Topp, E., Khan, I.U.H., Ball, B.R., Edwards, M., Gottschall, N., Sunohara, M., Lapen, D.R., 2015. Quantitative Campylobacter spp., antibiotic resistance genes, and veterinary antibiotics in surface and ground water following manure application: Influence of tile drainage control. Sci. Total Environ. 532, 138–153. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.114
- García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2011. Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro river basinRemoval in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. Environ. Int. 37, 462–473. doi:10.1016/j.envint.2010.11.011
- García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, S., Barceló, D., 2013. Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1275, 32–40. doi:10.1016/j.chroma.2012.12.004
- García-Galán, M.J., Silvia Díaz-Cruz, M., Barceló, D., 2008. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. TrAC Trends Anal. Chem. 27, 1008–1022.
- Gibs, J., Heckathorn, H.A., Meyer, M.T., Klapinski, F.R., Alebus, M., Lippincott, R.L., 2013. Occurrence and partitioning of antibiotic compounds found in the water column and bottom sediments from a stream receiving two wastewater treatment plant effluents in Northern New Jersey, 2008. Sci. Total Environ. 458-460, 107–116. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.076
- Giger, W., Alder, W.A.C., Golet, E.M., Kholer, H.-P.E., McArdell, C.S., Molner, E., Siegrist, H., Suter, M.J.-F., 2003. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewater, sewage sludges, and surface waters. Chimia 57, 485–491.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. Sci. Total Environ. 225, 109–118.
- Hoa, P.T.P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D.H., Viet, P.H., Suzuki, S., 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. Sci. Total Environ. 409, 2894–2901. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.030
- Hsu, J.-T., Chen, C.-Y., Young, C.-W., Chao, W.-L., Li, M.-H., Liu, Y.-H., Lin, C.-M., Ying, C., 2014. Prevalence of sulfonamide-resistant bacteria, resistance genes and integron-associated horizontal gene transfer in natural water bodies and soils adjacent to a swine feedlot in northern Taiwan. J. Hazard. Mater. 277, 34–43. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.02.016
- Hu, X., Zhou, Q., Luo, Y., 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. Environ. Pollut. 158, 2992–2998.
- Infante, B., Grape, M., Larsson, M., Kristiansson, C., Pallecchi, L., Rossolini, G.M., Kronvall, G., 2005. Acquired sulphonamide resistance genes in faecal Escherichia coli from healthy children in Bolivia and Peru. Int. J. Antimicrob. Agents 25, 308–312. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.12.004
- Karcı, A., Balcıoğlu, I.A., 2009. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. Sci. Total Environ. 407, 4652–4664. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.04.047
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecol. Indic. 8, 1–13.
- Kim, K.R., Owens, G., Kwon, S.I., So, K.H., Lee, D.B., Ok, Y.S., 2011. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. Water. Air. Soil Pollut. 214, 163–174.

- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere 75, 417–434. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.086
- Lindberg, R.H., Björklund, K., Rendahl, P., Johansson, M.I., Tysklind, M., Andersson, B.A.V., 2007. Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. Water Res. 41, 613–619.
- Lindsey, M.E., Meyer, M., Thurman, E.M., 2001. Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Anal. Chem. 73, 4640–4646. doi:10.1021/ac010514w
- Lin, M.-F., Lin, Y.-Y., Tu, C.-C., Lan, C.-Y., 2015. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii and their correlation with antimicrobial resistance. J. Microbiol. Immunol. Infect. doi:10.1016/j.jmii.2015.04.004
- López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Petrović, M., Barceló, D., 2013. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. Environ. Pollut. 174, 305–315. doi:10.1016/j.envpol.2012.11.022
- Luo, N., Pereira, S., Sahin, O., Lin, J., Huang, S., Michel, L., Zhang, Q., 2005. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant Campylobacter jejuni in the absence of antibiotic selection pressure. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 541–546.
- Maia, A.S., Ribeiro, A.R., Amorim, C.L., Barreiro, J.C., Cass, Q.B., Castro, P.M.L., Tiritan, M.E., 2014. Degradation of fluoroquinolone antibiotics and identification of metabolites/transformation products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1333, 87–98. doi:10.1016/j.chroma.2014.01.069
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O., 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. Environ. Pollut. 148, 570–579.
- Meersche, T.V. den, Pamel, E.V., Poucke, C.V., Herman, L., Heyndrickx, M., Rasschaert, G., Daeseleire, E., 2015. Development, validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous detection and quantification of five different classes of veterinary antibiotics in swine manure. J. Chromatogr. A. doi:10.1016/j.chroma.2015.12.046
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. Water Res. 47, 957–995. doi:10.1016/j.watres.2012.11.027
- Michael, I., Vasquez, M.I., Hapeshi, E., Haddad, T., Baginska, E., Kümmerer, K., Fatta-Kassinos, D., 2014. Metabolites and Transformation Products of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment as Contaminants of Emerging Concern, in: Lambropoulou, D.A., Nollet, L.M.L. (Eds.), Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, United Kingdom, pp. 413–458.
- Mojica, E.-R., Aga, D., 2011. Antibiotics Pollution in Soil and Water: Potential Ecological and Human Health Issues. Elsevier.
- Montes, R.M., 2012. El mercado de los productos farmacéuticos en Bolivia.
- Morel, M.-C., Spadini, L., Brimo, K., Martins, J.M.F., 2014. Speciation study in the sulfamethoxazole–copper–pH–soil system: Implications for retention prediction. Sci. Total Environ. 481, 266–273. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.040
- N. Gottschall, E. Topp, C. Metcalfe, M. Edwards, M. Payne, S. Kleywegt, P. Russell, D.R. Lapen, 2012. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. Chemosphere 87, 194–203.
- Nödler, K., Licha, T., Barbieri, M., Pérez, S., 2012. Evidence for the microbially mediated abiotic formation of reversible and non-reversible sulfamethoxazole transformation products during denitrification. Water Res. 46, 2131–2139. doi:10.1016/j.watres.2012.01.028
- Peng, X., Ou, W., Wang, C., Wang, Z., Huang, Q., Jin, J., Tan, J., 2014. Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal landfills in China. Sci. Total Environ. 490, 889–898. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.068
- Ribera Arismendi, M.A., 2010. La Bahía de Cohana. Actualización 2009-2010. –La Paz: Serie de estudios de caso sobre problemáticas socio ambientales en Bolivia No 1. LIDEMA. 78p.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, I., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. Sci. Total Environ. 447, 345–360. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.032
- Rodas, C., Mamani, R., Blanco, J., Blanco, J.E., Wiklund, G., Svennerholm, A.-M., Sjöling, \AAsa, Iniguez, V., 2011. Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. Braz. J. Infect. Dis. 15, 132–137.

- Salvarredy-Aranguren, M.M., Probst, A., Roulet, M., Isaure, M.-P., 2008. Contamination of surface waters by mining wastes in the Milluni Valley (Cordillera Real, Bolivia): Mineralogical and hydrological influences. Appl. Geochem. 23, 1299–1324. doi:10.1016/j.apgeochem.2007.11.019
- Schindler, B.D., Kaatz, G.W., 2016. Multidrug Efflux Pumps of Gram-Positive Bacteria. Drug Resist. Updat. doi:10.1016/j.drup.2016.04.003
- Schlüsener, M.P., Bester, K., 2006. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. Environ. Pollut. 143, 565–571.
- Segura, P.A., Takada, H., Correa, J.A., El Saadi, K., Koike, T., Onwona-Agyeman, S., Ofosu-Anim, J., Sabi, E.B., Wasonga, O.V., Mghalu, J.M., dos Santos, A.M., Newman, B., Weerts, S., Yargeau, V., 2015. Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: Impact of income inequality between countries. Environ. Int. 80, 89–97. doi:10.1016/j.envint.2015.04.001
- Shimizu, A., Takada, H., Koike, T., Takeshita, A., Saha, M., Rinawati, Nakada, N., Murata, A., Suzuki, T., Suzuki, S., Chiem, N.H., Tuyen, B.C., Viet, P.H., Siringan, M.A., Kwan, C., Zakaria, M.P., Reungsang, A., 2013. Ubiquitous occurrence of sulfonamides in tropical Asian waters. Sci. Total Environ. 452-453, 108–115. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.027
- Smajgl, A., Ward, J., 2013. The Water-Food-Energy Nexus in the Mekong Region: Assessing Development Strategies Considering Cross-Sectoral and Transboundary Ilpacts, Springer. ed. CSIRO Ecosystem Sciences, Townsville, QLD, Australia.
- Solliec, M., Roy-Lachapelle, A., Gasser, M.-O., Coté, C., Généreux, M., Sauvé, S., 2016. Fractionation and analysis of veterinary antibiotics and their related degradation products in agricultural soils and drainage waters following swine manure amendment. Sci. Total Environ. 543, 524–535. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.061
- Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., Yu, G., 2015. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. Emerg. Contam. 1, 14–24. doi:10.1016/j.emcon.2015.07.001
- Tamtam, F., Almayrac, J.-L., LeBot, B., Mercier, F., Bredeloux, M., Desportes, A., Eurin, J., Chevreuil, M., 2008. Les antibiotiques dans les eaux de surface : première évaluation de la contamination de la Seine et de rejets de stations d'épuration.
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Tuc Dinh, Q., Clément, M., Chevreuil, M., 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. Sci. Total Environ. 393, 84–95. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.12.009
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Res. 32, 3245–3260.
- Turiel, E., Martín-Esteban, A., Tadeo, J.L., 2006. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. Anal. Chim. Acta 562, 30–35.
- Underwood J.C, Harvey R.W, Metge D.W, Repert D.A, Baumgartner L.K, Smith R.L, Roane T.M, Barber L.B, 2011. Effects of the antimicrobial sulfamethoxazole on groundwater bacterial enrichment. Environ. Sci. Technol. 45, 3096–3101.
- Vree, T.B., van der Ven, A.J.M., Verwey-van Wissen, C.P.W.G.., van Ewijk-Beneken Kolmer, E.W., Swolfs, A.E.M., van Galen, P.M., Amatdjais-Groenen, H., 1994. Isolation, identification and determination of sulfamethoxazole and its known metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B, 658, 327–340.
- Vulliet, E., Cren-Olivé, C., 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. Environ. Pollut. 159, 2929–2934. doi:10.1016/j.envpol.2011.04.033
- Walters, E., McClellan, K., Halden, R.U., 2010. Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids–soil mixtures in outdoor mesocosms. Water Res. 44, 6011–6020.
- WHO, 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance.
- Wright, M.S., Peltier, G.L., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006. Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams: Co-selection for tolerance to metals and antibiotics. FEMS Microbiol. Ecol. 58, 293–302. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00154.x
- Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., Meng, W., 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. Chemosphere 119, 1379–1385.
- Zhang, H., Zhou, Y., Huang, Y., Wu, L., Liu, X., Luo, Y., 2016. Residues and risks of veterinary antibiotics in protected vegetable soils following application of different manures. Chemosphere 152, 229–237. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.111
- Zhang, Q., Sahin, O., McDermott, P.F., Payot, S., 2006. Fitness of antimicrobial-resistant Campylobacter and Salmonella. Microbes Infect. 8, 1972–1978. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.031

- Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M., Fanelli, R., 2010. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. J. Hazard. Mater. 179, 1042–1048. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.03.110

2.4 Conclusion

Dans ce chapitre, l'objectif principal était d'évaluer l'état de pollution du BV en termes de molécules antibiotiques et autres possiblement complexantes comme les éléments trace métalliques.

Ces résultats montrent que la qualité des eaux de surface du site d'étude est fortement dégradée avec des concentrations en nutriments, éléments trace métalliques et concentrations bactériologiques hors norme. Des composés antibiotiques (Sulfamethoxazole et Thrimethroprime) se trouvent également disséminés dans la majorité du réseau hydrographique (à l'exception de l'amont du bassin dans le cours d'eau Seke) mais aussi dans le compartiment souterrain et les sols du BV. Des produits de transformation du SMX se trouvent aussi présents dans les eaux de surface. Ces produits n'ont pas été observés dans le compartiment souterrain, probablement en raison d'une re-transformation en SMX, le composé parent, ou a une mobilité plus faible. La présence de ces composés antibiotiques est accompagnée de la présence de résistance bactérienne, principalement dans le réseau hydrographique, ceci même dans les zones non contaminées par les composés antibiotiques. La présence des gènes de résistance dans les sols est cependant limitée à l'aval de la zone urbaine, dans les zones irriguées par les eaux usées.

Le contexte hydrodynamique fortement contrasté du réseau hydrographique influe fortement sur les concentrations des polluants détectés. De manière générale, une remobilisation des éléments trace métalliques et des antibiotiques a lieu pendant la saison des pluies ce qui se traduit par une augmentation des concentrations dans le réseau hydrographique.

Les résultats ont mis en évidence que la ville de El Alto est la principale source de pollution en nutriments (en particulier phosphate), éléments trace métalliques et composés antibiotiques. La zone minière n'a pas une grande incidence sur la qualité des eaux en aval dû à l'effet tampon naturel des eaux (rééquilibrage du pH entrainant la précipitation d'éléments trace métalliques). En ce qui concerne les composés antibiotiques, la zone urbaine est bien la source principale, cependant l'existence d'autres sources de pollution reliées aux centres urbains mineurs (localités rurales) et possiblement aux activités d'élevage a aussi été mis en évidence. Nos résultats indiquent que la présence de gènes de résistance n'est pas toujours liée à la présence des composés antibiotiques. Tel est le cas des observations faites sur les sols à la source du cours d'eau Seke (amont du BV). La présence de gênes de résistance en amont du BV pourrait être due à la présence d'animaux traités aux antibiotiques et à une présence humaine sporadique, ou plus plausiblement à des mécanismes de co-résistance entre métaux

et antibiotiques. Dans le cas des sols plus en aval dans le BV, la présence des résistances bactérienne est plutôt liée aux rejets d'eaux usées.

Les risques auxquels est exposée la population du BV sont donc divers et importants notamment en tenant compte que la source principale d'eau potable du BV (eaux souterraines) est polluée, et que la population rurale est amenée à utiliser des eaux de surface polluées comme source d'eau potable (principalement dans la baie de Cohana) et qu'elle peut être en contact direct avec bactéries résistantes au SMX.

CHAPITRE IV. Etude du devenir du Sulfamethoxazole (SMX) et des impacts sur les communautés bactériennes.

Introduction

Dans le Chapitre III il a été démontré que le rejet des eaux usées est la source principale de pollution des eaux de surface et souterraines ainsi que des sols du BV. Cela se traduit par un état d'eutrophisation avancé des eaux de surface ainsi que par la présence d'éléments trace métalliques et d'antibiotiques (ainsi que des leurs produits de dégradation) dans les trois compartiments étudiés. La présence de résistance bactérienne aux antibiotiques dans les eaux de surface et les sols a aussi été montrée.

Dans ce chapitre IV je m'intéresse à l'étude des processus affectant le devenir des composés antibiotiques dans le BV avec le SMX comme composé modèle ainsi qu'aux impacts de cette pollution sur les communautés bactériennes du sol.

Le devenir des molécules dans l'environnement étant dépendant d'une variété de processus tels que la mobilité, la sorption et les dégradations abiotiques et biotiques, j'ai étudié ces processus séparément par la réalisation des différentes expériences de laboratoire et sur le terrain.

La réalisation de ces expériences a nécessité la validation d'une méthode d'analyse par HPLC-UV. Ces résultats sont montrés dans la première partie de ce Chapitre.

Dans un premier lieu il a été étudié le transfert réactif du composé modèle par la mise en place des expériences de sorption en batch (Article 3) et de mobilité en colonnes de sol (Article 4). Dans un deuxième temps les processus de dégradation abiotiques par la réalisation d'une expérience de photodégradation sur le terrain (Partie 3.1 du présent Chapitre) ont été étudiés. Finalement, le processus de dégradation biotique ainsi que les impacts sur les communautés microbiennes ont été évalués par la réalisation des essais en microcosme en laboratoire (Article 5).

1. Validation méthode HPLC-UV.

Le tableau 2 montre les réponses instrumentales obtenues par niveau de concentration et pour chaque série.

Niveau de Concentration	Série (date)	Valeur de référence (mg L-1)	Réponses instrumentales (aire)		
			1	**2**	**3**
1	16/07/2013	0.01	0.20	0.12	0.13
	23/11/2013		0.08	0.40	0.40
	25/11/2013		4.34	4.52	4.35
	28/11/2013		0.46	0.64	0.51
2	16/07/2013	0.5	8.00	7.87	7.92
	23/11/2013		28.68	28.55	28.55
	25/11/2013		21.68	22.59	21.73
	28/11/2013		19.32	19.03	19.07
3	16/07/2013	5	75.23	77.17	72.79
	23/11/2013		196.41	183.37	183.37
	25/11/2013		181.40	181.29	182.22
	28/11/2013		pas analysé	pas analysé	pas analysé
4	16/07/2013	10	146.62	146.83	151.32
	23/11/2013		373.69	380.84	365.93
	25/11/2013		355.81	353.71	359.90
	28/11/2013		386.41	380.69	381.37
5	16/07/2013	15	219.93	220.25	226.98
	23/11/2013		531.03	534.96	529.88
	25/11/2013		517.14	517.38	553.45
	28/11/2013		579.61	571.03	572.06
6	16/07/2013	25	369.93	360.25	366.98
	23/11/2013		886.82	893.39	884.91
	25/11/2013		853.29	853.67	913.20
	28/11/2013		962.16	947.91	949.61

Tableau 3 Réponses instrumentales (en triplicata : 1, 2 et 3) obtenues par niveau de concentration et série (analyse des mêmes solutions standards a 4 dates différentes).

Les coefficients du modèle d'étalonnage pour chaque série se trouvent consignés dans le tableau 4 pour chaque série d'étalonnage.

Série étalonnage	**o.o**	**P**
16/07/2013	14.645	1.148
23/11/2013	35.079	12.159
25/11/2013	34.836	5.0545
28/11/2013	38.158	0.4421

Tableau 4 Coefficients du modèle d'étalonnage pour chaque série. o.o : ordonnée à l' origine de la droite d'étalonnage. P : pente de la droite d'étalonnage

Les concentrations retrouvées pour chaque niveau de concentration ont été calculées à partir de ces coefficients et les réponses instrumentales du tableau 3 par prédiction inverse en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage:

$$Z = \frac{Y - a_0}{a_1}$$ ……Equation 1

oùY est la réponse instrumentale, a_0 est l'ordonnée à l'origine et a_1 est la pente du modèle d'étalonnage.

Le profil d'exactitude a été alors tracé à partir des différentes statistiques calculées pour les concentrations retrouvées (voir Feinberg, (2010)) aux différents niveaux de concentration étudiés (figure 24). Le profil d'exactitude indique que la méthode est validée par rapport aux exigences pour l'ensemble du domaine de validité (0,5 mg L^{-1} à 25 mg L^{-1}), parce que les limites de tolérance ne dépassent pas les limites d'acceptation. La méthode n'est pas acceptable pour des niveaux de concentration inferieurs à 0,5 mg L^{-1} puisque les valeurs obtenus pour le niveau de concentration 1 (0,01 mg L^{-1}) ne sont pas justes et se trouvent en dehors du domaine d'acceptabilité. Le graphique sur la figure 24 fournit d'autres indications. En particulier, il apparaît que la justesse varie avec la concentration, elle est d'environ 95.47% pour la concentration 0,5 mg L^{-1} et elle est supérieure à 99.77% pour les concentrations supérieurs à 5 mg L^{-1}. Ainsi pour l'analyse du SMX, la méthode s'est avérée être capable de fournir des résultats acceptables à ±10% et justes pour des concentrations entre 0.5 et 25 mg L^{-1}.

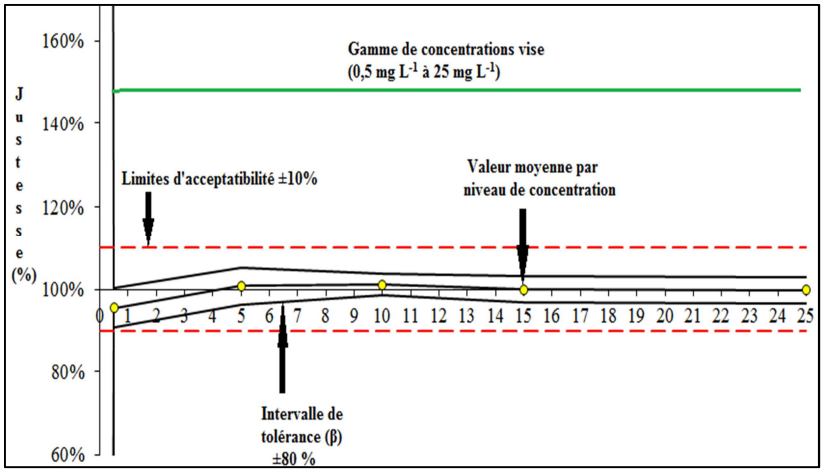


Figure 24 Profil d'exactitude pour la validation de la methode HPLC-UV.

2. Transfert réactif

2.1 Etude de la sorption du SMX dans les sols du BV.

2.1.1 Etude préliminaire pour la réalisation des isothermes de sorption.

La optimisation du ratio sol/solution et la cinétique de sorption ont été effectués sur deux sols du BV ayant des taux de MO contrastés : sol A :14.2% et sol B : 0.8%.

Optimisation du ratio sol/solution:

Selon les recommandations de la OECD (2000), ils est préférable de choisir des rapports sol/solution avec des Aeq% (pourcentage adsorbé à l'équilibre) supérieurs à 20% ou si possible supérieurs à 50%, mais il faut que les concentrations en solution soient détectables.

La figure 25 montre les Aeq% obtenus, on observe que pour le sol A les Aeq% varient entre 25 et 85%. Tous les rapports testés restent donc acceptables et avec des C_{aq}^{ads} (eq) détectables. Pour le sol B on observe que les Aeq% pour les rapports testés sont inférieurs à 20%. Ces différences sont en lien avec les différentes taux de MO de ces sols, ainsi pour la suite, les sols avec un pourcentage de MO >1% seront étudiés avec un rapport sol/solution 1/10 et les sols avec un pourcentage de MO < 1% seront étudiés avec un rapport sol/solution 1/1. Ce rapport n'a pas été testé ici mais il permettra d'augmenter le Aeq% pour se rapprocher de 20%.

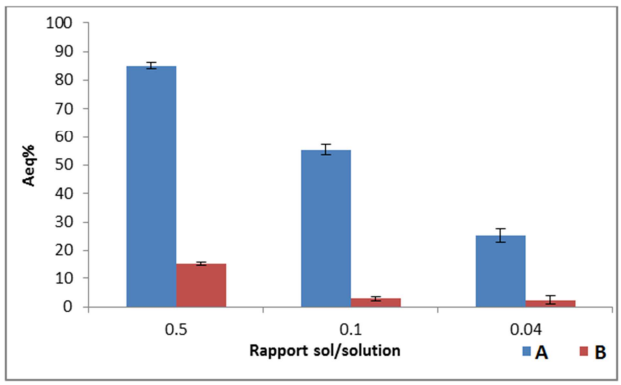


Figure 25 Pourcentage adsorbé à l'équilibre (Aeq%) en fonction du rapport sol/solution sur deux sols avec taux de MO contrastés.

Cinétiques de sorption :

Cette partie de l'étude mesure la cinétique de sorption du SMX étudié sur les mêmes deux sols ayant des taux de MO contrastés et avec les ratios sol/solution déterminées antérieurement. La concentration testée est de 25 mg L^{-1}. Les expériences ont été réalisées en triplicata, ici les valeurs moyennes sont présentées. Sur la Figure 26 on observe le pourcentage d'adsorption obtenue à chaque pas de temps. L'étude à montre que pour le sol A la sorption est rapide pendant les premiers 4 heures et pour le sol B pendant les premiers 6 heures. Ce qui est en accord avec Srinivasan et al (2014), qui ont observé que les différentes sulfonamides testées (Sulfamethoxazole, sulfachloropyridiazine et sulfamethazine) ont une sorption rapide pendant les premiers 5 heures.

Pour les deux sols on distingue un plateau où la concentration adsorbée n'augmente plus significativement ce qui correspond au temps d'équilibre. Pour le sol A, les concentrations

entre le temps 48h et 72h varient de 0.01, variation quasiment nulle. Le sol B montre une variation plus importante de 1.19 entre ces deux temps, mais la figure montre bien un aplatissement de la courbe et on considère que cette variation est négligeable. Des concentrations similaires après la phase d'adsorption rapide initiale (4h pour le sol A et 6h pour le sol B) suggèrent qu'il n'y a pas d'influence d'un processus de dégradation ou un phénomène de désorption dans les 72h de l'expérience. De ces deux faits, pour la suite des expériences, le temps d'équilibre a été fixe à 48h pour tous les sols.

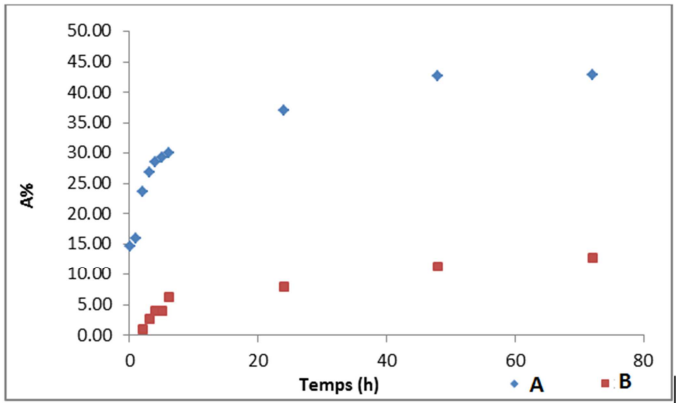


Figure 26 Pourcentage adsorbé (A%) en fonction du temps sur deux sols avec taux de matière organique contrasté

2.1.2 Article 3 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats.

Nous avons vu dans la synthèse bibliographique de cette thèse que l'adsorption a une influence prépondérante sur le devenir des polluants organiques et, en particulier, sur leur mobilité, car elle contribue à la détermination de sa répartition dans les phases du milieu (principalement entre les phases solides et liquide). On a pu constater aussi que l'adsorption des molécules organiques comme le SMX dépend principalement de ces propriétés moléculaires et des propriétés de l'adsorbant (sol). Plusieurs mécanismes d'interaction entrent en jeu dans la sorption de ce composé, par exemple, des échanges ioniques, des interactions polaires, des transferts de charge et des interactions hydrophobes.

Dans le Chapitre III il a été démontré que les sols du BV sont potentiellement exposés à une pollution par antibiotiques, principalement lors des saisons des pluies par inondation avec des eaux charges en antibiotiques ou par l'apport de fumiers d'animaux traités aux antibiotiques.

Les sols du BV étant de nature variée (pH, présence de métaux, teneurs en MO, minéralogie) et avec la finalité d'étudier sa sorption au niveau du BV, je me suis intéressée dans ce chapitre à l'étude de 10 sols localisées tout au long du site d'étude dans des points stratégiques (tête du BV, zone urbaine, zone agricole, bordure du lac Titicaca). Cette étude nous a permis d'obtenir

des données pertinentes sur sa sorption à l'échelle du BV pour mieux appréhender le devenir de cette molécule en termes de persistance et de mobilité.

Les résultats ont montré la présence des divers mécanismes jouant sur la sorption du composé dans les sols étudiés. En relation principalement avec la spéciation pH-dépendante du SMX, les caractéristiques physicochimiques des sols mais aussi avec la présence d'une multi-contamination. Les interactions hydrophobes, la sorption sur la matière organique et les échanges ioniques sont les principaux processus impliqués. Au niveau du BV on observe une sorption plus élevée dans les sols de la partie haute du BV et une sorption moins élevée dans les sols de la partie basse principalement liée à la spéciation du SMX et au taux de matière organique des sols. La sorption plus élevée du SMX en amont du BV a des conséquences sur les populations et les communautés microbiennes du sol, et en aval du BV, le SMX étant plus mobile, les risques de dissémination et de pollution des eaux souterraines sont plus élevés.

2.1.3 Characterization of sulfamethoxazole sorption in 10 soils of the Katari basin (Lake Titicaca, Bolivia) for evaluating antibiotic reactive transfer at the catchment scale.

Denisse Archundia[a] Marie-Christine Morel [a,b], , Celine Duwig[a,c], Lorenzo Spadini[a], Jean Martins[a,d]

[a] *Université Grenoble Alpes, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[b] *Le Conservatoire National des Arts et Métiers, Laboratoire d'Analyse chimique et Bioanalyse, departement Maqim, Pole SITI, 292 rue Saint Martin, 75141 Paris cedex 03, FRANCE*
[c] *IRD, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[d] *CNRS, LTHE, F38000 Grenoble, France*

* Corresponding author : marie-christine.morel@univ-grenoble-alpes.fr

To be submitted

Key words : *Sorption isotherms, sulfamethoxazole, contamination, Bolivian Altiplano, environmental risk, Kd, Retardation factor.*

Abstract

Antibiotics are poorly degraded in waste water treatment plants and can reach the environment almost unmetabolized through land application of waste water, sewage sludge or animal wastes. Sulfonamides (SA) are of particular interest because of their very important use by populations and also because of their important mobility in soils. Knowledge about antibiotics sorption in soils is necessary to efficiently predict the environmental risk associated with antibiotics dissemination in terrestrial ecosystems. The objective of this study was to determine the sorption kinetics and isotherms of sulfamethoxazole (SMX), in ten soils representative of the main areas of a high altitudinal catchment. SMX sorption isotherms revealed to be linear in all soils and highly variable. Sorption distribution coefficients (Kd) ranged between 0.28 and 19.5 L kg-1. SMX sorption was strongly controlled by soil organic matter in studied soils. Nevertheless, in soils with low organic matter different mechanisms such as electrostatic interactions or ion exchange involving less reactive ionized SMX species will occur.

1. Introduction

Lake Titicaca is the largest freshwater reservoir of the Andean plateau and the highest commercially navigable lake in the world (World Water Development, 2003). Located in a semi-arid, high-altitude area, its ecological balance is fragile. The area includes many iconic sites classified as RAMSAR. This rich ecosystem and its inhabitants are being exposed to pollutants released by rapidly growing urban areas and by mining, industrial and farming activities distributed in the whole Katari catchment (2022 km^2), The city of El Alto, the largest city of the Altiplano, with a rapidly growing population (Mazurek, 2012), also contributes to the global basin contamination, especially because of the limited water treatment capacities of the city (M.M.A.y.A., 2010; Chudnoff, 2006). The Katari basin empties into the Cohana bay in Titicaca's smaller Lake (Huiñamarca lake).

The first studies on the catchment (Katari) exiting at Cohana Bay (Duwig et al., 2014, Archundia et al., 2016) revealed important concentrations of organic and inorganic pollutants as well as the presence of pharmaceutical compounds in surface waters. In particular, antibiotics (AB) belonging to the sulfonamide class (SA) were found in high concentrations in the Katari surface waters and soils. These AB are widely used in human and veterinary medicine (Sarmah et al., 2006; Sukul et al., 2008). With exception of fish farming, it is widely recognized that AB dissemination in ecosystems is largely due to the release of non-metabolized residues from AB-treated humans and animals (Mojica and Aga, 2011). The risk of selective proliferation of resistant bacteria including pathogenic bacteria has been demonstrated (Reinthaler et al., 2003; Bergeron et al., 2015; Lu et al., 2015; (Nazaret and Aminov, 2015). This may cause environmental toxicity leading to public health problems such as the reduced availability of drinking water and/or impact animal productivity (Collins, 2001; Jørgensen and Halling-Sørensen, 2000). Antibiotic use is not subject to regulation in Bolivia, and antibiotics are used in large quantities with little regard for treatment duration, particularly in the rainy season when high rates of diarrhea are observed in children. Besides this important and unregulated use of AB, and despite the development of innovating treatment techniques (Orias and Perrodin, 2013; Xu et al., 2015; Gobel et al., 2007 ; Mackuľak et al., 2015; Ahmed et al., 2015; Kim et al., 2011), some of these AB (especially Sulfonamides) are poorly degraded in waste water treatment plants and can reach the environment almost unmetabolized through land application of waste water, sewage sludge or animal wastes (Kemper, 2008; Michael et al., 2013; Mojica and Aga, 2011). The main consequence is an important exposition of populations to AB molecules, thus leading to the development of microbial antibiotic resistances in humans and animals through resistance

genes transfer. For instance, (Bartoloni et al., 2002) detected *E. coli* bacteria resistant to Sulfamethoxazole (SMX) in young children in both Bolivia and Peru. Such situations have also been described in other developing countries (Lapworth et al., 2012; Li, 2014; Nguyen Dang Giang et al., 2015) and in industrialized countries (PETIT and Teysserie, 2013; Tamtam et al., 2008). This indicates that most of urbanized environments could be contaminated by pharmaceuticals products and especially by antibiotic molecules. Antibiotics are one of the major groups of emerging contaminants and have been widely detected in terrestrial and aquatic ecosystems. Among them, Sulfonamides (SA) are of particular interest because of their very important use by populations and also because of their important mobility in soils, in relation with their specific physical chemical properties. Depending on soil pH, the physicochemical properties of SA molecules can vary (hydrophobicity, complexation, solubility…) and they can be neutral, or hold positive or negative charges, which may strongly influence their sorption level in soils. For example, Gondim (2014) demonstrated that the AB Sulfamethoxazole (SMX), which is one of the most often detected SA in municipal sewage treatment plant effluents and in surface waters (Batt et al., 2006; Gibs et al., 2013; Karthikeyan and Meyer, 2006) can sorb variably to similar soils varying only in their pH (between 4 and 7). This is explained by the two pKa values of this molecule. AB ionization allows these molecules to interact with charged soil constituents such as cations (e.g. copper), which can significantly enhance their sorption to soil through the formation of highly reactive ternary complexes (Morel et al., 2014). Hou et al., (2010) observed that SMX sorption can happen on both organic and inorganic soil mineral fractions. All these specificities make AB molecules very complex in terms of reactivity with soil constituents and render the prediction of their behavior and fate very difficult, especially at the catchment scale. Indeed, as shown by Boxall et al., (2002); Figueroa-Diva et al., (2010) or Chen et al., (2014) AB sorption, and consequently of AB reactive transfer, is controlled by various and complex mechanisms, such as cation exchange, complexation processes, electrostatic interactions (clay minerals), hydrophobic interactions with organic matter (Tolls, 2001). The knowledge of the mechanisms governing antibiotic sorption in soils is thus necessary to efficiently predict the environmental risk associated with antibiotics dissemination in terrestrial and aquatic ecosystems.

In this context, the objective of this study was to determine the sorption kinetics and isotherms of sulfamethoxazole (SMX), a model sulfonamide AB, in ten soils representative of the main areas of the Katari catchment (mines, natural sites, agricultural sites, urban area, water treatment plant, shore of Lake Titicaca) in order to determine the key parameters

influencing the persistence of these compounds in the catchment. Since soil properties vary greatly along the Katari catchment (in pH, metals and organic matter contents), the behavior of sulfonamides and their dissemination in a catchment is thus expected to vary strongly among the different soils. The results were discussed in the light of basin pedology and soils characteristics and used to produce AB reactive transfer predictions at the basin scale.

2. Material and methods.

2.1 Soils

Ten soils were collected (0–10 cm) at various strategic points (Figure 1) along the Katari catchment from the altitudes of 3828 to 4708m a.s.l. At each location, composite soil samples were taken at the superficial layer (0-15 cm) by taking with a spatula about the same amount of soils at 5 different points at a distance of 5 m in the same plot. Once in the laboratory, samples were air-dried and passed through a 2-mm sieve.

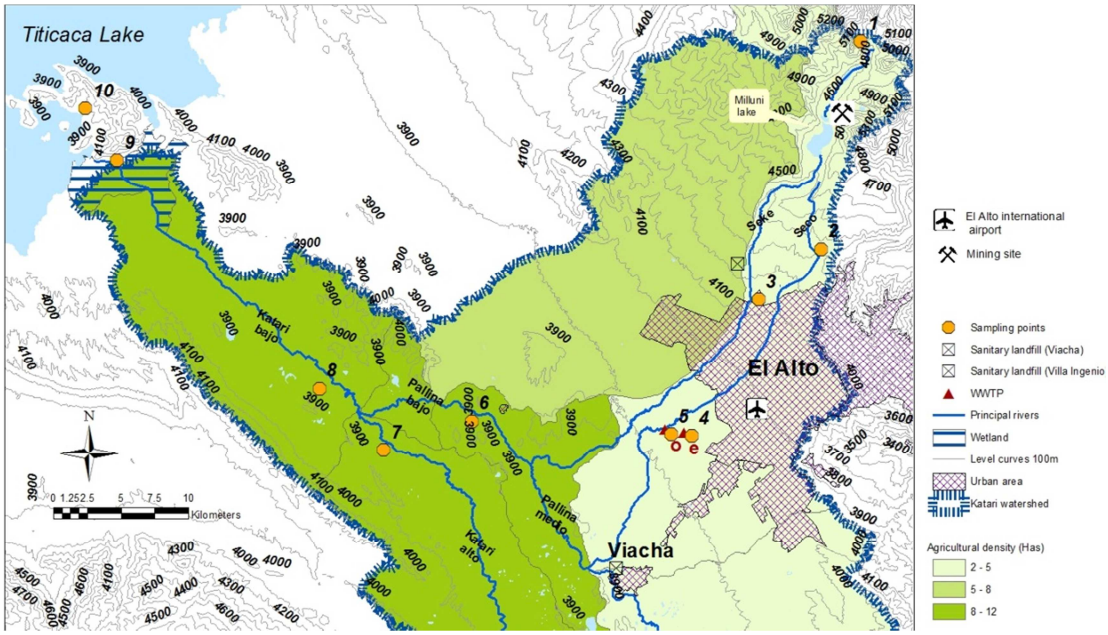


Figure 1. *Location of the studied soils.*

Soils are representing the diverse anthropogenic influences observed in the watershed, as well as the main pedological zones and soil usages of the catchment: an area with no human activity (soil 1), an area downstream of metal mining sites (soils 2 and 3), upstream (soil 4) and downstream (soil 5) the water treatment plant of El Alto city, at the exit of El Alto city (soil 6) in an agricultural area close to the Pallina River which receive contaminated waters from El Alto and Viacha cities and at the edge of Katari Alto river (soil 7) with no urban

influence in the agricultural area of the Katari basin, after the confluence of Katari and Pallina rivers (soil 8), and on the shore of Lake Titicaca in grazing areas (soils 9 and 10) .

2.2 Chemicals.

Sulfamethoxazole (98%) was purchased from LKT Laboratories, Inc. The ultrapure water employed was produced by the Elga purification system (PURELAB, Option-Q). Methanol (MeOH) and Acetonitril (ACN) were obtained from ROTH (ROTISOLV® HPLC Ultra Gradient Grade). Calcium chloride (CaCl2), potassium bromide (KBr) and Formic acid (CH2O2; reagent grade ≥95%) were obtained from Sigma-AldrichThe stock solution of SMX (1g L^{-1}) was prepared by dissolution in MeOH (HPLC grade) and was stored at 4°C in an amber glass vial in the dark. This solution was used to carry out the calibration and batch sorption experiments. The analysis of SMX in aqueous solutions was conducted with an HPLC system (Gilson) coupled to a UV detector and a fluorescence detector (FLD, Waters).

2.3 Chemical analysis.

SMX concentrations were determined by HPLC-UV (Spectra 100 UV system, Thermo Separation Products) equipped with a C-18 column (EC NUCLEOSIL 125/3 100-5 C18, 5 µm). The detection wavelength was 269 nm and the temperature was maintained at 40 °C. The mobile phase used was composed of ACN (15%), MeOH (15%), ultra pure water (70%) and formic acid (0.02%) with a fixed flow rate of 0.5 ml/min^{-1}. Each analysis lasted 10 min.and was performed with an injection volume of 20µL and three injections per sample. Quantification was carried out by external calibration and surface measurement of the peaks. The detection limit (DL) was 0.1 mg L^{-1} and the quantification limit (QL) was 0.5 mg L^{-1}. The analysis technique was validated with the accuracy profile approach (Feinberg and Laurentie, 2010).

2.4 Batch sorption studies.

Sorption tests were adapted from the methodology proposed by the OECD (OECD, 2000). All experiments were conducted in triplicate in the laboratory at ambient temperature (23°C), directly in glass tubes suitable for suspensions centrifugation. The soil batches were composed of a known mass of dry soil pre-equilibrated in $CaCl_2$ 10^{-2} mol L^{-1} and then suspended in a known volume of standard SMX solution prepared by cristals dissolution in MeOH (HPLC grade) and stored at 4°C in an amber glass vial in the dark until use.

At the end of each sorption experiment soil suspensions were centrifuged for 15 min. at 3500 rpm. 2ml of supernatants were collected, filtered (Chromafil Xtra PVDF) and immediately analysed by HPLC as described above.

Optimization of the soil/solution ratio

Optimizing the soil/solution ratio used in sorption experiments permits to increase analytical accuracy and results precision. Since it is generally accepted that organic matter (OM) plays a dominant role in organics sorption to soils (Calvet, 1989; Díaz-Cruz et al., 2003; Mermoud et al. 2008; Kim et al., 2011; Srinivasan and Sarmah, 2014; Srinivasan et al., 2014), the two soils with the greatest difference in OC content were chosen to optimize the soil/solution ratio to be used in the sorption kinetics and isotherm study. The selected soils were soils 4 (10.3%) and 10 (1.37%). Three soil/solution ratios were tested in triplicate (1:2, 1:10 and 1:25). For soil 4, SMX adsorption rate varied between 25% and 85% depending on the soil/solution ratio used. In soil 10, SMX sorption rate was always lower than 20%, whatever the tested ratio. Therefore to optimize the sorption results quality, the soil/solution ratio was set to 1:10 for soils with an OC content hihger than 1% and to 1:1 for soils with low OC contents in order to have between 20 and 50 % of AB sorption.

Sorption kinetics

Sorption equilibrium time was investigated through a sorption kinetic study. After agitation with $CaCl_2$ 10^{-2} mol L^{-1}, SMX solution (25 mg L^{-1}) was added to soil batches and then incubated at 23°C under agitation in the dark. The global duration of the experiment was set to 48 hours, which is short enough to prevent biodegradation as shown by Archundia et al. (2016-d in Prep). Soil suspension samples were collected at time 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 and 48h and SMX concentration in solution was quantified by HPLC (data not shown). A duration of 48h was found sufficient to reach sorption equilibrium and short enough to prevent biodegradation, in agreement with various other studies (e.g. Martins and Mermoud 1998, Mermoud et al. 2008).

Sorption isotherms

Sorption isotherms were determined using the procedure described above and using seven different SMX concentrations: 0, 12, 25, 76, 126, 190 and 253 mg L^{-1}. At the end of each experiment (48h incubation in the dark under agitation), glass assay tubes were centrifuged for 15 min. at 3500 rpm. 2ml of supernatants were collected, filtered (Chromafil Xtra PVDF) and immediately analyzed. Controls containing the same amount of soil in contact with CaCl2 solution were also included in the analysis.

Sorption modelling

Sorption isotherms were modelled with the linear model presented in Eq. 1 (e.g. Mermoud et al. 2008, Milfont et al. 2008) :

$$C_s = Kd\, C_e \quad (1)$$

where C_s (mg kg^{-1}) and Ce (mg L^{-1}) are equilibrium SMX concentrations in the solid and aqueous phases, respectively. Kd (L kg^{-1}) is a distribution coefficient of pollutant distribution amopng the solid and liquid phases.

In cases where sorption to oranic matter largely dominates the sorption processes, a normalized sorption coefficient can be used for describing chemical reactivity with soils (Eq. 2):

$$Koc = Kd/foc \quad (2)$$

where Koc (L g^{-1}) is a partitionning coefficient of the considered pollutant between water and soil organic matter. f_{oc} is the organic carbon fraction of soils (g kg^{-1}). Koc is often used to predict the reactivity of organic pollutants that dominantly sorb to organic constituents of soils (Martins and Mermoud 1998).

2.5 Estimation of SMX reactive transfer in the soils of the Bolivian Altiplano

In order to evaluate the potential mobility of SMX in the ten soils and at the scale of the Katari catchment, a retardation factor, R, was calculated for each soil using Eq. 5. Retardation factor calculation assumes that pollutant sorption isotherm is linear and can be quantified through a soil-solution distribution coefficient, Kd, which is the solpe of the sorption isotherm (Eq. 1).

$$R_f = 1 + K_d\left(\frac{\rho_b}{\theta}\right) \quad (3)$$

where ρ_b is the field soil bulk density (g cm^{-3}) and θ (cm^3 cm^{-3}) the volumetric water content corresponding to the field water holding capacity. For bulk density, a metal cylinder of 140.3 cm^3 volume was carefully inserted at the soil surface to determine the bulk density by oven-drying the collected soil at 105°C during 24h. The water holding capacity was estimated by means of continuous water content monitoring with Decagon probes (5TM) (Duwig, personal communication).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Soil characteristics and contamination levels

The 10 model soils were chosen to represent the main pedological zones and soil uses of the catchment. The main properties of the 10 soils are given in Table 1.

Soils 1, 2, 3, 4 and 5 correspond to Cambisol Eutric soils and have high OC contents (1.45 to 10.3%). The soils collected close to Lake Titicaca (soils 9 and 10) are sandy soils and have intermediate OC contents (1.37 to 1.8%). Soil nitrogen content varies between 0.03 and 1.18%. The highest value is observed in soil 4, which is regularly irrigated with wastewaters from the treatment plant (during 2 months before sampling). Soils iron oxides contents vary between 0.65 (soil 10) and 2.06 (soil 1). CEC values vary between 4 $cmol^{+}\ kg^{-1}$ (soil 8) and 23 (soil 4). These values were found well correlated with soils OC contents (data not shown). Soils pH are highly variable within the watershed, with values below 6 for soils 1, 2, 3, and 4, values around 6 and 7 for soils 5 and 6, and values over 8 for soils 7, 8, 9, and 10. SMX concentrations measured in the 10 soils are presented in Table 1. No SMX was detected in soils 1, 2, 3 and 7, which are non-urbanized areas. In the other soils, SMX concentrations varied between 200 and 1800 ng Kg^{-1}. These values are in agreement with the work by Duwig et al., (2014) and Archundia et al. (in prep.) who evidenced generalized AB (SA and trimethoprim) contamination of the surface waters of the watershed, and especially in the areas close to the cities and to the undersized wastewater treatment plant of El Alto city, in relation with the direct release of insufficiently treated wastewaters to surface waters or with illegal use of wastewater for irrigation.

***Table** 1Physico-chemical characteristics of the soils studied from Archundia et al, 2016*

Soil	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.36	5.26	4.64	5.55	6.78	6.74	8.27	8.54	8.3	8.43
CO (%)	8.22	7.29	3.57	10.3	1.45	0.89	0.37	0.5	1.81	1.37
N (%)	0.61	0.57	0.27	1.18	0.15	0.09	0.03	0.04	0.2	0.13
Fe oxydes (%)	2.06	0.69	1.78	1.39	1.14	1.1	1.1	0.98	1.96	0.65
Sand (%)	21.5	37.7	62.4	10.7	43.8	47.6	45.8	66.9	42.3	60.2
Silt (%)	49	43.9	26.4	57.4	41.3	38.8	44.3	22.6	38.3	26.1
Clay (%)	29.5	18.4	11.2	31.9	14.9	13.6	9.9	10.5	19.4	13.7
CEC ($cmol^{+}\ kg^{-1}$)	19	18.9	8.32	22.9	9.44	6.84	5.12	4.29	10.5	7.47
ρ_b ($g\ cm^{-3}$)	1.08	1.08	1.21	1.26	1.26	1.29	1.29	1.29	1.33	1.4
θ ($m^3\ m^{-3}$)	0.56	0.56	0.38	0.35	0.35	0.24	0.24	0.24	0.34	0.34
*SMX in soil ($ng\ kg^{-1}$)	< LD	N.a	< LD	1800 0	640	*500*	< LD	500	*200*	800

ρ_b is the field bulk density. θ is the field water holding capacity. * : Detection Limit (LD) = 100 ng L^{-1} ; Quantification Limit (QL) = 700 ng kg^{-1} for soil 6 and 400 ng kg^{-1} for soil 9. Italic values are below QL. NA : non analyzed

Soil 4 is the most contaminated of the studied soils (18000 ng kg^{-1}), probably because this soil is constantly receiving wastewater from the El Alto wastewater treatment plant. Soil 5 was irrigated during 2 months before sampling with untreated wastewater and presents consequently an important SMX concentration (640 ng kg^{-1}). Soil 6 SMX contamination (500 ng SMX kg^{-1}) is due to irrigation with water from Pallina River, which receives all wastewater from El Alto and Viacha cities. Soil 8 contamination (500 ng SMX kg^{-1}) can be explained by river overflow along with the use of AB treated livestock manure. This is probably the same reason that explains SMX contamination in soils 9 and 10 at the shores of Lake Titicaca (presence of AB treated livestock) and accumulation of SMX transported by surface waters and frequent overflow of soils. These results show that besides surface waters contamination by the AB SMX (Duwig et al., 2014) soils close to cities or to wastewater treatment plants are also strongly contaminated with this AB.

3.2 SMX sorption isotherms

SMX sorption isotherms (Figure 2) were determined in all soils after 48h of SMX-soil contact, which is sufficient to achieve sorption equilibrium (data not shown). Figure 2 shows that SMX sorption isotherms can be well fitted with a linear model (all $r^2 > 0.86$). Table 2 presents the sorption parameters which best fit the data.

Figure 2: *SMX sorption isotherms measured in the ten soils of the Bolivian Altiplano. Solid lines correspond to linear fittings with Eq. 1. Measurements were done in triplicates (average values are presented).*

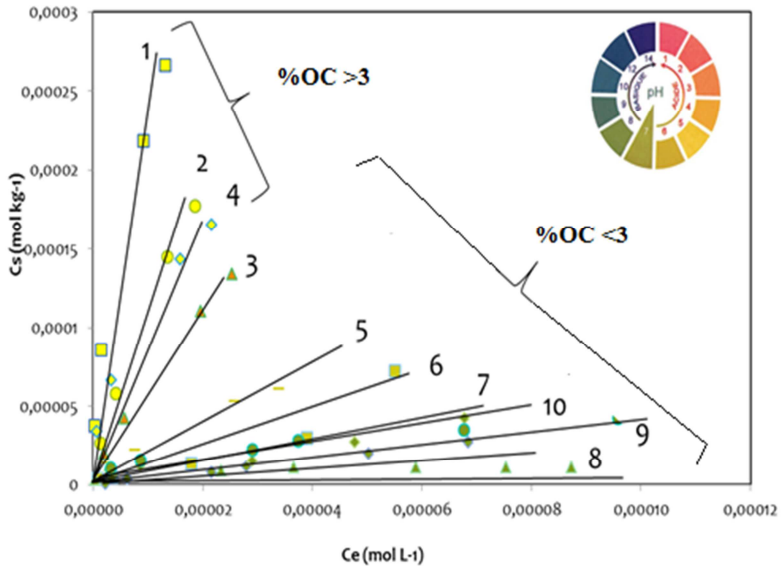


Figure 2 shows that SMX sorption varies strongly among the ten studied soils, with Kd values varying from 0.28 to 19.5 L kg^{-1}. As expected the soils presenting the highest OC content

(soils 1, 2, 3 and 4) are the more reactive and strongly sorb SMX. Soils 7 and 8, which present the lowest OC contents, present low SMX Kd values (0.4 and 0.28 L kg^{-1}) indicating poor affinity of these soils to SMX. Intermediate sorption isotherms were observed in soils 3, 5 and 6, which present intermediate OC contents (between 0.9 and 3.57%). Surprisingly soils 9 and 10, which present also intermediate OC contents (1.81 and 1.37%) poorly react with SMX as the corresponding Kd values are 0.71 and 0.5 L kg^{-1}, respectively. The ten SMX sorption isotherms determined in the ten studied soils can be divided in 2 groups below and above OC contents of 3%. The ten soils were linearly numbered following the slope of the catchment with Soil 1 collected at 4708m a.s.l. and soil 10 collected at 3828 m (close to Lake Titicaca). This suggests that soils reactivity to SMX follows more or less the altitude gradient, as it is quite well correlated with the organic matter content of the soils. Indeed Kd values rapidly decrease in soils 1 to 7 in relation with decreasing OC content (decreasing from 8.22 to 0.37%). Some deviation from this global behavior are however observed such as with soils 4 and 10, probably in relation with their specific physicochemical and organic carbon properties: soil 4 receives important amounts of wastewater and presents consequently important amounts of highly reactive nitrogen compounds and iron oxides as well as a very high CEC that should also contribute to SMX retention, even if the specific mechanisms are probably different from hydrophobic interactions. For soil 10 the situation is different and the enhanced SMX sorption in this soil probably relates to its high ionic strength as it is very close to Lake Titicaca and is almost always flooded with Lake water. Ionic strength is known to favor chemical sorption to soil constituents, especially for ionized molecules, by decreasing electrostatic forces, which normally limit anions sorption to negatively charges constituents.

Table 2: *Fitting parameters for SMX sorption isotherms in the 10 studied soils obtained with the linear model (Eq. 1).*

Soil	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
$K_{d\ (L\ kg^{-1})}$	19.5	10.31	5.02	7.66	1.43	0.78	0.4	0.28	0.71	0.5
Log K_{oc} [#]	3.38	3.15	3.15	2.87	2.99	2.94	3.03	2.75	2.59	2.56
r^2	0.94	0.98	0.99	0.94	0.90	0.95	0.99	0.87	0.93	0.85
R* (-)	38.6	20.9	17.0	28.6	6.1	5.2	3.2	2.5	3.8	3.1

[#] Koc was calculated by dividing Kd values by soil OC content (g Kg^{-1}) for each soil (Table 1).

* R is the Retardation factor which was calculated with Eq. 2 calculated with field bulk density and water holding capacity from Table 1.

The good correlation observed between SMX sorption and soil OC content is quite common for organic pollutants such as pesticides (e.g. Mermoud et al. 2008) and has been also suggested for AB molecules (e.g. Hou et al. 2010). Figure 3a confirms this effect as a quite

good correlation was observed (r^2 = 0.67) between Kd values and soils OC content. Similarly, SMX sorption is also well correlated with the CEC (r^2 = 0.61) of soils (Figure 3b). This was expected as CEC is known to be mostly controlled by soils OM and clay contents.

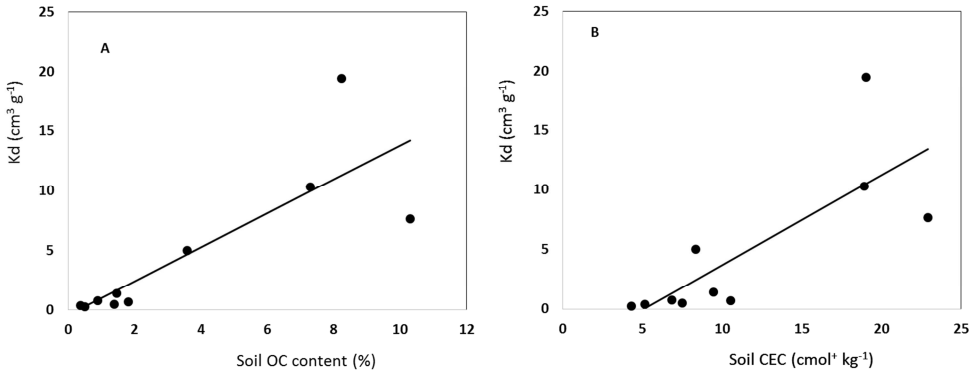


Figure 3 : *Relationships between the SMX sorption coefficient, Kd, and soil organic carbon content (A) or soil CEC (B).*

These results suggest that soil organic matter is the main SMX sorbent. This was verified by calculating a Koc value for each soil (Eq. 2). Log Koc values presented in Table 2 are very similar in all soils and close to 3 +/- 0.3, which is higher than the values (1.5 to 1.8) found by Srinivasan et al., (2010) onto dairy farm soils.

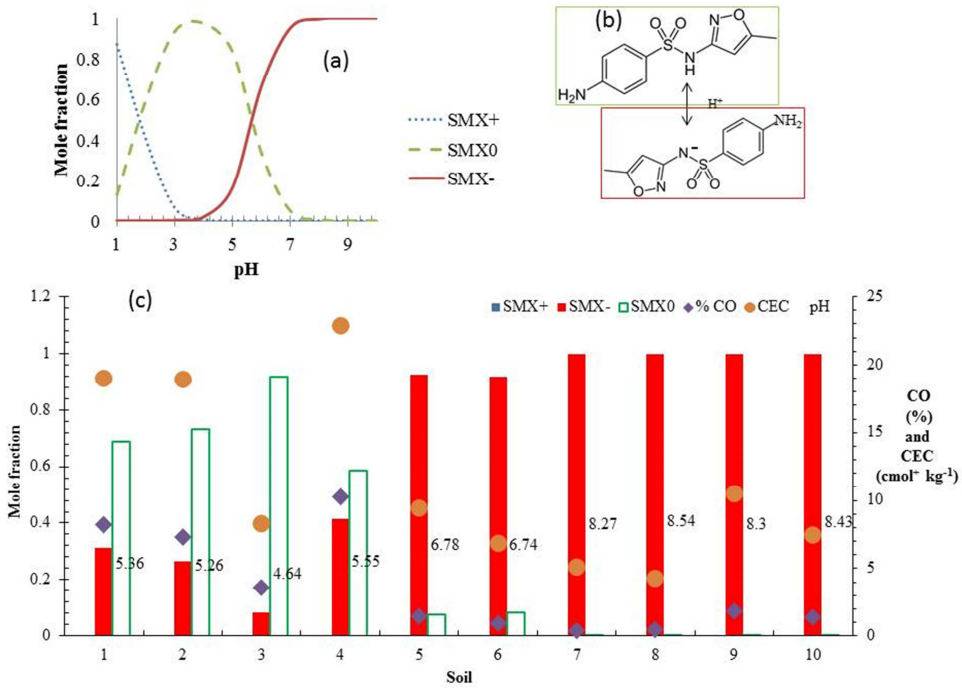


Figure 4 : *(a) Evolution of Sulfamethoxazole (SMX) speciation with soil pH. (b) Visualization of the protonation site on SMX molecule. (c) Calculation of SMX speciation in the ten studied soils and comparison with soil CEC and OC content. SMX mole fractions were calculated with the PhreeqC code.*

Furthermore soils 4 and 10 present extreme pH values (5.55 and 8.43) probably explaining their enhanced reactivity. Indeed, since SMX presents 2 pKa values, the speciation of this AB molecule varies with pH as can be shown in Figure 3a. At soil pH close to 5 important amounts of neutral SMX protonated molecules are present (Figure 3b) in soil solution and are more likely to sorb to soil constituents since this species is not affected by electrostatic repulsion, contrarily to the ionized SMX species.

Figure4c show the evolution of SMX mole fractions (protonated and deprotonated in the ten different soils as calculated with the PhreeqC code (Parkhurst, 1995). Positively charged SMX is neither present in the ten soils. In soils 5 to 10, SMX is almost always in the negatively charged form. In soils 1 to 4 a mixture of neutral and ionized species is present, allowing SMX to sorb through different mechanisms (hydrophobic, electrostatic, cationic or specific) probably explaining the higher SMX sorption rate observed in these soils as they are simultaneously acidic, organic matter rich and present a high CEC.

3.4 Evaluation of SMX reactive transfer in the Katari catchment

The reactive transfer of SMX at the Katari catchment scale was evaluated through the calculation of retardation factors in each soils. The retardation factor, R, describes the ratio between the average linear velocities (cm s^{-1}) of moving water (v_w) and of the pollutant (v_{pol}) (Stumm, 1992). As such, it may be a good estimator of the risk associated with the dissemination of pollutants at large scale. Retardation factor values were calculated (Table 2) with Eq. 3 using the Kd values measured in all soils. These results show that in the soils of the upper part of the Katari basin (soils 1 to 3), retardation factors of SMX are as expected very high (ranging between 17 and 39), indicating a probably negligeable risk of SMX transfer from soil surface to groundwater. In the soils of the lower part of the basin, R values ranged between 2.5 and 5.2, indicative of potentially high mobility of SMX in these soils. hese results indicate that in the case of SMX presence at the surface of such soils, SMX may probably be able to be transferred down to groundwater within a few years. Of course this assumption must be modulated by SMX persistence in these soils, which will probably be the crucial factor controlling the environmenetal risk associated with SMX fate in the basin. The soils receiving wastewater, either constantly (soil 4) or regularly during the two last months before sampling (soil 5) showed retardation factors of 29 and 6 (respectively) directly related to their organic matter content originating from the wastewater, which is also the main source of SMX.

Upstream El Alto city no SMX was detected in soils, in agreement with the absence of anthropogenic activities in this area (no agriculture, no livestock and only limited mining operations) and so no AB source was identified. The part of the Katari watershed which is influenced by anthropogenic activities begins downstream soil 3, right above El Alto city. Watercourses passing through El Alto city frequently overflow in wet season and only part of wastewaters can bee treated, in relation with the huge increase in population over the last decades. Consequently, SMX sources are numerous and may explain the high SMX levels in the collected soils (200 to 1800 ng kg^{-1}). Sulfamethoxazole presents clearly a high risk of ground water contamination as evidenved by the wide contamination of soils and surface waters in the basin

Consequently, SMX sorption is strongly variable in the soils of the catchment as its reactivity depends on soil characteristics such as pH and their contents in highly reactive phases (OM, Clay, metal oxides…). In this context, the ten studied soils can be divided into two groups of variable reactivity to SMX according to their pH and OC content: *Group 1* is composed of soils 1, 2, 3, and 4 (SMX being detected in the field only in the latter), located in the upper part of the catchment and presenting acidic pH values (pH <6) and OC contents > 6%. *Group 2* is composed of soils 5, 6, 7, 8, 9 and 10 (SMX was detected in all of these field soils but soil 7 not submitted o urban influence), which are located close to El Alto city or in the lower part of the catchment (soils with neutral to alkaline pH and low OC contents) under strong anthropogenic influence (except soil 7). Very different SMX retardation factors were calculated for the soils of these two groups, indicating very different susceptibilities to AB contamination. High environmental risk related to SMX contamination can be expected in the catchment areas where important SMX sources (close to habitation and grazing areas and treatment plants) are associated with poorly reactive soils (sandy soils with low OC contents). In such areas ABs such as SMX are likely to be significantly mobile (poorly retained) and able to reach shallow aquifers.

4 CONCLUSIONS

In the present work, sorption of the AB sulfamethoxazole (SMX) to ten soils representative of the Katari catchment was studied in order to evaluate the catchment susceptibility to AB molecules. SMX sorption isotherms revealed to be linear in all soils and highly variable as shown by the calculated sorption distribution coefficients, Kd, which ranged between 0.28 and 19.5 L kg^{-1}. SMX sorption was shown to be strongly controlled by soil organic matter through dominant hydrophobic interactions as confirmed by similar SMX log Koc values

calculated in all soils (3 +/-0.3). In soils presenting low OC contents SMX sorption still occurs but at lower rates and through different mechanisms, in relation with electrostatic interactions or ion exchange involving less reactive ionized SMX species. Soils with low OC contents have also neutral to alkaline pH at which SMX is known to be more mobile.

Since chemical sorption controls mobility processes in soils, retention rates appear as good descriptors of the potential mobility of pollutants. This mobility can be evaluated through the determination of a global retardation factor in each soil. Based on the measured Kd distribution coefficients of SMX, retardation factors were calculated to evaluate the relative transfer velocity of this AB in the tested soils as compared to water velocity. These retardation factors were shown to vary widely (from 2.5 to 38.6) from the lower part of the basin (poorly reactive basic soils with high risk of aquifer contamination) to the upper part of the basin (highly reactive acidic soils with low SMX contamination risk). Altogether these results constitute a pioneer dataset on ABs retention in a large set of ten soils representing the pedologic diversity of the Bolivian Altiplano. This study contributes to show that SMX sorption hugely varies in the different catchment soils and behaves very similarly to other organic pollutants in the Katari basin (sorption processes are pH-dependant and dominantly controlled by soil organic matter) and that the environmental risk associated with the dissemination of this molecule should be evaluated with the same numerical tools as those applied for pesticides fate predictions. This study also suggests that this risk may be limited by both reducing SMX sources (control of population usage of ABs, improvement of wastewater treatments, better control of livestock treatment and grazing areas) and improving soils and water management.

Acknowledgment

This work has been supported by a grant from Labex OSUG@2020, ANR grant #ANR-10-LABX-56 (funded by the Future Investments program launched by the French government and implanted by the ANR). The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mexicano (CONACyT) and the French National program EC2CO CNRS-INSU for research funding.

References

- *Ahmed, M.B., Zhou, J.L., Ngo, H.H., Guo, W., 2015. Adsorptive removal of antibiotics from water and wastewater: Progress and challenges. Sci. Total Environ. 532, 112–126. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.130*
- *Bartoloni, A., Cutts, F., Leoni, S., Austin, C.C., Mantella, A., Guglielmetti, P., Roselli, M., Salazar, E., Paradisi, F., 2002. Patterns of antimicrobial use and antimicrobial resistance among healthy children in Bolivia. Trop. Med. Int. Health 3, 116–123.*
- *Batt, A.L., Bruce, I.B., Aga, D.S., 2006. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. Environ. Pollut. 142, 295–302. doi:10.1016/j.envpol.2005.10.010*

- *Bergeron, S., Boopathy, R., Nathaniel, R., Corbin, A., LaFleur, G., 2015. Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. Int. Biodeterior. Biodegrad. 102, 370 – 374. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.017*
- *Boxall, A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P., Tolls, J., 2002. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. Toxicol. Lett. 131, 19–28.*
- *Calvet, R., 1989. Adsorption of Organic Chemicals in Soils. Environ. Health Perspect. 83, 145–177.*
- *Chen, H., Gao, B., Li, H., 2014. Functionalization, pH, and ionic strength influenced sorption of sulfamethoxazole on graphene. J. Environ. Chem. Eng. 2, 310–315. doi:10.1016/j.jece.2013.12.021*
- *Chudnoff, S.M., 2006. A Water Quality Assessment of the Rio Katari River and its Principle Tributaries, Bolivia (B.S. Earth and Environmental Science (Geology Option)). The University of New Mexico.*
- *Collins, A.E., 2001. Health ecology, land degradation and development. Land Degrad. Dev. 12, 237–250. doi:10.1002/ldr.436*
- *Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. TrAC Trends Anal. Chem. 22, 340–351.*
- *Duwig, C., Archundia, D., Lehembre, F., Spadini, L., Morel, M.C., Uzu, G., Chincheros, J., Cortez, R., Martins, J.M.F., 2014. Impacts of Anthropogenic Activities on the Contamination of a Sub Watershed of Lake Titicaca. Are Antibiotics a Concern in the Bolivian Altiplano? Geochem. Earths Surf. GES-10 Paris Fr. 18-23 August 2014 10, 370–375. doi:10.1016/j.proeps.2014.08.062*
- *Figueroa-Diva, R.A., Vasudevan, D., MacKay, A.A., 2010. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. Chemosphere 79, 786–793. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.017*
- *Gibs, J., Heckathorn, H.A., Meyer, M.T., Klapinski, F.R., Alebus, M., Lippincott, R.L., 2013. Occurrence and partitioning of antibiotic compounds found in the water column and bottom sediments from a stream receiving two wastewater treatment plant effluents in Northern New Jersey, 2008. Sci. Total Environ. 458-460, 107–116. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.076*
- *Gobel, A., Mcardell, C., Joss, A., Siegrist, H., Giger, W., 2007. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. Sci. Total Environ. 372, 361–371. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.07.039*
- *Hou, J., Pan, B., Niu, X., Chen, J., Xing, B., 2010. Sulfamethoxazole sorption by sediment fractions in comparison to pyrene and bisphenol A. Environ. Pollut. 158, 2826–2832.*
- *Jørgensen, S.E., Halling-Sørensen, B., 2000. Drugs in the environment. Chemosphere 40, 691–699.*
- *Karthikeyan, K.G., Meyer, M.T., 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. Sci. Total Environ. 361, 196–207.*
- *Kim, K.R., Owens, G., Kwon, S.I., So, K.H., Lee, D.B., Ok, Y.S., 2011. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. Water. Air. Soil Pollut. 214, 163–174.*
- *Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. Environ. Pollut. 163, 287 – 303. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034*
- *Li, W.C., 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. Environ. Pollut. 187, 193 – 201. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015*
- *Lu, Z., Na, G., Gao, H., Wang, L., Bao, C., Yao, Z., 2015. Fate of sulfonamide resistance genes in estuary environment and effect of anthropogenic activities. Sci. Total Environ. 527–528, 429 – 438. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.101*
- *Mackuľak, T., Nagyová, K., Faberová, M., Grabic, R., Koba, O., Gál, M., Birošová, L., 2015. Utilization of Fenton-like reaction for antibiotics and resistant bacteria elimination in different parts of WWTP. Environ. Toxicol. Pharmacol. 40, 492–497. doi:10.1016/j.etap.2015.07.002*
- *Mazurek, H., 2012. Parcours de territoire : la géographie à l'épreuve des Andes.*
- *M.M.A.y.A., 2010. Plan Director de la Cuenca Katari.*
- *Mojica, E.-R., Aga, D., 2011. Antibiotics Pollution in Soil and Water: Potential Ecological and Human Health Issues. Elsevier.*

- *Morel, M.-C., Spadini, L., Brimo, K., Martins, J.M.F., 2014. Speciation study in the sulfamethoxazole–copper–pH–soil system: Implications for retention prediction. Sci. Total Environ. 481, 266–273. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.040*
- *Nazaret, S., Aminov, R., 2015. Role and prevalence of antibiosis and the related resistance genes in the environment, Frontiers Research Topic Ebook. Frontiers Media SA.*
- *Nguyen Dang Giang, C., Sebesvari, Z., Renaud, F., Rosendahl, I., Hoang Minh, Q., Amelung, W., 2015. Occurrence and Dissipation of the Antibiotics Sulfamethoxazole, Sulfadiazine, Trimethoprim, and Enrofloxacin in the Mekong Delta, Vietnam. PLoS ONE 10. doi:10.1371/journal.pone.0131855*
- *OECD, 2000. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 1. Physical-Chemical properties. Test No. 106: Adsorption-Desorption Using a Batch Equilibrium Method.*
- *Orias, F., Perrodin, Y., 2013. Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. Sci. Total Environ. 454–455, 250 – 276. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.064*
- *Parkhurst, D., 1995. User's Guide to PHREEQC—a Computer Program for Speciation, Reaction-Path, Advective-Transport, and Inverse Geochemical Calculations.*
- *PETIT, K., TEYSSEIRE, R., 2013. SYNTHESE TECHNIQUE.*
- *Reinthaler, F.., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckenbauer, G., Mascher, F., Marth, E., 2003. Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge. Water Res. 37, 1685–1690. doi:10.1016/S0043-1354(02)00569-9*
- *Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. Chemosphere 65, 725 – 759. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026*
- *Srinivasan, P., Sarmah, A.K., 2014. Assessing the sorption and leaching behaviour of three sulfonamides in pasture soils through batch and column studies. Sci. Total Environ. 493, 535–543. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.034*
- *Srinivasan, P., Sarmah, A.K., Manley-Harris, M., 2014. Sorption of selected veterinary antibiotics onto dairy farming soils of contrasting nature. Sci. Total Environ. 472, 695–703. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.104*
- *Srinivasan, P., Sarmah, A., Manley-Harris, M., Wilkins, A.L., 2010. Sorption of sulfamethoxazole, sulfachloropyridazine and sulfamethazine onto six New Zealand dairy farm soils. World Congr. Soil Sci.*
- *Sukul, P., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M., 2008. Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. Chemosphere 73, 1344 – 1350. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.066*
- *Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Tuc Dinh, Q., Clément, M., Chevreuil, M., 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. Sci. Total Environ. 393, 84–95. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.12.009*
- *Tolls, J., 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. Env. Sci Technol 3397–406.*
- *World Water Development, 2003. The 1st un world water development report: Water for People, Water for Life.*
- *Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., Meng, W., 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. Chemosphere 119, 1379 – 1385. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040*

2.2 Etude de la mobilité du SMX dans les sols du BV : implications sur les niveaux de pollution par antibiotiques.

2.2.1 Article 4 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats

Les études réalisées sur la mobilité des SA ont montré que cette famille d'antibiotiques a généralement un potentiel de mobilité élevé. Cependant sa mobilité peut varier en raison des caractéristiques du milieu récepteur, par exemple : le type de sol et ses propriétés de sorption. Ces études ont montré que les facteurs qui influent principalement sur leur mobilité sont le pH, le temps de contact, la capacité d'échange cationique et le taux de matière organique.

En ce qui concerne le SMX, les études réalisées sur sa sorption indiquent que sa spéciation dépendante du joue un rôle prépondérant sur sa mobilité.

Toutefois, les études sur la mobilité du SMX dans des sols naturels et particulièrement dans des sols sous climat aride de haute altitude sont rares. C'est pourquoi dans cette étude nous avons étudié la mobilité du SMX dans 10 sols du BV du Katari ayant différentes caractéristiques (pH, taux de MO, texture).

Un des principaux objectifs a été celui d'évaluer le risque de dissémination de cet antibiotique dans le site d'étude (dans les sols, vers les eaux de surface ou vers les eaux souterraines) ainsi que vers les écosystèmes environnants tels que le lac Titicaca.

L'étude menée dans le cadre de cette thèse sur la sorption du SMX a montré que sa sorption est bien decrite par le modele lineaire même si elle reste très variable a sein du site d'étude en lién avec sa sorption ph-dependante. Dans cette section sa mobilité a été étudiée à l'aide des modèles mécanistes CXTFIT et HYDRUS-1D.

Les résultats indiquent que le SMX peut être considéré comme une molécule avec une mobilité allant de modérée à élevée dans le contexte de l'Altiplano bolivien. Sa mobilité est plus faible dans les sols de la partie haute du BV et très élevée dans la partie basse du BV ce qui est en accord avec les observations sur sa sorption. Cependant les facteurs de retard observes ici sont inférieurs que ceux obtenus avec les observations en batch. Par conséquent, il peut potentiellement migrer à travers le BV en polluant ainsi les écosystèmes de surface mais aussi le compartiment souterrain.

2.2.2 Experiments and modelling approaches to investigate the mobility of Sulfamethoxazole in ten soils of a Lake Titicaca subcatchment (Bolivia)

D. Archundia[a], C. Duwig[a,b], M.P. Perez[d], V. Orsag[c], , L. Spadini, B. Prado[e], [,f]. MC Morel[a,g,] J.M.F. Martins[a]

[a] *Université Grenoble Alpes, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[b] *IRD, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[c] *Universidad Mayor de San Andrès, Facultad de Agronomia, La Paz, Bolivia*
[d] *Universidad Mayor de San Andrès, Instituto de Hidrologia y Hydraulica, La Paz, Bolivia*
[e] Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología, , México, D.F., México
[f] *CNRS, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[g] *CNAM, Laboratoire d'analyses chimiques et bio analyses, Paris Cedex 3, France*

Keywords*: Antibiotic, reactive transport, HYDRUS-1D, rate-limited sorption*

To be submitted

Abstract:
Soils can be exposed to antibiotics via multiple ways. SMX is one of antibiotics commonly detected aquatic and terrestrial environments and is supposed to be highly mobile in soils due to its inherent molecular properties. The knowledge about the transport of SMX in natural soils, and particularly in soils from the Altiplano or Puna region in the central Andes is still limited. We carry out repacked column studies in 10 soils from a subcatchment of Titicaca Lake to explore SMX mobility behavior and assess the risk of spreading in the context of the Bolivian Altiplano. Relevant sorption processes were identified by modeling (CXTFIT and HYDRUS-1D codes) considering different sorption concepts. SMX mobility behavior was best described by models considering irreversible sorption as well as rate-limited and/or instantaneous sorption sites (depending on soil type). Soils located upstream of the watershed (Regosol) showed a higher adsorption capacity than soils located downstream (Cambisol). Results suggest that SMX can be classified as a moderately to high mobile compound depending principally on pH and OC contents and that there are potential risks of surface and groundwater pollution.

1 Introduction

Antibiotics are nowadays consider as emergent contaminants and soils can be exposed to antibiotics via multiple ways such as the use of contaminated sewage sludge or animal manure on agricultural fields, irrigation with treated or untreated wastewaters, outflows of sewer drains and of sewage treatment plants and flooding with polluted surface waters (Mojica and Aga, 2011; Oppel et al., 2004).

Sulfamethoxazole (SMX) has been one of the most used antibiotics worldwide since the 60's for human and animal therapy (WHO, 2001b). It belongs to the sulfonamide (SA's) family and the excretion rate of SMX as parent compound varies between 50% and 100% (Mojica and Aga, 2011). SMX is commonly detected in waste and surface waters as well as in soils and manure (Alighardashi et al., 2008; Eurin et al., n.d.; Gibs et al., 2013; Giger et al., 2003; Hoa et al., 2011; Hu et al., 2010; Karthikeyan and Meyer, 2006; Kemper, 2008; Kim et al., 2011; Leung et al., 2012; Li et al., 2013; Martínez-Carballo et al., 2007; Michael et al., 2013; Mojica and Aga, 2011; Tamtam et al., 2008; Zuccato et al., 2010).

For example, Hu et al. (2010) observed SMX concentrations in manure varying between 0.2 and 5.7 mg kg^{-1} and in soils varying between 0.03 and 0.9 µg kg^{-1}. Batt et al. (2006) found

SMX concentrations at the outlet of three WWTPs in Erie County, New York ranging from 0.37 to 6 µg L^{-1} and at 20 m downstream varying from 0.056 to 0.2 µg L^{-1}.

Generally, SA's are weak acids with a good solubility in water and so low distribution coefficient (K_d) values. Distribution coefficients of sulfonamides in soils have been reported to fall in the range of 0.6 to 7.4 L kg^{-1} (Sarmah et al., 2006). Srinivasan et al. (2013) reported K_d values for SMX in New Zealand soils (clay-loam, silt, and silt-loam) ranging between 2 and 4 L kg^{-1} for soil pH between 4 and 8. Boxall et al (2002) observed K_d values of sulfachloropyridazine varying between 0.9 and 1.8 L kg^{-1} (in silty-clay soil and sandy-loam soil, respectively). So SA's are supposed to be highly mobile in soils (García-Galán et al., 2008) with the risk of leaching to groundwaters (Kümmerer, 2009; Mojica and Aga, 2011; Tamtam et al., 2008). Indeed, García-Galán et al., (2010) observed SMX concentrations ranging from 0.08 to 312.2 ng L^{-1} in two ground water bodies of Catalonia (Spain).

Mobility of SA's had been studied by some authors. Srinivasan and Sarmah (2014) observed that SA's were highly mobile with a mobility pattern similar to that of conservative Br^- tracer used, whereas, some retardation was observed and it was dependent on the soil type and its sorption properties. Kurwadkar et al. (2011) found that the mobility of SA's was dependent on pH, soil charge density, and contact time; the effect of pH was most pronounced in sandy loam soils. Moreover, some effect of clay content and corresponding charge density, may also have an impact on SA's mobility by contributing to cation-exchange sorption at lower pH (Kurwadkar et al., 2011). Sulfadiazine studied in column experiments by Wehrhan et al. (2007) exhibited a retardation factor of 2 to 5 compared to the conservative chloride tracer used. In addition of sorption process with soil organic matter (OM), dissolved organic matter (DOM) contents of the liquid phase can also affects antibiotics mobility. On one hand, DOM can increase the solute apparent solubility resulting on enhanced mobility. On the other hand, DOM can reduce its mobility due to co-sorption mechanisms on solid phase (Chefetz et al., 2008).

As SMX is an organic compound, its sorption and mobility will depend on its inherent chemical properties, as well as on soil properties and on the liquid phase characteristics. Moreover, for organic and charged compounds a variety of interaction mechanisms are possible as ionic exchanges, polar interactions, van der Waals interactions as well as hydrophobic interactions which can modify their sorption and mobility.

SMX is characterized by two acid dissociation constants (pKa1 and pKa2) so that the speciation of sulfonamides significantly affects their tendency to complex with soil surfaces, form complexes with metal ions, and undergo biodegradation or photolysis. Depending on

pH, SMX can be present in cationic, neutral or anionic form. At pH>>pKa1 it is likely to occur in neutral form or in anionic form, while at pH<<pKa1 it will be present in its cationic form. In cationic form, cationic exchange reactions are possible, for example, on exchange sites present on clay soils (Calvet, 1989; Díaz-Cruz et al., 2003; Kim et al., 2011; Srinivasan et Sarmah, 2014; Srinivasan et al., 2013; Srinivasan et al., 2014). On the other hand, sulfonamides in neutral form can be easily absorbed on soil organic matter (Kurwadkar et al., 2011). Tolls (2001) studied the mobility of sulfonamide antibiotics and concluded that these could be related with compound solubility and hydrophobicity. Kurwadkar et al. (2011) studied the mobility of sulfamethazine and sulfathiazole and had concluded that its mobility is mostly dependent on pH, soil charge density and contact time.

Nevertheless the existence of studies about the processes involved in the mobility of SA's, in natural soils is still limited, especially by using deterministic modelling approach. Fate of antibiotics in soils not only depends on chemical and microbiological reactions between the molecule and the soils, but also on the transfer characteristics. Therefore, here we performed repacked column studies in 10 different soils (with different characteristics) from the Bolivian Altiplano (Katari watershed), where this antibiotic was detected at a concentrations ranging from ~80 to ~15000 ng L^{-1} in surface waters (Duwig et al., 2014) and at concentrations ranging from 0 to ~18 µg kg^{-1} in soils (Archundia et al., submitted). The objective was to explore its mobility behavior and assess the risk of dissemination of this antibiotic in the studied area and to the surrounding ecosystems such as the Titicaca Lake and groundwater. Relevant sorption processes were identified by inverse modeling (CXTFIT and HYDRUS-1D codes) considering different sorption concepts.

2. Materials and methods

2.1. Theory of solute transport

The convection-dispersion equation (CDE) (Eq. (1)) is used to simulate solute transport

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\,\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - \frac{v\partial C}{\partial x} \ldots\ldots \text{Eq. (1)}$$

where t is time (min), x is soil depth (cm) , C is the solution concentration (mg L^{-1}) in the liquid phase, D is the dispersion coefficient (cm^2 min^{-1}) and v is the average pore water velocity (cm min^{-1})).

Interaction of dissolved substances with soil matrix involves different concepts such as the type of sorption isotherm (linear or non-linear), time-dependency (instantaneous or rate-limited) and reversibility of the sorption process (reversible or irreversible) (Wehrhan et al., 2007).

The simplest case describes substances with instantaneous and reversible sorption and is called the *one-site equilibrium sorption* model. The sorption is described by the Freundlich isotherm (Eq. (2)), the linear isotherm being a particular case (m = 1):

$$S=K_f C^m \ldots\ldots \text{Eq. (2)}$$

where K_f is the Freundlich distribution coefficient (L^m mg^{1-m} kg^{-1}, S_1 is the sorbed concentration (g kg^{-1}) and m (-) is the dimensionless Freundlich exponent.

In case of linear isotherm (m = 1), the distribution coefficient K_d (L kg^{-1}) is the ratio between the sorbed and the equilibrium solute concentration and the retardation factor R is given by:

$$R = 1 + \frac{\rho}{\theta} K_d$$

where, θ is the volumetric water content (cm^3 cm^{-3}) and ρ is the soil bulk density (g cm^{-3}).

A kinetic term may be introduced (Eq. (3)) when the equilibrium distribution of the solute between solid and liquid phases cannot be considered as instantaneous:

$$\frac{dS}{dt} = \propto \left(K_f \, C^m - S\right) \ldots\ldots \text{Eq. (3)}$$

Where, $\propto$ is the adsorption/desorption rate coefficient (min^{-1}).

For some substances sorption can occurs in both, instantaneous (S1) and rate-limited sorption sites (S2) (Cameron and Klute, 1977; Florido et al., 2010). The two-sites sorption is described by the following set of equations:

$$S = S_1 + S_2$$

$$S_1 = F \, K_f C^m$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \alpha_2 \left[(1 - F) K_f C^m - S2\right] \ldots\ldots \text{Eq. (5)} ,$$

where F represents the fraction of the sites available for instantaneous sorption (S1).

Moreover, irreversible sorption can be taken into account which is represented as a first-order kinetic sink of solute in the water phase (Wehrhan et al., 2007). This process is given by Eq. (6).

$$\frac{\partial S_3}{\partial t} = \frac{\theta}{\rho} \beta_3 C \ldots\ldots \text{Eq. (6)}$$

Where β_3 is the irreversible adsorption rate coefficient [min^{-1}] and S3 represents irreversible sorption.

The three-sites two-rates irreversible sorption model is given by the following expression

$$S=S_1+S_2+S_3\text{…..Eq. (7)}$$

2.2. Soils

2.2.1 Soils description and sampling

Soils description was conducted on April 2014 during the wet season, for that purpose soil profiles were opened at 10 locations along the four main rivers of the studied watershed (Seke, Seco, Pallina and Katari rivers) according to the methodology proposed in the Guidelines for Soil Description (FAO, 2006). They represent the variety of soil types and soil use in the catchment (Figure 1). Points 1 and 2 correspond to high altitude soils of non-urban influence in the Puna grassland ecosystem, at 4708 and 4291m altitude respectively. Point 3 corresponds to a soil of low-urban influence as it is located at the Northern outskirt of El Alto city. Point 4 and 5 were sampled in the vicinity of the waste water treatment plant (WWTP) Puchukollo (Point 4 was receiving permanently untreated wastewater, and point 5 was part of an agricultural trial and was receiving treated wastewater every week during the last 2 months). Point 6 was sampled in the lower Pallina river (Pallina bajo) in an cropped barley plot. Points 7 and 8 were sampled in the upstream and the lower Katari river (Katari alto and Katari bajo, respectively) also in barley plot, already cropped for 7 and still in for 8. Points 9 and 10 were sampled on the shores of Lake Titicaca, in cropped quinoa and potatoes plots respectively. Soils 6 to 10 correspond to agricultural soils. 9 and 10 are under the lake influence (partially flooded when lake level is high).

At each profile, soil samples were taken in each horizon in order to characterize the soil profile. At each location, composite soil samples were also taken at the superficial layer (0-15 cm) for the displacement experiments. Soils composites samples were sampled by taking with a spatula about the same amount of soils at 5 different points at a distance of 5 m in the same plot. In the laboratory, samples were air-dried and passed through a 2-mm sieve. The parameters were determined at IBTEN (Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnologia Nuclear). The soil texture was determined using the hydrometer method (Bouyoucos, 1936). The pH was measured in water (water/soil ratio of 1:1.25) with a pH meter. The organic carbon was determined following the Walkley and Black method (Walkley and Black, 1934). The

exchangeable bases and cation exchange capacity were determined following the Metson method.

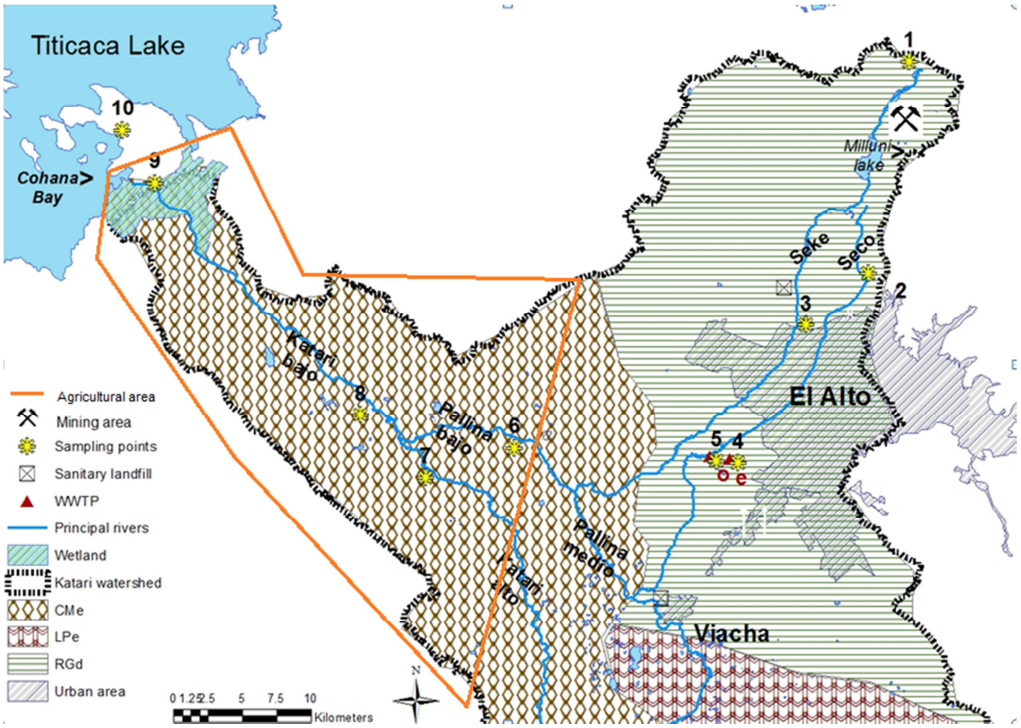


Figure 1. *Study site and sampling Points. e: refers to the entrance of the waste water treatment plant (WWTP) of Puchukollo. o: refers to the outlet of the WWTP. CMe (Eutric Cambisol), RGd (Distric Regosol) and LPe (Eutric Leptosol) refers to soil types (FAO, 1998).*

2.2.2 Soil chemical characteristics.

For the topsoil composite samples, chemical analyses were performed at the INRA Arras laboratory (France). ***Total nitrogen (N)*** was analyzed by dry combustion (norm NF ISO 13878). ***Organic carbon (OC)*** was determined by direct determination by dry combustion (norm NF ISO 10694). ***Cation exchange capacity (CEC)*** was determined by the Metson method (norm AFNOR **NF X 31-130**). For ***Iron oxydes (Feoxy)*** contents, an extraction was conducted by the Mehra and Jackson method and the determination of concentrations was conducted by ICP-AES. ***pH*** was measured by electrode at soil to water ratio of 1/5 (v/v) (norm NF ISO 10390)**.**

For ***Cu*** content extraction was performed based on the US EPA 3052 method by Microwave Assisted Extraction (MAE) as described in Archundia et al., (submitted). Quality assurance and control (QA/QC) of the analysis were performed with TIBET SEDIMENT (NIM GBW07323) certified reference material (CMR). Recovery for Cu was of 71.6%. Final suspensions were analyzed by ICP-AES with external calibration (LD: 1.2 µg L^{-1} and LQ: 3.7 µg L^{-1}).

2.2.3 Soil physical characteristics.

Texture analysis was carried out at the INRA Arras laboratory (France) with a 5 particle size fractions granulometer without further decarbonization (norm NF X 31-107). ***Mineralogy*** was determined at ISTERRE laboratory by X diffraction (Siemens D5000 et Bruker Axs D8).

For ***bulk density*** determination, a metal cylinder of 140.28 cm^3 volume was carefully inserted at the soil surface to determine the bulk density by oven-drying the collected soil at 105°C during 24h.

We used a tension disc-infiltrometer of 20 cm diameter set to subsequent tensions *h* of -10, -5, and -0.5 cm for *in situ* estimates of the ***hydraulic properties*** of the soil surface. Following the protocol in Müller et al., (2012), we determined the relationship between hydraulic conductivity and tensions by assuming that the flux (q, cm min^{-1}) under the disc was given by the Wooding's equation (Wooding, 1968) and that the hydraulic conductivity followed an exponential function with tension (Gardner, 1958):

$$K = K_{sat}e^{(\alpha h)} \quad (1)$$

where *Ksat* is the saturated conductivity (cm min^{-1}), h the pressure head (cm) and α a soil-dependent parameter (cm^{-1}). We derived the parameters *Ksat* and α by fitting a line through the data points (h, ln q).

2.3. Transport experiments

Methodology was adapted from the OECD guideline Leaching in Soil Columns (OECD, 2003). Transport studies were done only on the topsoil composite samples, under steady state at saturated conditions using bromide (Br^-) as nonreactive solute and SMX (Table 2) as reactive solute. Br^- inert tracer was used to estimate soil hydrodynamic transport parameters. Experiments were done at constant ionic strength and at soil pH.

Table 2. *Physicochemical properties of Sulfamethoxazole (SMX) antibiotic.*

Molecular formula	Molar weight ($g\ mol^{-1}$)	Water solubility ($g\ L^{-1}$)	pKa_1	pKa_2	Log K_{ow}	Henry's Law constant (m^3mol^{-1})
$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253.27764	0.5	1.8 (Lin et al., 1997)	5.57 (Lin et al., 1997)	0.89	6.42e−13 (Kimura et al., 2004)

SMX belongs to the sulphonamide family it has been worldwide use since 60's for the treatment of human and animal diseases (Table 2). In the environment, sulfonamides are

present in the neutral (non-charged) and anionic (deprotonated) form, the latter being most abundant at higher pH values (>6). There are studies showing that sulfonamides may persist for long periods in soil (Schauss et al., 2009).

Table 3. *Columns experimental conditions.*

Soil	Duplicate	Length (cm)	θ (cm^3 cm^{-3})	ρ (g cm^{-3})	Br- Pulse (VP)	SMX Pulse (VP)
1	A	10.3	0.47	0.83	0.53	0.87
	B	10.5	0.6	0.83	0.61	1.22
2	A	10	0.51	1.1	0.68	0.99
	B	10	0.53	1.1	0.46	0.92
3	A	10.3	0.6	0.91	0.60	0.98
	B	10.5	0.64	0.89	0.60	1.46
4	A	11	0.53	0.8	0.39	1.00
	B	11	0.56	0.87	0.41	0.82
5	A	10	0.49	1.28	0.47	0.94
	B	10	0.53	1.28	0.45	0.90
6	A	10	0.64	1.19	0.46	0.98
	B	10	0.75	1.2	0.40	0.80
7	A	9.5	0.48	1.23	0.51	1.02
	B	9.5	0.52	1.25	0.46	0.91
8	A	9	0.5	1.31	0.49	1.20
	B	9	0.43	1.32	0.53	1.06
9	A	10	0.5	1.23	0.50	0.92
	B	10.5	0.49	1.24	0.46	0.84
10	A	10.5	0.5	1.38	0.50	0.99
	B	10.8	0.46	1.35	0.49	0.98

The flux was set to ~0.3 ml min^{-1} for all columns. ρ refers to soil bulk density (experimentally determined). θ refers to the volumetric water content (experimentally determined). Pulse refers to the quantity of injected solution (Br- or SMX) as fraction of one pore volume (VP).

Displacement experiments were performed in duplicate for each soil. Columns (diameter, 2.6 cm) were packed to a depth of 10 cm at a bulk density closed to field ones. At the bottom of the column a peristaltic pump pushed the solutes that were injected from the bottom to the top of the column. The flux was set-up around 0.3 cm^3 min^{-1} and was fixed after the measurement of field saturated hydraulic conductivities. At the output of the column, the leachates were sampled with an automatic fraction sampler (FC203B fraction collector, Gilson). At the beginning, about two pore volumes (PV) of 0.01M$CaCl_2$ solution were leached through the column using a peristaltic pump to reach a steady-state flow rate and equilibrium in the soil solution electrical conductivity. When steady state was reached, the column was weighted to be able to calculate the volumetric water content at steady state by knowing the empty weight of the column and the initial soil water content. Br^- inert tracer, was first applied at a

concentration of 0.01M during approximately 0.5 PV and leached through by 2.5 PV with the 0.01M$CaCl_2$ solution. SMX stock solution (1 g L^{-1}) was prepared previously in methanol and was then diluted in 0.01M$CaCl_2$ solution to obtain a final concentration of 0.25 mg L^{-1}. One PV of 0.25 mg L^{-1} SMX solution was applied and leached through by several PV (3 to 10) of 0.01M$CaCl_2$ solution depending on the soil types and previous retardation factor obtained through batch experiments (Archundia et al., in preparation).

Fractions of the leachate were collected at different time steps depending on soil. Although the flow rate was regulated by the peristaltic pump, it was additionally controlled by weighing the solution loss from the input reservoir per unit time as well as the leached volume in the single fraction. The leachate samples were analysed for Br^- and SMX concentrations (see section 2.5). Additionally, pH was measured with a pH probe every 5-10 samples. Experimental conditions are listed in Table 3.

2.4 Chemical analysis of column experiments leachates.

Br^- concentrations in leachate samples were measured by ion chromatography (Metrohm 732/733 separation center, Metrosep A Supp 16 – 150mm, and Metrosep C2-150 mm anion column) based on the USEPA Method 300.0. Calibration standards were prepared from an Anion Multi-Element Standard (IC) (Carl ROTH). Limits of detection (LD) and quantification (LQ) were determined based on signal to noise ratio of 3 for both LD (2.66E-03 mg L^{-1}) and LQ (7.97E-03 mg L^{-1}).

SMX was analysed after filtration (Chromafil Xtra PVDF, 0.45 µm) by HPLC-UV (Spectra system UV 100, Thermo Separation Products) equipped with a C-18 (EC 125/3 NUCLEOSIL 100-5 C18, 5 µm) column. The detection wavelength was 269 nm and the temperature was maintained at 40 ° C. The mobile phase used was composed of ACN (15%), MeOH (15%), ultrapure water (70%) and formic acid (0.02%) with a fixed flow rate of 0.5 ml min^{-1}. Time analysis was fixed to 10 min, with an injection volume of 20µL and three injections per sample. Quantification was carried out by external calibration and measurement of peak areas. The limit of detection (LD) was 0.1 mg L^{-1} and the limit of quantification (LQ) of 0.5 mg L^{-1} (determined based on signal to noise ratio of 3 for both). The analytical method was validated by the method of accuracy profiles (Feinberg and Laurentie, 2010).

2.5. Parameters estimation

Water flow and solute transport in the soil columns were treated as one-dimensional problems in mathematical simulations. The water content was assumed to be constant in space and time

throughout the experiment as the columns were homogeneously packed and water-saturated at a constant rate from the bottom. The soils were assumed to be initially solute free (Br^- or SMX). The transport parameter D ($cm^2\ min^{-1}$) was determined by fitting the analytical solution of the CDE (Eq. (1)) to the experimental bromide breakthrough curve (BTC) using the CXTFIT code (Toride et al., 1999). From D ($cm^2\ min^{-1}$) and ν ($cm\ min^{-1}$) the dispersivity, λ (cm) (Eq. (8)) was calculated and used to fix the dispersivity for the SMX transport simulations.

$$\lambda = D/\nu \quad \text{.....Eq. (8)}$$

Since SMX exhibits non-linear and non-instantaneous sorption and no analytical solution exists for such transport behavior, we used the finite element code HYDRUS-1D (Simunek et al., 2008) to solve the convection-dispersion equation for reactive solute transport. A detailed description of HYDRYS-1D model could be found elsewhere (Casey et al., 2004; Wehrhan et al., 2007).

The model was run with gravity driven flow, where the hydraulic conductivity at the steady state water content was set equal to the input flow rate. HYDRUS-1D (Simunek et al., 2008) was used in an inverse mode to fit one or more parameters of the sorption model to the experimental SMX BTC.

To evaluate the goodness of fit, we used the different statistical criteria (Loague and Green, 1991).:

The Coefficient of determination (R^2) was calculated as show by equation 10:

$$R^2 = \sum_{i=I}^{n}\left(Oi - \overline{O}\right)^2 / \sum_{i=I}^{n}\left(Pi - \overline{O}\right)^2 \text{..... Eq. (10)}$$

Model efficiency (EF) is given by the equation 11. Perfect agreement of the model and experimental data is given by a EF =1.

$$EF = \left(\sum_{i=I}^{n}\left(O_{i-}\overline{O}\right)^2 - \sum_{i=I}^{n}(Pi - Oi)^2\right) / \sum_{i=I}^{n}\left(O_{i-}\overline{O}\right)^2 \text{ ..... Eq. (11)}$$

The Root mean square error (RMSE) was calculated by the equation 12. The sensitivity of the RMSE to outliers is the most common concern with the use of this metric (Chai and Draxler, 2014).

$$RMSE = [\sum_{i=I}^{n}(Pi - Oi)^2 / n]^{0.5} \text{..... Eq. (12)}$$

The Mean absolute error (MAE) is more suitable to describe uniformly distributed errors (Chai and Draxler, 2014) and was calculated with equation 13.

$$MAE = [\sum_{i=I}^{n}(Pi - Oi) / n] \text{.....Eq. (13)}$$

where P_i are the predicted values; O_i are the observed values; n is the number of samples; and $\overline{O}$ is the mean of the observed data.

3 Results and discussions

3.1. Soil properties

Table 1 shows only topsoils properties. Deeper layers are described hereafter. Soils 1, 2 and 3 are shallow and derived from granitic morainic materials from the Cordillera Real. The superficial horizons (0-15 cm) are organic of granular structure with high porosity. Below 15-20 cm, the sand, gravel and stones contents increase considerably, favoring vertical water infiltration as well as lateral water flow in the slope direction and possible mobilization of contaminants. These soils have extremely acid to highly acid pH (pH from 4.6 to 5.4) due to the high content of organic matter (3.6 to 8.2 %) and high humidity. The A horizons have high CEC especially for soil 3, due to high organic carbon content (OC).

Soils 4, 5, 6, 7, and 8 derived from alluvial materials or colluvio-alluvial deposits and are at an early stage of development (Inceptisols). They are moderately deep and the A horizon is porous of loamy or loamy/sandy texture, with low OC content. The pH varies from highly acid to (5.35) to slightly basic (8.54). The sand and gravel contents increase with depth in soil 5, indicating a better solute movement in deeper horizons towards groundwater. On the contrary, in soil profiles 6, 7 and 8, it can be observed an increase of clay content with depth, limiting water infiltration. The CEC of these soils are generally low due to low clay content compared to sand and silt and low OC content. Only soil 4 presents a high OC content which is linked with the continuous arrival of waste waters in provenance of the WWTP. Below 55 cm, the soils are clayey with low porosity. Smectite being the main important clay types in these soils means that during the dry season that can last 8 months, rapid water and solute movement could happen through cracks.

Soils 9 and 10 are moderately deep, porous soils derived from colluvium and lacustrine deposits. They are very poorly developed (Entisols) due to changes in lake level and sediment inputs during flood events. The superficial horizon is porous of loamy texture and has moderate fertility. The soils pHs are basic (8.3 and 8.54). Thinner materials such as silt and clay increase in lower horizons that could limit water infiltration compared to topsoil horizons.

Table 4 shows the determined topsoil properties. Studied soils covered a wide range of OC and pH values.

The principal component analysis (PCA) for these data (see SI.I) allowed us to see differences and similarities between topsoils. Variability within soils is mainly dominated by its OC

contents, as well, as for its CEC (parameters well represented by the PCA Axis 1 which explains the main of variability within soils). We distinguish principally 3 groups A) soils 1, 2 and 4 with OC contents >7%; B) soils 3 and 9 with OC contents between 1.8 and 3.6%) soils 5, 6, 7, 8 and 10 with OC contents <1.5. It has been observed that OC content is a dominant parameter on sulfonamides sorption (Lertpaitoonpan et al., 2009) and so in its mobility.

Cu contents could also affect SMX mobility by complexation as showed by Morel et al. (2014), the soil Cu contents were very variable between 12.1 to 87.6 mg kg^{-1}.

Values of pH were very variable between studied soils and ranged from 4.6 to 8.5. Several authors observed that SMX sorption decreases with pH increase (Boxall et al., 2002; Thiele-Bruhn S. and Aust, 2004). In fact SMX and sulfonamides in general can be present in its cationic, neutral or anionic form depending on pH, being the anionic form highly mobile (Srinivasan and Sarmah, 2014). Soils 1, 2, 3 and 4 were acidic with pH <6, while other soils shows pH ranging from 6.7 to 8.5.

Table 4. *Soil properties.*

		Soil									
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Pysico chemical	**% OC**	8.2	3.6	7.3	10.3	1.5	0.9	0.4	0.5	1.8	1.4
	% N	0.6	0.3	0.6	1.2	0.2	0.1	0	0	0.2	0.1
	% Feoxy	2.1	1.8	0.7	1.4	1.1	1.1	1.1	1.0	2.0	0.7
	Cu (mg Kg^{-1})	17.3	46.6	19.4	89.3	25.2	23.8	17.6	14	17.7	11.8
	CEC ($cmol^{+}$ Kg^{-1})	19	8.3	18.9	22.9	9.4	6.8	5.1	4.3	10.5	7.5
	pH	5.4	4.6	5.3	5.6	6.8	6.7	8.3	8.5	8.3	8.4
Texture (%)	**Silt**	49	26.4	43.9	57.4	41.3	38.8	44.3	22.6	38.3	26.1
	Sand	21.5	62.4	37.7	10.7	43.8	47.6	45.8	66.9	42.3	60.2
	Clay	29.5	11.2	18.4	31.9	14.9	13.6	9.9	10.5	19.4	13.7
Mineralogy (%)	**Quartz**	26.6	NA	NA	36.7	NA	NA	37.1	51.4	NA	47
	Plagioclase	21.2	NA	NA	10	NA	NA	4.5	11.7	NA	9.4
	Chlorite	9	NA	NA	5.5	NA	NA	5.7	3.3	NA	2.5
	Mica	11.8	NA	NA	16.7	NA	NA	19.8	12.3	NA	11.6
	Pyrophyllite	0.5	NA	NA	0	NA	NA	0	0	NA	0
	FelsparK	13.8	NA	NA	6.6	NA	NA	5.3	3.3	NA	4.6
	Smectite	17.2	NA	NA	24.4	NA	NA	22.3	15.9	NA	18.9
	Kaolinite	0	NA	NA	0	NA	NA	5.4	0	NA	0
	Hematite	0	NA	NA	0	NA	NA	0	1.3	NA	0.6
	Calcite	0	NA	NA	0	NA	NA	0	0.8	NA	5.5

OC: organic carbon. N: Nitogen. Cu : cooper. CEC: exchange cation capacity.

Soil texture specially clay contents affects sulfonamides mobility (Leal et al., 2013; Lertpaitoonpan et al., 2009). This is principally related with its small size and large surface area as well as with its charge and charge density which controls its reactivity (Ulery and Dree, 2008). Observed clay contents were also highly variable between 9 and 32%, soils 4 and 1 presents highest clay contents around 30%, while other soils vary between 10 and 20%.
Fe oxide contents varied between 0.7 and 2.1%. Leal et al. (2013) observed that sorption of sulfonamides at pH>6 may be enhanced in soils with high Al and Fe oxyhydroxide contents.
Only soils 1, 4, 7, 8, and 10 were analyzed for mineral fractions.
Quartz was the most dominant mineral on all analyzed samples. For soils 4, 7, 8, and 10 the second most abundant mineral was smectite and the third was Mica. In soil 1 the second most abundant mineral was Plagioclase and the third was smectite. Smectite is a 2:1 clay mineral that can expand or shrink depending on the water content. Under contrasting climate as in the Altiplano (9 months of dry season), this type of clay can impact water and solute transport through soils.

3.2 Bromide tracer breakthrough curves.

Model estimated and calculated parameters as well as eluted mass fractions of bromide-tracer BTC's are presented in Table 5.
Bromide (Br-) recovered amounts varied from 97% to 100% as expected for a conservative tracer, meaning that no Bromide was irreversibly sorbed in the soil. No significant tailing of the breakthrough bromide curves was observed indicating that transport of Bromide was in physical equilibrium (Figure 2), which was expected as the soils were sieved at 2mm. Nevertheless, a slightly tail was observed for soils 9 and 10, linked with the porous nature of soils inducing slight macropore flow and intra-aggregate diffusion. D and v transport parameters fitted for the bromide conservative tracer BTC's are shown in table 5. As show by the obtained coefficients of determination (R^2) the physical equilibrium CDE describes properly all obtained curves (obtained R^2 between 0.93 and 0.99). These means that bromide was appropriated as conservative tracer and that there was no stagnant or immobile water.
Dispersivity varied between 0.02 and 1.64 cm. OC contents and obtained λ were well correlated for agricultural soils (soils 6 to 10, R^2=0.8). This is linked with the fact that organic matter is involved in binding small soil particles into larger aggregates which increases particle size and thus tortuosity for water pathways. Higher λ values were consequently observed for soils 9 and 10 which have coarser texture and relatively high OC content (compared to soils 6 to 8).

As a fixed retardation factor of 1 did not lead to good fitting of the simulated Bromide breakthrough curve, the Retardation factor for Bromide was also estimated with CXTFIT. It was on average 0.92, and varied between 0.7 and 1.25. Apart soil 2, retardation factor of soils was equal or below to 1. Retardation factors below 1 are due to repulsion of Bromide by negative charges hold by clay minerals and organic matter. In the case of soil 2, this soil has the lowest pH (4.6) and a high Feox content (1.8 %). At acidic soil pH, organic matter as well as clay minerals (Kaoline, Halloysite, Vermiculite) and Fe and Al oxides hold variable charges that are positive. Even if a relation between pH and mean retardation factor is difficult to establish, Pearson correlation coefficient was of –0.5 showing an effect of pH on obtained retardation factors (negative correlation).

Table 5. *Transport parameters (estimated and calculated), eluted mass fractions of bromide-tracer breakthrough curves and mean pH during the experiment (standard deviation is given in parenthesis).*

Soil	Duplicate	EM (%)	R^2	EF	MSE	R	*v* (cm min^{-1})	λ (cm)	Ph
1	A	0.97	0.98	0.98	2.40E-03	0.80	0.11	0.08	4.8 (0.2)
	B	1.04	0.99	0.99	1.02E-03	1.02	0.09	0.13	4.8 (0.2)
2	A	1.10	0.99	0.99	8.47E-04	1.10	0.10	0.14	4.7 (0.1)
	B	1.06	0.94	0.93	4.65E-03	1.40	0.11	0.18	5 (0.1)
3	A	0.99	0.90	0.90	2.43E-02	0.93	0.08	0.06	6 (0.05)
	B	1.00	0.99	0.89	2.33E-03	1.00	0.09	0.06	5.3 (0.2)
4	A	1.00	0.99	0.99	5.78E-04	0.83	0.10	0.29	5.1 (0.2)
	B	1.00	0.93	0.82	2.79E-03	0.91	0.10	0.54	5.9 (0.1)
5	A	0.99	0.99	0.99	9.25E-04	0.95	0.11	0.02	6.3 (0.3)
	B	1.07	0.99	0.99	1.22E-03	0.97	0.10	0.10	6.3 (0.3)
6	A	1.00	1.00	1.00	4.21E-05	0.79	0.08	0.03	6.9 (0.02)
	B	0.99	0.99	0.84	1.36E-03	0.74	0.08	0.05	7 (0.2)
7	A	0.99	0.96	0.96	4.34E-03	1.07	0.11	0.03	7.5 (0.1)
	B	0.99	0.99	0.69	1.01E-03	1.07	0.10	0.02	7.2 (0.1)
8	A	1.07	0.97	0.97	3.30E-03	1.00	0.11	0.09	7.6 (0.08)
	B	1.02	0.99	1.00	6.16E-04	0.92	0.12	0.03	7.5 (0.01)
9	A	0.98	0.95	0.96	2.02E-03	0.76	0.11	1.64	7.8 (0.2)
	B	1.03	0.96	0.99	2.51E-03	0.64	0.09	1.06	7.4 (0.2)
10	A	1.09	0.96	0.94	2.35E-03	0.70	0.11	1.00	8 (0.2)
	B	1.09	0.93	0.98	4.13E-03	0.72	0.11	0.77	7.8 (0.06)

EM: eluted mass fractions. EF: model efficiency. RMSE: root mean square error. R^2: coefficient of determination. R: retardation factor for Bromide. v: pore water velocity (obtained experimentally). λ: dispersivity. EM, EF, and RMSE were calculated. λ and R were fitted.

3.3 SMX breakthrough curves (BTC).

Recorded pH values during experiment were comparable with initial soil pH (Table 4 and 5). pH remained stable during the displacement experiments (standard deviation between 0.2 and

0.05) and was highly variable between soils (4.7 to 8). The center of gravity of SMX BTC's was delayed relative to bromide BTC for all studied soils (Figure 2), with much more retardation for soils 1 to 4 than soils 5 to 10. This is indicative of the presence of retardation processes linked with the reactivity of SMX and soils properties.

Observed BTC's for soils 1, 2, 3, 4, 5, 9 and 10 exhibits a tail being more extended for soils 1, 2, 3 and 4 (Figure 2). A complete breakthrough of SMX was not achieved for soils 1, 2 and 4 during the experimentation time due to higher retention time. Extended tailing can be explained by the high OC content: Carrillo et al. (2015) observed a desorption negatively correlated with the OC content of the soils, meaning that at higher OC content, fewer desorption. Also, the tailing may be related to the eventual presence of DOC in leachates (not measured in this study): according to Haham et al. (2010), there is competition between SMX, DOC and SMX-DOC complexes for binding sites.

Although applied fluxes were similar for all columns (~ 0.3 ml min^{-1}) eluted mass fractions (calculated by artificially extending the BTC to zero for soils 1, 2 and 4) were also highly variable ranging between 35% and 100%. Eluted mass fractions were higher for soils 5 to 10 (between 67% and 100%) while they were lower for soils 1 to 4 (between 66.7% and 35%). This indicates that either irreversible sorption or degradation process took place during SMX transport on studied soils.

3.4 Reactive transport modelling

CXTFIT was first used to model SMX BTC by fitting either the equilibrium model or the chemical non equilibrium model. The coefficient of determination (R^2) varied from 0.86 to 0.99 but the inverse modelling lead to unlikely high biodegradation rates (on average 2 d^{-1}) in contradiction with the results of an independent biodegradation experiment realized on the same soils (Archundia et al. in preparation).

As eluted mass fractions were always lower than 100% the existence of irreversible sorption was admitted for all soils. As a second step, HYDRUS-1D was used to fit SMX BTC's using different sorption models, where the biodegradation rate was fixed as the rate obtained for the same soils in independent static biodegradation experiments (Archundia et al., in preparation) and irreversible soil sorption rate was fitted. The model complexity was increased from one-site equilibrium models to more complex multiple-site models with reversible and irreversible sorption as described by Wehrhan et al., (2007).

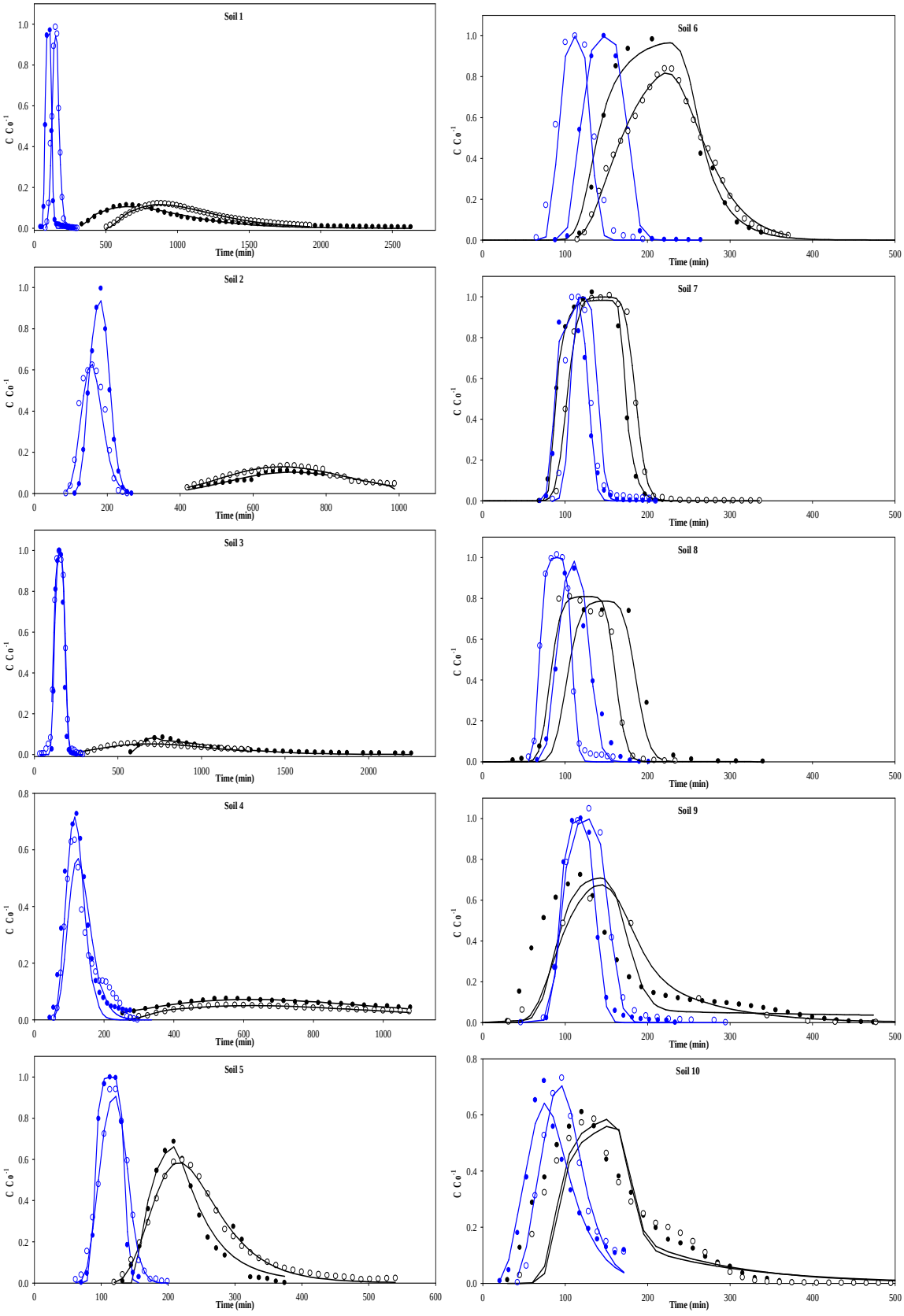
Table 6 shows the best model (M) explaining SMX sorption behavior for each column as well as fitted parameters. Soils 1 and 5 were best described by the three-site-two-rate-Freundlich-

irreversible model (3-2-F-I) (soil1: R^2= 0.98 and EF 0.95; soil5: R^2= 0.96 and EF 0.98 (mean of duplicates)), with m values close to 1. To facilitate the determination of the retardation factor, we rerun the fitting with linear isotherm for soils 1 and 5 and showed only K_d values in Table 6. SMX sorption behavior in soils 2, 3 and 4 was best described by the three-site-two-rate-Linear-irreversible model (3-2-L-I) (R^2 between 0.89 and 0.97; EF between 0.89 and 0.96). Accordingly, SMX sorption in these soils is complex and of three types: instantaneous, time dependent and irreversible, due to the presence of different sorption sites on the soil organic matter. On the other side, SMX sorption behavior for soils 6 to 10 was best described by the two-site-two-rate-linear-irreversible model (2-2-L-I) (R^2 between 0.7 and 1; EF between 0.6 and 1). Thus, SMX sorption sites in these soils can be classified in two fractions: the first where sorption is rate-limited and the second where sorption is irreversible.

Nevertheless the goods fittings of 2-2-L-I model, it failed to describe extended tails of SMX BTC's for soils 9 and 10, as showed by the lowers R^2 and EF (Figure 2, table 6). The CXTFIT code was tested in non–equilibrium conditions and was not able to describe SMX BTC's, while obtained R^2 in equilibrium conditions were greater that R^2 obtained with HYDRUS code. However, tailing remained not well represented by estimates and leads to overestimated biodegradation rates. A bad representation of extended BTC's tailing with 2 site models was also observed by Wehrhan et al. (2007). Extended BCT's tailing as well as asymmetrical BTC could be related with physical and/or chemical non-equilibrium (Zhaosheng F. et al., 2011). Physical non-equilibrium is related with transport through structure soils, where lateral diffusion of solute in to and out of the soil matrix or immobile water causes tailing. Chemical non-equilibrium is caused by sorption/desorption kinetics. Both processes can occur simultaneously (Casey et al., 2004). Our experiments were carried out with repacked soils suggesting that observed tailing is more related with chemical non-equilibrium and hysteresis.

All soils presented irreversible sorption and rate-limited sorption. Irreversible sorption may be attributed to surface complexation and irreversible chemical binding to the organic fraction (Bhandari, 1996; Schwarz et al., 2012). However, it cannot be excluded that at least a part of observed tailing was caused by slow SMX desorption (rate-limited). Drillia et al. (2005) reported similar results for SMX and Wehrhan et al. (2007) observed that sorption of sulfadiazine (another sulfonamide antibiotic) was also rate-limited. Furthermore, there is considerable evidence that sorption of organic compounds (as SMX) has an instantaneous equilibrium component and a slower time-dependent component (Pignatello, 1989).

Figure 2. *Breakthrough curves for Br- tracer (in blue) and for SMX (in black). In duplicate for each solution (Br or SMX). Symbols are observed values and fitted values are lines. Put x axis from 0 to 2000 min for soil 1 to 4 and from 0 to 500 for soils 5 to 10.*



Diffusion of SMX molecules on the surface of the soil organic matter (at short times) and intra-organic matter diffusion (at longer times) are possible responsible mechanisms for rate-limited sorption, this was already observed for other organic compounds as the herbicide simazine (Fortin et al., 1997) and the pesticide parathion (Leenheer and Ahlrichs, 1971). Furthermore, the contribution of mineral surfaces to observed rate-limited sorption cannot be ruled out as it is known that polar compounds, as SMX, can have significant interactions with inorganic soil components.

3.5 Parameter estimates and their relationship with soil properties.

Observed mobility of SMX is comparable to results from SMX sorption obtained in static batch experiment on the same soils (Archundia et al., in preparation).

As explained earlier, for the same of simplicity, we performed linear isotherm for all soils, which allowed us to compare retardation factors. Retardation factors were highly variable among studied soils (between 1.1 and 7.87). Depending on retardation factors we can clearly distinguish two groups of soils. The first group exhibits higher retardation factors varying from 6.84 to 7.87 (soils 1 to 4), while the second shows lower retardation factors ranging from 1.1 to 1.91 (soils 5 to 10).

Due to the low pH values of soils 1 to 4 (under the pKa2 of SMX), the dominant species of SMX in these soils are the neutral and cationic species. The high retardation factor found in soils 1 to 4, can be explained by the high CEC (from 8 to 23 $cmol^{+}\ kg^{-1}$) and the elevated OC content (from 3.6 to 10 %). Sorption mechanisms involved are ion exchanges and hydrophobic interactions onto OC compounds. These results are in accordance to Srinivasan et al. (2014) and Kurwadkar et al. (2011) wo found that SMX sorption is greatly enhanced with low pH, high CEC, OC and clay content.

In soils 5 to 10, which pH are above the SMX pKa2, the predominant SMX specie is the anionic form which is highly mobile in negatively charged soils. Negatively charged clay particles and organic matter (due to the presence of carboxyl/phenolic groups) at soil pH could be responsible of repulsion processes. Nevertheless, sorption processes could exist due to several factors: sorption onto OC by hydrophobic interactions, and SMX sorption to positively charged minerals. However, these minerals are rare in the studied soils. Kurwadkar et al. (2011) found that in general, sulfonamides were mobile at pH>6 with a similar behavior than a conservative tracer at high pH. The lower retardation factor in soils 5 to 10, might be also explained by a higher mobility of the anionic form of the SMX in the presence of DOC, however we did not measure DOC concentrations in leachates. Chefetz et al. (2008)

concluded that a competition between the anionic form of Naproxen and the DOC took place for binding sites of soil OM, to explain the higher mobility of the compound in soil column experiments.

Thus, pH and OC contents were the parameters that better explained observed retardation factors for all soils (R^2=0.83 for both).

Higher sorption distribution coefficient (K_d), and irreversible sorption ($ß_3$) were observed for soils 1 to 4 (mean values: 3.9 L kg^{-1} and 0.006 min^{-1}, respectively), in agreement to lower eluted mass fractions (EM) and higher retardation factors. They exhibit low first order rate coefficients (α) (mean α: 0.02 min^{-1}), indicating slower chemical mass transfer between the solid and aqueous phase explaining the BTC's shape (flattened and extended).

Soil 5 showed intermediate values for K_d (mean: 0.34 L kg^{-1}), α (mean: 0.09 min^{-1}), $ß_3$ (mean: 0.002 min^{-1}) indicating a lower sorption affinity, quicker chemical mass transfer as well as lower irreversible sorption than in soils 1 to 4. These parameters explain the observed intermediate retardation factor (around 2) and the BTC's shape. Soil 5 was irrigated with raw wastewater during the last two months before sampling, and started to build up OC and Cu contents. The enhance of SMX sorption by complexation with Cu was already observed by (Morel et al., 2014) who found that the sorption of SMX in soil increases strongly in the presence of copper supporting the assumed formation of ternary SMX–Cu–soil complexes, especially at pH 6 when copper is dominantly sorbed. This explanation is also valid for soil 4 showing the highest Cu content.

Lower sorption affinity (K_d) and irreversible sorption ($ß_3$) were observed for soils 6 to 10 (mean values: 0.11 L $kg^{-1}$and 0.001 min^{-1} respectively). This relates to higher eluted mass fractions (EM) and retardation factors near to those of the conservative tracer. Fraction of adsorption sites available for instantaneous sorption (F) was null for soils 6 to 10 showing that SMX was only sorbed on rate-limited sorption sites. Soils 6 to 8 showed the highest first order rate coefficients (mean: 0.38 min^{-1}) while soils 9 and 10 had lower α (mean: 0.03 min^{-1}) explaining extended BTC's tails.

Similar K_d values in an Eutric Cambisol was observed by Wehrhan et al. (2007) for the sulfadiazine antibiotic, also belonging to the SA's family and using the HYDRUS code.

.

Table 6. *Fitting parameters of the best fitting model of SMX BTC's.*

Soil	Duplicate	Best Model	EM (%)	Model statistics							Fitted parameters		
				R^2	EF	SSQ	MAE	RSME	K_d (L kg^{-1})	R	F	β_3 (min^{-1})	α (min^{-1})
1	A	3-2-F-I	50.6	0.98	0.95	0.04	0.02	0.03	3.74	7.60	3.1E-01 (0.01)	5.9E-03 (2.3E-04)	8.6E-03 (5.E-04)
	B	3-2-F-I	59.8	0.99	0.99	0.32	0.01	0.02	4.97	7.87	4.6E-01 (0.08)	4.4E-03 (1.9E-02)	9.1E-03 (3.E-04)
2	A	3-2-L-I	58.8	0.91	0.90	0.24	0.04	0.06	3.12	7.72	4.6E-04 (5.E-05)	7.4E-03 (3.8E-04)	3.9E-02 (3.E-03)
	B	3-2-L-I	66.7	0.96	0.96	0.34	0.03	0.04	2.90	7.01	1.1E-02 (0.4)	4.9E-03 (2.6E-02)	4.1E-02 (2.E-02)
3	A	3-2-L-I	40.0	0.97	0.95	0.07	0.03	0.04	4.41	7.69	5.9E-01 (0.01)	8.9E-03 (2.9E-04)	7.2E-03 (6.E-04)
	B	3-2-L-I	48.0	0.89	0.89	0.08	0.06	0.07	4.24	6.90	4.3E-03 (4.E-03)	6.4E-03 (9.9E-05)	1.1E-02 (1.E-04)
4	A	3-2-L-I	42.0	0.95	1	0.14	0.04	0.04	3.87	6.84	1.1E-01 (0.02)	5.4E-03 (8.1E-04)	8.6E-03 (5.E-04)
	B	3-2-L-I	35.0	0.96	0.96	0.09	0.03	0.03	3.93	7.11	3E-01 (9.E-03)	7.5E-03 (1.8E-04)	7.8E-03 (4.E-04)
5	A	3-2-F-I	67.0	0.94	0.97	2.45	0.04	0.06	0.31	1.82	4.8E-01 (0.2)	3.4E-03 (7.1E-04)	8.8E-02 (5.E-02)
	B	3-2-F-I	88.0	0.99	0.99	2.57	0.01	0.01	0.38	1.91	1E-02 (0.3)	1.5E-03 (1.8E-04)	8.3E-02 (4.E-03)
6	A	2-2-L-I	99.0	0.98	0.98	3.72	0.04	0.04	0.06	1.12	0	6.6E-05 (8.6E-04)	4.9E-02 (1.E-02)
	B	2-2-L-I	87.0	0.99	0.99	6.87	0.01	0.01	0.19	1.31	0	5.2E-04 (9.4E-05)	6.5E-02 (7.E-03)
7	A	2-2-L-I	98.0	1	1	7.15	0.01	0.01	0.04	1.10	0	2.1E-04 (3.5E-04)	2.E-01 (3.E-02)
	B	2-2-L-I	90.0	0.99	0.98	6.75	0.02	0.03	0.06	1.14	0	1E-06 (4.1E-04)	1.E-01 (2.E-02)
8	A	2-2-L-I	94.0	0.99	0.99	1.95	0.02	0.03	0.12	1.31	0	3.1E-03 (4.5E-04)	1 (1)
	B	2-2-L-I	90.0	0.99	0.99	3.79	0.02	0.03	0.08	1.25	0	3.7E-03 (4.4E-04)	8.8E-01 (3.E-01)
9	A	2-2-L-I	98.0	0.7	0.60	2.17	0.07	0.12	0.19	1.47	0	2.6E-03 (1.8E-03)	7.2E-03 (5.E-02)
	B	2-2-L-I	96.0	1	1	4.79	0.01	0.01	0.07	1.17	0	3.4E-04 (2.8E-04)	1.1E-01 (9.E-03)
10	A	2-2-L-I	90.0	0.76	0.74	1.89	0.05	0.09	0.18	1.49	0	3.1E-03 (1.7E-03)	9.6E-03 (7.E-03)
	B	2-2-L-I	83.0	0.80	0.76	1.77	0.05	0.08	0.11	1.32	0	4.E-03 (9.7E-04)	1.8E-02 (2.E-03)

Model refers to the model that best fitted the observed data. Names of models are composed as follows: number of sorption sites-number of rates-sorption concept (L: linear and F: Freundlich)-reversibility of sorption process (irreversible: I and reversible: R). EF: model efficiency, SSQ: sum of squares, MAE: mean absolute error, RSME: root square mean error, R: retardation factor, Kd: distribution coefficient for the linear model, F: Fraction of adsorption sites available for instantaneous sorption, $ß_3$: Irreversible adsorption rate coefficient, α: First order rate coefficient for one site or two site non-equilibrium adsorption, Standard deviation (stdv) is given in brackets.

3.5 SMX mobility at the watershed scale risk of ground water pollution.

SMX was found to present different mobility at the watershed scale. In soils located above El Alto city (1, 2 and 3) SMX shows low mobility (high retardation factors ~7 to ~8) were about 30 to 60% of SMX will be retained in its superficial horizon. Nevertheless, considering that in its lower horizons infiltration is favoured by the increase in sand and gravel contents, the mobile SMX fraction could be available to leaching towards ground waters, especially that these soils are located in the recharge zone of the El Alto Aquifer (Purapurani).

In soils located nearby the WWTP (4 and 5), SMX also shows low mobility (retardation factors ~2 to ~7), here SMX mobile fractions (~40 and ~70%, soils 4 and 5 respectively) are likely to reach ground water compartment in dry season when cracks are present in lower horizons due to high contents of smectites clay. This may also happen at the beginning of the wet season when soil internal drainage increases. In soils 6, 7, and 8 located in the Pallina bajo , Katari alto and Katari bajo rivers, respectively (Figure 1), SMX will be highly mobile (mean retardation factor: 1.2 and mean mobile fraction: 93%). The higher clay content in lower horizons means that during the wet season, SMX leaching towards groundwater could however been slowed down.

Soils located on the shore of Titicaca lake (soils 9 and 10) also present high SMX mobility (mean retardation factor: 1.4 and mean mobile fraction: 92%). At this location, the risk of groundwater pollution is increased because of shallow groundwater levels linked to the lake level fluctuation.

4 Conclusions

Transport of SMX in a variety of high altitude soils from the Bolivian Altiplano was investigated using dynamic displacement experiment in repacked laboratory columns.

SMX eluted mass fractions were lower than 100% for all studied soils, suggesting the existence of irreversible sorption and degradation process during transport. This was supported by HYDRUS modelling as best fitted models consider irreversible sorption for all studied soils. In addition to irreversible sorption, the consideration of rate-limited sorption with 2 sorption sites (instantaneous and rate limited, for soils 1 to 5 rich in organic carbon, and only rate limited for soils 6 to 10 with lower content of organic carbon) was required to properly describe observed SMX mobility behavior, showing the importance of organic matter in the SMX sorption processes. Types of organic matter in the different soils and DOC should also be estimated to better understand the different sorption processes. These results indicate that transport of SMX involves different chemical non-equilibrium and time

dependent sorption process which are related with soil properties and SMX pH dependent-speciation. Thus, SMX mobility is complex and should be studied in the light of different sorption concepts.

At the watershed scale, soils located upstream (Regosol) showed low SMX mobility as the consequence of higher retention capacity enhanced by higher OC contents and acidic pH. Nevertheless, the fraction can potentially migrate due to the presence of coarse materials in lower horizons (soils 1, 2, and 3) and to the presence of smectites that can form cracks during the dry season (soil 4 and 5). Soils located downstream (Cambisol) showed high SMX mobility in relation with low retention capacity and soils texture. In these soils the presence of smectite which forms cracks in dry season (soils 6, 7 and 8) and the shallow groundwater levels (soils 9 and 10) enhance the risks of groundwater contamination.

Based on these results, we suggest that SMX can be classified as a moderately to highly mobile compound on the Bolivian Altiplano context, depending principally on pH and OC soil contents. Our results also suggest that complexation with metal ions (as Cu^{+}) also plays a role on SMX mobility. Nevertheless the high variability of SMX mobility among studied soils, this antibiotic can potentially migrate through the studied basin and eventually pollute surface and ground water ecosystems. This is especially important in the lower part of the basin where SMX will be very mobile, increasing potential risks of groundwater and Titicaca lake contamination. A screening in 8 wells in the Purapurani aquifer localized below El Alto city showed that SMX is present in the groundwater systems in concentrations between 42 and 221 ng L^{-1} (Archundia et al., in preparation). Moreover, in soils of the upper part of the basin where SMX presents low mobility, impacts on soils bacterial communities could be enhanced by increased residence time in soils.

Acknowledgements

This work was supported by the French national program EC2CO "Ecosphère Continentale et Côtière", the LABEX OSUG@2020, ANR grant # ANR-10-LABX-56" (financed on the Future Investments program launched by the French government and implemented by the ANR) and the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico).

References

- Archundia, D., Duwig, C., Lehembre, F., Chiron, S., Prado, B., Morel, M.C., Martins, J.M.F., submitted. Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca lake and occurrence of SMX resistance genes.
- Archundia, D., Duwig, C., Spadini, L., Uzu, G., Guédron, S., Morel, M.C., Cortez, R., Ramos Ramos, O., Chincheros, J., Martins, J.M.F., in preparation. Eutrophization and polymetallic contamination in the continuum Milluni - Katari - Lake Titicaca : Impact of anthropogenic activities from the fastest-growing urban center of Bolivia (El Alto, 4000 m a.s.l.). Geochem. Explor. Submitted.

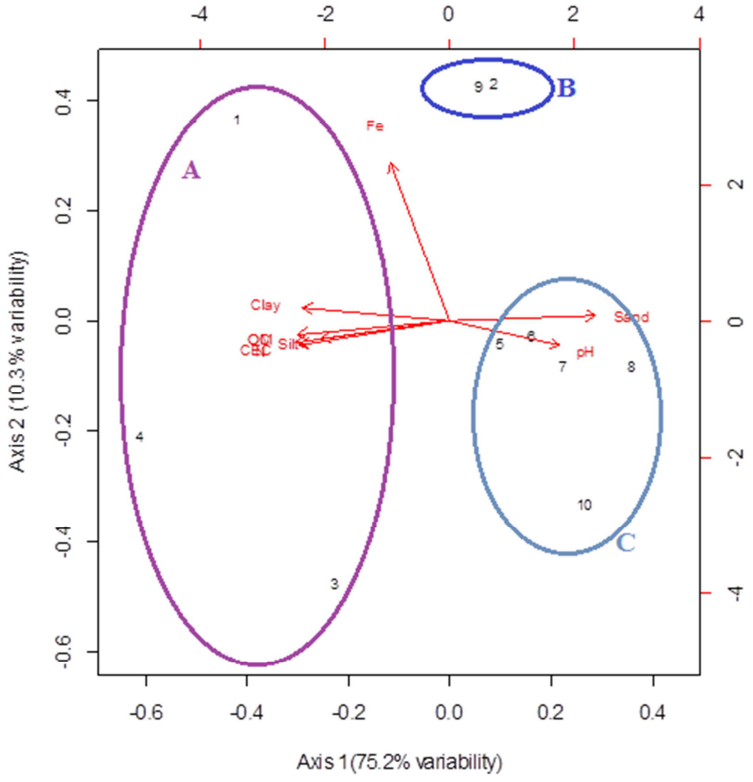
- Batt, A.L., Bruce, I.B., Aga, D.S., 2006. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. Environ. Pollut. 142, 295–302. doi:10.1016/j.envpol.2005.10.010
- Bhandari, A., 1996. Binding of 4-monochlorophenol to soil. Environ. Sci. Technol. 30, 2305–2311.
- Boxall, A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P., Tolls, J., 2002. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. Toxicol. Lett. 131, 19–28.
- Calvet, R., 1989. Adsorption of Organic Chemicals in Soils. Environ. Health Perspect. 83, 145–177.
- Cameron, D.R., Klute, A., 1977. Convective–dispersive solute transport with a combined equilibrium and kinetic adsorption model. Water Resour Res 13, 183–188.
- Casey, F.X.M., Hakk, H., Šimůnek, J., Larsen, G.L., 2004. Fate and Transport of Testosterone in Agricultural Soils. Environ. Sci. Technol. 38, 790–798. doi:10.1021/es034822i
- Chai, T., Draxler, R.R., 2014. Root mean square error (RMSE) or mean absolute error (MAE)? – Arguments against avoiding RMSE in the literature. Geosci. Model Dev. 7, 1247–1250. doi:10.5194/gmd-7-1247-2014
- Chefetz, B., Mualem, T., Ben-Ari, J., 2008. Sorption and mobility of pharmaceutical compounds in soil irrigated with reclaimed wastewater. Chemosphere 73, 1335–1343. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.070
- Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. TrAC Trends Anal. Chem. 22, 340–351.
- Drillia, P., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 2005. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. Chemosphere 60, 1034–1044. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.032
- Duwig, C., Archundia, D., Lehembre, F., Spadini, L., Morel, M.C., Uzu, G., Chincheros, J., Cortez, R., Martins, J.M.F., 2014. Impacts of Anthropogenic Activities on the Contamination of a Sub Watershed of Lake Titicaca. Are Antibiotics a Concern in the Bolivian Altiplano? Procedia Earth Planet. Sci. 10, 370–375. doi:10.1016/j.proeps.2014.08.062
- FAO, 2006. Guidelines for soil description, 4th ed. ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAO, 1998. Land and Water Digital Media Series n5; Soil and Terrain Database for Latin America and the Carribean - 1:5 Million scale (SOTERLAC). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Feinberg, M., Laurentie, M., 2010. Le cahier des techniques de l'Inra. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude.
- Florido, A., Valderrama, C., Arévalo, J.A., Casas, I., Martínez, M., Miralles, N., 2010. Application of two sites non-equilibrium sorption model for the removal of Cu(II) onto grape stalk wastes in a fixed-bed column. Chem. Eng. J. 156, 298–304. doi:10.1016/j.cej.2009.10.020
- Fortin, J., Flury, M., Jury, W.A., Streck, T., 1997. Rate-limited sorption of simazine in saturated soil columns. J. Contam. Hydrol. 25, 219–234.
- García-Galán, M.J., Garrido, T., Fraile, J., Ginebreda, A., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2010. Simultaneous occurrence of nitrates and sulfonamide antibiotics in two ground water bodies of Catalonia (Spain). J. Hydrol. 383, 93–101. doi:10.1016/j.jhydrol.2009.06.042
- García-Galán, M.J., Silvia Díaz-Cruz, M., Barceló, D., 2008. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. TrAC Trends Anal. Chem. 27, 1008–1022.
- Gardner, W.R., 1958. Some steady-state solutions of unsaturated moisture flow equations with application to evaporation from a water table. Soil Sci 85, 228–232.
- Hoa, P.T.P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D.H., Viet, P.H., Suzuki, S., 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. Sci. Total Environ. 409, 2894–2901. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.030
- Hu, X., Zhou, Q., Luo, Y., 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. Environ. Pollut. 158, 2992–2998.
- Kim, K.R., Owens, G., Kwon, S.I., So, K.H., Lee, D.B., Ok, Y.S., 2011. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. Water. Air. Soil Pollut. 214, 163–174.
- Kimura, K., Toshima, S., Amy, G., Watanabe, Y., 2004. Rejection of neutral endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceutical active compounds (PhACs) by RO membranes. J. Membr. Sci. 245, 71–78. doi:10.1016/j.memsci.2004.07.018
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere 75, 417–434. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.086
- Kurwadkar, S.T., Adams, C.D., Meyer, M.T., Kolpin, D.W., 2011. Comparative mobility of sulfonamides and bromide tracer in three soils. J. Environ. Manage. 92, 1874–1881. doi:10.1016/j.jenvman.2011.03.018

- Leal, R.M.P., Alleoni, L.R.F., Tornisielo, V.L., Regitano, J.B., 2013. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. Chemosphere 92, 979–985. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.018
- Leenheer, J.A., Ahlrichs, J.L., 1971. A kinetic and equilibrium study of the adsorption of carbaryl and parathion upon soil organic matter surfaces. Soil Sci Soc Am Proc 35, 700–705.
- Lertpaitoonpan, W., Ong, S.K., Moorman, T.B., 2009. Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. Chemosphere 76, 558–564.
- Lin, C.-E., Chang, C.-C., Lin, W.-C., 1997. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. A, 105–112.
- Loague, K., Green, R.., 1991. Statistical and graphical methods for evaluating solute transport models: Overview and application. J. Contam. Hydrol. 7, 51–73.
- Mojica, E.-R., Aga, D., 2011. Antibiotics Pollution in Soil and Water: Potential Ecological and Human Health Issues. Elsevier.
- Morel, M.-C., Spadini, L., Brimo, K., Martins, J.M.F., 2014. Speciation study in the sulfamethoxazole–copper–pH–soil system: Implications for retention prediction. Sci. Total Environ. 481, 266–273. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.040
- Müller, K., Duwig, C., Prado, B., Siebe, C., Hidalgo, C., Etchevers, J., 2012. Impact of long-term wastewater irrigation on sorption and transport of atrazine in Mexican agricultural. J. Environ. Sci. Health Part B 47, 30–41.
- N Toride, Leij, F.J., Genuchten, M.T. van, 1999. The CXTFIT Code for Estimating Transport Parameters from Laboratory or Field Tracer Experiments. Version 2.1.
- OECD, 2003. OECD Guidelines for the testing of chemicals: Leaching in Soil Columns.
- Ommen, H.C.V., Van Genuchten, M.T., Van Der Molen, W.H., Dijksma, R., Hulshof, J., 1989. Experimental and theoretical analysis of solute transport from a diffuse source of pollution. J. Hydrol. 105, 225–251.
- Oppel, J., Broll, G., Loffler, D., Meller, M., Rombke, J., Ternes, T., 2004. Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. Sci. Total Environ. 328, 265–273. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.02.004
- Pignatello, J.J., 1989. Sorption Dynamics of Organic Compounds in Soils and Sediments. Soil Sci. Soc. Am. Inc Madison WI, SSSA Special Publication No. 22. 45–80.
- Rheinheimer dos Santos, D., Cambier, P., Mallmann, F.J.K., Labanowski, J., Lamy, I., Tessier, D., van Oort, F., 2013. Prospective modeling with Hydrus-2D of 50years Zn and Pb movements in low and moderately metal-contaminated agricultural soils. J. Contam. Hydrol. 145, 54–66. doi:10.1016/j.jconhyd.2012.12.001
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. Chemosphere 65, 725–759. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.026
- Schauss, K., Focks, A., Heuer, H., Kotzerke, A., Schmitt, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B.M., Matthies, M., Amelung, W., 2009. Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. TrAC Trends Anal. Chem. 28, 612–618.
- Schwarz, J., Thiele-Bruhn, S., Eckhardt, K.-U., Schulten, H.-R., 2012. Sorption of Sulfonamide Antibiotics to Soil Organic Sorbents: Batch Experiments with Model Compounds and Computational Chemistry. ISRN Soil Sci. 2012, 1–10. doi:10.5402/2012/159189
- Simunek, J., Sejna, M., Saito, H., Genuchten, M.T.V., 2008. The HYDRUS-1D Software Package for Simulating the One-Dimensional Movement of Water, Heat, and Multiple Solutes in Variably-Saturated Media. Dep. Environ. Sci. Univ. Calif. RIVERSIDE RIVERSIDE Calif.
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., 2014. Assessing the sorption and leaching behaviour of three sulfonamides in pasture soils through batch and column studies. Sci. Total Environ. 493, 535–543. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.034
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., Manley-Harris, M., 2014. Sorption of selected veterinary antibiotics onto dairy farming soils of contrasting nature. Sci. Total Environ. 472, 695–703. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.104
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., Manley-Harris, M., 2013. Co-contaminants and factors affecting the sorption behaviour of two sulfonamides in pasture soils. Environ. Pollut. 180, 165–172. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.022
- Tafteh, A., Sepaskhah, A.R., 2012. Application of HYDRUS-1D model for simulating water and nitrate leaching from continuous and alternate furrow irrigated rapeseed and maize fields. Agric. Water Manag. 113, 19–29. doi:10.1016/j.agwat.2012.06.011

- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Tuc Dinh, Q., Clément, M., Chevreuil, M., 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. Sci. Total Environ. 393, 84–95. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.12.009
- Thiele-Bruhn S, Aust MO, 2004. Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. Env. Contam Toxicol 47.
- Tolls, J., 2001. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. Environ. Sci. Technol. 35, 3397–3406. doi:10.1021/es0003021
- Ulery, A.L., Dree, R., 2008. Methods of Soil Analysis: Mineralogical methods. Part 5. ,Soil Science Society of America, Wisconsin. USA.
- Wehrhan, A., Kasteel, R., Simunek, J., Groeneweg, J., Vereecken, H., 2007. Transport of sulfadiazine in soil columns — Experiments and modelling approaches. J. Contam. Hydrol. 89, 107–135. doi:10.1016/j.jconhyd.2006.08.002
- WHO, 2001. IARC Monographs on the evaluation of cancinogenic risks to humans.
- Wooding, R., 1968. Steady infiltration from a shallow circular pond. Wat Resourc Res 4, 1259–1273.
- Zhaosheng F., Francis X. M, Casey, Heldur Hakk, Gerald L. Larsen, Eakalak Khan, 2011. Sorption, Fate, and Mobility of Sulfonamides in Soils. Water Air Soil Pollut 49–61. doi:10.1007/s11270-010-0623-6

SI Experiments and modelling approaches to investigate the mobility of Sulfamethoxazole in ten soils of a Lake Titicaca subcatchment (Bolivia)

SI.I PCA Soil properties.



2.3 Processus de dégradation du SMX et impacts sur les communautés bactériennes.

2.3.1 Photodegradation du SMX dans un environnement d'haute altitude.

Le devenir et la transformation de produits pharmaceutiques dans les milieux naturels dépendent, entre autres, des processus de dégradation biotiques et abiotiques. La dégradation abiotique dans les eaux de surface peut se produire par hydrolyse et/ou photolyse. Les produits pharmaceutiques sont en règle générale résistants à l'hydrolyse (Andreozzi et al., 2003), c'est pourquoi le mécanisme de photolyse (directe et indirecte) est considéré comme la voie principale de leur transformation abiotique.

Etant donné que l'intensité de la lumière naturelle dépend de la latitude et de l'altitude, on attend que le SMX soit fortement photodégradé dans le contexte de l'Altiplano bolivien où le rayonnement UV est particulièrement important en raison de son altitude élevée (> 3800 m) ainsi que de sa localisation dans la ceinture tropicale. A La Paz en Bolivie, la puissance des rayonnements solaires peut être supérieure à 500 W/m² durant les jours ensoleillés (Fanola et al., 2012).

Dans ce contexte, le but de cette partie de la thèse a été d'étudier le processus de photolyse de la molécule de SMX sous lumière naturelle dans les conditions de haute altitude de l'Altiplano bolivien. Le but est d'évaluer le rôle de la photodégradation dans le devenir et la persistance du SMX à l'échelle site d'étude. Ainsi, des expériences de photodegradation ont été menées dans trois matrices d'eau différentes : i) eau pure, ii) eau chargé en ions avec un fond ionique reconstitué et semblable au fond ionique au point de prélèvement (K : 34 mg L^{-1}, Cl^- :154 mg L^{-1}, SO_4^- : 31 mg L^{-1}, Na : 99 mg L^{-1}, Mg : 68 mg L^{-1}, les sels ioniques utilisés ont été : $K_2SO_4^-$, $NaCl^-$, $MgCl^-$, $CaCO_3$ et KCl^-) et iii) eau de rivière (prélevé sur le cours d'eau Seco après la décharge des eaux traités de la STEP du BV).

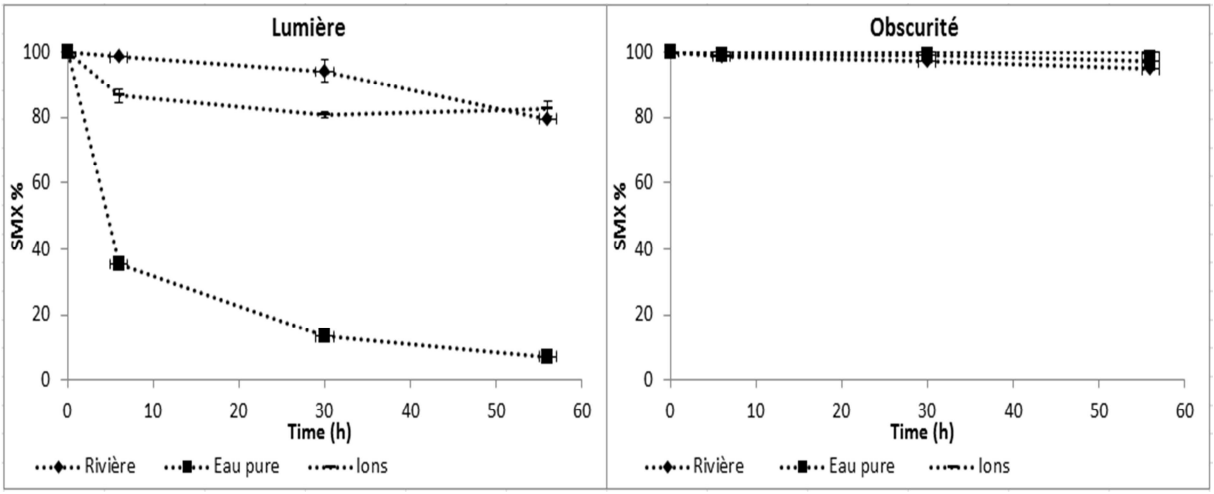
Résultats

La concentration en SMX a diminué dans toutes les matrices exposées à la lumière naturelle du soleil, toutefois la diminution a été variable selon les matrices étudiées. La diminution la plus importante a été observée dans l'eau pure où seulement 7.2% de la concentration initiale du SMX était encore présente à la fin de l'expérience.

Une photodégradation plus faible du SMX a été observée dans l'eau pure chargée en ions (lesquels) et dans l'eau de rivière, avec des bilans de masse en SMX de 82.5 et 79.5%, respectivement (Figure 1). Dans le cas de l'eau de rivière, ces pourcentages sont surement dus

à la présence de molécules organiques, qui ont la faculté d'absorber la lumière, réduisant ainsi la photodégradation. Tandis que dans le cas de l'eau chargée en ions, il est connu depuis longtemps que les sels inorganiques ont également la faculté d'adsorber la lumière (Buck et al., 1954).

Figure 1. *Cinétique de photodégradation du SMX dans différentes matrices aqueuses.*



Chaque point représente la moyenne de deux prélèvements. Les carres représentent la cinétique dans l'eau pure, les rhombes représentent la cinétique dans l'eau de rivière et les tirets représentent la cinétique dans l'eau chargée en ions.

Cependant, une dégradation plus importante du SMX a été observée dans l'eau de rivière. Cela suggère l'existence de mécanismes de photodégradation indirecte liée à la présence de substances photosensibles, comme par exemple les acides humiques, produisant des espèces actives générées au cours de l'irradiation (Andreozzi et al., 2003) lesquelles vont à leur tour oxyder le composé étudié. Aucune dégradation n'a été observée dans l'échantillon de contrôle pour l'eau chargée en ions maintenue dans l'obscurité (Récupération finale du SMX égale à 100%). Une légère décroissance a été observée dans l'échantillon de contrôle pour l'eau pure ainsi que pour l'eau de rivière (2.8 et 5.2% respectivement) suggérant la présence d'autres mécanismes (Hydrolyse…) impliqués dans la dissipation du SMX. Concernant le contrôle dans l'eau pure, cette décroissance est probablement liée à la présence d'hydrolyse. La décroissance observée dans l'échantillon de contrôle pour l'eau de rivière peut être due à l'adsorption du SMX sur les matières en suspension, à sa décantation (car l'eau de rivière n'a pas été filtrée) ou à l'hydrolyse. Cependant ces processus n'ont pas joué un rôle prépondérant dans sa dissipation, comme le démontrent les faibles constantes de dégradation obtenues dans les échantillons de contrôle.

Une photodégradation du SMX similaire de 3.9% a été observée par Niu et al. (2013) dans des échantillons d'eau usée avec du SMX maintenus dans l'obscurité, 1% de cette décroissance étant reliée à l'adsorption du SMX sur les matières en suspension.

Les constantes de dégradation observées dans les différentes matrices, ainsi que les temps de demi-vie obtenus sont consignés dans la table 1. La dissipation du SMX est bien décrite par le modèle cinétique de premier ordre, avec des R^2 entre 0.73 et 0.98.

Etant donné qu'un taux de dégradation a également été observé pour les contrôles dans l'eau pure et l'eau de rivière, les constantes de photodégradation pour ces matrices ont été déterminées à partir de la différence entre les constantes de dégradation des contrôles à l'obscurité et les échantillons exposés à la lumière (Zhang et al., 2012) (Table 1).

Les constantes de dégradation obtenues pour les échantillons de contrôle ont été inférieures de 5 (eau de rivière) à 22 (eau pure) ordres de grandeur en comparaison aux constantes de dégradation observées dans les échantillons exposés à la lumière. Ceci suggère que les autres processus de dégradation tels que l'hydrolyse, l'adsorption sur les matières en suspension et la dégradation microbienne sont moins importants que la photodégradation et pourraient éventuellement être négligés dans une modélisation globale.

Des taux de photodégradation supérieurs ont été observés par Murgolo et al. (2015) avec de la lumière solaire simulée (0.132 et 0.35 h^{-1} dans l'eau pure et des effluents de STEP, respectivement). De façon similaire, Ryan et al. (2011) ont observé des taux de dégradation de 0.68 et 0.4 h^{-1} dans des effluents de STEP et de l'eau pure respectivement et au même pH que dans cette étude (pH8) avec de la lumière solaire simulée.

Les différences observées entre les taux de photodégradation obtenus dans ces études et a nôtre pourraient être liées au fait que les échantillons d'eaux usées utilisés ont été préalablement filtrés, contrairement aux nôtres. En effet, la filtration a pu diminuer la présence de matériaux organiques (comme les algues), qui peuvent provoquer des interférences dans les réactions de photodégradation (Murgolo et al., 2015).

Un autre point intéressant est que les taux de photodégradation observés dans ces études pour l'eau pure sont plus faibles que dans les effluents de STEP. Ceci est expliqué par le fait que la photolyse indirecte est plus importante dans les effluents de STEP due à la présence de radicaux hydroxyles et de matières organiques à l'état de triplet excité (Ryan et al., 2011). Ce constat soutient notre conclusion que la photolyse indirecte est moins importante que la photolyse directe dans l'eau de rivière ou les concentrations en polluant sont généralement plus faibles que dans les eaux usées.

Table 1. *Constantes de dégradation et constante de photodegradation du SMX en trois matrices d'eau différentes.*

Matrices	Lumière naturelle			Obscurité			Constante de photo-degradation (h^{-1})
	Constante de dégradation de1^{er} ordre k (h^{-1})	R^2	$T_{1/2}$ (d)	Constante de dégradation du premier ordre k(h^{-1})	R^2	$T_{1/2}$ (d)	
Eau de rivière	0.0016	0.99	7.8	0.0003	0.99	41	0.0013
Eau pure	0.0228	0.98	0.25	0.001	0.73	12	0.0218
Eau chargée en ions	0.0006	0.73	20	0	-	-	0

Les concentrations pour l'eau chargée en ions ont été les suivantes, K : 34 mg L^{-1}, Cl^- :154 mg L^{-1}, SO_4^- : 31 mg L^{-1}, Na : 99 mg L^{-1} et Mg : 68 mg L^{-1}.

D'une manière générale, les résultats montrent que la photolyse directe peut jouer un rôle dans le devenir du SMX dans le site d'étude. Cependant, seulement 20% du SMX ont été photodégradés dans les eaux naturelles étudiées. Ainsi, le SMX pourrait être persistant dans les eaux « naturelles » de surface de la zone étudiée et cela même dans des conditions de rayonnement UV élevées.

2.3.2 Processus biotiques et impacts sur les communautés bactériennes.

2.3.3 Article 5 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats.

L'étude bibliographique nous a permis de constater les lacunes existantes ainsi que les points de vue divergents par rapport à la biodégradabilité des molécules antibiotiques, y compris celle du SMX. On a aussi constaté que les études de biodégradabilité dans les sols pour le SMX restent rares et sont parfois contradictoires. Certaines de ces études suggèrent que ce composé est faiblement biodégradé dans des conditions naturelles tandis que d'autres suggèrent que la biodégradation naturelle peut jouer un rôle important dans sa dissipation (Boreen et al., 2004; Cetecioglu et al., 2013; Ryan et al., 2011).

Dans ce contexte, je me suis intéressée dans ce chapitre à l'étude de la biodégradation du SMX dans les différents sols du BV du Katari. Toujours dans l'optique d'une étude au niveau BV, les essais ont été réalisés sur les 10 sols sur lesquels nous avons étudié la sorption et la mobilité de cette molécule.

Si d'une part les microorganismes peuvent jouer un rôle dans la persistance du SMX ils sont aussi la cible principale de ses impacts, du fait que le SMX est une molécule antibiotique. Ces impacts portent principalement sur la structure et la composition des communautés microbiennes mais aussi sur le développement de résistances. Cependant, les impacts des molécules antibiotiques dans l'environnement sont encore méconnus.

C'est pourquoi dans cette partie de la thèse une étude sur les impacts du SMX sur les communautés microbiennes a été couplée à l'étude sur sa biodégradabilité dans les sols.

Les résultats de l'article présenté ci-après montrent que le SMX peut être potentiellement biodégradé par voie microbienne dans la majorité des sols étudiés. Cependant le taux de biodégradation est très variable dans les sols étudiés, en relation principalement avec leur taux de matière organique.

Globalement, les impacts du SMX observés semblent être liés à la localisation et la texture des sols étudiés ainsi qu'à leur usage (sols de montagne, sols urbains ou sols agricoles) et à la pré-exposition des populations microbienne des sols à la présence de SMX. Ainsi, les impacts du SMX ont été plus forts dans les sols des zones peu ou pas urbanisées et pas ou peu soumises à une pollution par cette molécule. L'approche de séquençage haut débit utilisée pour évaluer l'impact du SMX sur les communautés microbiennes des sols s'est avérée bien plus sensible que les empreintes génétiques obtenues par DGGE. Nous avons ainsi pu montrer que l'ajout de SMX modifie la structure des communautés microbiennes de la plupart des sols (diversité et richesse) ainsi que l'abondance relative des bactéries des sols. Ainsi certains phyla tels que *Actinobacter* sont très sensibles au SMX au point de quasiment disparaitre dans les sols traités au SMX, contrairement au phyllum γ-*Proteobacter*, par exemple, peu affecté par l'ajout de SMX dans tous les sols, indiquant une résistance globale de ces bactéries à cet antibiotique.

L'effet du SMX sur le développement de résistances bactériennes à cet antibiotique dans les sols a été surprenant, étant donné que nous n'avons pas observé de développement de résistance au SMX dans les sols où les gènes n'étaient pas initialement présents. Bien que rassurants, ces résultats sont plutôt surprenants puisqu'ils suggèrent que la présence de SMX dans les sols n'induit pas d'augmentation de la concentration en gènes de résistance *sul*. Ceci indique que d'autres mécanismes de résistance au SMX moins spécifiques ont pu être mis en œuvre par les microorganismes des sols exposés à cet antibiotique.

2.3.4 Evaluation of Sulfamethoxazole biodegradation and impacts in soils of the Bolivian Highlands (Katari watershed).

Evaluation of Sulfamethoxazole biodegradation and impacts in soils of Bolivian Highlands (Katari watershed).

D. Archundia[a], F. Lehembre[a], J.M.F. Martins[a,b,*], M-C Morel[a,c], E. Vince[a] and C. Duwig[a,d].

[a] *Université Grenoble Alpes, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[b] *CNRS, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[c] *CNAM, Laboratoire d'analyses chimiques et bio analyses, Paris Cedex 3, France*
[d] *IRD, LTHE, F38000 Grenoble, France*

** Corresponding author: jean.martins@univ.grenoble-alpes.fr*

In preparation for Environmental Pollution Journal

ABSTRACT:
Processes controlling antibiotics (AB) environmental fate are not well known yet because many complex processes are involved such as sorption, complexation to trace metal elements, biotic or abiotic transformations... The presence of AB in soils can inhibit bacterial growth and induce the development of bacterial resistances. Sulfamethoxazole (SMX) is one of the sulfonamides most often detected in natural environments in relation with its poor metabolization in humans and animals and its molecular properties, which make it a mobile contaminant in soils. Little information is available about SMX biodegradation and impact in soils despite its wide detection in aquatic and terrestrial environment. The present study aims at advancing our knowledge on antibiotics biodegradation in soils, especially in high altitude ecosystems and to document their impact on soil microbial communities and their ability to induce resistance gene transfer in such environments. Our results obtained in ten soils of the Bolivian Altiplano demonstrated significant SMX dissipation in all soils in relation with SMX sorption, hydrolysis and specific biodegradation. SMX half-life was calculated in all soils and was shown to vary between 33 days (in SMX most contaminated soil) to 462 days (in an uncontaminated soil). No biotic degradation was observed in some soils of the watershed indicating potentially high persistence of this antibiotic. SMX impact in the soils was evaluated with DGGE fingerprints and high throughput sequencing (barcoding). DGGE results were less sensitive than sequencing, as the latter permitted to evidence deeper SMX impact on the diversity (Shannon and Simpson indexes) of microbial communities of all soils. In most of the tested soils the Actinobacter phylum showed high sensitivity to SMX pollution as it almost disappeared from SMX treated soils. Contrarily γ-proteobacteria abundance, remained almost unchanged, indicating a good adaptation of these bacteria to SMX. The monitoring of SMX resistance genes sul1 and sul2 revealed that soils contamination with SMX did not lead to the development of studied SMX resistance genes in any of the studied soils. These resistance genes were detected only in the soil that is regularly irrigated or flooded with wastewater from the water treatment plant of El Alto city, although SMX was detected at important levelss in 6 of the 10 tested soils. This work provides pioneering results on SMX biodegradation and impact in soils of high altitude (Bolivian Altiplano), which will help understanding the persistence, dissemination and impact of this antibiotic at a catchment scale

Keywords: *Sulfamethoxazole, soil, persistence, bacterial communities, DGGE fingerprints, Miseq, DNA barcoding, antibiotic resistance genes (ARGs).*

1 INTRODUCTION

Pharmaceutical products (PP) are considered as emerging contaminants as they have been detected in wastewaters worldwide only recently (Ternes, 1998; Gomez et al., 2007; Vieno et al., 2007; Miege et al., 2009; Suarez et al., 2012; Ay-din and Talini, 2013; Tewari et al., 2013). More specifically antibiotics are increasingly used worldwide for preventing and treating various diseases in humans or animals. In the 2000-2010 period human consumption of antibiotics increased by 36%, predominantly in developing countries (Van Boeckel et al.,

2014). The ecotoxicological impact of pharmaceuticals is quite well known (e.g. Kümmerer, 2009; Proia et al., 2013): pharmaceuticals and their metabolites have been shown to alter cell functions and gene expression (light sensitivity, allergic reactions, malformations…), to act as Endocrine Disruptors Compounds (EDC), and to lead to antibiotic bioaccumulation and to resistance in microorganisms. The drivers controlling the environmental fate of pharmaceuticals such as antibiotics at basin scale are conversely poorly documented because of the complex processes involving environmental and contaminant-specific properties such as sorption, complexation with trace metal elements and biotic or abiotic transformations. Due to their inherent antibacterial properties, antibiotics direct impacts are related to bacterial communities in soils or waters through the inhibition of bacterial growth, consequently affecting sensitive groups and promoting the development of antibiotic-resistant strains (DeVries et al., 2015; Martinez, 2009; Mojica and Aga, 2011). Moreover, bacterial resistance to antibiotics has become nowadays a central issue since it can lead to animal and public health problems (Mojica and Aga, 2011).

Sulfamethoxazole (SMX) is one of the most commonly detected antibiotic in natural environments (Alighardashi et al., 2008; Eurin et al., n.d.; Gibs et al., 2013; Giger et al., 2003; Hoa et al., 2011; Hu et al., 2010; Karthikeyan and Meyer, 2006; Kemper, 2008; Kim et al., 2011; Leung et al., 2012; Li et al., 2013; Martínez-Carballo et al., 2007; Michael et al., 2013; Tamtam et al., 2008; Zuccato et al., 2010). Duwig et al. (2014), have observed SMX concentrations of up to 14’624 ng L^{-1} in the surface waters of the Katari watershed.

In combination with trimethoprim (TMP) SMX is one of the most common prescriptions in human and animal therapy since the 1930’s. SMX belongs to the sulfonamide antibiotic family. Sulfonamides are poorly absorbed and metabolized in organisms, thereby between 50 to 90% of the administered dose is excreted in urine and feces as the unchanged parent compound (Mojica and Aga, 2011; Schauss et al., 2009).

Several studies have been conducted to understand the biodegradation of SMX in activated sludge (Collado et al., 2013; Drillia et al., 2005, 2005; Müller et al., 2013; Yang et al., 2011). However there is little information about its degradation and impact in natural environments. Srinivasan and Sarmah (2014) and Xu *et al*, (2011) suggested that natural biodegradation could play an important role in SMX dissipation in aquatic or terrestrial environments. Some studies have been carried out to understand the impact of SMX on the structure and functioning of bacterial populations (Collado et al., 2013; Demoling et al., 2009; DeVries et al., 2015; Johansson et al., 2014; Kor-Bicakci et al., 2014) as well as on the development and

spreading of antibiotic resistance within bacteria (Binh et al., 2008; Demoling et al., 2009; Goni-Urriza et al., 2000). Sulfonamide bacterial resistance is mainly mediated by genes "*sul*1", "*sul*2" and "*sul*3" (Perreten and Boerlin, 2003; Sköld, 2000). In particular,*sul*1 and *sul*2 genes have been found in large quantities in various matrices by some authors (Binh et al., 2008; Heuer et al., 2008).

This study is the first of its kind in high altitudinal soils and in the Katari watershed. Here we aim at advancing our knowledge about antibiotics biodegradation in high altitude soils and to document their impact on the structure of soil bacterial communities through DGGE fingerprinting and high throughput sequencing, as well as on the effect of antibiotic contamination on the dissemination of specific antibiotic resistance genes (ARG) as monitored by qPCR. The results were discussed in the light of field level of SMX concentration and soils physicochemical main properties.

2 Material and methods

2.1 Sampling, soil properties and SMX initial concentrations.

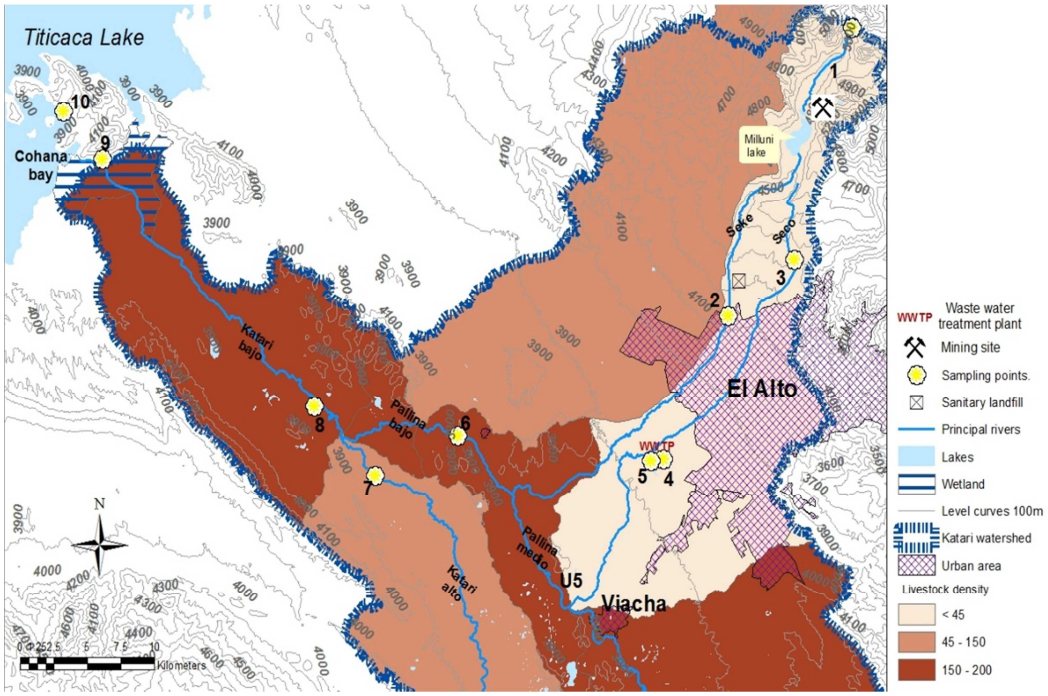


Figure 1. *Study site and location of studied soils.*

Composite soil samples were collected at ten different locations of the Katari watershed (Figure 1). For that the superficial layer (0-15 cm) was sampled with a spatula at 5 different points at a distance of 5 m in the same plot. Sampled different locations were: natural sites (soil 1), agricultural sites (soils 6, 7 and 8), urban soils (soils 4 and 5) and border of Titicaca

Lake (soils 9 and 10). Samples were sieved at <2mm and transported in plastic bags to LTHE Laboratory (France) at 4°C. Natural sites (soil1), agricultural sites (soils 6, 7 and 8), urban soils (soils 4 and 5) and border of Titicaca Lake (soils 9 and 10). Samples were sieved at <2mm and transported in plastic bags to LTHE Laboratory (France) at 4°C.

The main physicochemical properties of the ten studied soils are presented in (Archundia et al., in preparation). The SMX content of these soils was determined in (Archundia et al., inpreparation), initial concentrations varied between 0.5 and 18 ng L^{-1}.

2.2 The model antibiotic

Sulfamethoxazole (SMX) was chosen as model antibiotic molecule because it is largely used in human and animal treatments, and it has been widely detected in the environment. SMX (98% purity) was purchased from LKT Laboratories, Inc. A stock solution of SMX (1g L^{-1}) was prepared by dissolution in MeOH (HPLC grade) and stored at 4°C in an amber glass vial in the dark. SMX solutions were then prepared by dilution in ultrapure water obtained with a Millipore **Direct-Q 3** UV Water Purification **System.** Aqueous SMX solutions were then used to carry out the batch degradation experiments.

2.3 Chemical analysis

SMX concentrations were determined in liquid aliquots, collected at each sampling time, by HPLC equipped with a UV Detector (Spectra system UV 100, Thermo Separation Products) and a C-18 column (EC 125/3 NUCLEOSIL 100-5 C18, 5 µm). The detection wavelength was 260nm and the temperature was set at 40°C. The mobile phase was a mixture of Acetonitrile (15%), Methanol (15%), milli-Q water (70%) and formic acid (0,02%) at a flow rate of 0.8 ml min^{-1}. ***HPLC grade Methanol and Acetonitrile were purchased from Carl ROTH Ltd (France). CaCl2*** and formic acid were purchased from Sigma Aldrich. The total duration of SMX analyses for each sample was 10min and injection volume was 100µL (in triplicate). Quantification was performed using external calibration and peak area measurements (Detection limit (LD) was 0.15 mg L^{-1}; Quantification Limit (LQ) was 0.5 mg L^{-1}).

2.4 Experimental design.

Biodegradation experiments were performed within the two months following soil sampling. The experiments were performed in 250ml glass bottles with soil slurry using the procedure described by Martins and Mermoud 1998. Briefly, Tree different treatments were performed in duplicate: i) Non-sterile soils with sterile water (NS-C), used as blanks ii) Sterile soil with SMX (S-SMX) used to evaluate SMX abiotic degradation and sorption ii) and iii) Non-sterile

soils with SMX (NS-SMX). In the two last conditions, SMX initial concentration was set to~ 25 mg L-1. SMX Concentration was chosen to properly differentiate between sorption and biodegradation process. The most adequate soil / solution ratio was determined (preliminary tests, data not shown) and set to 1:10. Soil solution ionic strength was set constant in all conditions by adding appropriated amounts of $CaCl_2$ 1,1 g L^{-1} with an equilibration time of 12h. Additionally, batches with 200ml of SMX solution (duplicate, same ionic strength and SMX concentration) were incubated in the same conditions to account for SMX hydrolysis. Sterile soils were obtained by two consecutive autoclaving at 121°C and 1 bar for 1.5h. Sterility was verified by bacterial plate counts of soil aliquots using Luria-Bertani agar plates.
The soil batches were obtained by placing 20gr of soil in glass flasks closed with cotton rubbers, in equilibrium with $CaCl_2$ (1.1g L^{-1}) solution and spiked with appropriated amounts of water (controls) or SMX solutions. Batches were incubated for 3 months under agitation at 350 rpm in the dark at constant temperature (20°C ± 2). At times 0, 1, 2, 5, 7, 15, 20, 33, 60 and 90 days, 1.5ml of soil slurry was collected in all batches and centrifuged to separate solid and liquid phases. The supernatant of each sample was stored at -20°C until analysis.-

2.5 SMX impact on soil bacterial communities.

SMX impact on soils bacterial communities was studied only in soils 1, 4, 5, 8 and 10 by applying DGGE, pyrosequencing and qPCR techniques. Soil samples were collected in duplicate from the NS-SMX soils and Control soils at times 1, 7, 30, 60 and 90 days. To evaluate SMX impact these samples were compared to untreated soils samples (T0). DNA was extracted from soil samples using the FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) following the manufacturer's protocol. Crude DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis (1%) by comparison with a calf thymus DNA range (Biorad France) and UV visualization of the ethidium bromide stained gels with a Molecular imager Gel Doc™ XR (Biorad) device.

2.5.1 *16S rDNA amplification for DGGE analysis.*

Changes on soil microbial diversity were assessed using the 16S rDNA gene. 16S rDNA PCR amplification was carried out with the pair of primers 515F-GC and 806R (Caporaso et al., 2012). It allows amplifying the V4 hypervariable region of 16S rDNA. A GC clamp of 40pb (CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG) was added to the extremity 5' of the forward primer (F). Amplification was performed using a C1000 thermal cycler (Biorad France). PCR mixture (25µl) was prepared with 13.25 µL of sterile

filtered milliQ water, 5 µL of Taq buffer 5X PCR Green GoTaq® Flexi (Promega), 2 µL of $MgCl_2$ (25mM), 2 µL of dNTP (2,5 mM), 0,5 µL each primer (10µM), 0,625 µL of bovine serum albumin (10 $mg.mL^{-1}$), 0,125 µL of GoTaq® Flexi DNA Polymerase ($5U.\mu L^{-1}$) and 1µl of DNA. PCR program was as follows: 1) denaturing step (94 °C for 3 min), 2) 29 amplification cycles each one composed of: denaturing step (94 °C for 45 sec), annealing (50 °C for 1 min) and extension (72 °C for 1 min 30 sec), 3) final extension (72 °C for 10 min). Amplification products were checked by agarose gel electrophoresis (1%) in 1× Tris–Borate–EDTA buffer by comparison with a calf thymus DNA range (Biorad) and UV visualization of the ethidium bromide stained gels whit a Molecular imager Gel Doc^{TM} XR (Biorad) device.

2.5.2 *DGGE analysis.*

16S rDNA PCR products (~ 300 ng) were loaded into a polyacrylamide gel (10%) with a denaturing gradient of 45 to 60%. They were electrophoresed for 16 h at 60V in TAE buffer 1X (40mM Tris, 20 mM sodium acétate, 1 mM EDTA) at 60°C using the DCodeTM Universal Mutation Detection System (BioRad). The gel was stained by SYBR Gold (Invitrogen) 1/10000 (v/v) for 30 min in the dark. Finally the developed gel was scanned using a Molecular imager Gel Doc^{TM} XR (Biorad) device. Banding patterns of obtained DGGE profiles were analyzed by Quantity One version 4.6.9 software (Bio-Rad). The background of the gels was subtracted by the "rolling ball" algorithm with a radius of 50 pixels.

Similarity dendrograms (clustering based on the Pearson correlation coefficient) by the Agglomerative hierarchical clustering (AHC) method were performed in basis of a binary matrix representing the presence or absence of a band using the XLSTAT 2014.4.10 software with samples at 1, 7 and 30 days of contact with SMX.

Similarities were also studied by the comparison of different parameters calculated from DGGE profiles measured at T0 and 30 days after SMX spiking: diversity index (Shannon, Simpson's) and Richness. Richness estimation was based on the total number of DNA bands in DGGE profiles, since each band is likely to be attributed to a single phylogenetically distinct population. Diversity indexes (Equations 1, 2 and 3) were calculated on the basis of the bands detected and their relative intensity, which was calculated from the peak area of densitometric curves:

Shannon index (H '):

$$H' = - \Sigma p_i \ln p_i \quad (1)$$

where p_i is the proportion of intensity of each band.

Simpson's reciprocal index (D'):

$$D'=1/D \quad (2)$$

where D is the Simpson's index calculated as follows:

$$D= \Sigma p_i \quad (3)$$

2.5.3 *Pyrosequencing and bioinformatic analysis.*

Based on the DGGE results, only T0 and T30 samples of all conditions were analyzed by high throughput sequencing to evaluate SMX impact at the microbial community level, i.e. the shifts in the structure of bacterial communities.

The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using bacterial universal primers V3F (CCTACGGGNGGCWGCAG) and V4R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) with an eight-base sequence unique to each sample as a barcode and a 28 bp Illumina adapter. The amplification program consisted an initial denaturation step at 94°C for 1 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 65°C for 1 min and 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 10 min. PCR reactions were performed in triplicate 25 µL reaction system containing 2.5 µL 10X PCR Buffer, 2 µL of dNTPs (25 mM), 0.5 µL of each primer (10 µM), 0.125 µL of MTP Taq DNA polymerase (Sigma) (5U/µL), 0.625 µL of BSA (10 g/L), 0.125 µL of DMSO and 10 ng of template DNA. Amplicons of each replicate were pooled in equimolar and paired-end sequenced (2 x 300) on an Illumina MiSeq platform (GenoToul, INRA) according to the standard protocols.

Paired sequences datasets were processed with QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) software. First, a demultiplexing and quality filtering step were carried out as described (Bokulich et al., 2012). Then, all of the sequences of around 460 bp were clustered into OTUs at 97% sequence similarity using the UCLUST method (Edgar, 2010). A single representative sequence from each clustered OTU was used to align the Greengenes database (version gg_13_8) (De Santis et al., 2006). Taxonomic classification for each OTU was determined with RDP Classifier (Wang et al., 2007) using a minimum confidence cut off of 0.8. OTUs represented by rare sequences (fewer than 0.005% across all samples) were excluded from further analysis. Phylogenetic trees were generated and visualized using FastTree. Alpha diversity was evaluated through rarefaction curve, species richness, evenness and Shannon and Simpson diversity indices. Beta diversity was evaluated with weighted Unifrac distance matrices (Lozupone and Knight, 2005) and jackknifed principal coordinates were computed to compress dimensionality into two-dimensional principal coordinate

analysis plots. Alpha and Beta diversity analyses were conducted after first normalizing the filtered OTU table to the smallest dataset in the study.

2.5.4 *Evaluation of SMX contamination effect on SMX resistance genes concentration in soils*

qPCR assays were employed to determine the prevalence of SMX resistance genes (RGs) in the bacterial communities of the studied soils, following the procedure described by Heuer et al., (2008) and Heuer and Smalla, (2007). Targeted ARG's were sul1 and sul2. qPCR was performed at 30, 60 and 90 days after SMX spiking in soils. sul1 and sul2 genes were quantified in triplicate using a CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) after labeling with the fluorescent dye SYBR-Green I. The real-time PCR primer sets used are listed in Table 1.

Table 1. Real-time PCR primers sequences.

Name	Sequence (5'- 3')	Tm (°C)	Size (pb)	Reference
sul1	Sul1-653F-CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	60	67	Heuer and Smalla, (2007)
	Sul1-719R-TTGCCGATCGCGTGAAGT			
sul2	Sul2-595F-CGGCTGCGCTTCGATT	53	60	Heuer et al, (2008)
	Sul2-654R-CGCGCGCAGAAAGGATT			

The reactional medium was of 20 µl containing 10 µl of SsoADV Univer SYBR Green Supermix 200 (Bio-Rad), 0.5 µl of each primer, 1 µl of template, and 8 µl of H2O. The thermocycler was programmed for 10 min at 95 ◦C, followed by 40 cycles of 15 s at 95◦C, 60s at the annealing temperatures (60°C for sul1 and 53°C for sul2 and 16S Rrna. The product specificity was confirmed by melting curve analysis (5sec at 95°C and 1 min. 65°C – 97°C). Calibration curves were generated with plasmids carrying target genes: sul1 and sul2. Plasmids were generated using the PROMEGA pGEM®-T easy vector systems method (ref. A1360) with laboratory Escherichia coli (commercial competent cells pGEM®-T) harboring the recombinant plasmids. For that 2µl of plasmid were put in contact with 50µl of e. coli cells, the mix was incubated in glass for 20min and subject to a heat shock at 42 °C for 45-50sec and maintained in ice for 2min. Then, 950µL of Super Optimal Broth medium (SOC au) were added to the reactional medium at room temperature and incubated for 90 min. at 37 ° C in agitation at 150rpm. E. coli cells were grown in LB liquid medium in the presence of

kanamycin (50 ng µL-1) as selective element of kan-resistant plasmid at 37 °C for 3hr. Then chloramphenicol (170µg/mL) was added to improve amplification of the plasmid in the cells. Transformed cells were aliquoted in 15-30% glycerol and stored at -20°C for further use. To express results, quantities of resistance genes were normalized to the 16S gene copy number. The qPCR efficiencies were between 90 and 102%, the R^2 values were between 0.98 and 0.99 for all calibration curves.

2.6 Statistical analysis.

The statistical significance of differences of structural parameters and diversity indexes (calculated from DGGE fingerprints and high-throughput sequencing) between treatments was tested by analysis of variance (ANOVA) and the differences between calculated means tested by paired multiple comparisons with the Bonferroni correction (n=2). Differences on taxonomic composition of microbial communities were studied. Statistical significance was determined at the confidence level of 0.05. The environmental and microbial variables were statistically confronted by applying Pearson's correlation coefficient. All tests were performed with the statistical software R 3.1.1.

3 Results and discussion

3.1 Microbial degradation kinetics and SMX biodegradation capacity of soils.

A sorption kinetic study (Archundia, in preparation) revealed that SMX sorption equilibrium occurred with 6h after SMX addition in studied soils, being in agreement with previous studies (Srinivasan et al, 2014). Important and variable initial decreases of SMX concentration were observed in all soils. This is commonly attributed to chemical sorption to soil constituents (varying mostly with the total soils organic carbon and iron oxides contents) but not to degradation. Because of their antibiotic activity, sulfonamides antibiotics (including SMX) was shown to be poorly biodegraded in the first 12 hours following their application to soil (Yang et al., 2011) presumably because their biodegradation requires a prior adaptation of the microbial community. To facilitate the determination of degradation rate constants, the first 24h of the degradation kinetics were thus not considered.

Consequently, biodegradation kinetics were initiated 24h after SMX spiking, in order to allow bacterial communities to adapt to SMX and to allow prior degradation of more readily biodegradable substances, which could cause competitive inhibition on xenobiotic oxidation.

SMX abiotic degradation (hydrolysis and chemical degradation) was evaluated similarly in sterile soils.

Figure 2 presents SMX degradation kinetics in sterile and Non-sterile systems. All these kinetics were well described with a first order kinetic equation, which is often used for describing organic pollutants dissipation in soils (Martins and Mermoud, 1998).

Globally the coefficients of determination (R^2) were good and ranged from 0.7 to 0.96 (Table 2) and from 0.82 to 0.99 (Table 2) in sterile and non-sterile conditions, respectively. This is in agreement with Xu et al., (2011) who showed that SMX biodegradation was well described with a first order decay model.

SMX microbial degradation rate constants were determined from the difference between experimental data obtained in sterile and non-sterile soils (Zhang et al., 2012). Microbial degradation rate constants vary strongly among the studied soils (Table 2 and Figure 2). They ranged between 1E-03 and 1.4E-02d^{-1} (Table 2).

These values are lower than those obtained by Zhang et al., (2012) for ciprofloxacin antibiotic on soil, indicating that SMX is more persistent with regard to soil biodegradation.

Biodegradation of SMX was evidenced in soils 2 to 10 as the degradation rate constants were higher in non-sterile than in sterile systems. Indeed, calculated SMX half-lives were always higher in sterile soils (Table 2), varying between 50 to 1486 days. In soil 1 the microbial degradation rate constants were identical in both conditions. That shows that in soil 1 SMX degradation is mostly abiotic and indicates that its microbial community is poorly adapted to SMX biodegradation.

This is consistent with the absence of historical use of SMX (Archundia et al., in preparation) in the soil 1 area (SMX was not detectable). In this soil, SMX dissipated almost completely within 90 days in both soil conditions.

Soil 4 show the highest microbial degradation rate according to highest %OC (10.3) and highest initial SMX concentration (18 µg kg^{-1}). Soils 2 and 3 also showed highest microbial degradation rate constants, according also with higher organic carbon contents 4 and 7.3% respectively than other soils (OC%<2).

Figure 3 shows the relation between microbial degradation constants and organic carbon contents. The percentage of organic carbon is well correlated with microbial degradation rate constants with exception for soil 1 (R^2 = 0.9, without soil 1).

Figure2. *SMX degradation kinetics in soils (in sterile and Non-sterile soils). Circles refers to sterile soils (mean of duplicates), Triangles refers to Non-sterile soils (mean of duplicates). Line refers to linear model fitting.*

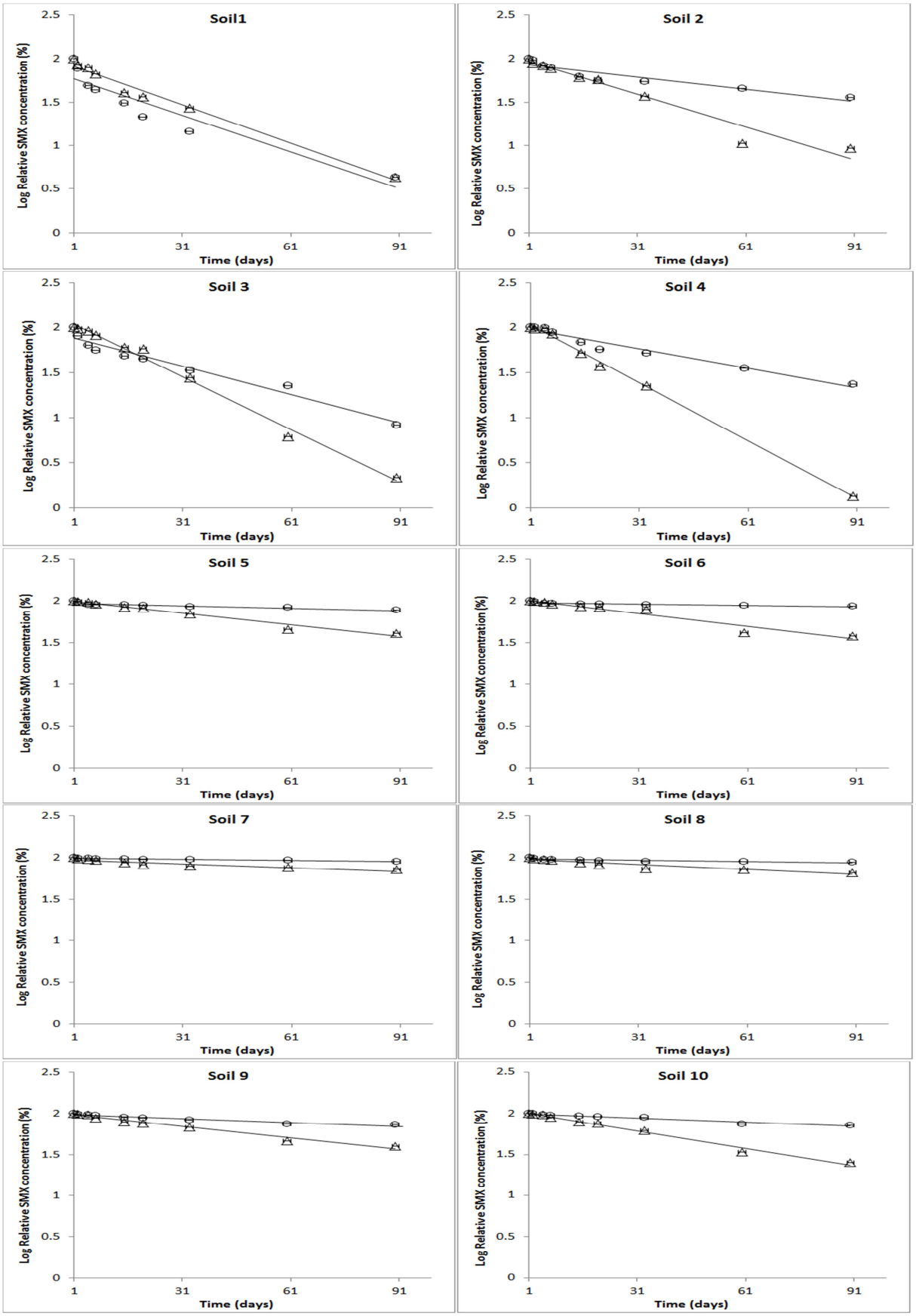


Table 2. *Kinetic parameters of SMX degradation in soil.*

	Soil	First-order rate constant k (d^{-1})	R^2	$T_{1/2}$ (d)		Soil	First-order rate constant k (d^{-1})	R^2	$T_{1/2}$ (d)	Microbial degradation rate constant (d^{-1})
Sterile soils	**1**	1.40E-02	0.9	50	Non-sterile soils	**1**	1.40E-02	0.9	50	-
	2	4.70E-03	0.86	147		**2**	1.20E-02	0.95	58	6.60E-03
	3	1.04E-02	0.96	67		**3**	1.95E-02	0.99	36	9.10E-03
	4	7.20E-03	0.96	96		**4**	2.13E-02	0.99	33	1.40E-02
	5	1.00E-03	0.81	693		**5**	4.00E-03	0.97	173	3.70E-03
	6	6.00E-04	0.7	1155		**6**	5.20E-03	0.94	133	4.80E-03
	7	5.00E-04	0.95	1386		**7**	1.50E-03	0.82	462	1.00E-03
	8	5.00E-04	0.71	1386		**8**	2.00E-03	0.88	347	1.40E-03
	9	1.50E-03	0.91	462		**9**	4.60E-03	0.97	151	2.90E-03
	10	1.70E-03	0.96	408		**10**	7.10E-03	0.98	98	5.30E-03

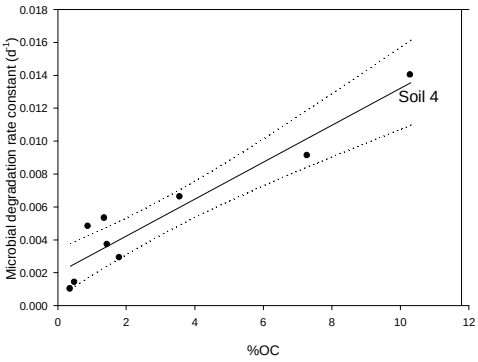


Figure 3. *Relationship between Microbial degradation rate constant (d^{-1}) and soils organic carbon content. Dotted lines represents 95% confidence interval. Soil 1 was excluded because the Microbial degradation rate constant was the same for sterile and non-sterile systems.*

This suggests that high OC content in soil enhance antibiotic biodegradation probably in relation with the higher microbial activity (except for soil 1, in which no biotic degradation was observed). The important SMX contamination of soil 4 also probably favored microbial community pre-adaptation and so SMX degradation (lowest persistence). These results are in agreement with Xu et al., (2011) who showed that SMX biodegradation was significantly increased when increasing humic acids content in a water-sediment system of a natural river. Our results show that OC-rich soils present important antibiotic degradation capacities although SMX is not completely degraded, as important SMX residues were detected in field collected soils (Archundia et al., in prep.).

Even if SMX biodegradation was evidenced in most of the studied soils (except soil 1) biodegradation of SMX can be considered as low since microbial degradation constants were low. This is consistent with other studies that found that SMX is persistent in soils (Alexy et al., 2004; Xu et al., 2011). Srinivasan and Sarmah, (2014) observed SMX half-lives between 4.3 and 13.3 in pasture soils from New Zealand. The half-lives measured in this study non-sterile soils were all higher (between 33 and 462 days) than these values.

Moreover, used experimental batch conditions may lead to an overestimation of biodegradation rates. In fact, the continuous agitation of the medium enhances the accessibility of bacteria to SMX and allows greater ventilation contributing to the sustainability of the biodegradation system. The analytical method used could also induce an overestimation of biodegradation rates because it does not allow us to differentiate between a partial or total SMX degradation.

Altogether our results show that SMX is degraded through both biotic and abiotic processes in all soils of the studied site but remains significantly persistent especially under in-situ conditions and in soils which have never been polluted with this antibiotic.

Altogether our results show that SMX is degraded through both biotic and abiotic processes in all soils of the studied site but remains significantly persistent especially in soils which have never been polluted with this antibiotic.

3.2 SMX impact on soil biodiversity measured.

3.2.1 SMX induced shifts in the structure of soil bacterial communities.

DGGE fingerprints and high-throughput sequencing of PCR-amplified 16s rRNA, *sul1* and *sul2* products were used to evaluate the major changes in bacterial communities structure induced by SMX one month after spiking. .

The analysis of microbial biodiversity shifts revealed by DGGE fingerprints permitted to show that SMX contamination had globally low impact on soils microbial structures as the statistical analysis of these data revealed that SMX impact on soil microbial community was significant only in soil 1. Diversity index and richness parameters calculated from DGGE fingerprints are presented in Table 3. In soil 1 SMX impacted both the richness and diversity (Shannon and Simpson indexes) of microbial community with significant differences in microbial communities between times 0 and 30 days after contamination (p-value: richness (0.00635), Shannon (0.002.58), Simpson (0.016)). These results are confirmed by the significant difference of biodiversity indexes measured in the control and SMX contaminated

soils at T30 (p-value: richness (5.30E-06), Shannon (4.60E-05), Simpson (1.90E-04)). In the other soils no significant differences between treatments were observed. Similar results of SMX impact have been observed by Collado et al., (2013) through a DGGE approach in activated sludges.

A cluster analysis of all soils results was performed and presented in a dendrogram form (SI.I). Even if the statistical analysis of calculated index by DGGE was significant only in soil 1, dendogram revealed also impacts for soils 5, 8 and 10.

As expected, dendogram of soil 1 revealed an immediate impact of SMX as the microbial community structure was shifted one day after SMX spiking. 30 days after SMX contamination all SMX samples were grouped separately from control and T0 samples, indicating an important impact of SMX on the bacterial community structure in this soil. The separation of control samples measured after 1 and 7 days could be attributed to bacteria community adaptation of experimental conditions.

SMX impact on the microbial communities of soils 5 and 8 remained clearly visible until 30 days, as the corresponding samples (30SMX) appeared apart from the other samples, which were all grouped. In soil 10 an impact of SMX is visible only until 7 days (7SMX). No SMX effect was detected by clustering in soil 4 (all samples are grouped). Using DGGE fingerprints Zhang et al., (2014) also showed inhibitory effects of SMX (as co-pollutant of estrone and17β-estradiol) on the presence of some bacterial species.

Results obtained with high throughput sequencing were much more sensitive than DGGE and permitted to show variable impact of SMX in the different soils. For each soil, 5 000 to 18 000 filtered and high quality sequences were obtained per sample. Rarefaction curves are shown in SI.II. The bioinformatics analysis of these sequences permitted to calculate several parameters describing the microbial diversity of each soil sample (Table 3).

In Soil 1 a significant decrease in equitability (p-value: 5.8E-04), Shannon (p-value: 3.5E-03) and Simpson (p-value: 8.4E-03) was observed between T0 and T30, thus confirming the results obtained by DGGE. Soil 8 showed similar significant changes in biodiversity: equitability (p-value : 7.2E-04), Shannon (p-value: 8.2E-04) and Simpson (p-value: 1.2E-03)). In soil 4, SMX contamination did not modify significantly microbial community equitability, richness (p-value: 6.7E-03), Shannon (p-value: 2.8E-02) and Simpson (p-value: 8.2E-03) indexes at time 30 days. Soil 5 not present statistically significant variations in biodiversity. Finally soil 10 equitability, richness and Shannon and Simpson indexes decreased significantly between T0 and 30 days. These results are in agreement with the work of

Demoling et al., (2009) who also observed SMX impact on the structure of soil bacterial communities of manure amended soils 2 and 5 weeks after exposure to to 20 and 500 mg kg^{-1} SMX .

Table 3. *Structure microbial community parameters and microbial diversity index of different studied soils and treatments calculated by the means of DGGE and sequencing analysis results. T0: initial soil sample without any treatment. 30C: 30 days control soils. 30SMX: 30 days SMX soils.*

		DGGE			Miseq			
Soil	**Sample**	**Richness**	**Shannon**	**Simpson**	**Equitability (Evenness)**	**Richness**	**Shannon**	**Simpson**
1	**T0**	26	3.13	19.58	0.86	1245.5	6.10	129.7
	30C	34	3.40	26.09	0.80	1005.0	5.54	64.9
	30SMX	21	2.76	12.16	0.63	788.5	4.22	11.8
4	**T0**	32.5	2.91	11.41	0.86	1322.5	6.16	211.4
	30C	28.5	2.93	14.30	0.80	1126.1	5.62	63.0
	30SMX	30.5	2.83	10.91	0.77	980.3	5.33	67.9
5	**T0**	37	3.50	28.82	0.88	1114.5	6.16	190.9
	30C	42	3.59	30.59	0.89	1303.0	6.38	219.7
	30SMX	37	3.52	30.57	0.88	1185.0	6.22	198.0
8	**T0**	27	2.81	9.78	0.88	1795.0	6.62	277.5
	30C	26.5	2.66	9.52	0.89	1726.0	6.64	323.4
	30SMX	23	2.56	8.43	0.80	1306.0	5.74	72.2
10	**T0**	45	3.39	18.64	0.88	1504.0	6.41	238.1
	30C	34.5	3.15	15.91	0.89	1608.5	6.53	293.3
	30SMX	34.5	2.99	12.06	0.82	1150.5	5.81	97.2

As demonstrated previously DGGE is much less sensitive than high throughput sequencing for evaluating chemicals impact in soils. This relates to the difficulty of separating by DGGE DNA fragments which have low amount of sequence variation and to the limitation in the maximum number of visible different DNA fragments, which can be separated or also to the co-migration of DNA fragments. In addition, several studies have revealed that PCR-DGGE is often limited to the detection of dominant species (Boon et al., 2002; Hoshino and Matsumoto, 2007; Sigler and Turco, 2002). Consequently, our results suggest that in soils 4, 5, 8 and 10 the dominant soil bacterial species successfully tolerate important SMX concentrations.

In addition, a rarefaction analysis was performed to compare observed species richness between treatments and to identify whether a sample was unequally sampled. Rarefaction curves are shown in SI.II. Most of rarefaction curves approached a plateau or were asymptotic, only T0b rarefaction curve for soil 5 was truncated in reason of the limited number of sequences obtained. Rarefaction analyses showed that sampling of microbial

populations was globally adequate and confirms the quality of obtained DNA sequences and bioinformatics analysis. Regarding SMX impact on species richness once again microbial populations of soil 5 don't appear to be affected.

Altogether these results permitted to show that the impact of the antibiotic SMX in soils of the bolivian altiplano is strongly controlled by the historical use of SMX (pre-adaptation of microbial populations to SMX) and by the provenance of the soils with clear distinction between agricultural (soils 8 and 10), pristine (soil 1) or urban soils (soils 4 and 5). Soil 1, not initially polluted by SMX and originating from a natural mountain area, was is the more sensitive to SMX contamination as evidenced with both DGGE and metabarcoding approaches. Agricultural soils (8 and 10), which present in the field intermediate SMX concentrations (0.5 and 1.3µg kg^{-1}, respectively) were slightly but significantly impact by SMX, as evidenced only by the DNA sequencing approach, indicating also that SMX impact preferentially poorly dominant bacterial species undetectable by the DGGE approach. Finally soils 4 and 5 presenting initial SMX concentrations of 0.6 and 18µg kg^{-1} respectively and originating from urban areas were insensitive to SMX spiking, probably in relation with well adapted soil microbial community.

3.2.2 SMX impact on the taxonomic composition of soil microbial communities.

Pyrosequencing of the 16srDNA genes was performed to explore the bacterial phylogenetic structure of initial soil (T0), control (30C) and SMX polluted (30SMX) soils 30 days after contamination. Figure 4 presents the relative abundance of bacterial phyla in all soils at T0 and T30. At T0 the dominant phyla were *Actinobacter* and *Proteobacter* in all studied soils. Within *Proteobacter* the most dominant classes were α, ß and ɣ-*proteobacteria*, while within *Actinobacter*, *actinobacteria*, *acidimicrobiia*, and *thermoleophilia* dominated

In soils 1 and 8 the phylum *Proteobacter* was dominant and presented relative abundances of 38 and 25.4%, respectively. Within the *Proteobacter*, ß-*proteobacteria* was the most abundant class in soil 1 (35.3%) and α-*proteobacteria* the most abundant in soil 8 (60.4%). In these two soils the second dominant phylum was *Actinobacter*, with a percentage of 24.5 and 22, respectively. *actinobacteria* is the most dominant class in the *Actinobacter* phylum (soil 1: 62.8% and soil 8: 63%), while *thermoleophilia* is the second most dominant class (soil 1: 22% and soil 8: 16.5%).

The microbial community of soils 4 and 5 was dominated by *Actinobacter* with relative abundances of 35 and 32.5, respectively and the second more abundant phylum was *Proteobacter* with 29.2 and 26 %, respectively. Within *Actinobacter* the most dominant class

was *actinobacteria* with 88 and 63%, respectively, while the most dominant class of *Proteobacter* was α-*proteobacteria* in both soils (soil 4: 56% and soil 5: 62.5%). In soil 10, the *Actinobacter* and *Proteobacter* phyla were present in similar proportion of 27.4 and 26.2, respectively.

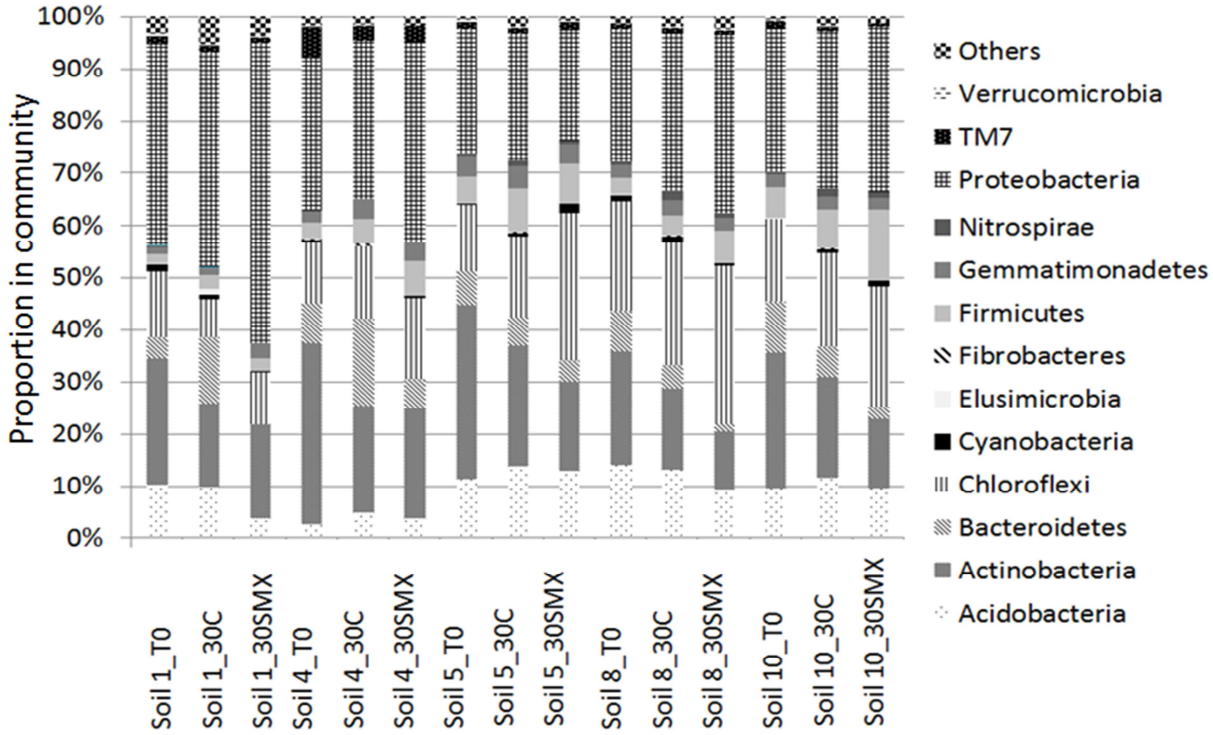


Figure 4. *Average proportions (n=2) of bacterial phyla in studied soils and different treatments (30C: 30 days control soil, 30SMX: 30 days SMX soil, T0: initial soil sample without any treatment).*

In control soils 1, 5 and 10 no variation in the relative abundance of dominant phyla was observed between T0 and T30 showing the absence of incubation effect on the microbial community structure contrarily to what was observed in soils 4 and 8. In soil 4 *Proteobacter* became the dominant phylum while in soil 8 *Proteobacter* remained dominant and *Chloroflexi* increased and became the second more abundant phylum (Fig. 5), probably in relation with its antibiotic resistance capacity.

For the same reason *Chloroflexi* abundance increased (14.7%) in soil 5 while *Proteobacter* remained almost constant (26 and 21.2 at T0 and T30, respectively).

Globally the *Actinobacter* phylum abundance decreased in all SMX polluted soils, as well as the less dominant *Bacteroidetes* class.

These results are consistent with observations made by Collado et al., (2013) who studied the effects of SMX on the bacterial communities of activated sludges. These authors observed that *Proteobacter* presented no susceptibility to SMX while *Actinobacter* became

undetectable after 2 months exposure to SMX. The increase of *Chloroflexi* in soil 5 probably relates to the important initial concentration of SMX (T0) which may have shifted the soil bacterial community to a higher tolerance to this antibiotic.

In SMX-treated soils we observed an increase of the abundance of *Proteobacter* between T0 and T30 in soils 1 (18%), 4 (7.8%), 8 (9.3%) and 10 (5.9%), α-*proteobacteria* being the most represented class (~68-90%). In all SMX polluted soils ß-*proteobacteria* decreased drastically after 30 days of exposure to SMX (13.6 to 35.2 % at T0 compared to 3.2 to 13% soils, while ɣ-*proteobacteria* abundance remained almost constant. Collado et al., (2013) has observed an increase of ɣ-*proteobacteria* after exposure to SMX in activated sludges. Unchanged proportions of ɣ-*proteobacteria* could relate to the fact that some species belonging to ɣ-*proteobacteria* (such as *Thiothrix sp.*) are known to degrade Sulphur containing compounds (Rossetti, 2003; Williams and Unz, 1985). The presence of efflux pumps systems, which are particularly prominent within *proteobacteria* phylum, could also be responsible of observed unchanged proportions (Anes et al., 2015; Hassan et al., 2015).

The order *Rhodocyclales* of the ß-*proteobacteria* class completely disappeared in SMX treated soils suggesting that these bacteria are vulnerable to SMX pollution. This is in disagreement with Collado et al., 2013 and Kanagawa et al., 2000, who reported *Rhodocyclales* increase after SMX pollution and suggested that this group has enhanced resistance to antibiotics.

Figure 5 shows a cluster tree representing the microbial communities of the different soils and treatments. We can observe that soils 1, 4 and 5 are well separated while soils 8 and 10 are mixed indicating very similar microbial communities and response to SMX exposure. Figure 5 confirms the clear impact of SMX pollution on soils 1, 5, 8 and 10 (all 30SMX samples are grouped). In soil 4 the effect was less clear as control samples are mixed with SMX polluted samples.

Diversity index and cluster tree (UPGMA-UniFrac) results did not lead to the same conclusions about the impact of SMX on bacterial community of soil 5. Thus, diversity indexes show that soil 5 was not impacted, while the constructed cluster tree shows the opposite. These contradictory results are linked to the inherent method differences. The UPGMA-UniFrac method is a β-diversity measure (measuring the partitioning of biological diversity among communities or along an environmental gradient) whereas diversity indexes measure the α-diversity (diversity within the community) (Lozupone and Knight, 2005; Chang et al., 2011). The cluster tree UPGMA-UniFrac method seems to be more accurate to

detect differences between communities as it incorporates information on the relative relatedness of community members by incorporating phylogenetic distances between observed organisms in the computation (Lozupone and Knight, 2008).

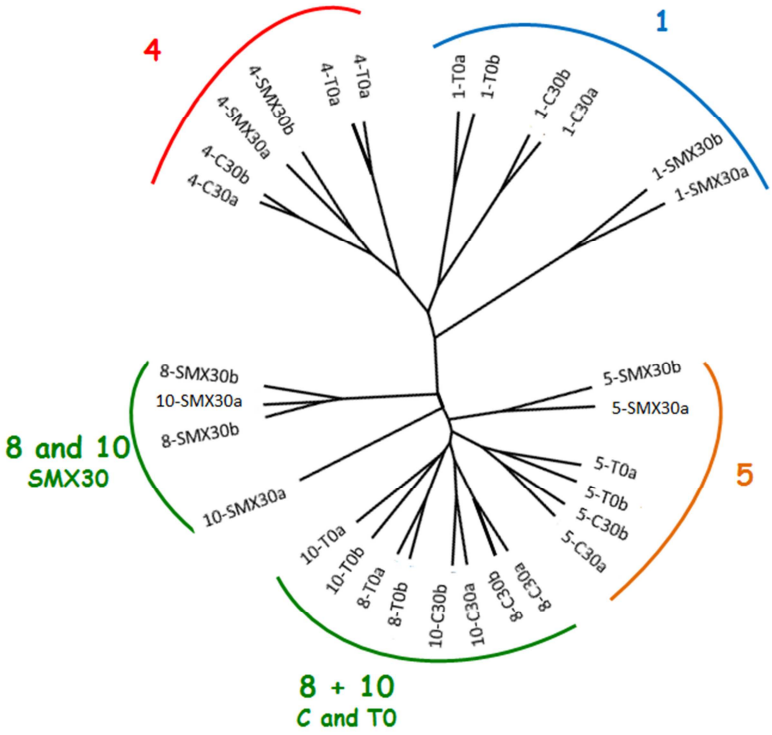


Figure 5. *Cluster tree of different soil microbial communities obtained with the UPGMA algorithm (pondered UNIFRAC). Numbers refers to different soils. C30 refers to 30 days control soils. SMX30 refers to 30 days SMX soils. a and b refers to duplicates.*

3.3 Presence and evolution of SMX resistance genes.

SMX resistance genes *sul1* and *sul2* were only detected in soil 4, which was sampled near the Puchucokollo waste water treatment plant (WWTP). The presence of bacterial DNA in all samples was confirmed by the amplification of 16s rRNA gene. qPCR efficiencies for *sul1* and *sul2* genes in soil 4 were 98.3% and 96.5%, respectively and correlation coefficient R^2 were 0.99 for both genes, confirming the quality of the measurements. This could be related with limiting high altitudinal conditions (drastic diurnal physicochemical variations and dryness).

Figure 6 shows the temporal evolution of the copy number of SMX resistance genes in soil 4. As expected, we can observe that the number of genes decreases in the control from 0 to 90 days. On the contrary, in the SMX polluted soil the copy number of both studied genes increased drastically after 30 days compared to the initial soil sample (T0). Number of genes tends to decrease after 30 days and remained at the same level of initial soil sample (T0) after

90 days. Thus indicating a certain resilience of soil after SMX full dissipation, even if resistance genes not disappear completely.

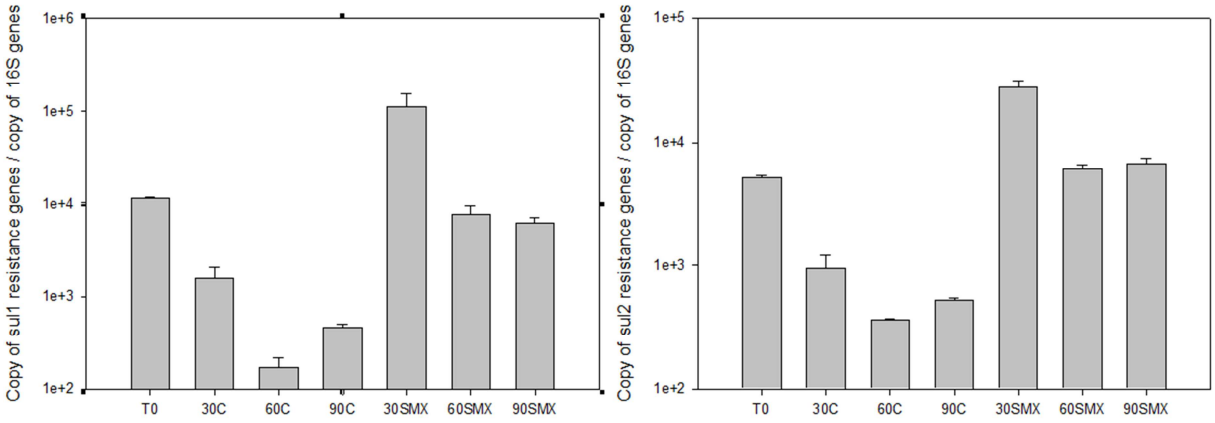


Figure 6 *Temporal evolution of the copy number of SMX resistance genes normalized by the number of 16S rRNA gene in Soil 4. Standard deviations were calculated with triplicates*

Soil 4 is the closest to the WWTP. The presence of sul1 and sul2 SMX resistance genes can be explained by the continuous discharge of waste waters at this sampling point, which are responsible for the dissemination of significant amounts of SMX and consequently of associated bacteria harbouring SMX resistance genes. This happens during the wet season when the treatment plant capacity is exceeded and also when local population illegally deviates waste waters from the entry of the WWTP for irrigating crops.

Such localized SMX pollution has not yet lead to the spreading of these SMX resistance genes towards in the other studied soils (1, 5, 8 and 10), as these two genes were not detectable by qPCR at T0. This indicates that the presence and level of SMX ARGs is strongly correlated with the distance to wastewater treatment plants.

4 Conclusion

This study demonstrates the occurrence of SMX biodegradation in most of the studied soils (except in soil 1), even if an overestimation of real biodegradation rates is expected in connection with experimental conditions and used analytical methods. SMX observed biodegradation varies widely in the studied soils. SMX microbial degradation rates were shown to relate to soils organic carbon contents as well as to SMX contamination level in soils. However, the presence of SMX in the field suggests that SMX is not completely degraded and presents variable persistence, which depends on soils properties and pre-exposure to antibiotics.

High throughput sequencing was used to evaluate SMX impact in soils and revealed a much more sensitive technique than DGGE. The DGGE results (low SMX impact) suggested that the dominant soil bacterial species were globally tolerant to SMX contamination.

Soils 1, 8 (agricultural) and 10 (close to the Titicaca lake) were sensitive to SMX pollution showing a decrease in bacterial community richness. While, urban soils (4 and 5) seemed unaffected by SMX, indicating a well-adapted soil microbial community, due to the regular application of SMX-enriched waters originating from urban wastewaters.

The high throughput sequencing analysis of SMX treated and untreated soils revealed that the abundance of the *Actinobacter* phylum decreased globally in all SMX polluted soils, as well as the less dominant *Bacteroidetes* and that ß-*proteobacteria philla* . On the contrary, ɣ-*proteobacteria* abundance remained similar in control and SMX polluted soils, suggesting a global resistance to this antibiotic family, which could relate to the known capacity of these bacteria to degrade Sulphur-containing chemicals or whit the presence of efflux pump mechanisms.

SMX resistance genes *sul*1 and *sul*2 were detected only in field samples of soil 4, in relation with the high SMX concentration measured in this soil and with the continuous discharge of waste waters at this sampling point. Surprisingly, SMX pollution didn't lead to the development of SMX *sul* resistance genes in the other studied soils. This possibly relates to the involvement of other SMX resistance mechanisms (e.g. efflux pump systems…), which deserve more investigations in the future. Altogether these results indicate that the presence of sul genes in natural soils relates to the dissemination of SMX and/or SMX-resistant microorganisms, e.g. through soils irrigation with SMX-enriched wastewaters.

Acknowledgements.
This work was supported by the French national program EC2CO "Ecosphère Continentale et Côtière". The authors thank the CONACYT program for the PhD fellowship of D. Archundia. LTHE is part of the Labex OSUG@2020, ANR grant #ANR-10-LABX-56 (funded by the Future Investments Program launched by the French government and implemented by the French agency ANR.

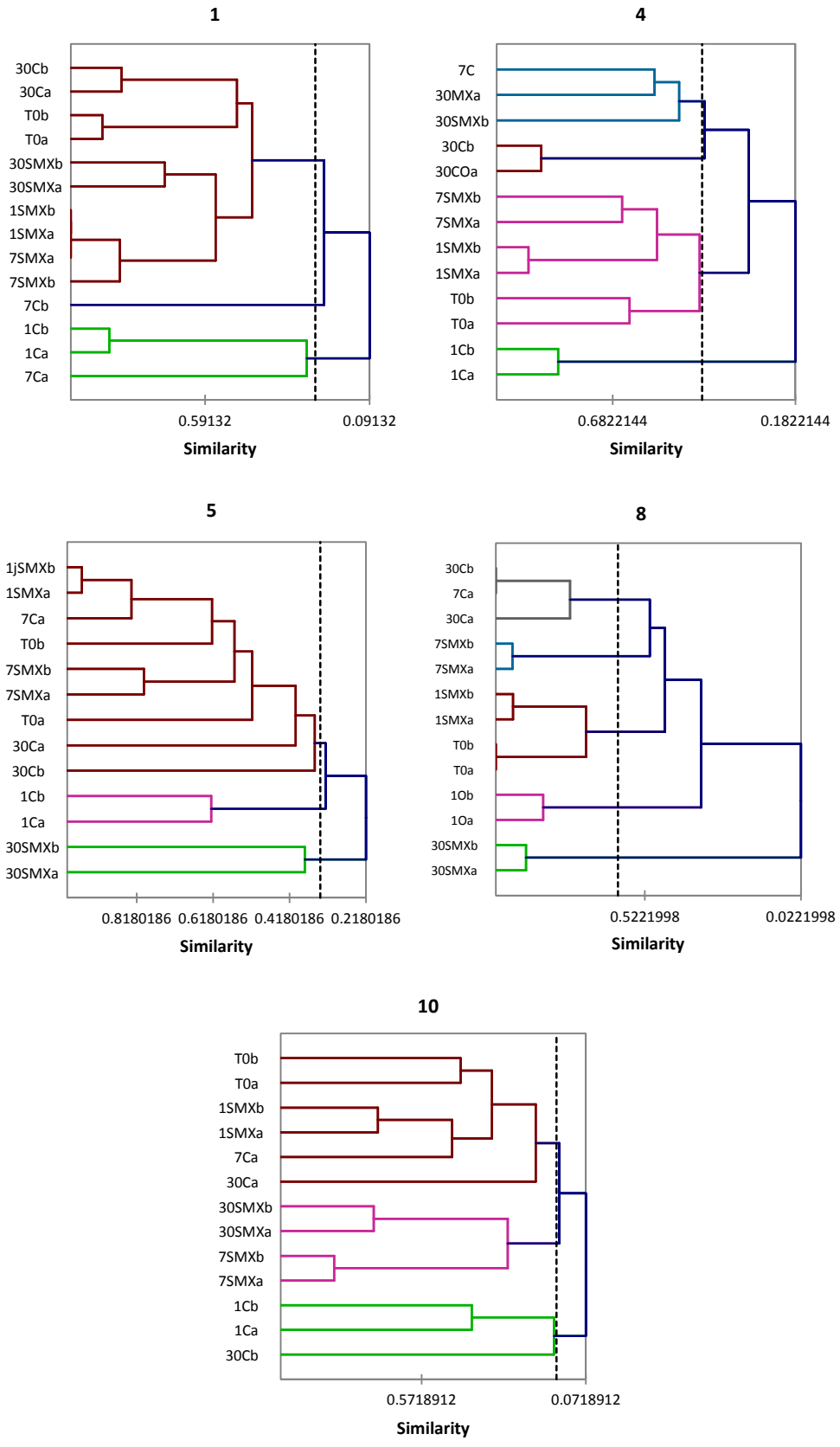
References

- Alexy, R., Kümpel, T., Kümmerer, K., 2004. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. Chemosphere 57, 505–512.
- Anes, J., McCusker, M.P., Fanning, Sã©., Martins, M., 2015. The ins and outs of RND efflux pumps in Escherichia coli. Front. Microbiol. 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00587
- Archundia, D., Duwig, C., Lehembre, F., Chiron, S., Prado, B., Morel, M.C., Martins, J.M.F., submitted. Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca lake and occurrence of SMX resistance genes.
- Archundia, D., Duwig, C., Perez, M.P., Orsag, V., Spadini, L., Prado, B., Morel, M.C., Martins, J.M.F., in preparation. Experiments and modelling approaches to investigate the mobility of Sulfamethoxazole in ten soils of a Lake Titicaca subcatchment (Bolivia).
- Binh, C., Heuer, H., Kaupenjohann, M., Smalla, K., 2008. Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. FEMS Microbiol. Ecol. 66, 25–37.
- Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2012. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. Nat. Methods 10, 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276

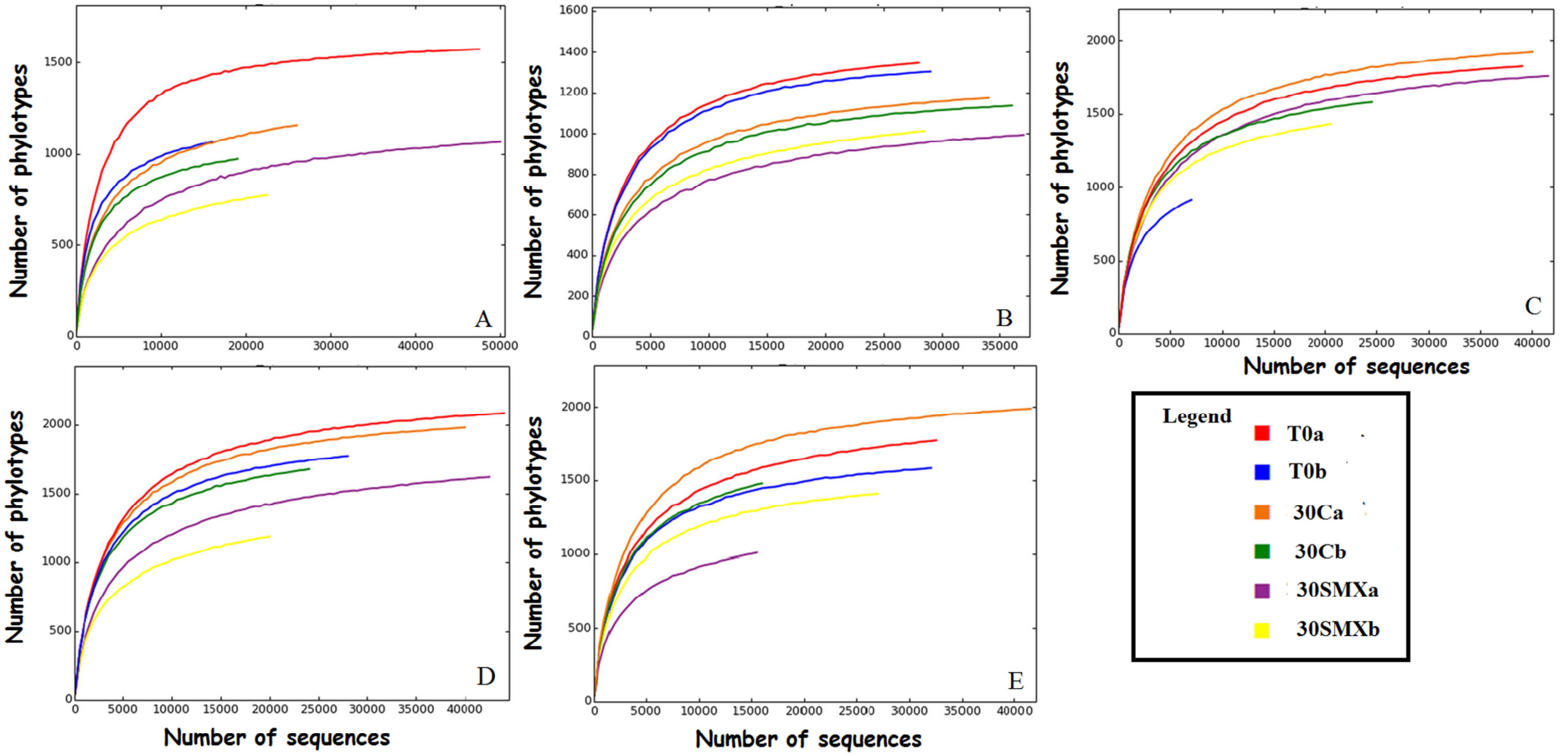
- Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W., Top, E.M., 2002. Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. FEMS Microbiol. Ecol. 39, 101–112.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., others, 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. ISME J. 6, 1621–1624.
- Chang, Q., Luan, Y., Sun, F., 2011. Variance adjusted weighted UniFrac: a powerful beta diversity measure for comparing communities based on phylogeny. BMC Bioinformatics.
- Collado, N., Buttiglieri, G., Marti, E., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Comas, J., Rodriguez-Roda, I., 2013. Effects on activated sludge bacterial community exposed to sulfamethoxazole. Chemosphere 93, 99–106. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.094
- Demoling, L.A., B\aa\aath, E., Greve, G., Wouterse, M., Schmitt, H., 2009. Effects of sulfamethoxazole on soil microbial communities after adding substrate. Soil Biol. Biochem. 41, 840–848.
- DeVries, S.L., Loving, M., Li, X., Zhang, P., 2015. The effect of ultralow-dose antibiotics exposure on soil nitrate and N2O flux. Sci. Rep. 5, 16818. doi:10.1038/srep16818
- Drillia, P., Dokianakis, S.N., Fountoulakis, M.S., Kornaros, M., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 2005. On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole. J. Hazard. Mater. 122, 259–265. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.03.009
- Duwig, C., Archundia, D., Lehembre, F., Spadini, L., Morel, M.C., Uzu, G., Chincheros, J., Cortez, R., Martins, J.M.F., 2014. Impacts of Anthropogenic Activities on the Contamination of a Sub Watershed of Lake Titicaca. Are Antibiotics a Concern in the Bolivian Altiplano? Procedia Earth Planet. Sci. 10, 370–375. doi:10.1016/j.proeps.2014.08.062
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Goni-Urriza, M., Capdepuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P., Quentin, C., 2000. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae andAeromonas spp. Appl. Environ. Microbiol. 66, 125–132.
- Hassan, K.A., Liu, Q., Henderson, P.J.F., Paulsen, I.T., 2015. Homologs of the Acinetobacter baumannii AceI Transporter Represent a New Family of Bacterial Multidrug Efflux Systems. mBio 6, e01982–14. doi:10.1128/mBio.01982-14
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., Spiteller, M., 2008. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. Soil Biol. Biochem. 40, 1892–1900.
- Heuer, H., Smalla, K., 2007. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. Env. Microbiol 9, 657–666.
- Hoa, P.T.P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D.H., Viet, P.H., Suzuki, S., 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. Sci. Total Environ. 409, 2894–2901. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.030
- Hoshino, Y.T., Matsumoto, N., 2007. DNA- versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation. Soil Biol. Biochem. 39, 434–444. doi:10.1016/j.soilbio.2006.08.013
- Johansson, C.H., Janmar, L., Backhaus, T., 2014. Toxicity of ciprofloxacin and sulfamethoxazole to marine periphytic algae and bacteria. Aquat. Toxicol. 156, 248–258. doi:10.1016/j.aquatox.2014.08.015
- Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Horn, M., Wagner, M., 2000. Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5043–5052.
- Kor-Bicakci, G., Pala-Ozkok, I., Rehman, A., Jonas, D., Ubay-Cokgor, E., Orhon, D., 2014. Chronic impact of sulfamethoxazole on acetate utilization kinetics and population dynamics of fast growing microbial culture. Bioresour. Technol. 166, 219–228. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.042
- Lozupone, C., Knight, R., 2008. Species Divergence and the Measurement of Microbial Diversity. FEMS Microbiol Rev 32, 557–578. doi::10.1111/j.1574-6976.2008.00111.x
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. Am. Soc. Microbiol. 71, 8.
- Martinez, J.L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environ. Pollut. 157, 2893–2902.
- Martins, J.M., Mermoud, A., 1998. Sorption and degradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturated/unsaturated soil batch systems. J. Contam. Hydrol. 33, 187–210.

- Mojica, E.-R., Aga, D., 2011. Antibiotics Pollution in Soil and Water: Potential Ecological and Human Health Issues. Elsevier.
- Müller, E., Schüssler, W., Horn, H., Lemmer, H., 2013. Aerobic biodegradation of the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole by activated sludge applied as co-substrate and sole carbon and nitrogen source. Chemosphere 92, 969–978. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.02.070
- Perreten, V., Boerlin, P., 2003. A New Sulfonamide Resistance Gene (sul3) in Escherichia coli Is Widespread in the Pig Population of Switzerland. Antimicrob Agents Chemother 47, 1169–1172.
- Rossetti, S., 2003. Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithoautotrophic Thiothrix strain isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1271–1276. doi:10.1099/ijs.0.02647-0
- Schauss, K., Focks, A., Heuer, H., Kotzerke, A., Schmitt, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B.M., Matthies, M., Amelung, W., 2009. Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. TrAC Trends Anal. Chem. 28, 612–618.
- Sigler, W.V., Turco, R.F., 2002. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Soil Ecol. 21, 107–118.
- Sköld, O., 2000. Sulfonamide Resistance: Mechanisms and Trends. Drug Resist. Updat. 3, 155–160.
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., 2014. Dissipation of sulfamethoxazole in pasture soils as affected by soil and environmental factors. Sci. Total Environ. 479-480, 284–291. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.014
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., Manley-Harris, M., 2014. Sorption of selected veterinary antibiotics onto dairy farming soils of contrasting nature. Sci. Total Environ. 472, 695–703. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.104
- Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R., 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. Lancet Infect. Dis. 14, 742–750.
- Wang, Q., Garrity, G., Tiedje, J.M., Colle, J.R., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5261–5267.
- Williams, T.M., Unz, R.F., 1985. Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 273–282.
- Xu, B., Mao, D., Luo, Y., Xu, L., 2011. Sulfamethoxazole biodegradation and biotransformation in the water–sediment system of a natural river. Bioresour. Technol. 102, 7069–7076. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.086
- Yang, S.-F., Lin, C.-F., Yu-Chen Lin, A., Andy Hong, P.-K., 2011. Sorption and biodegradation of sulfonamide antibiotics by activated sludge: Experimental assessment using batch data obtained under aerobic conditions. Water Res. 45, 3389–3397. doi:10.1016/j.watres.2011.03.052
- Zhang, C.-L., Guo, X.-L., Li, B.-Y., Wang, Y., 2012. Biodegradation of ciprofloxacin in soil. J. Mol. Liq. 173, 184–186. doi:10.1016/j.molliq.2012.06.016
- Zhang, X., Li, Y., Liu, B., Wang, J., Feng, C., 2014. The effects of estrone and 17β-estradiol on microbial activity and bacterial diversity in an agricultural soil: Sulfamethoxazole as a co-pollutant. Ecotoxicol. Environ. Saf. 107, 313–320. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.010

SI.I Dendrograms calculated on the basis of Pearson correlation coefficients. Sample names are composed as follows: Sampling time in days-type of system (C: control sytems or SMX: SMX systems)-duplicate (a or b). T0:initial soil sample without any treatment.



SI.II Rarefaction curves of different soils and treatments after 30 days SMX contact (in duplicated: a and b). A: Soil 1. B: Soil 4. C: Soil 5, D: Soil 8. E: Soil 10.



2.4 Conclusion

Dans ce chapitre IV, une étude sur les principaux processus affectant le devenir des composés antibiotiques dans le BV a été réalisée avec le SMX comme composé modèle ainsi que sur l'impact du SMX sur les communautés bactériennes du sol.

Premièrement c'est le transfert réactif de ce composé qui a été étudié. L'étude de sa sorption a montré que les paramètres du sol ayant une influence principale sur sa rétention sont le pH, la matière organique et la CEC (capacité d'échange cationique). Les processus intervenant sur sa sorption sont principalement les interactions hydrophobes et les échanges ioniques, selon le type de sol étudié et son pH. Par ailleurs, il a été observé que la sorption du SMX est généralement concentration- dépendante suivant une isotherme de Freundlich. Les sols de la partie haute du BV, riches en matière organique, ont des propriétés de rétention plus importantes avec des risques potentiels sur les populations et les communautés microbiennes, tandis que les sols de la partie aval du BV, pauvres en matière organique, ont des propriétés de rétention plus faibles et présentent des risques plus importants de pollution des environnements aquatiques de surface et souterrains. Ces résultats sont en accord avec les expériences effectuées sur la mobilité du SMX en colonnes de sol. Cependant, les expériences statiques en batch donnent des valeurs de Kd entre 2 et 8 fois plus élevées que les Kd déterminés en dynamique en colonnes de sol. Ces différences sont classiquement interprétées par le fait que le temps de contact n'est pas le même dans les deux expériences, et que le soluté, la phase mobile, n'a pas forcément accès à tous les sites de sorption dans la colonne de sol (phase immobile), contrairement aux batch. Les facteurs de retard sont également 2 à 5 plus élevés en batch qu'en colonne mais présentent les mêmes tendances. Cette étude a montré que le SMX est une molécule hautement mobile dans la partie avale du BV et moins mobile en amont. L'étude du transfert réactif a aussi révélé l'intervention de mécanismes de sorption de nature variée (pour la plupart des sols), ce qui a été vérifié par la modélisation réalisée des courbes de sortie du SMX en colonne de sols. En effet, la prise en compte des modèles de sorption « complexes » (sites de sorption instantanés, avec cinétique et irréversibles) a été nécessaire pour la simulation adéquate des courbes expérimentales. Cependant l'étude sur sa mobilité nous a permis de montrer aussi que les risques de dissémination vers les eaux souterraines sont réels dans tout le BV dus aux caractéristiques physico-chimiques des horizons inférieurs des sols, expliquant les concentrations en antibiotiques retrouvées dans les eaux souterraines. L'étude sur sa photodégradation dans les eaux de surface a mis en évidence

que cette molécule est persistante, et cela en dépit du fort taux en rayon ultra-violet, dû à l'altitude élevée (entre 3800 et 6000m) du BV. En effet les autres molécules présentes de manière naturelle ou anthropique dans les eaux de surface ont plutôt un rôle protecteur en réduisant la photodégradation du composé. Ceci explique la présence du SMX dans la quasi-totalité du réseau hydrographique du BV jusqu'au lac Titicaca, même si la source principale de cette pollution est liée aux rejets d'eaux usées non traitées, ou traitées par la STEP située à l'aval de la ville de El Alto. Cependant, même si le taux de photodégradation est faible, c'est le paramètre principal expliquant sa dissipation dans les eaux de surface étudiées. Les expériences menées sur la biodégradation du SMX dans les 10 sols étudiés du BV montrent qu'il peut avoir une biodégradation biotique même si les taux sont faibles : ces taux sont principalement liés aux taux de matière organique des sols ainsi qu'à la présence de communautés microbiennes pré-adaptées à la présence du composé étudié. Il nous reste cependant à étudier la sorption du SMX sur les particules en suspension (minérales ou organiques) dans les rivières du BV, particulièrement chargées en saison des pluies.

L'étude des impacts sur les communautés microbiennes a été abordée ici en considérant les impacts sur leurs compositions ainsi que sur le développement de résistance bactérienne. En effet l'ajout de SMX dans les sols a conduit à une modification de la composition des communautés microbiennes dans tous les sols. Cependant les sols les plus affectés ont été les sols des zones rurales, qui n'ont jamais été en contact avec le SMX ou on a principalement observé l'augmentation du phylum *Proteobacteria*. Les sols urbains pollués ont été peu impactés par l'ajout du SMX, dû à une préadaptation de leurs communautés microbiennes. Les gènes de résistance bactérienne au SMX étudies se sont développées seulement dans le sol ou ils étaient présentes avant l'expérience.

CHAPITRE V. Application du modèle GREAT-ER pour l'évaluation du devenir et du risque écotoxicologique lie à la présence du SMX dans le réseau hydrographique du BV du Katari.

1. Article 6 : Présentation générale de l'étude et synthèse des principaux résultats.

La modélisation est reconnue comme un outil indispensable pour la compréhension du devenir et du comportement des polluants dans les milieux naturels. C'est également un outil de prédiction des concentrations environnementales et d'identification des sources de pollution guidant le développement de stratégies de protection et de gestion des milieux.

Dans les chapitres précédents il a été montré la présence avérée des antibiotiques dans les eaux de surface du BV, principallement du SMX. Les processus prépondérants sur sa sorption, mobilité et dégradation ont aussi été identifiés.

Dans ce chapitre, la capacité du modèle GREAT-ER dans la prédiction de la distribution spatiale des concentrations du SMX dans les eaux de surface du BV ainsi que dans l'identification des zones à risque avec des concentrations élevées en SMX a été évaluée.

Un analyse de sensibilité a aussi été réalisée afin d'identifier les variables de contrôle ce qui est utile dans la mise en place d'une stratégie de protection environnementale par les autorités boliviennes.

Les résultats montrent que le modèle GREAT-ER - avec comme entrées : la constante de dégradation dans l'eau de rivière ici déterminé, la diminution du SMX observée dans la STEP du BV, et la consommation en antibiotiques dans le site d'étude (déduite des mesures sur en antibiotiques dans le Chapitre III) - a été capable de reproduire la distribution spatiale des concentrations observées et cela même en dépit de la faible quantité des données disponibles. Cependant, l'obtention de données plus précises sur la variabilité des débits (principalement en saison humide) ainsi que les paramètres décrivant la dégradation et autres processus de perte du SMX (par exemple, l'utilisation des eaux de rivière pour l'irrigation provoquant la diminution de la masse du SMX) est essentielle dans le but d'améliorer la précision des prédictions.

Il a été mis en évidence que la consommation en antibiotiques est le paramètre qui influence le plus les concentrations retrouvées dans les eaux de surface. Ainsi il est conseillé aux pouvoirs publics de mettre en place une politique d'accès aux antibiotiques dans le but de controler la consommation et donc la pollution des milieux naturels par les antibiotiques et diminuer les risques d'exposition.

2. Application of the GREAT-ER model to assess the environmental fate and the ecotoxicological risk of the Sulfamethoxazole antibiotic on the Katari catchment (Bolivian Altiplano).

D. Archundia[a], L Boithias, C. Duwig[a,b,*], G. Flores Aviles, F. Mujica Quispe[f], J.M. Martins

[a]*Université Grenoble Alpes, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[b]*IRD, LTHE, F38000 Grenoble, France*
[c]*GET, Université de Toulouse, CNRS, IRD, UPS, CNES, France*
[f]*SENHAMI (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología), La Paz, Bolivia*

Keywords: *Deterministic and stochastic model, attenuation, chemical exposure, pharmaceutically active compounds (PhACs).*

Abstract:
Antibiotics are considered as emergent pollutants and they can induce adverse effects in terrestrial or aquatic organisms. Surface water compartment is of particular concern as it receives direct waste waters discharges. Modeling is nowadays highlighted as an essential tool on the understanding of fate and behavior of these compounds as well as on environmental risk assessment. This study aims at testing the ability of the GREAT-ER model in simulating observed SMX concentrations in surface waters in the environmental context of the Bolivian Altiplano, to assess the sensitivity of simulated concentrations to variations in parameters and to evaluate the environmental risk by SMX contamination. The model was able to predict the general spatial pattern of SMX concentrations. Nevertheless, there remains some degree of uncertainty about losses process of SMX. Pharmaceutical consumption is the parameter that influences the most the environmental concentrations. Natural attenuation by rivers can helps to reduce SMX concentrations but enhance environmental risks associated with SMX transformation products. A better management of pharmaceutical consumption patterns and of wastewater collection and treatment is recommended for the reduction of antibiotic pollution and its related ecotoxicological risks.

1 Introduction

Antibiotics are not completely metabolized in organisms, in consequence a part of administered dose is excreted in unchanged form (Zuccato et al., 2000). The principal sources of antibiotics in the environment are the discharge of treated and untreated wastewater and the land application of animal manure (Mojica and Aga, 2011). They are nowadays considered as emergent contaminantss and have been detected in various environmental compartments (Hirsch et al., 1999; Martinez, 2009; Segura et al., 2015; Sui et al., 2015). Antibiotics can induce adverse effects in terrestrial and aquatic organisms even at low concentrations altering principally microbial community structure (Hernando et al., 2006; Kümmerer, 2009; Proia et al., 2013; Corcoll et al., 2015).

The surface water compartment is of particular concern as it receives direct waste waters discharges. Generally, contaminant concentrations in surface waters tend to decrease gradually as one moves downstream the pollution point-sources, which is known as natural attenuation or in-stream attenuation. Attenuation is related with natural assimilation properties of rivers which are dependent on different processes such as degradation (abiotic and biotic) and sorption (Lunestad et al., 1995; Huang et al., 2001; Halling-Sorensen et al., 2002). Moreover, Acuña et al., (2015) observed that in-stream attenuation was highly variable among pharmaceuticals and river segments.

Few studies have characterized pharmaceutical residues in the extreme conditions of the Altiplano (UV radiation, temperature and humidity) (PNUMA, 2011). Duwig et al., (2014) and Archundia et al., (in preparation) have already shown the presence of pharmaceutical residues in the surface waters of the Katari catchment. Sulfamethoxazole (SMX) was observed by these authors at concentrations ranging from 5 to 14624 ng L^{-1}.

Understanding of the antibiotic environmental fate is still limited due to the number of compounds that are released to natural ecosystems and the difficulty to measure all these molecules. Modeling is useful to calculate Predicted Environmental Concentrations (PECs), (Jagiello et al., 2015), as well as to help prioritizing protection or mitigation strategies, to inform management decisions and to cover data lacks (e.g., Castanedo et al., 2006). Models combining Geographic Information Systems (GIS) and water quality are preferred as they allow taking into account spatial variability (Feijtel et al., 1997; Keller, 2006) and to identify emission sources (Hüffmeyer et al., 2009). Thus, modeling is an essential tool to understand the fate and the behavior of these compounds as well as for environmental risk assessment. Environmental risk assessment is based in the comparison between the PECs (obtained by modelling) and the worst-case predicted no effect concentrations (PNEC) estimated from standard toxicity assays (Hernando et al., 2006).

There are two main modeling approaches, the single-media and the multi-media (Grill et al., 2016; Keller, 2006). In multi-media models the environment is divided into different compartments for which the chemical concentration is estimated. Most of these models are based on the fugacity approach (Mackay D., 2001). Among these models we find the European Union System for the Evaluation of Substances (EUSES) and the models Level I, II, III and IV developed by Mackay and co-workers (Mackay et al., 1997). EUSES is a local and regional model used as a decision-support tool to address the effective risks posed by chemicals to human and environment (Vermeire et al., 2005). EUSES was designed to identify the likely media into which the chemical will tend to partition (Keller, 2006). Nevertheless, these models generally need a large amount of data and are hence difficult to parameterize, they are spatially coarse, and they do not allow for site-specific predictions (Grill et al., 2016).

The single-media models such as the in-stream models (also called water quality models), integrate the processes to which chemicals are exposed (e.g., sedimentation, degradation, sorption) as well as the hydrological/hydraulic process (Anderson et al., 2004; Feijtel et al., 1997; Grill et al., 2016). They are widely used to calculate PECs in river networks (Keller,

2006). It has been proposed that single-media approaches might be sufficient for modelling the environmental fate of pharmaceuticals as they are not really multimedia contaminantss, but rather tend to stay in the medium of emission (water or soil) where their rate of degradation is a primary fate process (Żukowska et al., 2006). Amongst single-media models we find the GREAT-ER and PhATE models.

The PhATE model was developed to estimate concentrations of active pharmaceutical ingredients in U.S. surface waters by using the mass balance approach (Anderson et al., 2004). The GREAT-ER model, or Geography-referenced Regional Exposure Assessment Tool for European Rivers, is a chemical exposure prediction tool at the catchment level, developed for use within the European environmental risk assessment schemes with both a deterministic and an stochastic approaches (Kehrein et al., 2015). The GREAT-ER model has been pointed by Keller, (2006) as appropriate for modelling down-the-drain chemicals as pharmaceuticals because it accounts for both spatial and temporal variability and it requires few data. Several studies have been successfully conducted with this model to predict pharmaceutical concentrations in surface waters (Schowanek and Webb, 2002; Johnson et al., 2007; Alder et al., 2010; Aldekoa et al., 2013).

This study constitutes the first attempt to model antibiotic compounds in the Altiplano context. Our objectives were (1) to test the ability of the GREAT-ER model in simulating observed SMX concentrations in surface waters in the environmental context of the Bolivian Altiplano, (2) to assess the sensitivity of GREAT-ER inputs, namely consumption patterns, removal by WWTP and removal by rivers and (3) to evaluate the environmental risk posed by the SMX contamination of the surface waters on a high altitudinal catchment.

2 Materials and Methods

2.1 Site settings

The Katari catchment (2,022 km2) is located in the western part of Bolivia (Bolivian Altiplano) (M.M.A.y.A., 2010). The climate is cold/arid whit an altitude higher than 3800 m.a.s.l. and extreme diurnal variations of climatic factors such as solar radiation, temperature and humidity. Rainfall season lasts from December to March, with an annual rainfall of 492 to 620 mm (M.M.A.y.A., 2010). The Katari catchment (Fig. 1) is drained by 4 main rivers: Seke, Seco, Pallina and Katari. The *Cordillera Real*, located at the Northeast of the Katari catchment, is the mountain where the Seco and the Seke Rivers have their sources. In the Southwest part, the *Serranías Inter-altiplánicas* delimits the northern Altiplano of the

southern Altiplano. They correspond to the source of the Katari Alto River. In the southeast,

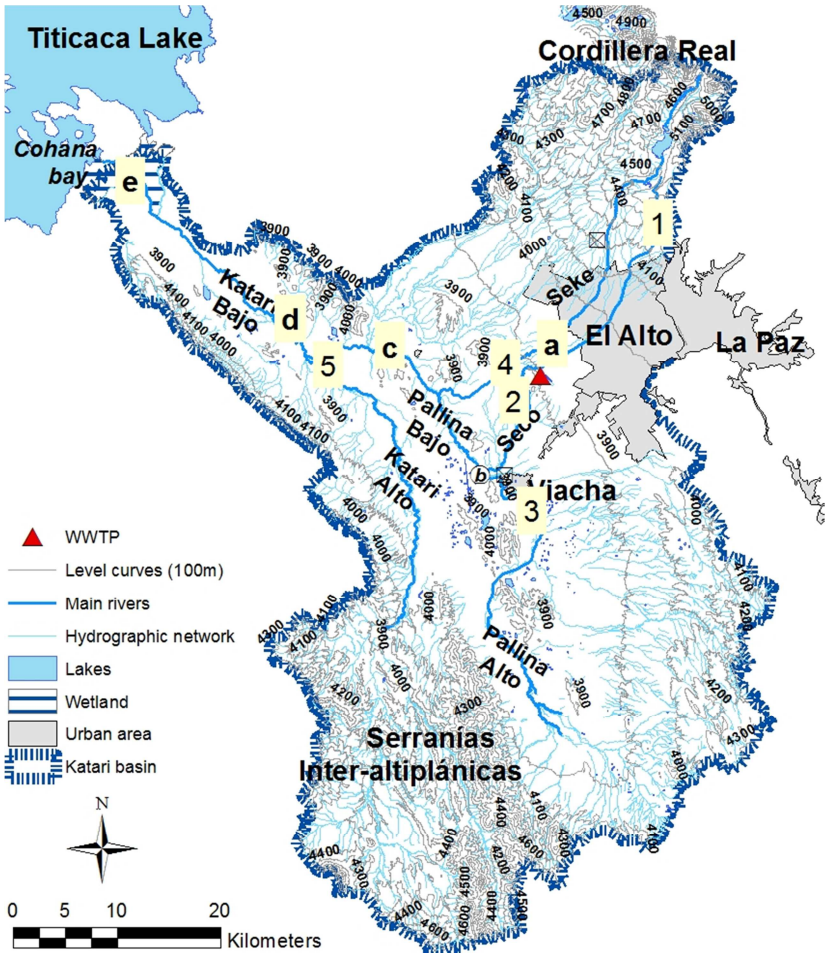


Figure 1 *Study site and main rivers. Numbers and letters represent water sampling stations for SMX measurements. Numbers refers to considered emission points. Letters are points used for the model performance evaluation (see section 2.4).*

there are also some high grounds, up to 4400m, which are the sources of the Pallina Alto River (M.M.A.y.A., 2010). The main river is the Katari River (90 km, 0.9 m^3 s^{-1} during low flow at Katari bajo gauging station, up to 41.4m^3 s^{-1} during floods) which opens out to the Lake Titicaca in the Cohana Bay (Archundia et al., submitted). Its main tributary is the Pallina River, which passes by the Viacha city. Between Viacha and the confluence with the Katari river the Pallina River receives the discharges of the Seke and Seco Rivers. These latter rivers flow through the El Alto city. El Alto is the main city of the catchment with a population of about 1,2 million inhabitants (Mazurek, 2012). El Alto city has undersized waste water treatment facilities and counts with a variety of industries as tanneries, furniture's, painting metallurgy's and pharmaceutical (Ribera Arismendi, 2010; Archundia et al., in preparation). The waste water treatment plant (WWTP) of the city (WWTP Puchukollo) treats about 50 to 60 % of the waste waters (Ribera Arismendi, 2010) and discharges its treated waters in the

Seco River. During the dry season, the WWTP discharge represents up to 0.5 to 7 times the natural flow rate of the Seco River, depending on the season (Duwig et al., 2014). Therefore the quality of surface waters downstream El Alto is poor and presents an advanced eutrophication state as well as polymetallic and antibiotic contaminantion (Archundia et al., submitted; Archundia et al., submitted; Fonturbel, 2005). Agriculture and livestock are also present in the catchment (M.M.A.y.A., 2010). The 30,000 head of cattle can potentially be treated by antibiotics. The main sources of pharmaceutical residues in the catchment are discharges of treated and untreated wastewater and the spreading of animal manure as fertilizer on the surface of agricultural soils (Archundia et al., submitted). Detailed description of the catchment can be found in Archundia et al. (2016; submitted to Journal of Geographical Exploration) and Archundia et al (2016; in preparation).

2.2 GREAT-ER model

GREAT-ER is based on a geographic information system (GIS) for data storage and visualization, as well as on mathematical models for the prediction of the fate of chemical compounds (Feijtel et al., 1997). The basic elements of the model are the discharge points (pollution point-sources) and the river stretches. Emission data is calculated on the basis of the number of inhabitants, the water consumption (L capita^{-1} day^{-1}) and the pharmaceutical consumption (kg capita^{-1} year^{-1}). If waste water treatment is present at the emission point, the removal efficiency, or removal rate (in percent) of the WWTP is taken into account. Chemical elimination in rivers is described by first-order in-stream removal, assuming a fixed rate.

$$R_{RIVER} = 1 - e^{-HTR*k_river} \ldots\ldots (1)$$

Where *k* is the chemical in-stream removal rate (h^{-1}) and *HTR* is the hydraulic travel time calculated from the segment length (m) and the average velocity (m s^{-1}) in each segment.

The chemical fate in rivers can be modeled with different complexity levels depending on the availability of the input data (Boeije and Koormann, 2003).

2.3 Modelling study design

The fate of SMX in rivers was modelled using the model complexity one. No in-sewer removal was considered (*RSEWER= 0*). The SMX elimination in WWTP was described by a fixed removal rate (only for emission point 1). The SMX elimination in rivers was described by first-order in-stream removal rate, assuming a fixed rate for all river stretches. The details of values are given in the following sections.

2.3.1 Emission points

A schematic diagram representing the considered emission points is presented in Fig. 2 (for geographic location see Fig. 1). Five emission points were considered: 1) Upper Seco, representing the contribution from the Seco upper part; 2) WWTP Puchukollo, located downstream El Alto city and discharging treated waste waters into the Seco River; 3) Pallina Alto, located on the Pallina Alto stream; 4) Seke River, located at the confluence of the Seke and the Pallina Bajo Rivers, which represent the contribution of the part of El Alto city which is not connected to the WWTP and by which this river flows and 5) Katari Alto River, located upstream the confluence with Pallina River.

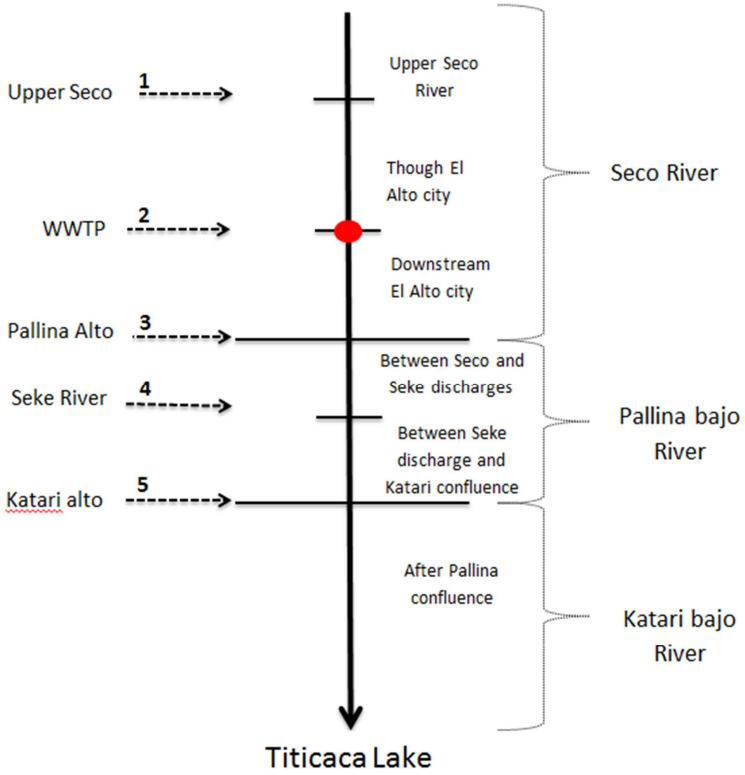


Figure 2. *Schematic diagram of the Katari catchment and SMX emission points. Red circle refers to the WWTP of Puchukollo.*

2.3.2 Data inputs

Digital River network and catchment boundary

The digital river network (distribution and length) as well as the catchment boundary were generated from geographical referenced data from the Bolivian *Ministerio de Medio Ambiente y Agua* (M.M.A.y.A., La Paz) using the ESRI Spatial Analyst tool in ArcGIS 10.1.

Stream parameters

Mean stream flow, velocity and depth were obtained from sampling campaigns of Archundia et al. (submitted) (wet and dry season, 2014 and 2015, respectively). To assess the hydrological intra-season variability we also included stream flow data from Duwig (personal

communication) and from the Bolivian *Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología* (SENAMHI, La Paz).

Population

The number of inhabitants connected to emission points 1 (86 inhab.), 3 (4472 inhab.), 4 (240000 inhab.) and 5 (10997 inhab.) was obtained from the geographical referenced data base of the M.M.A.y.A. In the case of emission point 2, the number of inhabitants was calculated from the total population of El Alto city (1,200,000 inhab., data from M.M.A.y.A.) and the percentage of El Alto city households connected to the WWTP (50% (M.M.A.y.A., 2010) and was thus fixed to 600000 inhab.

SMX local consumption (c_SMX)

No data was available about the local consumption of SMX. Thus, we calculated an apparent local consumption from the observed SMX (*obs_SMX*) concentrations reported in Archundia et al., (submitted) at the 5 emission points for 2014 (wet season) and 2015 (dry season), the number of inhabitants for each emission point and the water consumption per inhabitant (52 L cap^{-1} d^{-1}; Buxton et al. (2013)) (Table 1). This allowed considering the variability of the SMX consumption within the catchment and the season.

SMX removal rate in WWTP of Puchukollo (k_WWTP).

We obtained the *k_WWTP* value from the ratio between input and output concentrations of the WWTP in Archundia et al. (2016), which was 70% (Table 1). As this is the only WWTP across the catchment, no SMX removal was considered for the other emission point-source.

SMX removal rate in River (k_river)

The value of *k_river* we used in the model was the degradation constant calculated by Archundia et al. (in preparation) from SMX spiked and not sterilized surface waters from the Seco River exposed to natural solar radiation (k=0.0016 h^{-1}) (Table 1).

2.3.3 Scenarios and sensitivity analysis

Scenarios were applied independently for each season with the following parameters: mean flow, velocity and depth as well as percentile values of existing data. Two reference scenarios were defined, one for each season: RW (wet season) and RD (dry season) both with estimated SMX removal rate at the Puchukollo WWTP (70%) and observed *k_river* by Archundia, et al (in preparation) (k=0.0016 h^{-1}).

In addition, we tested 12 scenarios to assess the sensitivity of the 3 input parameters by changing the SMX consumption *c_SMX* (WC± and DC±), the SMX removal rate in rivers *k_river* (WKr± and DKr±) and the SMX removal rate in WWTP *k_WWTP* (WP± and DP±).

The Table 1 lists the 12 scenarios. These scenarios were defined from reference scenarios considering variations of ±40% respect to the reference value of the 3 considered parameters. This standardized interval is relevant given 1) the uncertainty related on the actual consumption calculation, and 2) the variation observed for *k_river* and *k_WWTP* parameters from literature (considered values are consigned in SI.1 and SI.2).

Table 1. *Reference scenarios RW (wet season) and RD (dry season), and sensitivity analysis scenarios defined as ±40% of the reference scenario inputs. The parameters c_SMX, k_WWTP and k_river are the annual consumption, the removal in the WWTP and the removal rate in the River, respectively.*

Season	ID	Scenario description	*c_SMX* by emission point (kg cap^{-1} day^{-1})					*k_WWTP* (%)	*k_river* (h^{-1})
			1	2	3	4	5		
WET (W)	**RW**	**Reference scenario**	**2.27E-07**	**8.26E-05**	**1.81E-06**	**1.61E-06**	**2.02E-04**	**70**	**1.60E-03**
	WC+	+40% consumption	3.18E-07	1.16E-04	2.53E-06	2.26E-06	2.82E-04	70	1.60E-03
	WC-	-40% consumption	1.91E-07	6.94E-05	1.52E-06	1.35E-06	1.69E-04	70	1.60E-03
	WKr+	+40% *k_river*	2.27E-07	8.26E-05	1.81E-06	1.61E-06	2.02E-04	70	2.24E-03
	WKr-	-40% *k_river*	2.27E-07	8.26E-05	1.81E-06	1.61E-06	2.02E-04	70	9.60E-04
	WP+	+40% WWTP removal	2.27E-07	8.26E-05	1.81E-06	1.61E-06	2.02E-04	98	1.60E-03
	WP-	-40% WWTP removal	2.27E-07	8.26E-05	1.81E-06	1.61E-06	2.02E-04	42	1.60E-03
DRY (D)	**RD**	**Reference scenario**	**2.50E-07**	**2.37E-05**	**1.81E-06**	**2.53E-06**	**2.33E-06**	**70**	**1.60E-03**
	DC+	+40% consumption	3.50E-07	3.32E-05	2.53E-06	3.54E-06	3.26E-06	70	1.60E-03
	DC-	-40% consumption	2.10E-07	1.99E-05	1.52E-06	2.13E-06	1.96E-06	70	1.60E-03
	DKr+	+40% *k_river*	2.50E-07	2.37E-05	1.81E-06	2.53E-06	2.33E-06	70	2.24E-03
	DKr-	-40% *k_river*	2.50E-07	2.37E-05	1.81E-06	2.53E-06	2.33E-06	70	9.60E-04
	DP+	+40% WWTP removal	2.50E-07	2.37E-05	1.81E-06	2.53E-06	2.33E-06	98	1.60E-03
	DP-	-40% WWTP removal	2.50E-07	2.37E-05	1.81E-06	2.53E-06	2.33E-06	42	1.60E-03

2.4 Model's performance evaluation and parameter sensitivity

The performance of the model was evaluated by graphically comparing the observed concentration of SMX (*obs_SMX*, *Fig 1*) and the PECs given by the reference scenarios (RW and RD) and by calculating the Coefficient of Determination (R^2) and the Percent Bias (PBIAS) between the observations and the predictions. The *obs_SMX* points used for the model performance evaluation are shown in Figure 1. Comparison in point *a* was only available for the wet season while the comparison in point e was only available for the dry season.

To assess the sensitivities of the tested input parameters, the 14 scenarios were coupled to a sensitivity analysis (SA). We calculated the average (*S*) of relative sensitivity indices (*Si*) at each river segment, each of them calculated as suggested by Boithias et al., (2014):

$$Si = \frac{\partial P}{\partial I} . \frac{I}{P(I)} \text{.....(2)}$$

With *P* the predicted concentration in the considered river stretch and *I* the value of the parameter changed (namely *c_SMX*, *k_WWTP* and *k_river*). The average *S* value was calculated for both wet and dry seasons. The higher the value of *S*, the more sensitive the parameter. For *c_SMX*, the calculation of *Si* was conducted with the mean of *c_SMX* at emission points by season.

2.5 Ecotoxicological environmental risk.

The GREAT-ER model accounts with a risk analysis tool, where the ratio of PEC/ PNEC (substance specific predicted no effect concentration) is calculated (Wagner and Koormann, 2011). If the PEC/PNEC ratio is greater than one, there is an environmental risk. We conducted the environmental risk analysis separately for the both wet and the dry seasons with the reference scenarios (RW and RD) and we calculated the PEC/PNEC for each river stretch. The considered PNEC value was obtained from Schlabach et al., (2005) (27 ng L^{-1}). It is based on ecotoxicological data from three trophical levels: algae, crustaceans and fish.

3 Results and discussion

3.1 Model estimates

Generally, the GREATER model was able to reproduce the spatial pattern of SMX during both seasons. That means low SMX concentrations upstream the El Alto and Viacha cities, higher SMX concentrations in the Seco River (downstream the discharge of the WWTP) and in Pallina River bajo (after Viacha city), and decreasing SMX concentrations until the outlet of the catchment (Figure 3 (A: wet season) and (B: dry season)). Calculated coefficients of determination were of 0.98 and 0.78, for wet and dry seasons respectively.

Nevertheless, simulated concentrations during the wet season at the vicinity of the urban area were considerably overestimated compared to observed concentrations (Figure 3(A)). This is quantified by the high PBIAS value (+1497%) calculated for this season. Differences could be related with 1) the scarcity of flow data during the wet season resulting in an inadequate consideration of the hydrological variability and 2) the presence of old clay pits, particularly in the vicinity of Viacha, in which water is lost causing SMX mass reduction and so lower *obs_SMX* concentrations.

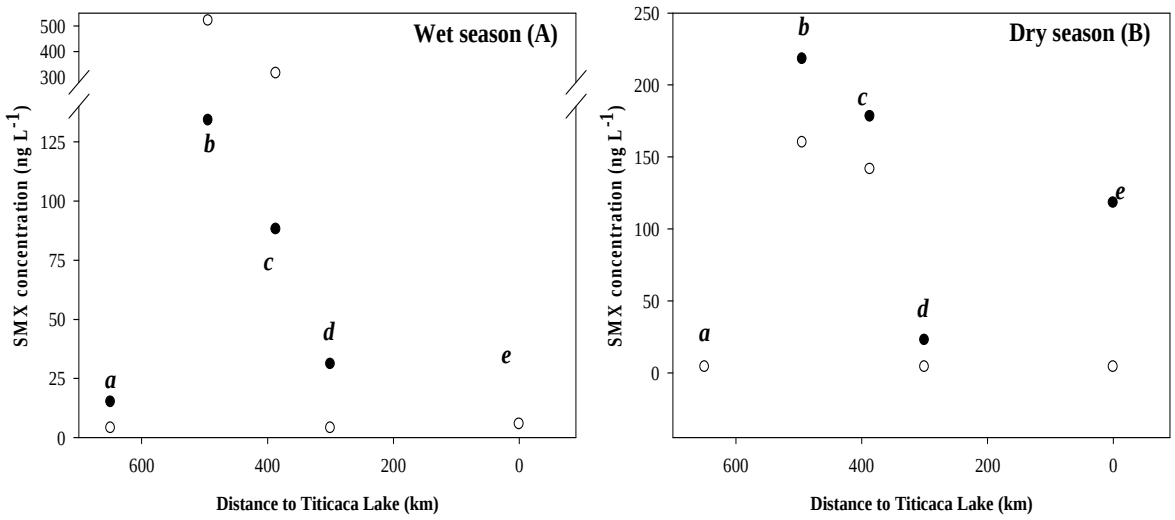


Figure 3. *Observed and simulated SMX concentrations in the Katari catchment* (for both wet season (A) and dry season (B)). *Filled circles refer to observed concentrations (obs_SMX) while hollow circles refer to simulated concentrations (PECs).*

Conversely, simulated concentrations during the dry season were close to observed concentrations (PBIAS=-45.5%) although slightly underestimated, especially for point e (Figure 3(B)).

SMX simulated concentrations at the Katari bajo River for both seasons (0 to 300 km distance to Titicaca Lake (d and e)) and before the WWTP Puchukollo (~ 650 km distance to Titicaca Lake (a)) were lower than observed. Notice that observed SMX concentration upstream the WWTP of Puchukollo (a) was only available for the wet season and that the observed SMX concentration at the outlet of the Katari River (e) was only available for the dry season. The underestimation of simulated concentrations at these sampling stations suggests the presence of other actual SMX sources. For example, non-point sources such as the runoff from agricultural soils amended with manure of SMX treated animals (for the Katari bajo River) and possible direct waste water discharges within El Alto city can lead to increase the actual SMX concentration at outlet.

3.2 Controlling factors of SMX concentrations in surface waters of the catchment

The SMX spatial pattern in both seasons remained the same for the 12 tested scenarios.

The increase of the SMX consumption led to the increase of the SMX simulated concentrations in both seasons (scenarios WC+ and DC+) and the contrary when decreasing the SMX consumption (scenarios WC- and DC-). The variation of *k_WWTP* to 42% and 98%

(in both seasons) respectively resulted in an increase or a decrease of the simulated concentrations in the Seco and Pallina River stretches. Concentrations in the Seke River remained unchanged, as expected, due to the non-influence of the WWTP on this River. In the case of Katari bajo River, the SMX concentrations remain also at the same levels, suggesting that considered removal rate in Rivers (0.0016 h^{-1}) is enough to buffer an increase of the SMX concentrations upstream. Nevertheless, this could be also linked to the dilution with less polluted waters from the Katari alto River. It has been proposed by several authors that dilution is more relevant than river removal in the attenuation of pharmaceutical concentrations surface waters (e.g. Ort et al., 2009), while other studies showed that river removal can be equally relevant to dilution in reducing river concentrations (e.g. Acuña et al., 2015).

The variation of the *k_river* parameter (±40%) resulted on an increase/decrease of 40% (depending on the scenario) which is explained by the linear relationship between the pharmaceutical concentration at the entrance of the WWTP and the pharmaceutical concentration at its outlet.

The Table 2 shows the average sensitivity indices of the 3 considered parameters for both the wet and the dry seasons. For both seasons, the most sensitive parameter was the SMX consumption (*c_SMX*), then the removal rate in the River (*k_river*), and finally the removal rate in the WWTP (*k_WWTP*).

This results show that when modelling the fate of SMX in high altitudinal/arid catchments as the study site, the major attention has to be put on the assessment of the pharmaceutical consumption. The low sensitivity of PECs to a change in the *k_WWTP* parameter is consistent with the fact that wastewater collection and treatment facilities are scarce on the catchment, and shows that sources of SMX contaminantion are manifold and not only related with the WWTP of Puchukollo.

Table 2. *Average sensitivities S of the 3 input parameters of the GREAT-ER model applied to the Katari catchment (Bolivian Altiplano). The parameters c_SMX, k_WWTP and k_river are the annual consumption, the removal in the WWTP and the removal rate in the River, respectively.*

Parameter	***c_SMX***		***k_WWTP***		***k_river***	
Season	Wet	Dry	Wet	Dry	Wet	Dry
S	2460546	1006221	-7	-5.28	-2060	-1158

3.3 Ecotoxicological environmental risk assessment

Ecotoxicological environmental risk assement was performed using the PNEC value for aquatic organisms (algae, crustaceans and fish) from Schlabach et al. (2005), which was calculated from available data from published literature.

The ratio *PEC/PNEC* for each river stretch varied between 0.15 and 24.6 for the wet season and between 0.15 and 7.6 for the dry season. The environmental risk is thus higher during the wet season, when *PEC/PNEC* values exceed 10. The Figure 4 shows the potential environmental risk associated with the presence of SMX in surface waters of the Katari catchment for wet (A) and dry (B) seasons.

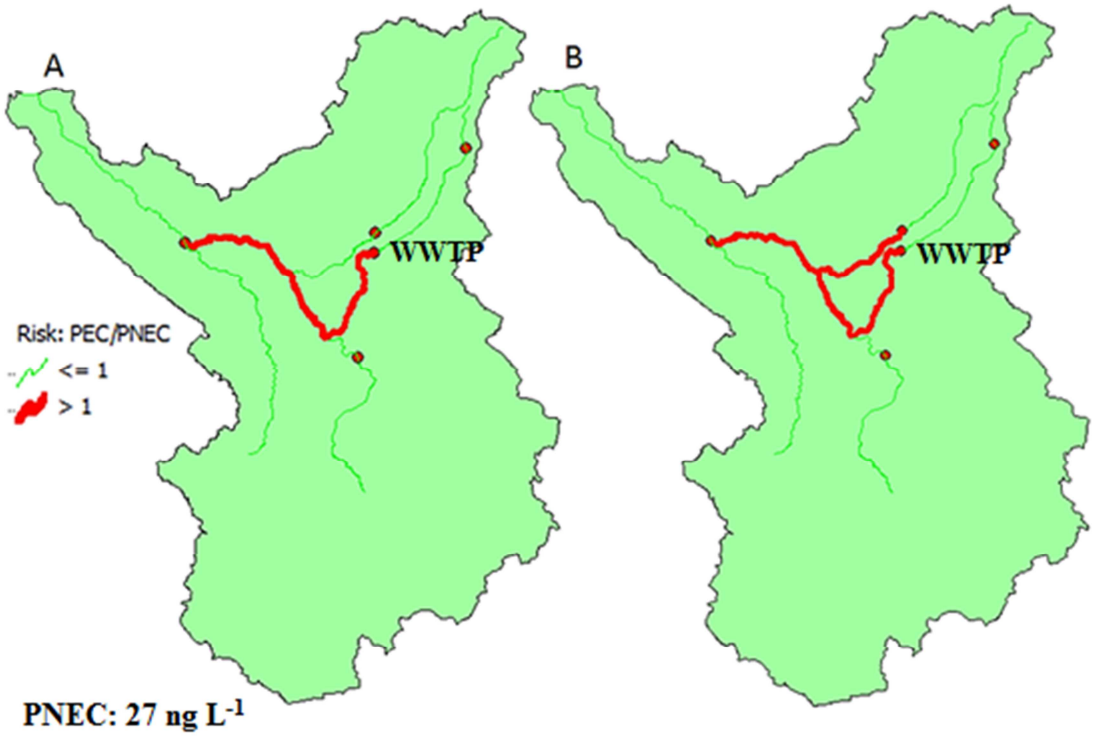


Figure 4. *SMX environmental risk in the surface waters of the Katari catchment (A: wet season. B: dry season) expressed as the PEC/PNEC ratio. PEC refers to predicted environmental concentration (from simulations for reference scenarios for both seasons). PNEC refers to predicted no effect concentration (from literature).*

During the wet season, the environmental risk is present in the lower Seco River after the discharge of the Puchukollo WWTP (*PEC/PNEC*: 24.6) and in the lower Pallina River under the influence of treated wastewater discharges from the WWTP (*PEC/PNEC* between 11.7 and 19.3). Thus, the environmental risk appears mainly associated with wastewater discharges from the Puchukollo WWTP during the wet season. For the dry season, the environmental risk is predicted in the same river stretches as predicted during the wet season (lower Seco (*PEC/PNEC*: 7.6) and lower Pallina River (*PEC/PNEC* between 5.3 and 6)) but also in the lower Seco River receiving the waste waters discharges from El Alto city without prior treatment (*PEC/PNEC*: 4.3). The concentrations entering the Titicaca lake are below PNEC.

The mean ratio of *PEC/PNEC* (mean of *PEC/PNEC* at all river stretches*)* of the reference scenarios were 4.8 for the wet season and 2 for the dry season. These values are within the range of *PEC/PNEC* observed in other studies performed with the GREAT-ER model for pharmaceutical compounds (Aldekoa et al., 2013; Alder et al., 2010).

These results suggest that a better management of the treatment of wastewaters stemming from the two main cities of the catchment (El Alto and Viacha) is required to improve the water quality downstream. According to predicted values and conducted environmental risk assessment, SMX concentrations arriving to Titicaca lake is not a threat for the aquatic ecosystem, especially considering the dilution effect in the lake. However, the real concentration is higher considering the fact that non-point sources are not considered by the GREAT-ER model. Furthermore, the existence of an environmental risk in the lower Katari River as well as in the upper part of the Seco River (before the Puchukollo WWTP) cannot be excluded considering that PEC where lower than observed concentrations for both seasons.

4 Conclusion and perspectives

The GREAT-ER model was able to predict the spatial pattern of SMX concentration in the surface waters of the Katari catchment for both the dry and the wet seasons, especially considering the scarcity of information.

Nevertheless, an effort on the characterization of water dynamics is essential to improve the accuracy of PECs, particularly during the wet season, so is the estimation of the SMX local consumption. Overall, there remains some degree of uncertainty about the degradation behavior and SMX mass lost (polluted water losses in the river network). This highlights the importance of the assessment of degradation and lost mass process of antibiotics on the study site. The last, could help to achieve more accurate results on the prediction of the fate of antibiotic compounds and to properly evaluate the risks associated with its presence.

The conducted sensitivity analysis showed that pharmaceutical consumption is the parameter that influences more on environmental concentrations. Thus consideration of local consumption is necessary in the order to obtain realistic estimates. The results also suggest that natural attenuation by rivers helps to reduce SMX concentrations. However, diminution of SMX concentrations by natural attenuation can enhance environmental risks associated whit SMX transformation products as it also can have toxic effects (Hess et al., 1999) and can potentially be retransformed on the parent compound (Feijtel et al., 1997). Furthermore, non-point sources principally located in the Katari bajo River which increases concentrations at the lower part of the catchment cannot be considered with this model.

Even if natural attenuation happens, the environmental risk assessment showed that the most exposed areas are the lower Seke, Seco and Pallina Rivers in connection of its urban influence. Consequently, it is proposed that a better management of pharmaceutical consumption patterns and of wastewater collection and treatment is necessary on the order to reduce antibiotic contamination and its related ecotoxicological risk across the Katari catchment.

Acknowledgements
This project was partly funded by LABEX OSUG@2020, ANR grant # ANR-10-LABX-56" (financed on the Future Investments program launched by the French government and implemented by the ANR). We thank the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the support given to the first author. We thank the Bolivian Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI, La Paz) for their technical assistance.

References

- Acuña, V., von Schiller, D., García-Galán, M.J., Rodríguez-Mozaz, S., Corominas, L., Petrovic, M., Poch, M., Barceló, D., Sabater, S., 2015. Occurrence and in-stream attenuation of wastewater-derived pharmaceuticals in Iberian rivers. Sci. Total Environ. 503-504, 133–141. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.067
- Aldekoa, J., Medici, C., Osorio, V., Pérez, S., Marcé, R., Barceló, D., Francés, F., 2013. Modelling the emerging pollutant diclofenac with the GREAT-ER model: Application to the Llobregat River Basin. J. Hazard. Mater. 263, 207–213. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.08.057
- Alder, A.C., Schaffner, C., Majewsky, M., Klasmeier, J., Fenner, K., 2010. Fate of β-blocker human pharmaceuticals in surface water: Comparison of measured and simulated concentrations in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. Water Res. 44, 936–948. doi:10.1016/j.watres.2009.10.002
- Anderson, P.D., D'Aco, V.J., Shanahan, P., Chapra, S.C., Buzby, M.E., Cunningham, V.L., DuPlessie, B.M., Hayes, E.P., Mastrocco, F.J., Parke, N.J., Rader, J.C., Samuelian, J.H., Schwab, B.W., 2004. Screening Analysis of Human Pharmaceutical Compounds in U.S. Surface Waters. Environ. Sci. Technol. 38, 838–849. doi:10.1021/es034430b
- Anderson PD, D'Aco VJ, Shanahan P, Chapra SC, Buzby ME, Cunningham VL, Duplessie BM, Hayes EP, Mastrocco FJ, Parke NJ, Rader JC, Samuelian JH, Schwab BW, 2004. Screening analysis of human pharmaceutical compounds in U.S. surface waters. Env. Sci Technol 38, 838–849.
- Archundia, D., Duwig, C., Lehembre, F., Chiron, S., Prado, B., Morel, M.C., Martins, J.M.F., submitted. Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca lake and occurrence of SMX resistance genes.
- Archundia, D., Duwig, C., Spadini, L., Uzu, G., Guédron, S., Morel, M.C., Cortez, R., Ramos Ramos, O., Chincheros, J., Martins, J.M.F., submitted. Eutrophization and polymetallic contamination in the continuum Milluni - Katari - Lake Titicaca : Impact of anthropogenic activities from the fastest-growing urban center of Bolivia (El Alto, 4000 m a.s.l.). Geochem. Explor. Submitted.
- Boeije, G., Koormann, F., 2003. Chemical Fate Models.
- Boithias, L., Sauvage, S., Srinivasan, R., Leccia, O., Sánchez-Pérez, J.-M., 2014. Application date as a controlling factor of pesticide transfers to surface water during runoff events. CATENA 119, 97–103. doi:10.1016/j.catena.2014.03.013
- Buxton, N., Escobar, M., Purkey, D., 2013. El Cambio Climático y la Crisis del Agua en La Paz y El Alto.
- Duwig, C., Archundia, D., Lehembre, F., Spadini, L., Morel, M.C., Uzu, G., Chincheros, J., Cortez, R., Martins, J.M.F., 2014. Impacts of Anthropogenic Activities on the Contamination of a Sub Watershed of Lake Titicaca. Are Antibiotics a Concern in the Bolivian Altiplano? Procedia Earth Planet. Sci. 10, 370–375. doi:10.1016/j.proeps.2014.08.062
- Feijtel, T., Boeije, G., Matthies, M., Young, A., Morris, G., Gandolfi, C., Hansen, B., Fox, K., Holt, M., Koch, V., others, 1997. Development of a geography-referenced regional exposure assessment tool for European rivers-GREAT-ER contribution to GREAT-ER# 1. Chemosphere 34, 2351–2373.
- Fonturbel, F., 2005. Evaluación preliminar de la calidad hídrica, mediante indicadores fisicoquímicos y biológicos, en la Bahía de Cohana, Lago Titikaka,(Departamento de La Paz, Bolivia).

- Grill, G., Khan, U., Lehner, B., Nicell, J., Ariwi, J., 2016. Risk assessment of down-the-drain chemicals at large spatial scales: Model development and application to contaminants originating from urban areas in the Saint Lawrence River Basin. Sci. Total Environ. 541, 825–838. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.100
- Halling-Sorensen, B., Sengelov, G., Tjørnelund, J., 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. Arch Env. Contam Toxicol 42, 263–271.
- Hernando, M., Mezcua, M., Fernandezalba, A., Barcelo, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. Talanta 69, 334–342. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.037
- Hess, D.A., Sisson, M.E., Suria, H., Wijsman, J., Puvanesasingham, R., Madrenas, J., Rieder, M.J., 1999. Cytotoxicity of sulfonamide reactive metabolites: apoptosis and selective toxicity of CD8+ cells by the hydroxylamine of sulfamethoxazole. FASEB J. 13, 1688–1698.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. Sci. Total Environ. 225, 109–118.
- Huang, C.-H., Renew, J.E., Smeby, K.L., Pinkston, K., Sedlak, D.L., 2001. Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. Water Resour 120, 30–40.
- Hüffmeyer, N., Klasmeier, J., Matthies, M., 2009. Geo-referenced modeling of zinc concentrations in the Ruhr river basin (Germany) using the model GREAT-ER. Sci. Total Environ. 407, 2296–2305. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.055
- Jagiello, K., Mostrag-Szlichtyng, A., Gajewicz, A., Kawai, T., Imaizumi, Y., Sakurai, T., Yamamoto, H., Tatarazako, N., Mizukawa, K., Aoki, Y., Suzuki, N., Watanabe, H., Puzyn, T., 2015. Towards modelling of the environmental fate of pharmaceuticals using the QSPR-MM scheme. Environ. Model. Softw. 72, 147–154. doi:10.1016/j.envsoft.2015.06.013
- Johnson, A.C., Keller, V., Williams, R.J., Young, A., 2007. A practical demonstration in modelling diclofenac and propranolol river water concentrations using a GIS hydrology model in a rural UK catchment. Environ. Pollut. 146, 155–165. doi:10.1016/j.envpol.2006.05.037
- Kehrein, N., Berlekamp, J., Klasmeier, J., 2015. Modeling the fate of down-the-drain chemicals in whole watersheds: New version of the GREAT-ER software. Environ. Model. Softw. 64, 1–8.
- Keller, V., 2006. Risk assessment of “down-the-drain” chemicals: Search for a suitable model. Sci. Total Environ. 360, 305–318. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.08.042
- Lunestad, B.T., Samuelsen, O.B., Fjelde, S., Ervik, A., 1995. Photostability of eight antibacterial agents in seawater. Aquaculture 134, 217–225.
- Mackay D., 2001. Multimedia environmental models. The fugacity approach., 2nd ed. CRC Press.
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.-Ch., 1997. Illustrated handbook of physical-chemical properties of environmental fate for organic chemicals. CRC press.
- Martinez, J.L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environ. Pollut. 157, 2893–2902.
- Mazurek, H., 2012. El censo en Bolivia, una herramienta de desarrollo. T’inkazos 32: Coordination du numéro spécial sur les recensements.
- M.M.A.y.A., 2010. Plan Director de la Cuenca Katari.
- Mojica, E.-R., Aga, D., 2011. Antibiotics Pollution in Soil and Water: Potential Ecological and Human Health Issues. Elsevier.
- Ort, C., Hollender, J., Schaerer, M., Siegrist, H., 2009. Model-Based Evaluation of Reduction Strategies for Micropollutants from Wastewater Treatment Plants in Complex River Networks. Env. Sci Technol 43, 3214–3220. doi:10.1021/es802286v
- PNUMA, 2011. Perspectivas del medio ambiente en el sistema hidrico Titicaca-Desaguadero-Poopo-Salar de Coipasa (TDPS). PNUMA.
- Radke, M., Lauwigi, C., Heinkele, G., Mürdter, T.E., Letzel, M., 2009. Fate of the Antibiotic Sulfamethoxazole and Its Two Major Human Metabolites in a Water Sediment Test. Env. Sci Technol 43, 3135–3141. doi:10.1021/es900300u
- Ribera Arismendi, M.A., 2010. La Bahía de Cohana. Actualización 2009-2010. –La Paz: Serie de estudios de caso sobre problemáticas socio ambientales en Bolivia No 1. LIDEMA. 78p.
- Schlabach M, Grung M, Heimstad ES, Moe M, Schlabach M, Svenson A, Thomas K, Woldegiorgis A, 2005. Human and Veterinary Pharmaceuticals, Narcotics, and Personal Care Products in the Environment. Report 1-98.
- Schowanek, D., Webb, S., 2002. Exposure simulation for pharmaceuticals in European surface waters with GREAT-ER. Toxicol. Lett. 131, 39–50.

- Segura, P.A., Takada, H., Correa, J.A., El Saadi, K., Koike, T., Onwona-Agyeman, S., Ofosu-Anim, J., Sabi, E.B., Wasonga, O.V., Mghalu, J.M., dos Santos, A.M., Newman, B., Weerts, S., Yargeau, V., 2015. Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: Impact of income inequality between countries. Environ. Int. 80, 89–97. doi:10.1016/j.envint.2015.04.001
- Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., Yu, G., 2015. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. Emerg. Contam. 1, 14–24. doi:10.1016/j.emcon.2015.07.001
- Vermeire, T., Rikken, M., Attias, L., Boccardi, P., Boeije, G., Brooke, D., de Bruijn, J., Comber, M., Dolan, B., Fischer, S., Heinemeyer, G., Koch, V., Lijzen, J., Müller, B., Murray-Smith, R., Tadeo, J., 2005. European union system for the evaluation of substances: the second version. Chemosphere 59, 473–485. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.062
- Wagner, J.O., Koormann, F., 2011. GREAT-ER Desktop Manual.
- Zuccato E., Calamari D, Natangelo M., Fanelli R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. The Lancet 355, 1789–1790. doi:S0140-6736(00)02270-4
- Żukowska, B., Breivik, K., Wania, F., 2006. Evaluating the environmental fate of pharmaceuticals using a level III model based on poly-parameter linear free energy relationships. Sci. Total Environ. 359, 177–187. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.05.033

3. Conclusion

Dans ce chapitre, l'objectif principal était de tester la capacité du modèle GREAT-ER pour simuler les concentrations en SMX observées dans les eaux de surface du BV. Une modélisation ciblée sur le réseau hydrographique a été choisie car la molécule a été retrouvée dans la quasi-totalité du réseau hydrographique en lien avec le rejet des eaux usées traitées ou non traitées alors que peu de sols sont pour l'instant affectés par la présence d'antibiotiques. Le deuxième objectif était de déterminer si ce modèle est un outil viable pour une utilisation ultérieure par les autorités boliviennes dans l'identification des zones à risque et la gestion de cette pollution.

Cet exercice a été réalisé avec la constante de dégradation observée lors de l'expérience de photodégradation dans l'eau de rivière et différentes données déduites lors de la caractérisation de l'état du pollution du BV. Bien que ne disposant pas de paramètres décrivant par exemple la rétention du SMX dans les sédiments du réseau hydrographique ou de données sur la consommation de cette molécule, les résultats de modélisation montrent que les données disponibles ont été suffisantes pour décrire la tendance générale de la distribution spatiale du composée étudié dans les principaux cours d'eau du BV. Le modèle GREAT-ER peut donc être utilisé dans le contexte du BV comme outil de gestion et d'aide à la décision.

Cependant, les modélisations pourraient être sensiblement améliorées avec principalement une meilleure description de la variabilité hydrologique, ce qui est important dans les conditions climatiques contrastées de l'Altiplano.

Les zones à risque identifiées comme prioritaires sont les zones du réseau hydrographique sous l'influence des activités urbaines. L'analyse de sensibilité effectuée a montré que la consommation est le principal paramètre influant sur les concentrations retrouvées et qu'une meilleure gestion des eaux usées dans l'ensemble du BV est nécessaire dans le but de réduire cette pollution des eaux de surface ainsi que la pollution des autres compartiments, principalement le compartiment souterrain afin de limiter les risques sur les populations des zones urbaines.

CHAPITRE VI. Conclusions et perspectives.

L'objectif général de ces travaux de thèse était d'une part, la compréhension et l'identification des processus majeurs intervenant dans le devenir des molécules antibiotiques dans l'environnement, et d' autre part, l'étude de ces processus sur les populations bactériennes. Un apport important de ces travaux est l'intégration de différents types d'observations allant de l'échelle centimétrique à l'échelle du bassin versant dans un contexte extrême en terme climatique et de haute altitude dans l'Altiplano bolivien. Les études antérieures sur la contamination dans l'Atliplano se sont surtout focalisées sur les éléments traces métalliques, étant donné le grand nombre de sites miniers autour du Lac Titicaca. Notre étude concernant les polluants émergents et notamment les antibiotiques est la première de ce genre dans cet environnement. Ainsi, la réalisation de ces travaux a nécessité une approche pluridisciplinaire faisant appel à des observations de terrain en hydrologie et en géochimie, à des connaissances sur la dynamique des systèmes, la microbiologie et la modélisation. L'étude des processus a été réalisée sur un des antibiotiques le plus fréquemment retrouvée dans les milieux naturels ainsi que sur le site d'étude : le Sulfamethoxazole. Dans cette partie conclusive, je reprends les questions adressées au début de la thèse.

Quel est l'état actuel de pollution du site d'étude (molécules antibiotiques et autres possiblement complexantes)? Quelles sont les sources de pollution par les antibiotiques?

Le bassin versant (BV) du Katari s'est avéré être fortement dégradé en terme de contamination des ressources en eau et en sols, avec la présence d'une multi-contamination des eaux de surface provenant des zones urbaines, principalement liée au rejet des eaux usées. L'intérêt porté à la caractérisation de la présence des éléments traces métalliques est fondée sur le fait qu'ils peuvent agir comme molécules complexantes en modifiant ainsi la sorption et mobilité du composé antibiotique modèle.

En termes d'éléments trace métalliques, leur présence dans la partie amont du bassin versant est liée à leur origine géogénique ainsi qu'aux activités minières. Cependant, les cours d'eau provenant de la Cordillère Real tamponnent cette pollution avant leur entrée dans la ville d'El Alto. C'est ainsi que les fortes concentrations dans la phase dissoute et particulaire retrouvées plus bas sont en relation avec une pollution urbaine qui perdurent dans les eaux de surface jusqu'à la baie de Cohana dans le lac Titicaca, même si des processus de dilution, sorption et décantation font diminuer les concentrations. La qualité microbiologique des eaux est aussi

très dégradée due à la présence de quantités très élevées de coliformes fécaux qui est un autre indice de pollution par les eaux usées. Les nutriments (principalement le phosphore et le carbone organique) sont aussi présents en quantité excessive dans le réseau hydrographique dans la zone urbaine et en aval. De la même façon, des concentrations élevées de SMX (entre 12 et 134 ng L^{-1} en saison humide et entre 13.2 et 218 ng L^{-1} en saison sèche), proches des concentrations retrouvées dans la Seine ou le Mekong par d'autres auteurs, ont été observées dans le réseau hydrographique du BV. Les concentrations les plus élevés ont été retrouvées à proximité de la sortie de la station d'épuration des eaux usées et en d'autres points de la zone urbaine. Le SMX est aussi présent dans l'eau souterraine à des concentrations similaires aux eaux de surface, variant de 42 à 221 ng L^{-1}. Ces concentrations ont été mesurées dans les puits fournissant l'eau potable à la ville d'El Alto. Ces résultats représentent un risque réel pour les populations, même si les effets toxicologiques de ce type de pollution sur les êtres humains sont encore méconnus. Le SMX a aussi été retrouvé dans les sols du BV à des concentrations très variables. Ces résultats démontrent l'importance d'une meilleure compréhension des processus régissant sa persistance et sa dissémination ainsi que de ses effets adverses potentiels.

Au jour d'aujourd'hui, les connaissances concernant le devenir de ces polluants dit « émergents » sont restreintes. L'étude sur l'état de pollution du site d'étude confirme que ce composé est persistant et mobile dans le contexte de l'Altiplano bolivien, et susceptible de polluer d'avantage les écosystèmes environnants.

Ce constat fait ressortir la nécessité de surveiller la présence des composés antibiotiques, mais aussi d'autres molécules pharmaceutiques rejetés dans les eaux usées, dans le site d'étude et en général dans les écosystèmes de haute altitude anthropisés, qui sont en général des écosystèmes fragiles dus aux conditions climatiques extrêmes (faibles températures et taux d'humidité, forts rayonnements UV et fortes variations diurnes de ces paramètres).

La résistance bactérienne aux antibiotiques est-elle présente? Si oui, y a-t-il un lien entre la présence d'antibiotiques et la présence de résistance bactérienne au même composé ?

Des gènes de résistance bactérienne au SMX (principalement *sulI* et *sulII*) ont été observés sur l'ensemble du réseau hydrographique, ainsi que dans les zones pas ou peu anthropisées et où la concentration SMX était en dessous des limites de détection.

Un fait intéressant est que la prévalence des gènes de résistance (*sulI*) en tête du BV (avec présence très limitée d'activités humaines et avec des concentrations en SMX inférieures aux limites de détection) a été la même pour les deux campagnes d'échantillonnage réalisées et avec des abondances relatives semblables à celles observées dans les effluents de la STEP. Ce résultat suggère que les mécanismes de co-résistance sont très dynamiques et vraisemblablement liés à la présence naturelle d'éléments métalliques dans cette zone. Nous avons donc la confirmation que l'étude de la pollution par antibiotiques et de leurs impacts nécessite une approche multi-contaminants en prenant en compte les autres molécules susceptibles d'interagir avec les antibiotiques.

En aval de la zone urbaine la présence de gènes de résistance dans les eaux de surface s'est avérée être intimement liée aux rejets des eaux usées dans les rivières. Les abondances relatives les plus élevées ont été observées dans les effluents de la STEP, abondance qui diminue graduellement en aval du rejet. Un autre résultat intéressant est que l'abondance relative des gènes de résistance dans les effluents de la STEP est plus élevée que celle dans les afluents, confirmant les résultats d'autres auteurs sur le rôle des STEPs en tant qu'éléments clés dans la transmission, la multiplication et la dissémination des gènes de résistance.

Le lien entre la présence des gènes de résistance dans les sols et la présence d'antibiotiques n'a pas été vérifié. En effet, des sols avec présence du SMX n'ont pas montré la présence de gènes de résistance. Seul le sol proche de la STEP recevant fréquemment des rejets d'eaux usées a présenté des gènes de résistance. Dans le cas des sols, il semblerait que les gènes de résistance soient associés au rejet fréquent d'eaux usées plutôt qu'à la présence de l'antibiotique étudié. Ces résultats sont très intéressants et pourraient être liés aux conditions extrêmes de l'Altiplano limitant l'activité microbienne et le développement de résistance même en présence de l'antibiotique, ce qui ouvre des perspectives intéressantes.

Pour tester l'hypothèse que la présence et prévalence de gènes de résistance est plutôt lié à l'apport de ces gènes par les eaux usées, il serait intéressant de réaliser des expériences dans lesquels les sols sont irriguées avec des eaux usées et de suivre la prévalence de ces gènes après l'arrêt d'irrigation.

Quelles sont les facteurs majeurs influençant le devenir et la persistance du composé modèle dans un environnement de haute altitude?

Hypothétiquement, le composé modèle étant une molécule photodégradable et dans les conditions de haute altitude avec une incidence élevée des rayons ultra-violet, on s'attent à ce que la photodegradation soit un facteur prépondérant sur son devenir et sa persistance dans les eaux de surface. Cependant, ces travaux de thèse ont montré que si bien cette molécule est soumise à de la photodégradation, le taux est faible en comparaison aux résultats de la littérature. Cela est lié au fait que la plupart des études sur la photodégradation du SMX ont été réalisées dans des conditions de laboratoire et dans de l'eau pure. Nous avons montré qu'effectivement dans l'eau pure, cette molécule suit une cinétique de photodégradation très élevée et rapide. Par contre, dans des conditions naturelles (eau de rivière) ce taux est considérablement réduit en raison de la présence d'autres molécules, que ce soient naturelles ou d'origine anthropique. La présence de molécules organiques et d'ions qui ont la faculté d'absorber la lumière semble une explication raisonnable pour les faibles taux de photodégradation observés. Il a aussi été démontré que d'autres processus abiotiques comme l'hydrolyse, la sorption par des matières en suspension et la biodégradation sont négligeables. Ceci explique la présence de ce composé dans la quasi-totalité du réseau hydrographique, et cela même dans des zones éloignées des sources principales (rejet des eaux usées traitées ou non traitées).

Nous avons également étudié sa persistance dans le compartiment sol. Comme attendu nous avons pu constater que les propriétés du sol, principalement le pH, influençaient les caractéristiques physicochimiques du composé modèle (spéciation pH-dépendante) et par conséquent sa mobilité et sa rétention. Ce qui est lié à la présence du SMX dans des formes différentes (neutre et ionique) aux pH, contenus de matiere organique et aux capacités d'echangue cationique des sols étudiés. La biodégradation du composé a également été observée dans les sols étudiés cependant le taux de biodégradation est très variable et généralement faible. En vue des résultats sur les différents processus affectant le SMX dans le bassin du Katari, nous concluons que la sorption est le processus prépondérant dans le devenir du SMX dans les sols du BV, le pH, le taux de matière organique et la CEC étant les propriétés des sols influençant majoritairement la sorption. Dans ce contexte, il est recommandé de poursuivre ces travaux en considérant : i) une gamme de concentrations élargie vers des valeurs faibles (pour s'approcher des concentrations environnementales) et ii)

des différents pH, taux de matière organique et CEC dans un même sol afin de valider ces résultats.

Ces résultats montrent également l'existence d'un risque de développement de résistances bactériennes dans les sols de surface où ce composé est fortement retenu, principalement dans les sols de la zone urbaine irrigués avec les eaux usées riches en matière organique et les sols des zones humides de haute altitude de la région du Puna andin qui ont des taux de matière organique et des capacités de sorption élevés.

Quel est la mobilité du composée modèle au niveau du bassin versant ? et Existe-t-il un risque de pollution par antibiotiques des eaux souterraines ?

La majorité des études existantes sur la mobilité du SMX montre que cette molécule est hautement mobile. Ces travaux de thèse ont montré que sa mobilité est variable selon les caractéristiques du sol et très possiblement selon la présence ou non d'autres contaminants (principalement la présence d'autres molécules complexantes) qui peuvent être fortement retenus dans les sols.

En résumé, dans la partie haute du BV où des zones humides sont alimentés par les glaciers et ont donné lieu à des sols acides mais très riches en matière organique, ainsi que dans les sols de la zone urbaine irrigués par les eaux usées riches en matière organique, le SMX montre des propriétés de mobilité réduites. En effet 30 à 60% du composé est retenu dans les sols de surface. Dans la partie aval du BV et sur les berges du lac Titicaca, le SMX a une mobilité élevée. Dans ces sols peu développés et pauvres en matière organique, seulement environ 7% du composé est retenu dans les sols de surface.

Le potentiel de pollution des eaux souterraines ne peut cependant pas être correctement évalué seulement avec ces observations expérimentales sur l'horizon superficiel. Le travail réalisé sur la caractérisation des horizons en profondeur a montré la présence d'un risque élevé de pollution des eaux souterraines là où le composé avait une mobilité réduite en surface. Dans certains sols, l'augmentation des taux de sable et de gravier dans les horizons inférieurs ainsi que la présence d'argiles gonflantes favorisent l'infiltration de la fraction non sorbée. Ces argiles gonflantes ont été observées dans la partie aval du BV rendant le risque de pollution de l'aquifère plus important pendant la saison sèche et au début de la saison humide dû aux phénomènes de retrait-gonflement des argiles lorsque la teneur en eau varie fortement. Sur les berges du lac Titicaca, l'augmentation des matériaux grossiers dans les horizons inferieurs,

associé à la faible profondeur à laquelle est localisé l'aquifère, indique également un risque de pollution élevé.

Les résultats démontrent que la mobilité du SMX est un phénomène complexe qui doit tenir compte d'une sorption irréversible, avec cinétique et dépendante du pH.

L'ensemble de ces résultats font clairement ressortir le risque potentiel de contamination des eaux souterraines par des composés organiques mobiles et potentiellement toxiques dans le BV et expliquent également les fortes concentrations en SMX retrouvées dans les eaux souterraines étudiées (puits de production d'eau potable de la ville de El Alto).

Compte tenu du risque élevé, il est recommandé d'étudier la présence des composés antibiotiques dans les puits de la partie basse du BV ainsi qu'à proximité des berges du lac Titicaca, pour compléter les connaissances sur les risques auxquels les populations sont exposées.

Quels sont les impacts de la présence du composé modèle sur la structure des communautés bactériennes ainsi que sur le développement de résistance bactérienne?

L'impact du SMX sur les communautés bactériennes a été évalué par une approche qualitative, en étudiant la variation de l'indice de diversité bactérienne (Shannon et Simpson) mesuré par des empreintes moléculaires de type DGGE et le séquençage d'ADN ainsi que par une étude qualitative sur la structure phylogénétique des communautés bactériennes. On observe aussi des effets variables parmi les sols étudiés, indiquant une sensibilité différente des communautés bactériennes à la pollution par antibiotiques.

Dans cette étude la technique de séquençage s'est révélée être plus sensible. Le sol qui a montré le plus d'impact au SMX est le sol situé en tête du BV, où les effets ont été visibles avec les deux techniques utilisées, les indices de diversité étant significativement différents avant et après ajout de SMX. Dans ce sol, les impacts ont été visibles rapidement montrant que la population bactérienne de ces sols est très sensible, en lien avec l'absence de pollution par le SMX. Le sol situe dans la partie aval du BV (le long de la rivière Katari) a aussi montré des effets sur les indices de diversité (seulement par séquençage) en lien aussi avec une pollution faible par SMX. Les sols localisés à proximité de la STEP n'ont pas montré des changements significatifs après l'ajout de SMX, les populations bactériennes étant habituées à la présence du SMX due aux rejets des eaux usées traitées et non traitées contenant des

concentrations élevées en SMX. Les sols situés sur les berges du lac Titicaca ont été faiblement affectés, avec des variations de ces indices de diversité non significatifs statistiquement. Dans les sols où un impact a été observé, les impacts concernent essentiellement une baisse de biodiversité, de richesse spécifique et du nombre de bactéries de différentes espèces (équitatibilité).

L'analyse qualitative sur les indices de diversité a été approfondie par une étude sur la structure phylogénétique par pyroséquençage. Les phylum dominants avant ajout de SMX dans les sols étudiés sont *Actinobacter* et *Proteobacter*. Globalement, le phylum *Actinobacter* et les *bacteroidetes* ont diminué dans tous les sols après ajout du SMX, tandis que le phylum *Proteobacter* n'a pas été affecté.

Comme rappelé plus haut, les gènes de résistance au SMX (*sulI* et *sulII*) ont été détectés seulement dans l'ADN métagénomique extrait du sol à proximité de la STEP. Ceci indique que ce sol est un réservoir important de bactéries résistantes à cet antibiotique. Par ailleurs, l'ajout de SMX n'a pas provoqué le développement de résistance bactérienne au SMX (gènes *sulI* et *sulII*) dans les autres sols étudiés (avec absence initial de ces gènes). Ces résultats sont très intéressants et contredisent les hypothèses de départ, c'est-à-dire un développement de résistance dans tous les sols en présence du composé étudié. Ils expliquent cependant le fait que certains sols contaminés aux SMX ne montrent pas de résistances bactériennes au SMX.

Ces résultats pourraient être liés aux conditions extrêmes de l'Altiplano (variations diurnes extrêmes des facteurs climatiques : rayonnement solaire, température, humidité) et généralement sèches limitant l'activité microbienne et donc le développement de résistance. Cette hypothèse mérite d'être étudiée plus en profondeur en examinant les paramètres pouvant affecter l'activité microbienne un par un et avec en fonction de différentes concentrations de antibiotique. Cela permettrait de déceler les mécanismes de développement, transmission et prévalence des gènes de résistance dans les conditions extrêmes et sèches de haute altitude. D'autre part, l'absence du développement des gènes *sulI* et *sulII* peut-être lié à la présence des autres mécanismes conférant la résistance aux antibiotiques comme par exemple les pompes a efflux. C'est pourquoi il est recommandé d'étudier le développement des gènes liés à ces mécanismes de résistance.

Un modèle numérique existant peut-il être envisagé comme outil de simulation et prédiction des concentrations en antibiotiques dans les eaux de surface du bassin versant en utilisant les données collectées durant cette thèse ?

L'étape finale de ces travaux avait comme but d'utiliser les différentes données ici recueillies pour alimenter un modèle existant et tester sa capacité à simuler les concentrations observées dans le réseau hydrographique. Les données utilisées ont été : i) la constante de dégradation totale dans l'eau de rivière observée durant l'expérience de photodégradation ($0.0016h^{-1}$), ii) la rétention du SMX dans la STEP, déduite des concentrations retrouvées en entrée et en sortie (70%) et iii) les données hydrologiques recueillies dans la partie « Etat de pollution du BV ». Le modèle nécessitait des données de consommation du composé dans le site d'étude, cependant ces données sont inexistantes. C'est pourquoi une consommation par zone a été déduite à partir des concentrations observées à certains points stratégiques du BV (STEP, amont des 4 cours d'eau principaux). Cette démarche a aussi permis de prendre en compte la variation dans la quantité de SMX rejetée au sein du BV.

Globalement, le modèle choisi (GREAT-ER) a été capable de reproduire la distribution spatiale des concentrations, qui confirme le choix d'alimenter le modèle avec des données de consommation différentes par zone, permettant une reproduction fidèle de la distribution réelle. Cependant du point de vue quantitatif, les concentrations prédites ont été sur-estimées dans les zones soumises a l'influence urbaine (surtout pendant la saison humide), tandis que dans les zones de la partie base du BV, les concentrations ont été plutôt sous estimées (cependant, elles sont plus proches des valeurs réelles que les valeurs sur estimées dans la zone urbaine).

Ces différences sont reliées principalement à la faible quantité des données hydrologiques (données continues) avec lesquelles la simulation a été réalisée, surtout dans les conditions d'un régime hydrologique fortement dynamique en saison des pluies. C'est pourquoi il est fortement conseillé d'améliorer l'acquisition des données sur les régimes hydrologiques du BV. Cette amélioration pourrait être réalisée aussi par modélisation en utilisant des données de précipitation qui sont plus nombreuses que les données de débits.

Plusieurs scenarios ont été testés avec la finalité d'identifier les variables de contrôle des concentrations prédites. La variable qui influe principalement sur ces concentrations a été la consommation. Ce résultat est prévisible compte tenu que l'accès aux antibiotiques n'est pas

règlementé dans le site d'étude. Ceci induit l'auto-médication avec des doses et durées de traitement non adéquates. La simulation avec ces différents scenarios permet d'identifier des variables « clefs » sur lesquelles les gestionnaires peuvent agir pour contrôler ou diminuer la pollution et ses impacts. Nos résultats indiquent qu'en agissant sur la consommation du SMX, les concentrations environnementales auront tendance à diminuer.

Nous avons également réalisé une évaluation du risque environnemental. Cette évaluation a été réalisée sur la base de données éco-toxicologiques provenant de trois niveaux trophiques: les algues, les crustacés et les poissons. Les zones à risque identifiées sont les zones sous l'influence des rejets des eaux usées. Cependant, la recherche bibliographique a montré que les données éco-toxicologiques existantes pour l'évaluation des risques associés à la présence d'antibiotiques dans l'environnement sont faibles. Principalement, et étant donné que les effets négatifs principaux de cette pollution sont sur les communautés bactériennes et le développement de résistance, il serait plus pertinent de travailler avec des données d'éco-toxicologie bactériennes. Cependant, ces données sont inexistantes dans la littérature. Cela confirme la nécessité d'obtenir des données adéquates dans différents contextes (ou écosystèmes) pour évaluer correctement les risques potentiels de la pollution par antibiotiques dans l'environnement.

Etant donné que les données recueillies dans ce travail de thèse ont été adéquats pour reproduire la distribution générale du SMX dans le réseau hydrographique du BV, il serait intéressant de continuer ce travail de modélisation en utilisant les paramètres de sorption, de mobilité et de dégradation obtenus dans les sols pour une modélisation sur la dissémination de ce composé dans les sols et en subsurface à l'échelle du BV.

References

- Abellán, M.N., Giménez, J., Esplugas, S., 2009. Photocatalytic degradation of antibiotics: The case of sulfamethoxazole and trimethoprim. Catal. Today 144, 131–136. doi:10.1016/j.cattod.2009.01.051
- Adams, C., Wang, Y., Loftin, K., Meyer, M., 2002. Removal of antibiotics from surface and distilled water in conventional water treatment processes. J Env. Eng 253–260.
- Akiba, T., Koyama, K., Ishiki, Y., Kimura, S., Fukushima, T., 1960. ON THE MECHANISM OF THE DEVELOPMENT OF MULTIPLE-DRUG-RESISTANT CLONES OF SHIGELLA. Jpn. J. Microbiol. 4, 219–227.
- Alexy, R., Kümpel, T., Kümmerer, K., 2004. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. Chemosphere 57, 505–512.
- Alexy, R., Kumpel, T., Kummerer, K., 2000. Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt Literaturrecherche, Stoffauswahl. First progress report of Grant (First progress report of Grant from Federal Environmental Agency Berlin, Freiburg. No. 29863722).
- Amiard, J.-C., 2011. Les risques chimiques environnementaux: Méthodes d'évaluation et impacts sur sur les organismes. Lavoisier.
- Andersson, D., 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 6, 452–456.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. Chemosphere 50, 1319–1330.
- Bahnmüller, S., von Gunten, U., Canonica, S., 2014. Sunlight-induced transformation of sulfadiazine and sulfamethoxazole in surface waters and wastewater effluents. Water Res. 57, 183–192. doi:10.1016/j.watres.2014.03.019
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends Microbiol. 14, 176–182. doi:10.1016/j.tim.2006.02.006
- Balsalobre, L., de la Campa, A.G., 2008. Fitness of Streptococcus pneumoniae Fluoroquinolone-Resistant Strains with Topoisomerase IV Recombinant Genes. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 822–830. doi:10.1128/AAC.00731-07
- Bartoloni, A., Pallecchi, L., Benedetti, M., Fernandez, C., Vallejos, Y., Guzman, E., Villagran, A.L., Mantella, A., Lucchetti, C., Bartalesi, F., 2006. Multidrug-resistant commensal Escherichia coli in children, Peru and Bolivia. Emerg. Infect. Dis. 12, 907.
- Batt, A.L., Bruce, I.B., Aga, D.S., 2006. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. Environ. Pollut. 142, 295–302.
- Bertelkamp, C., Reungoat, J., Cornelissen, E.R., Singhal, N., Reynisson, J., Cabo, A.J., van der Hoek, J.P., Verliefde, A.R.D., 2014. Sorption and biodegradation of organic micropollutants during river bank filtration: A laboratory column study. Water Res. 52, 231–241. doi:10.1016/j.watres.2013.10.068
- Berthet, J., Amar-Costesec, A., 2005. Dictionnaire de biologie / Jacques ; en collaboration avec Alain Amar-Costesec ; [préface de Christian de Duve]. De Boeck, Bruxelles.
- Bialk, H.M., Pedersen, J.A., 2008. NMR Investigation of Enzymatic Coupling of Sulfonamide Antimicrobials with Humic Substances. Env. Sci Technol 106–112.
- Binh, C., Heuer, H., Kaupenjohann, M., Smalla, K., 2008. Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. FEMS Microbiol. Ecol. 66, 25–37.
- Blanco, G., Lemus, J.A., Grande, J., 2009. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. Environ. Res. 109, 405–412.
- Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W., Top, E.M., 2002. Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. FEMS Microbiol. Ecol. 39, 101–112.
- Boreen, A.L., Arnold, W.A., McNeill, K., 2004. Photochemical Fate of Sulfa Drugs in the Aquatic Environment: Sulfa Drugs Containing Five-Membered Heterocyclic Groups. Environ. Sci. Technol. 38, 3933–3940. doi:10.1021/es0353053
- Bourdat-Deschamps, M., Leang, S., Bernet, N., Daudin, J.-J., Nélieu, S., 2014. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction–ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction. J. Chromatogr. A 1349, 11–23. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.006
- Boxall, A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P., Tolls, J., 2002. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. Toxicol. Lett. 131, 19–28.
- Calvet, R., 2003. Le sol: propriétés et fonctions, France Agricole. ed. DUNOD.
- Calvet, R., 1989. Adsorption of Organic Chemicals in Soils. Environ. Health Perspect. 83, 145–177.

- Cetecioglu, Z., Ince, B., Azman, S., Gokcek, N., Coskun, N., Ince, O., 2013. Determination of Anaerobic and Anoxic Biodegradation Capacity of Sulfamethoxasole and the Effects on Mixed Microbial Culture, in: Chamy, R. (Ed.), Biodegradation - Engineering and Technology. InTech.
- Chen, J., Su, Z., Liu, Y., Wang, S., Dai, X., Li, Y., Peng, S., Shao, Q., Zhang, H., Wen, P., Yu, J., Huang, X., Xu, H., 2009. Identification and characterization of class 1 integrons among Pseudomonas aeruginosa isolates from patients in Zhenjiang, China. Int. J. Infect. Dis. 13, 717–721. doi:10.1016/j.ijid.2008.11.014
- Chen, H., Liu, S., Xu, X.-R., Liu, S.-S., Zhou, G.-J., Sun, K.-F., Zhao, J.-L., Ying, G.-G., 2015. Antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: Occurrence, bioaccumulation and human dietary exposure. Mar. Pollut. Bull. 90, 181–187. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.10.053
- Chèvre, N., Rossi, L., 2007. Micropolluants organiques dans les eaux de surface. Etat de la recherche.
- Choi, K.-J., Kim, S.-G., Kim, C., Kim, S.-H., 2007. Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD. Chemosphere 66, 977–984. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.037
- Collado, N., Buttiglieri, G., Marti, E., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Comas, J., Rodriguez-Roda, I., 2013. Effects on activated sludge bacterial community exposed to sulfamethoxazole. Chemosphere 93, 99–106. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.094
- Cristobal Girardia, Josephine Greve, Marc Lamshöft, Ingo Fetzer, Anja Miltner, Andreas Schäffer, Matthias Kästner, 2011. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. J. Hazard. Mater. 198, 22–30.
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 417–433.
- De la Cruz, N., Giménez, J., Esplugas, S., Grandjean, D., de Alencastro, L.F., Pulgarín, C., 2012. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. Water Res. 46, 1947–1957. doi:10.1016/j.watres.2012.01.014
- Delemasure, J.-V., 2012. Analyse des caractéristiques physico-chimiques des sols influant les transferts de contaminants métalliques et organiques vers le lac Titicaca (Stage de recherche). ECOLE POLYTECHNIQUE.
- De Marsily, G., 1981. Hydrogéologie quantitative. Masson, Paris.
- Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. TrAC Trends Anal. Chem. 22, 340–351.
- Drewes, J.., Bellona, C., Oedekoven, M., Xu, P., Kim, T.., Amy, G., 2006. Rejection of Wastewater-Derived Micropollutants in High-Pressure Membrane Applications Leading to Indirect Potable Reuse. Environ. Prog. 24, 400e409.
- Drillia, P., Dokianakis, S.N., Fountoulakis, M.S., Kornaros, M., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 2005. On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole. J. Hazard. Mater. 122, 259–265. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.03.009
- Duarte, S., Pascoal, C., Cassio, F., 2012. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology-Insights from Freshwaters. INTECH Open Access Publisher.
- Duwig, C., Archundia, D., Lehembre, F., Spadini, L., Morel, M.C., Uzu, G., Chincheros, J., Cortez, R., Martins, J.M.F., 2014. Impacts of Anthropogenic Activities on the Contamination of a Sub Watershed of Lake Titicaca. Are Antibiotics a Concern in the Bolivian Altiplano? Procedia Earth Planet. Sci. 10, 370–375. doi:10.1016/j.proeps.2014.08.062
- Erico Navarro Agreda, 2011. LA PARTICIPACIÓN PRIVADA EN LOS SERVICIOS DE AGUA Y ALCANTARILLADO DE LAS CIUDADES DE LA PAZ Y EL ALTO EN BOLIVIA [WWW Document]. URL http://fr.scribd.com/doc/60672895/LA-PARTICIPACION-PRIVADA-EN-LOS-SERVICIOS-DE-AGUA-Y-ALCANTARILLADO-DE-LAS-CIUDADES-DE-LA-PAZ-Y-EL-ALTO-EN-BOLIVIA-ERICO-NAVARRO-2011 (accessed 1.18.13).
- European Commision, 2003. Regulation (European Commision) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition.
- FAO, 2005. FAO, Land and Water Digital Media Series n5; Soil and Terrain Database for Latin America and the Carribean - 1:5 Million scale.
- Feijtel, T., Boeije, G., Matthies, M., Young, A., Morris, G., Gandolfi, C., Hansen, B., Fox, K., Holt, M., Koch, V., others, 1997. Development of a geography-referenced regional exposure assessment tool for European rivers-GREAT-ER contribution to GREAT-ER# 1. Chemosphere 34, 2351–2373.
- Feinberg, M., 2010. Mise en oeuvre du profil d'exactitude. Cah. Tech. Inra 18.
- Feinberg, M., Laurentie, M., 2010. Le cahier des techniques de l'Inra. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude.
- Figueroa-Diva, R.A., Vasudevan, D., MacKay, A.A., 2010. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. Chemosphere 79, 786–793. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.017

- Fisher, A.., 1980. Environmental Risk Assessment, Scope 15. Anne V. Whyte and Ian Burton.
- Gormley, A., Pollard, S., Rocks, S., 2011. Guidelines for Environmental Risk Assessment and Management: Green Leaves III.
- Fonturbel, F., 2005. Evaluación preliminar de la calidad hídrica, mediante indicadores fisicoquímicos y biológicos, en la Bahía de Cohana, Lago Titikaka,(Departamento de La Paz, Bolivia).
- Fonturbel Rada, F., 2005. Indicadores fisicoquímicos y biológicos del proceso de eutrofización del Lago Titikaka (Bolivia). Ecol Apl 4, 135–141.
- Frédéric, O., Yves, P., 2014. Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. Chemosphere 115, 31–39. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.016
- Garcia, A.H.M., Rivas, J., Figueroa, L., Monroe, A.L., 1995. Case history: pharmaceutical wastewater treatment plant upgrade (SmithKline Beecham Pharmaceuticals Company). Desalination 255–263.
- Genin, B., Chauvin, C., Ménard, F., 2003. Cours d'eau et indices biologiques: pollution, méthodes, IBGN, 2eme ed. Educagri.
- Gibs, J., Heckathorn, H.A., Meyer, M.T., Klapinski, F.R., Alebus, M., Lippincott, R.L., 2013. Occurrence and partitioning of antibiotic compounds found in the water column and bottom sediments from a stream receiving two wastewater treatment plant effluents in Northern New Jersey, 2008. Sci. Total Environ. 458-460, 107–116. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.076
- Giger, W., Alder, W.A.C., Golet, E.M., Kholer, H.-P.E., McArdell, C.S., Molner, E., Siegrist, H., Suter, M.J.-F., 2003. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewater, sewage sludges, and surface waters. Chimia 57, 485–491.
- Goni-Urriza, M., Capdepuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P., Quentin, C., 2000. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae andAeromonas spp. Appl. Environ. Microbiol. 66, 125–132.
- Green, S.J., Leigh, M.B., Neufeld, J.D., 2010. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis, in: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, pp. 4137–4158.
- Grill, G., Khan, U., Lehner, B., Nicell, J., Ariwi, J., 2016. Risk assessment of down-the-drain chemicals at large spatial scales: Model development and application to contaminants originating from urban areas in the Saint Lawrence River Basin. Sci. Total Environ. 541, 825–838. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.100
- Halling-Sorensen, B., Sengelov, G., Tjørnelund, J., 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. Arch Env. Contam Toxicol 42, 263–271.
- Han, H., Xiao, H., Lu, Z., 2016. Short-term toxicity assessments of an antibiotic metabolite in wistar rats and its metabonomics analysis by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Toxicol. Appl. Pharmacol. doi:10.1016/j.taap.2016.01.004
- He, H., Jansson, P.-E., Svensson, M., Meyer, A., Klemedtsson, L., Kasimir, Å., 2016. Factors controlling Nitrous Oxide emission from a spruce forest ecosystem on drained organic soil, derived using the CoupModel. Ecol. Model. 321, 46–63. doi:10.1016/j.ecolmodel.2015.10.030
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., Spiteller, M., 2008. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. Soil Biol. Biochem. 40, 1892–1900.
- Hiba, A., Carine, A., Haifa, A.R., Ryszard, L., Farouk, J., 2016. Monitoring of twenty-two sulfonamides in edible tissues: Investigation of new metabolites and their potential toxicity. Food Chem. 192, 212–227. doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.093
- Hoa, P.T.P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D.H., Viet, P.H., Suzuki, S., 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. Sci. Total Environ. 409, 2894–2901. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.030
- Hoshino, Y.T., Matsumoto, N., 2007. DNA- versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation. Soil Biol. Biochem. 39, 434–444. doi:10.1016/j.soilbio.2006.08.013
- Hu, X., Zhou, Q., Luo, Y., 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. Environ. Pollut. 158, 2992–2998.
- Huang, C.-H., Renew, J.E., Smeby, K.L., Pinkston, K., Sedlak, D.L., 2001. Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. Water Resour 120, 30–40.
- Hüffmeyer, N., Klasmeier, J., Matthies, M., 2009. Geo-referenced modeling of zinc concentrations in the Ruhr river basin (Germany) using the model GREAT-ER. Sci. Total Environ. 407, 2296–2305. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.055
- Humbert, L., 2010. Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications. Ann. Toxicol. Anal. 22, 61–68.

doi:10.1051/ata/2010010
- Huovinen, P., 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin. Infect. Dis. 32, 1608–1614.
- Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G., Sköld, O., 1995. Trimethoprim and Sulfonamide Resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 279–289.
- Ingerslev, F., Halling-Sorensen, B., 2000. Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge. Env. Toxicol Chem 19, 2467–2473.
- Instituto Nacional de Estadística de Bolivia, 2001. CENSO DE POBLACION Y VIVIENDA - 2001 POBLACION POR DEPARTAMENTOS, PROVINCIAS, SECCIONES MUNICIPALES, LOCALIDADES Y ORGANIZACIONES COMUNITARIAS [WWW Document]. URL http://www.ine.gob.bo/comunitaria/comunitariaVer.aspx?Depto=02&Prov=01&Seccion=05 (accessed 1.18.13).
- Jacobsen, P., Berglind, L., 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. Aquaculture 70, 365–370.
- Jagiello, K., Mostrag-Szlichtyng, A., Gajewicz, A., Kawai, T., Imaizumi, Y., Sakurai, T., Yamamoto, H., Tatarazako, N., Mizukawa, K., Aoki, Y., Suzuki, N., Watanabe, H., Puzyn, T., 2015. Towards modelling of the environmental fate of pharmaceuticals using the QSPR-MM scheme. Environ. Model. Softw. 72, 147–154. doi:10.1016/j.envsoft.2015.06.013
- J Martins, Mermoud, A., 1999. TRANSPORT OF RIMSULFURON AND ITS METABOLITES IN SOIL COLUMNS. Chemosphere 38, 601–616.
- Kehrein, N., Berlekamp, J., Klasmeier, J., 2015. Modeling the fate of down-the-drain chemicals in whole watersheds: New version of the GREAT-ER software. Environ. Model. Softw. 64, 1–8.
- Keller, V., 2006. Risk assessment of “down-the-drain” chemicals: Search for a suitable model. Sci. Total Environ. 360, 305–318. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.08.042
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecol. Indic. 8, 1–13.
- Kim, K.R., Owens, G., Kwon, S.I., So, K.H., Lee, D.B., Ok, Y.S., 2011. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. Water. Air. Soil Pollut. 214, 163–174.
- Kodešová, R., Grabic, R., Kočárek, M., Klement, A., Golovko, O., Fér, M., Nikodem, A., Jakšík, O., 2015. Pharmaceuticals’ sorptions relative to properties of thirteen different soils. Sci. Total Environ. 511, 435–443. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.088
- Köhler, T., Kok, M., Michea-Hamzehpour, M., Plesiat, P., Gotoh, N., Nishino, T., Curty, L.K., Pechere, J.-C., 1996. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 2288–2290.
- Koormann, F., Rominger, J., Schowanek, D., Wagner, J.-O., Schröder, R., Wind, T., Silvani, M., Whelan, M.J., 2006. Modeling the fate of down-the-drain chemicals in rivers: An improved software for GREAT-ER. Environ. Model. Softw. 21, 925–936. doi:10.1016/j.envsoft.2005.04.009
- Kovalova, L., Siegrist, L., Singer, H., Wittmer, A., McArdell, C.., 2012. Hospital wastewater treatment by membrane bioreactor: performance and efficiency for organic micropollutant elimination. Environ. Sci. Technol. 1536e1545.
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere 75, 417–434. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.086
- Kümmerer, K., Henninger, A., 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. Clin. Microbiol. Infect. 9, 1203–1214.
- Kurwadkar, S.T., Adams, C.D., Meyer, M.T., Kolpin, D.W., 2011. Comparative mobility of sulfonamides and bromide tracer in three soils. J. Environ. Manage. 92, 1874–1881. doi:10.1016/j.jenvman.2011.03.018
- Kutìlek, M., Nielsen, D.R., 1994. Soil Hydrology. GeoEcology, Catene Verlag, Cremlingen-Destedt, Germany.
- Leal, R.M.P., Alleoni, L.R.F., Tornisielo, V.L., Regitano, J.B., 2013. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. Chemosphere 92, 979–985. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.018
- Lee, M.H., Lee, H.J., Ryu, P.D., 2001. Public health risks: chemical and antibiotic residues. Asian-Aust J Anim Sci 14, 402–413.
- Lertpaitoonpan, W., Ong, S.K., Moorman, T.B., 2009. Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. Chemosphere 76, 558–564.
- Leslie B. Masseya, Brian E. Haggarda, Joel M. Galloway, Keith A. Loftin, 2010. Antibiotic fate and transport in three effluent-dominated Ozark streams. Ecol. Eng. 36, 930–938.
- Levin, B.R., 2002. Models for the spread of resistant pathogens. Neth J Med 60, 58–64.
- Lunestad, B.T., Samuelsen, O.B., Fjelde, S., Ervik, A., 1995. Photostability of eight antibacterial agents in seawater. Aquaculture 134, 217–225.
- Luo, N., Pereira, S., Sahin, O., Lin, J., Huang, S., Michel, L., Zhang, Q., 2005. Enhanced in vivo fitness of

fluoroquinolone-resistant Campylobacter jejuni in the absence of antibiotic selection pressure. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 541–546.
- Mackay D., 2001. Multimedia environmental models. The fugacity approach., 2nd ed. CRC Press.
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P., Sharma, P.K., 2010. High performance lmiquid chromatography: a sort review. J. Glob. Pharma Technol. 2, 22–26.
- Martinez, J.L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environ. Pollut. 157, 2893–2902.
- Martinez, J.L., Perez-Diaz, J.C., 1990. Cloning of the determinants for microcin D93 production and analysis of three different D-type microcin plasmids. Plasmid 23, 216–225.
- Martin, R., 2013. El mercado de productos farmaceuticos en Bolivia.
- Martins, J.M., Mermoud, A., 1998. Sorption and degradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturated/unsaturated soil batch systems. J. Contam. Hydrol. 33, 187–210.
- Mazurek, H., 2012. Parcours de territoire : la géographie à l'épreuve des Andes.
- McEvoy, G.K., 2006. AHFS Drug Information 2006. American Society of Health-System Pharmacists, Brethesda, MD.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. Water Res. 47, 957–995. doi:10.1016/j.watres.2012.11.027
- Minh, T.B., Leung, H.W., Loi, I.H., Chan, W.H., So, M.K., Mao, J.Q., Choi, D., Lam, J.C.W., Zheng, G., Martin, M., Lee, J.H.W., Lam, P.K.S., Richardson, B.J., 2009. Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: Ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour. Mar. Pollut. Bull. 58, 1052–1062. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.02.004
- M.M.A.y.A., 2010. Plan Director de la Cuenca Katari.
- Mojica, E.-R., Aga, D., 2011. Antibiotics Pollution in Soil and Water: Potential Ecological and Human Health Issues. Elsevier.
- Moore, D.E., Zhou, W., 1994. Photodegradation of sulfamethoxazole: a chemical system capable of monitoring seasonal changes in UVB intensity. Photochem. Photobiol. 59, 497–502.
- Morel, M.-C., Spadini, L., Brimo, K., Martins, J.M.F., 2014. Speciation study in the sulfamethoxazole–copper–pH–soil system: Implications for retention prediction. Sci. Total Environ. 481, 266–273. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.040
- Müller, E., Schüssler, W., Horn, H., Lemmer, H., 2013. Aerobic biodegradation of the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole by activated sludge applied as co-substrate and sole carbon and nitrogen source. Chemosphere 92, 969–978. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.02.070
- Nazaret, S., Aminov, R., 2014. Role and prevalence of antibiosis and the related resistance genes in the environment, Frontiers Research Topic Ebook. Frontiers Media SA.
- Negreanu, Y., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., Cytryn, E., 2012. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. Env. Sci Technol 46, 4800–4808.
- Niu, J., Zhang, L., Li, Y., Zhao, J., Lv, S., Xiao, K., 2013. Effects of environmental factors on sulfamethoxazole photodegradation under simulated sunlight irradiation: Kinetics and mechanism. J. Environ. Sci. 25, 1098–1106. doi:10.1016/S1001-0742(12)60167-3
- N Toride, Leij, F.J., Genuchten, M.T. van, 1999. The CXTFIT Code for Estimating Transport Parameters from Laboratory or Field Tracer Experiments. Version 2.1.
- Nwosu, V.C., 2001. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. Res Microbiol 152, 421–430.
- OECD, 2000. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 1. Physical-Chemical properties. Test No. 106: Adsorption-Desorption Using a Batch Equilibrium Method.
- Ona-Nguema, G., Roose-Amsaleg, C., Paolozzi, L., Liébart, J.-C., Bauda, P., Bodilis, J., Dussurget, O., Forterre, P., Gutierrez, C., Latifi, A., 2015. Microbiologie. DUNOD, Paris.
- Orias, F., Perrodin, Y., 2013. Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. Sci. Total Environ. 454-455, 250–276. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.064
- Paré, J.R.J., Bélanger, J.M.R., 1997. Instrumental methods in food analysis. Elsevier science.
- Peng, X., Wang, Z., Kuang, W., Tan, J., Li, K., 2006. A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China. Sci. Total Environ. 314e322.
- Perreten, V., Boerlin, P., 2003. A New Sulfonamide Resistance Gene (sul3) in Escherichia coli Is Widespread in the Pig Population of Switzerland. Antimicrob Agents Chemother 47, 1169–1172.
- Ploy, M.-C., Gassama, A., Chainier, D., Denis, F., 2005. Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. Immuno-Anal. Biol. Spéc. 20, 343–352. doi:10.1016/j.immbio.2005.10.001

- PNUMA, 2011. Perspectivas del medio ambiente en el sistema hidrico Titicaca-Desaguadero-Poopo-Salar de Coipasa (TDPS). PNUMA.
- Puckowski, A., Mioduszewska, K., Łukaszewicz, P., Borecka, M., Caban, M., Maszkowska, J., Stepnowski, P., 2016. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. J. Pharm. Biomed. Anal. doi:10.1016/j.jpba.2016.02.049
- Raich-Montiu, J., Folch, J., Compañó, R., Granados, M., Prat, M.D., 2007. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. J. Chromatogr. A 1172, 186–193. doi:10.1016/j.chroma.2007.10.010
- RECORD, 2012. Substances émergentes, polluants émergents dans les déchets Analyse et prospective.
- Ribera Arismendi, M.A., 2010. La Bahía de Cohana. Actualización 2009-2010. –La Paz: Serie de estudios de caso sobre problemáticas socio ambientales en Bolivia No 1. LIDEMA. 78p.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, I., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. Sci. Total Environ. 447, 345–360. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.032
- Robert Grosse, Carlos Santos, JavierTaks, StefanThimmel, 2006. Las Canillas Abiertas de América Latina II: La lucha contra la privatización del agua y los desafíos de unagestión participativa y sustentable de los recursos hídricos. Casa Bertolt Brecht, Montevideo, Uruguay.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Velasco, C., Pascual, Á., Cano, M.E., Martínez-Martínez, L., Martínez-Martínez, L., Pascual, Á., 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J. Infect. Chemother. 17, 149–182. doi:10.1007/s10156-010-0120-2
- Ryan, C.C., Tan, D.T., Arnold, W.A., 2011. Direct and indirect photolysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in wastewater treatment plant effluent. Water Res. 45, 1280–1286. doi:10.1016/j.watres.2010.10.005
- Rysz, M., Alvarez, P.J.J., 2004. Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments. Water Res. 38, 3705–3712.
- Sangster, J., 1997. Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry. Wiley.
- Schauss, K., Focks, A., Heuer, H., Kotzerke, A., Schmitt, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B.M., Matthies, M., Amelung, W., 2009. Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. TrAC Trends Anal. Chem. 28, 612–618.
- Schmitt, H., Haapakangas, H., van Beelen, P., 2005. Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance. Soil Biol. Biochem. 37, 1882–1892.
- Segura, P.A., Takada, H., Correa, J.A., El Saadi, K., Koike, T., Onwona-Agyeman, S., Ofosu-Anim, J., Sabi, E.B., Wasonga, O.V., Mghalu, J.M., dos Santos, A.M., Newman, B., Weerts, S., Yargeau, V., 2015. Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: Impact of income inequality between countries. Environ. Int. 80, 89–97. doi:10.1016/j.envint.2015.04.001
- Sengelov, G., Agersø, Y., Halling-Sørensen, B., Baloda, S.B., Andersen, J.S., Jensen, L.B., 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. Environ. Int. 28, 587–595.
- Simunek, J., Sejna, M., Saito, H., Genuchten, M.T.V., 2008. The HYDRUS-1D Software Package for Simulating the One-Dimensional Movement of Water, Heat, and Multiple Solutes in Variably-Saturated Media. Dep. Environ. Sci. Univ. Calif. RIVERSIDE RIVERSIDE Calif.
- Sköld, O., 2000. Sulfonamide Resistance: Mechanisms and Trends. Drug Resist. Updat. 3, 155–160.
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., 2014a. Assessing the sorption and leaching behaviour of three sulfonamides in pasture soils through batch and column studies. Sci. Total Environ. 493, 535–543. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.034
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., 2014b. Dissipation of sulfamethoxazole in pasture soils as affected by soil and environmental factors. Sci. Total Environ. 479-480, 284–291. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.014
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., Manley-Harris, M., 2014. Sorption of selected veterinary antibiotics onto dairy farming soils of contrasting nature. Sci. Total Environ. 472, 695–703. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.104
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., Manley-Harris, M., 2013. Co-contaminants and factors affecting the sorption behaviour of two sulfonamides in pasture soils. Environ. Pollut. 180, 165–172. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.022
- Stockholm County Council, 2014. Environmentaly classified pharmaceuticals: 2014-1015.
- Swann Committee, 1969. Report of Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. Her Majesty's Stationary Office. London.
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Tuc Dinh, Q., Clément, M., Chevreuil, M., 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. Sci. Total Environ. 393, 84–95. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.12.009

- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Res. 32, 3245–3260.
- Thiele-Bruhn S, Aust MO, 2004. Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. Env. Contam Toxicol 47.
- Tong, L., Eichhorn, P., Pérez, S., Wang, Y., Barceló, D., 2011. Photodegradation of azithromycin in various aqueous systems under simulated and natural solar radiation: Kinetics and identification of photoproducts. Chemosphere 83, 340–348. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.025
- Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K., 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. Chemosphere 74, 1090–1097. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.10.051
- Top, E., Mergeay, M., Springael, D., Verstraete, W., 1990. Gene escape model: transfer of heavy metal resistance genes from Escherichia coli to Alcalignes eutrophus on agar plates and in soil samples. Appl. Environ. Microbiol. 56.
- Trovó, A.G., Nogueira, R.F.P., Agüera, A., Fernandez-Alba, A.R., Sirtori, C., Malato, S., 2009a. Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation. Water Res. 43, 3922–3931. doi:10.1016/j.watres.2009.04.006
- Trovó, A.G., Nogueira, R.F.P., Agüera, A., Sirtori, C., Fernández-Alba, A.R., 2009b. Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: Persistence, toxicity and photoproducts assessment. Chemosphere 77, 1292–1298. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.065
- Valdés, M.E., Huerta, B., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., Barceló, D., Rodriguez-Mozaz, S., 2016. Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolization by fish. Sci. Total Environ. 557-558, 58–67. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.03.045
- Van der Werf, H.M., 1997. Évaluer l'impact des pesticides sur l'environnement. Courr Env. 31, 5–22.
- Van Genuchten, M., Wierenga, P., 1976. Mass Transfer Studies in Sorbing Porous Media I. Analytical Solutions. Soil Sci. Soc. Am. 40.
- van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front. Microbiol. 2.
- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D., 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. J. Hydrol. 389, 416–428. doi:10.1016/j.jhydrol.2010.06.005
- WHO, 2001. Water Quality: Guidelines, Standards and Health. L Fewtrell and J Bartram, Geneve.
- Wu, Y., Chen, D., Kookana, R., 2011. Aqueous photodegradation of selected antibiotics under different conditions. Energy Procedia 11, 2098–2103.
- Xu, B., Mao, D., Luo, Y., Xu, L., 2011. Sulfamethoxazole biodegradation and biotransformation in the water–sediment system of a natural river. Bioresour. Technol. 102, 7069–7076. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.086
- Yang, S.-F., Lin, C.-F., Yu-Chen Lin, A., Andy Hong, P.-K., 2011. Sorption and biodegradation of sulfonamide antibiotics by activated sludge: Experimental assessment using batch data obtained under aerobic conditions. Water Res. 45, 3389–3397. doi:10.1016/j.watres.2011.03.052
- Yang Wu, D.C., Rai, K., 2011. Aqueous Photodegradation of Selected Antibiotics under Different Conditions. IPCBEE I.
- Yu, T., Lin, A.., Lateef, S.., Yang, P., 2009. Removal of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs by extended sludge age biological process. Chemosphere 77, 175e181.
- Zhang, C.-L., Guo, X.-L., Li, B.-Y., Wang, Y., 2012. Biodegradation of ciprofloxacin in soil. J. Mol. Liq. 173, 184–186. doi:10.1016/j.molliq.2012.06.016
- Zhang, Q., Sahin, O., McDermott, P.F., Payot, S., 2006. Fitness of antimicrobial-resistant Campylobacter and Salmonella. Microbes Infect. 8, 1972–1978. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.031
- ZHENG, W., ZHANG, L., ZHANG, K., WANG, X., XUE, F., 2012. Determination of Tetracyclines and Their Epimers in Agricultural Soil Fertilized with Swine Manure by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. J. Integr. Agric. 11, 1189–1198.
- Zielezny, Y., Groeneweg, J., Vereecken, H., Tappe, W., 2006. Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity. Soil Biol. Biochem. 38, 2372–2380.

ANNEXE 1

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Procedia Earth and Planetary Science 10 (2014) 370 – 375

Procedia
Earth and Planetary Science

Geochemistry of the Earth's Surface meeting, GES-10

Impacts of anthropogenic activities on the contamination of a sub watershed of Lake Titicaca. Are antibiotics a concern in the Bolivian Altiplano?

C. Duwig[a,]*, D. Archundia[a], F. Lehembre[a], L. Spadini[a], M.C. Morel[a,b], G. Uzu[a], J. Chincheros[c], R. Cortez[d], J.M.F. Martins[a]

[a]*LTHE, UMR 5564, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France*
[b]*CNAM, Laboratoire d'analyses chimiques et bio analyses, Paris Cedex 3, France*
[c]*Universidad Mayor de San Andrès, Laboratorio de Calidad Ambiental, Insituto de Ecologia, La Paz, Bolivia*
[d]*Universidad Mayor de San Andrès, Instituto de Geologia, La Paz Bolivia*

Abstract

The Titicaca Lake is the most important water resource over the Andean plateau and the ecological equilibrium of this region is nowadays perturbed by recent changes in land use and management practices. The Katari watershed encompasses mining area, cities representing over 1.2 million habitants, and agricultural zones before ending in Cohana bay in the Titicaca Lake. Cohana Bay is known to be one of the most eutrophic bay of the Titicaca Lake. The objective of the study was to evaluate the impact of anthropic activities along the watershed on the river quality and on the bacterial diversity. Both mining activities and release of wastewater in river systems impacts greatly the surface water quality, with level of As exceeding limits for drinking water, and phosphate over the European guidelines for bad quality rivers. Antibiotic from the sulfonamide family was detected in the watershed in high concentrations downstream of the two main cities and bacterial resistance occurred in nearly all the sampled water points.

© 2014 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/).
Peer-review under responsibility of the Scientific Committee of GES-10

Keywords: antibiotics; nutrients; trace metallic elements; bacterial resistance.

* Corresponding author. Tel.: +33 476 51 42 81; fax: +33 456 52 09 87.
E-mail address: celine.duwig@ird.fr

1878-5220 © 2014 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/).
Peer-review under responsibility of the Scientific Committee of GES-10
doi:10.1016/j.proeps.2014.08.062

1. Introduction

The Titicaca Lake constitutes the most important water resource on the Altiplano and the most elevated in the world. The ecosystems present inside the lake and in the surrounding watersheds, as well as human activities developed since millenaries, adapted themselves to very constraining climate and soil conditions. The ecological equilibrium of this region is nowadays perturbed by recent changes due to an important urban demographic growth, to the entry of the society in modernity and to the transformations of usages and practices at local and global scales. For millennia, the edges of Lake Titicaca have been subject to intense mining leading to trace metal elements contamination [1]. The Katari watershed, located in the northern part of the Altiplano includes mining zones, as well as urban, industrial and agricultural area. Salvarredy-Aranguren et al. [2] studied the mining related contamination in the Milluni Valley, located in the north-east part of the Katari watershed and they found that surface water were strongly contaminated by the acid mine drainage from mining operations in the area. The ecological balance of the watershed and Titicaca Lake is also disturbed by domestic and industrial wastewater discharges from rapidly growing urban areas. Katari watershed encompasses El Alto city, the biggest city in the Altiplano, which is a very good example of a quick developing city sensible to environmental changes. El Alto population increased from 95,000 habitants in 1976 to around 1.2 million according to the last census without any land planning and regulation. The wastewater collect and treatment system of this city are insufficient [3] and cover only about 50% of this fast growing city, which causes wastewater discharges directly into the rivers with subsequent impacts on the quality of the surface waters [1]. The outlet of Katari watershed, Cohana Bay, has the waters among the most eutrophic of the lake [4]. Antibiotics were already reported to have adverse effect on human health in Bolivia [5] but no study has been performed on their presence in the river systems and their impact on bacterial community. This present study aims (i) to document the occurrence of trace metals, nutriments, and antibiotics in the Katari watershed and to (ii) evaluate the impact of contamination on bacterial resistance along the watershed. It is the first study of its kind to provide baseline information on the multi-contamination risks of water resources around the Titicaca Lake.

2. Materials and methods

2.1. Studied site

The Katari watershed is about 2022 km^2. Only a part of the Katari watershed was sampled, the most populated, (Fig. 1), which represents 40% of the whole Katari watershed. The watershed is dominated by summits reaching 6000 m asl in the Eastern Andes (Cordillera Real, Huayna Potosi, 6088 m asl). Four main rivers flow through the considered part of the watershed: the Katari, Seco, Seke and Pallina rivers. The Seke and Seco rivers take their source in the Milluni Valley where a network of diffuse runoff and wetlands can be observed during the wet season. Seke river discharges into Milluni lakes, which receive mining drainage [2] and serve also as the main reservoir of drinking water for la Paz city. Downstream, Seke and Seco rivers flow through El Alto (1.2 million habitants) and Viacha (80000 habitants), where treated and untreated urban waters are discharged into it. These rivers discharge into the Rio Pallina, itself discharging into the Katari river. Finally the Katari river runs through rural areas and discharges into Titicaca Lake in the Cohana bay.

The climate of the region is semi-dry and cold as determined by the Intertropical Convergence Zone and by its high altitude (over 3800 m). The region has extreme diurnal variations of climatic factors such as solar radiation, temperature and moisture deficit. Rainfall is very low with an average annual precipitation of 492-620 mm/year, concentrated from December to March.

2.2. Sampling and analytical procedures

Surface waters were sampled in June 2012 (dry season) and February 2013(wet season) at 12 points along the watershed (Fig. 1a). 5 AM and 5 AV correspond to the entry and the exit of the Waste Water Treatment Plan (WWTP) at el Alto respectively: 5 AV is located just before the release of treated waste water in the Seco River. At each point, flow rate, pH, temperature and Electrical conductivity were measured *in situ*. Samples were taken for nutrients, antibiotics, and trace elements in dissolved phase, as well as trace elements in particulate phase and

sediments. Filtration at 0.45µm if necessitated was performed *in situ* or the same day at the laboratory. Nutrients were analyzed by ionic chromatography for anions and by ICP AES for cations and trace metals. A screening of different antibiotics families (Sulfonamides, Penicillin G, Cyclines, Trimethoprim, Chloramphenicol) was analysed by HPLC MS/MS. The existence of bacterial resistance to sulfamethoxazol in water was evaluated by PCR (genes *Sul1*, *Sul2* and *Sul3*).

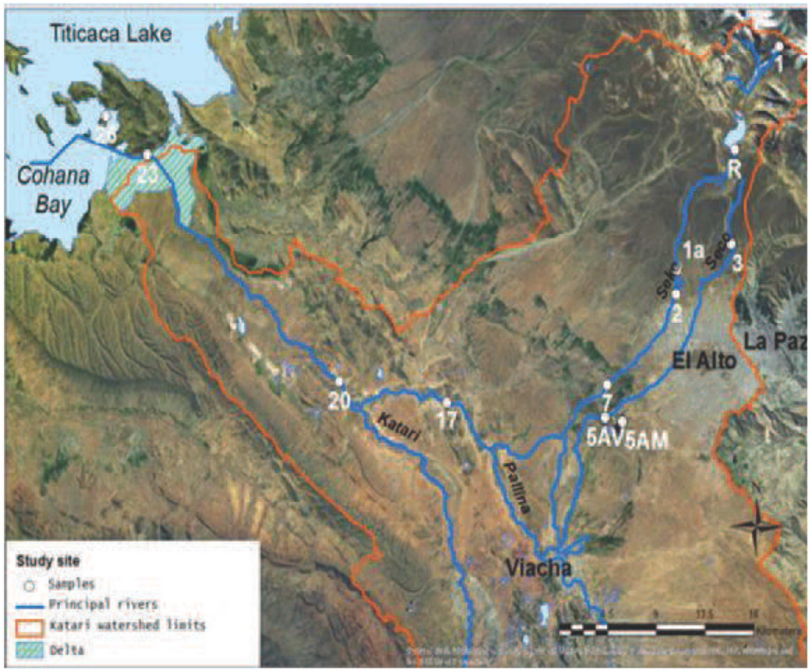


Fig. 1. Map of part of the Katari watershed and sampling sites

3. Results and Discussion

3.1. Nutrients concentration and trophic state indicators

During the dry season, the water samples upstream (4500-4700m a.s.l, points 1 and 3, Fig. 1) show the pattern of an unpolluted oxygenated watercourse with low aqueous Fe, Mn and phosphate (< limit detection) and low nitrate (< 1 mg L^{-1}). The rivers water quality changes entirely when entering the urban area. The appearance of two redox indicators, Fe and phosphate are observed (Fig. 2). Phosphate concentrations may be considered extreme, as they surpass the European guidelines for highly polluted river waters (2 mg L^{-1} PO_4^{-3}, European guidelines) by a factor of 10. Aqueous Fe, presumably present as Fe(II), is measured at 0.1 mg L^{-1}. These concentrations characterize eutrophic conditions which relates to oxygen depletion, algal and slime development, and high bacterial loads. This quality change is due to the high inputs of untreated waste waters entering rivers of low flow, i.e. low dilution and self-cleaning potential especially in the dry season. The discharge of the WWTP of El Alto represents 0.5 to 7 times the natural flow rate of the Seco river at the point of confluence, in wet and dry season respectively. Finally, the river water quality changes again at the entrance of Lake Titicaca: Phosphate and Fe are depleted. This decrease presumably relates to both, dilution and re-oxygenation effects.

During the wet season, river flow rates increases strongly. At the sampling dates they were multiplied by 50 to 300 between dry and wet season. This change in flow rate affects the water chemistry. Nutrients (NO_3^-, PO_3^{-3}) still distribute similarly in the watershed compared to dry season but at lower levels because of dilution (Fig. 2). Ammonium (data not shown), only measured in the wet season campaign, was only detected in the polluted urban area, confirming the eutrophic state of the water. In both wet and dry season, Chloride increases from almost < 1

mg L^{-1} upstream to ~ 100 mg L^{-1} at the entry of the urban area and ~200 mg L^{-1} after the confluence with the Pallina. Similarly, Sulfate concentrations are high between 30 and 120 mg L^{-1} and do not vary a lot between dry and wet season. Chloride and Sulfate concentrations remain high even in the estuary of the Titicaca Lake, where the salinity is high: the electrical conductivity ranges between 1200 and 1500 µS cm^{-1} [6]. The WWTP does not seem to have an impact on nutrients concentrations, as the concentration before and after are similar at least in wet season. In opposite, Fe and Mn concentrations distributes differently between wet and dry season. In the wet season, they are measured in the whole transect at concentrations ≤ 2 mg L^{-1} for Fe and ≤ 0.7 mg L^{-1} for Mn. In parallel, the presence of moderate dissolved oxygen is measured in all points. This co-presence of metals in reduced state and oxygen in the urban area is due to rapid oxygenation because of good mixing with high water flow. The presence of aqueous Fe, presumably Fe(II), in the top uncontaminated samples upstream the mining site and urban area is more difficult to explain. Eventually, sulfide to sulfate oxidation in local ore deposits reduces the abundantly present Fe oxides. This Fe(II) is thus leached to the stream during the wet season.

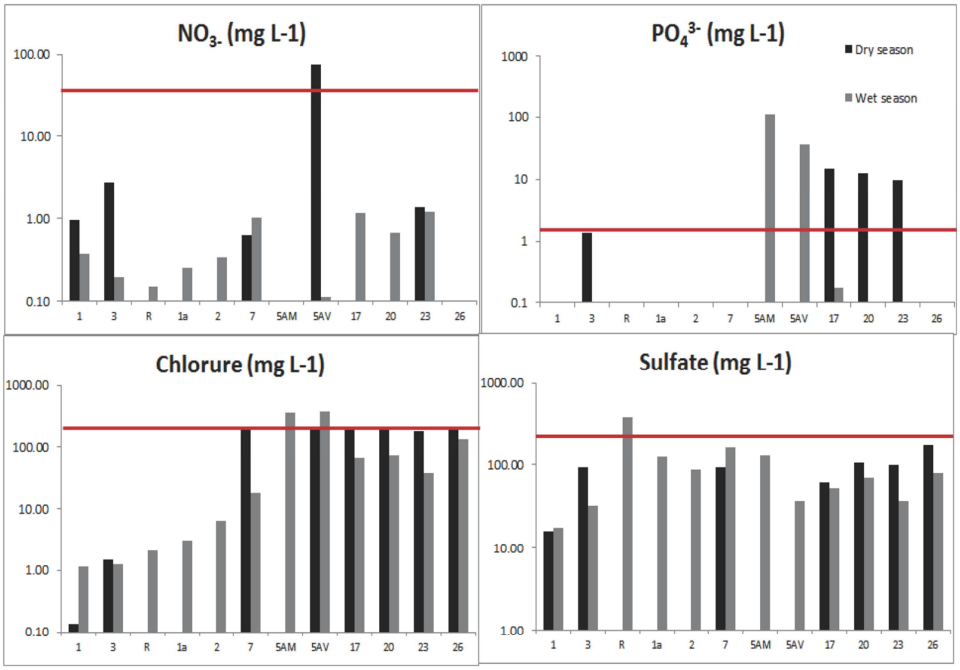


Fig. 2 : Evolution of nitrate, phosphate, sulfate and chloride along the watershed. Red line: European guidelines for bad quality river waters

3.2. Dissolved and particulate trace metal concentrations

The sampling point R was downstream of the Sn mining area and metallic elements are mainly in dissolved phase (Fig. 3) because of low pH (3.5). This change in pH relates to acid mine drainage, i.e. the acid generating oxidation of reduced anions such as sulfides during ore processing. Downstream the mining site, the pH rapidly re-equilibrates to neutral to basic values, this stands for a sufficient buffering pH effect of the water and minerals in contact with flowing water, or respectively a moderate impact of the mining activity on the water quality. Across the urban area (from points 1a to 7), the dissolved concentrations of Cd, Ni, Zn, As increase nearly twofold (Fig. 3). However, particulate concentrations are constant expect for Zn at point 7. Dissolved metallic elements may be generated by mining activities (point 3), waste landfills (above point 1a), and wastewaters (points 2 and 7). Levels of dissolved and particulate metallic elements increase after the WWTP (point 5AV). Particulate concentrations increase twofold and is due to flocculation processes in the ponds. Point 17 receives black water from El Alto and Viacha cities, and dissolved concentrations for As and Pb are measured similar to levels at the WWTP exit. There is an increase of particulate and dissolved concentrations between 20 and 23 showing impacts of anthropic activities in the Cohana

bay. Ba, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn, Al and Fe concentrations were greater in wet season (data not shown) in accordance with previous results[2], which is probably linked with leaching from rocks by percolating rain water and with the presence of acid mine drainage upstream of the Milluni lac reservoir area. The acid mine drainage results from contact of rainwater with crushed or broken rock that contains iron sulfide. Besides, Se and As concentrations were generally greater in dry season.

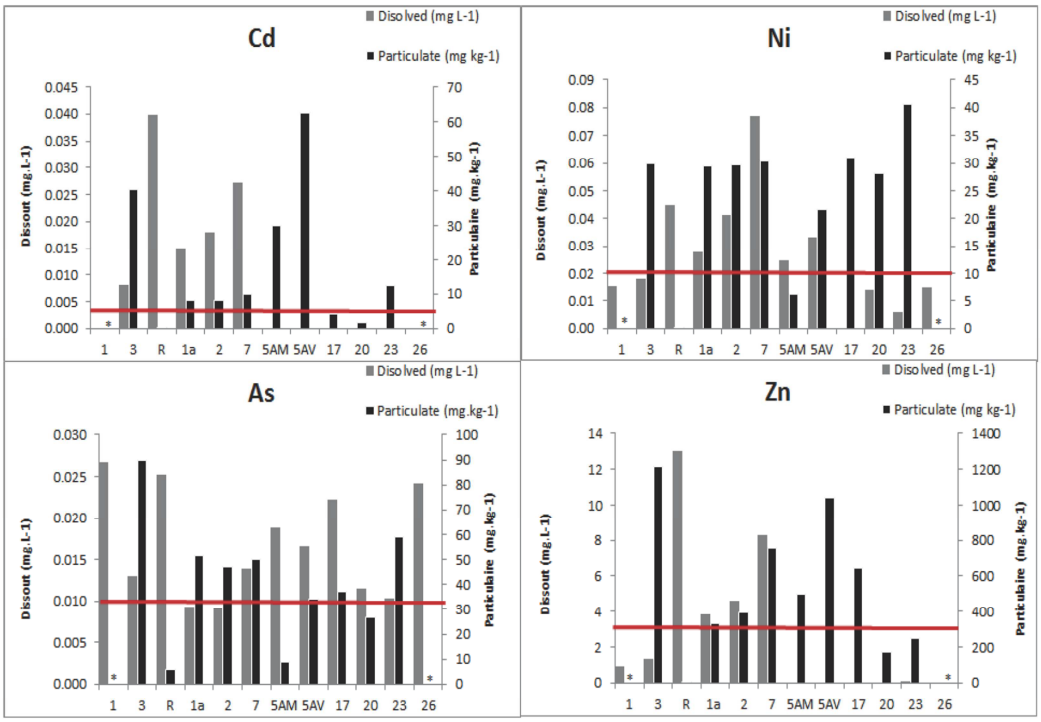


Fig 3. Evolution of Cd, As, Ni and Zn in dissolved and particulate phase in the wet season. * means that the concentration could not be analyzed because the particulate matter was not enough.

In regards with World Health Organization (WHO) water guidelines for human consumption, As is the metalloid the most of concern in the Katari which always exceeds threshold of 10µg L^{-1} (Fig. 3). Dissolved As is a residue from mining activities resulting from the oxidative weathering of arsenopyrite and is evenly widespread among the watershed. Cd, Ni, Zn and Pb overpass also their respective tolerable limit for water guidelines (0.003 mg L^{-1} for Cd, 0.02 mg L^{-1} for Ni (EU guideline), 3 mg L^{-1} for Zn and 0.01 mg L^{-1} for Pb) upstream the WWTP. Downstream the WWTP, the waters exhibit very low concentrations of dissolved Cd, Ni, Zn (Fig. 3) and Pb and metals reach the particulate fraction (same trends were observed for Cr, Cu, Sn, Mo, Co, data not shown). A hypothesis to explain this behavior is the enrichment in organic matter downstream the WWTP which complexes dissolved metal

3.3. Antibiotics and antibiotics resistance

The screening analyses were performed at points 3, 5AV, 17, 20 and 23. Sulfamethoxazol (SMX) and Trimethoprim (TMP) were the predominant antibiotics detected (Table 1). These two antibiotics are commonly used in the world, sometimes together, for illness treatment for humans and animals. SMX concentrations downstream of the two main cities of the watershed (8832 and 14624 ng L^{-1}) are much higher than concentrations detected in the Seine river in Paris [7] (3.6 to 18 ng L^{-1}) and in the Mekong river in Vietnam [8] (1720 ng L^{-1}). To date, no study shows that this level of concentration has adverse effect for human health. However, the main impact is the modification of biodiversity of indigenous soil and water bacterial population and possible development of bacterial resistance. The last report by WHO [9] globally reveals that antibiotic resistance impacts every region of the world

and is now a major threat to public health. All sampling points present SMX resistance genes (gen *sul1* was the most frequently observed), even in sites located away from SMX sources (point 1). This could be due to the natural presence of metallic elements. Bacterial resistances to diverse metals and antibiotics are often genetically linked, suggesting that exposure to toxic metals may select for strains resistant to antibiotics and vice versa. The only site where not SMX resistance genes were found was the R site, located at the output of the Milluni water reservoir. At this site, the highly acidic water (pH = 3) can affect the development of bacterial communities.

Table 1. Main antibiotics analysed in 5 points of the watershed (ng L^{-1}). LD: detection limit, LQ: quantification limit

Antibiotic	3	5AV	17	20	23
Sulfamethoxazol	63	8832	14624	8893	86
Trimethoprim	31	2632	4474	28	26
Sulfathiazol	1.5	114	137	59	<LQ
Chloramhenicol	23	20	28	<LD	<LD
Sulfadiletoxine	3.4	<LQ	<LQ	<LD	20

4. Conclusions

In the Katari watershed, the release of wastewater in river systems has a great impact on water quality: nutrients, especially phosphate, exceed greatly levels for bad quality river water downstream of the two main cities. Trophic indicators such as dissolved Mn and Fe and oxygen depletion show that waters are eutrophic. The trophic state of Cohana Bay inside the Titicaca Lake is much better: the native plant *Schoenoplectus tatora*, commonly known as totora, growing in the Cohana Bay, is known to remove nutrients such as phosphorus and nitrogen from effluents [10]. Another major impact of wastewater release is the presence of antibiotics, especially SMX, in higher concentrations than in much bigger cities than El Alto. This leads to bacterial resistance to antibiotics in all the sampled points of the watershed except one. Sn mining site upstream of El Alto city releases As in concentrations higher than the WHO drinking water levels and its concentration stays high all along the watershed down to the Lake. Dissolved concentrations of other metallic elements (Cd, Zn and Ni) are high (over the drinking water standards) upstream the watershed, but decrease downstream because they sorbed on suspended sediments.

References

[1] Ministerio de Medio Ambiente y Agua, Bolivia. Plan Nacional de Cuencas - Plan Director de la Cuenca Katari. Ministerio de Medio Ambiente y Agua Viceministerio de Recursos Hídricos y Riego; 2010.

[2] Salvarredy-Aranguren M.M., Probst A., Roulet M., Isaure M.P. Contamination of surface waters by mining wastes in the Milluni Valley (Cordillera Real, Bolivia): Mineralogical and hydrological influences. *Applied Geochemistry* 2008; **23**:1299-1324

[3] Galarza E., Gómez R. Cities in the Andes: threats and hopes. *Environment & Poverty Times* 2005; **04**.

[4] Fontúrbel R.F. Physico-chemical and biological indicators of the eutrophication process at Titicaca Lake (Bolivia). *Ecología Aplicada* 2005, **4**:135-141.

[5] Infante B., Grape M., Larsson M., Kristiansson C., Pallecchi L., Rossolini G.M., Kronvall G. Acquired sulphonamide resistance genes in faecal Escherichia coli from healthy children in Bolivia and Peru. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005 ; **25**:308–312.

[6] Monroy M., Maceda-Veiga A., de Sosto A. Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. *Science of the Total Environment* 2004; **487**:233–244.

[7] Tuc Dinh Q., Alliot F., Moreau-Guigon E., Eurin J., Chevreuil M., Labadie P. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. *Talanta* 2011; **85**:1238–1245.

[8] Shimizu A., Takada H., Koike T., Takeshita A., Saha M., Rinawati, Nakada N., Murata A., Suzuki T., Suzuki S., Chiem N.H., Tuyen B.C., Viet P.H., Siringan M.A., Kwan C., Zakaria M.P., Reungsang A. Ubiquitous occurrence of sulfonamides in tropical Asian waters. *Sci. Total Environ*. 2013; **452-453**:108–115.

[9] http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/

[10] UNEP. *Source Book of Alternative Technologies for Freshwater Augmentation in Latin America and the Caribbean*, part 2.3 Clarification using plants and plant material 1997; http://www.oas.org/dsd/publications/Unit/oea59e/begin.htm#Contents.