



HAL
open science

**Antibiotiques apportés seuls ou en mélange
(antibiotique+antibiotique et antibiotique+métaux)
dans des sols agricoles – Devenir et impacts sur les
microorganismes du sol et leurs activités**

Aurore Andriamalala

► **To cite this version:**

Aurore Andriamalala. Antibiotiques apportés seuls ou en mélange (antibiotique+antibiotique et antibiotique+métaux) dans des sols agricoles – Devenir et impacts sur les microorganismes du sol et leurs activités. Ecologie, Environnement. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA022 . tel-02140610

HAL Id: tel-02140610

<https://theses.hal.science/tel-02140610>

Submitted on 27 May 2019

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.

Antibiotiques apportés seuls ou en mélange (antibiotique+antibiotique et antibiotique+métaux) dans des sols agricoles – Devenir et impacts sur les microorganismes du sol et leurs activités

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie,
environnement et santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : sciences de l'environnement

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 10/12/2018, par

Aurore Andriamalala

Composition du Jury :

| | |
|---|--------------------|
| Gilles VARRAULT Professeur, Université Paris-Est Créteil, LEESU, Créteil | Président |
| Clarisse MALLET Maître de conférences, HDR, Université de Clermont Auvergne, UMR CNRS 6023, Aubière | Rapporteur |
| Dominique PATUREAU DR, INRA, LBE, Narbonne | Rapporteur |
| Philippe CAMBIER DR, INRA, UMR ECOSYS, Grignon | Directeur de thèse |
| Laure VIEUBLÉ-GONOD Maître de conférences, AgroParisTech, UMR ECOSYS, Grignon | Co-encadrante |
| Isabelle DÉPORTES Ingénieur, ADEME, Angers | Invitée |



Avant-propos

Le sujet de cette thèse est axé sur la valorisation agronomique de déchets, et sur l'impact environnemental et sanitaire encore mal connu de la présence simultanée de résidus médicamenteux et de métaux au sein des sols agricoles. Les travaux de recherche se sont inscrits dans le cadre du projet ANR CESA CEMABS "Exposition chronique aux antibiotiques et métaux dans les sols : impact sur les processus microbiens incluant la dynamique de l'antibio-résistance" (2013-2017). Il a été cofinancé par l'INRA, l'Institut nationale de la recherche agronomique, Département Environnement & Agronomie, et par l'ADEME, l'Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie, dans le cadre de son programme « déchet et économie circulaire ». Les expérimentations ont été conduites au laboratoire de l'INRA, UMR ECOSYS pôle Sol à Thiverval Grignon. La formation doctorale a été encadrée par l'école doctorale ABIES, AgroparisTech.

Je voudrais donc exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes affiliées à l'INRA, à l'ADEME, et à l'école doctorale ABIES, qui auront mobilisé les moyens financiers, matériaux et pédagogiques pour me permettre de mener à bien cette étude.

La réalisation de ce travail aura été possible grâce au soutien indéfectible de mon directeur de thèse Philippe Cambier, et de mon encadrante Laure Vieublé Gonod. Mes deux encadrants m'auront permis de développer mes compétences scientifiques et de repousser mes limites personnelles. Je les remercie du fond du cœur pour ces dernières années, pour leurs encouragements, leur compréhension, leur patience, leur disponibilité, leurs conseils. Je les remercie pour les multiples relectures et corrections de l'article et de ce manuscrit, qui m'auront permis d'améliorer ma réflexion, la structuration de mes pensées, mes capacités de synthèse, de rédaction, et de communication. Je les remercie pour tous les échanges qui m'auront permis dépasser mes blocages et faire aboutir ce projet. Chacun à leur manière, mes deux encadrants auront été parfait pour moi, merci.

Un immense merci à toutes les personnes qui auront participé de près ou de loin au bon déroulement de ces travaux, qui m'auront formé aux expérimentations, ou apporté leur assistance au laboratoire. Merci à Valérie Dumény, pour sa bonne humeur et tous ces supers moments dans la zone radioactive. Merci à Valérie Bergheaud, qui a aussi veillé à ce que les protocoles et divers fichiers soient tenus au carré, me facilitant grandement le travail. Un énorme merci du fond du cœur à mes deux héros du skalar, Jean-Noël Rampon et Yolaine Goubard, qui auront à maintes et maintes reprises trouvé une solution pour pallier les caprices de la machine. Et encore merci à Yolaine pour toute son énergie et son implication à la mise en œuvre des manip et de l'exploitation des résultats. Merci à Eric Vachet, pour son aide, ses conseils, et aussi pour ces moments à échanger et réfléchir sur le monde. Merci à Valentin Serre, pour son aide, sa bonne humeur et le partage de toutes ses connaissances historiques. Merci à Marjolaine Deschamps pour son aide à la mise en place des protocoles, les informations fournies, et évidemment sa joie de vivre contagieuse. Merci à Arnaud Goulut, le héros des ordinateurs, toujours réactif pour régler les soucis informatiques, et toujours très sympathique.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du comité de pilotage, Ed Topp, Isabelle Déportes, Patricia Garnier, Fabrice Martin, et Sophie Ayrault, pour leur suivi et leurs conseils.

La magie de Grignon n'aurait pas pu opérer sans la dynamique et la bonne ambiance générale véhiculée par chaque membre de l'équipe. C'est avec nostalgie que je repense à tous ces moments partagés du quotidien ou hors des murs du labo. Je suis heureuse de vous avoir rencontrée.

Merci à Pierre Benoît, Laure Mamy, Camille Chambon, Dalila Hadjar, Sabine Houot, Enrique Barriuso, Sylvie Nélieu, Nathalie Bernet, Philippe Baveye, David Montagne, Joël Michelin, Valérie Pot, Emmanuel Vaudour, Jean-Marc Gilliot, Benjamin Bataard, Jean-Baptiste Duclos, Camille Resseguier, pour leur sympathie ou leurs encouragements, ainsi que pour tous ces moments, que ce soit à la cafèt', à la cantine, au bowling ou autour d'un verre, je me serais sentie bien à leur côté. Merci à Vincent Mercier et Géraud, tous les deux solaires à leur façon et transmetteurs d'énergie. Merci à Aurélia Michaud pour son écoute, son soutien et nos échanges hors du commun.

Merci à Florent Levavasseur, pour m'avoir supporté pendant 5 mois de colocation, et qui est aujourd'hui un véritable ami. Merci à Raluca Ciuraru, qui fait aussi partie de ma vie, pour ses conseils avisés, et qui est mon model de diplomatie. Merci à Fred Rees, pour son écoute, sa souplesse et tout le reste.

Un énorme merci à ma grande amie Laure Vogel toujours présente même au bout de la France, merci pour son écoute, ses conseils, sa grande compréhension et ce merveilleux champagne bio qu'elle m'aura fait découvrir. Merci aux autres membres de la coloc, Anaïs Goulas, Ophélie Sauzet, et Julie Meneghel qui est dans mon coeur, ainsi qu'Olivier Crouzet, Alix Bell, Fiona Obriot, Marie Stauffer, Sabrina Ferhi, et Karen Yemadje, il y en aura eu des moments épiques ! J'espère que nous nous réunirons encore, merci pour votre accueil, votre présence, votre soutien et tous ces moments de folie. Merci à Guillaume Nataf, qui m'aura soutenu le bout de vie que nous avons partagé ensemble.

Merci à mes deux amours Myriam Germain et Lisa Citerne, les femmes de tous les possibles, que j'espère voir régulièrement entre deux de leurs cavalcades à travers la France et au-delà.

Merci à mon amie Charlotte Vedere, pour son entrain, son soutien, son humour et tous ces moments mémorables passés ensemble. Merci à mes amis internationaux, aux deux Marco et à Ottone d'Italie, merci à Paulina et Claudia du Chili, Aliia de Russie pour leur fun, leur ouverture d'esprit, et leur contact chaleureux. Merci aux anciens ou nouveaux stagiaires, doctorants ou CDD, mes amis Eléa, Kévin, Manon, Sixtine, Anaïs, et Guillaume, merci à Léa, Anne, Déborah, Pierre et Victor pour tous ces supers moments pleins de joie et de rires. Merci aussi à mes récents compagnons de bureau, Vladislav pour ces discussions sans filtre, merci à Tristan pour sa bonne humeur et sa compréhension, à Marianne pour son humour canadien et son cœur gros comme ça, à Jeanne avec sa discrétion feinte, merci pour ces moments de détente pré et post-sieste. Merci aux deux nouvelles mamans Justine Barthod et Alexandra Crème pour leur sourire et leur humour à toute épreuve.

Enfin merci à toute ma famille qui m'aura soutenu ces dernières années, mes frères, ma sœur, mes cousin et cousines, ma tante et mes oncles. Et particulièrement merci à mes parents. Merci pour tout.



Table des matières

| | | |
|------------|---|----|
| 1. | INTRODUCTION GENERALE..... | 1 |
| 2. | ETAT DE L'ART..... | 5 |
| 2.1. | Conséquences des apports aux sols agricoles de produits résiduaire organiques..... | 5 |
| 2.1.1. | Origine et enjeux de la valorisation agricole des déchets organiques..... | 5 |
| 2.1.2. | Epandage sous forme brute ou après traitement des PRO..... | 6 |
| 2.1.3. | Flux de PRO épandus..... | 8 |
| 2.1.4. | Contaminants dans les PRO et réglementations..... | 9 |
| 2.1.5. | Antibiotiques dans les PRO et dans les sols..... | 12 |
| 2.1.6. | Eléments Traces Métalliques dans les PRO et dans les sols..... | 16 |
| 2.2. | Devenir des antibiotiques dans les sols agricoles..... | 20 |
| 2.2.1. | Mécanismes en jeu..... | 21 |
| 2.2.1.1. | Rétention..... | 21 |
| 2.2.1.2. | Biodisponibilité..... | 26 |
| 2.2.1.3. | Dégradation..... | 27 |
| 2.2.2. | Impact des PRO sur le devenir des ATB..... | 29 |
| 2.2.3. | Devenir des antibiotiques en mélange de contaminants..... | 29 |
| 2.2.3.1. | ATB+ATB..... | 29 |
| 2.2.3.2. | ATB+ETM..... | 30 |
| 2.2.3.2.1. | Devenir des ETM dans le sol..... | 30 |
| 2.2.3.2.2. | Devenir des ATB en mélange avec les ETM..... | 32 |
| 2.3. | Effets des antibiotiques sur les communautés microbiennes du sol..... | 34 |
| 2.3.1. | Abondance ou biomasse..... | 34 |
| 2.3.2. | Diversité et structure..... | 35 |
| 2.3.3. | Activités..... | 36 |
| 2.3.4. | Toxicité aigüe vs toxicité chronique..... | 37 |
| 2.3.5. | Facteurs influant..... | 38 |
| 2.3.6. | Effet des antibiotiques en mélange de contaminants..... | 39 |
| 2.3.6.1. | ATB+ATB..... | 39 |
| 2.3.6.2. | ATB+ETM..... | 40 |

| | | |
|------------|--|----|
| 2.3.6.2.1. | Effet des ETM dans le sol..... | 40 |
| 2.3.6.2.2. | Effet des ATB en mélange avec les ETM..... | 41 |
| 2.4. | Questions de recherche et démarche expérimentale..... | 43 |
| 3. | MATERIEL ET METHODES..... | 47 |
| 3.1. | Site de prélèvement et conditionnement des échantillons de sol..... | 47 |
| 3.2. | Caractéristiques des PRO appliqués aux sols..... | 48 |
| 3.3. | Caractéristiques des échantillons de sols..... | 48 |
| 3.4. | Choix des antibiotiques..... | 49 |
| 3.5. | Choix des métaux..... | 52 |
| 3.6. | Devenir des antibiotiques dans le sol..... | 52 |
| 3.6.1. | Coefficient de distribution Kd de SMX et N-ac-SMX | 52 |
| 3.6.2. | Incubations..... | 52 |
| 3.6.3. | Mesure du ¹⁴ C_CO ₂ | 53 |
| 3.6.4. | Quantification des résidus ¹⁴ C..... | 53 |
| 3.6.5. | Analyse des résidus ¹⁴ C dans les fractions extractibles de SMX et N-ac-SMX | 54 |
| 3.7. | Effets des antibiotiques dans le sol..... | 55 |
| 3.7.1. | Incubations pour la mesure des biomasses, de la respiration totale et des métaux disponibles..... | 55 |
| 3.7.1.1. | Mesure de la biomasse microbienne totale..... | 56 |
| 3.7.1.2. | Mesure de la biomasse fongique..... | 56 |
| 3.7.1.3. | Mesure de la respiration totale..... | 56 |
| 3.7.1.4. | Suivi de la biodisponibilité des ETM..... | 57 |
| 3.7.2. | Incubation pour la mesure de la minéralisation de l'azote..... | 57 |
| 3.8. | Mesure du pH des solutions et des sols..... | 57 |
| 3.9. | Analyses statistiques..... | 58 |
| 3.10. | Récapitulatif des principales expérimentations..... | 58 |
| 4. | DEVENIR DES ANTIBIOTIQUES SMX, N-AC-SMX ET CIP APPORTES SEULS DANS LES SOLS T, DVB ET FUM..... | 61 |
| 4.1. | Introduction..... | 61 |
| 4.2. | Matériels et méthodes..... | 62 |
| 4.3. | Article : Fate of sulfamethoxazole, its main metabolite N-ac-sulfamethoxazole and ciprofloxacin in agricultural soils amended or not by organic waste products..... | 63 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.4. | Complément de la section de l'article : 3.1.4. Compararison between SMX and N-ac-SMX at d3 and d156..... | 75 |
| 4.4.1. | Comparaison des bilans ¹⁴ C du SMX et du N-ac-SMX à J3..... | 75 |
| 4.4.2. | Comparaison des bilans ¹⁴ C du SMX et du N-ac-SMX à J156..... | 76 |
| 4.5. | Conclusion sur le devenir de 3 antibiotiques apportés seuls dans des sols régulièrement amendés ou non amendés par des PRO..... | 78 |
| 5. | EFFET DES ANTIBIOTIQUES SMX ET CIP APPORTES SEULS SUR LES MICROORGANISMES DU SOL ET LEURS ACTIVITES DE MINERALISATION C ET N.... | 79 |
| 5.1. | Introduction..... | 79 |
| 5.2. | Matériels et méthodes..... | 80 |
| 5.3. | Résultats..... | 81 |
| 5.3.1. | Biomasse microbienne totale..... | 81 |
| 5.3.2. | Biomasse fongique..... | 81 |
| 5.3.3. | Respiration totale..... | 82 |
| 5.3.4. | Minéralisation de N..... | 82 |
| 5.4. | Discussion..... | 83 |
| 5.5. | Conclusion sur les effets de SMX et CIP apportés seuls..... | 86 |
| 6. | DEVENIR DES SULFONAMIDES SMX ET N-AC-SMX APPORTES EN MELANGE AVEC DE LA CIP, ET/OU EN PRESENCE DE METAUX A FAIBLE OU FORTE DOSE..... | 87 |
| 6.1. | Introduction..... | 87 |
| 6.2. | Matériels et méthodes..... | 88 |
| 6.3. | Résultats..... | 90 |
| 6.3.1. | Mesures des pH..... | 90 |
| 6.3.2. | Minéralisation du SMX et du N-ac-SMX..... | 92 |
| 6.4. | Distribution de la radioactivité provenant du SMX et N-ac-SMX à J3..... | 94 |
| 6.4.1. | Influence des caractéristiques des solutions d'apport des sulfonamides..... | 94 |
| 6.4.2. | Comparaison entre le SMX et le N-ac-SMX..... | 96 |
| 6.5. | Distribution de la radioactivité provenant du SMX et N-ac-SMX à J156..... | 96 |
| 6.5.1. | Influence des caractéristiques des solutions d'apport des sulfonamides..... | 96 |
| 6.5.2. | Comparaison entre le SMX et le N-ac-SMX..... | 97 |
| 6.6. | Discussion..... | 100 |
| 6.6.1. | Impact du mélange d'antibiotiques sur le devenir des sulfonamides..... | 100 |
| 6.6.2. | Impact du mélange ATB + ETM sur le devenir des sulfonamides..... | 101 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 6.6.3. | Comparaison des devenir du SMX et du N-ac-SMX..... | 103 |
| 6.7. | Conclusion sur le devenir de SMX et N-ac-SMX apportés en mélange de contaminants..... | 103 |
| 7. | EFFETS DES MELANGES ATB + ATB et ATB + ETM SUR LES MICROORGANISMES ET LEURS ACTIVITES DE DEGRADATION..... | 105 |
| 7.1. | Introduction..... | 105 |
| 7.2. | Matériels et méthodes..... | 107 |
| 7.3. | Résultats..... | 108 |
| 7.3.1. | Impact du mélange ATB + ATB..... | 108 |
| 7.3.1.1. | Biomasse microbienne totale..... | 108 |
| 7.3.1.2. | Biomasse microbienne fongique..... | 108 |
| 7.3.1.3. | Respiration totale..... | 109 |
| 7.3.1.4. | Minéralisation de N..... | 109 |
| 7.3.2. | Impact du mélange ATB + ETM..... | 110 |
| 7.3.2.1. | Mesure du pH des sols dans les extraits CaCl ₂ | 110 |
| 7.3.2.2. | Disponibilité du Cu et Zn..... | 110 |
| 7.3.2.3. | Biomasse microbienne totale..... | 112 |
| 7.3.2.4. | Biomasse microbienne fongique..... | 113 |
| 7.3.2.5. | Respiration totale..... | 114 |
| 7.3.2.6. | Minéralisation de N..... | 115 |
| 7.4. | Discussion..... | 116 |
| 7.4.1. | Effet cocktail ATB + ATB..... | 116 |
| 7.4.2. | Effet cocktail ATB + ETM..... | 116 |
| 7.5. | Conclusion sur les effets de SMX et CIP apportés en mélange de contaminants... | 118 |
| 8. | Conclusion..... | 119 |
| 8.1. | Synthèse..... | 123 |
| 8.1.1. | ATB apportés seuls au sol..... | 123 |
| 8.1.2. | ATB apportés en mélange (SMX + CIP)..... | 124 |
| 8.1.3. | ATB apportés en mélange avec des métaux (SMX + Cu + Zn)..... | 124 |
| 8.2. | Discussion et perspectives..... | 127 |
| | Bibliographie..... | 131 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : ISMO issus de l'analyse de 440 produits résiduaux organiques différents répartis en quatre catégories : Boues ; Composts ; Effluents d'élevage ; Autres matières organiques. | 7 |
| Figure 2 : Répartition des surfaces (hectares) qui ont reçu un épandage de PRO par type de grande culture et de prairies en 2011. | 8 |
| Figure 3 : Modes d'action des antibiotiques et principales familles d'antibiotiques (Ona-Nguema et al., 2015)..... | 12 |
| Figure 4 : Sources possibles et voies de dissémination des antibiotiques dans les différents compartiments de l'environnement. L'épaisseur des flèches est fonction de l'importance des contributions en contaminants à l'environnement. | 14 |
| Figure 5 : Part des différentes sources de contamination dans l'estimation des quantités totales d'ETM entrant sur les sols agricoles en France (ADEME-SOGREAH, 2007). | 17 |
| Figure 6 : Devenir des antibiotiques et de leurs produits de transformation après épandage de PRO sur les sols agricoles. | 21 |
| Figure 7 : Description des processus de biodisponibilité d'un contaminant dans le sol jusqu'à son effet biologique au sein d'un organisme (d'après Lanno et al., 2004 ; Harmsen, 2007). | 27 |
| Figure 8 : Effets possibles des antibiotiques sur la structure et les fonctions des communautés microbiennes du sol ainsi que sur la tolérance d'une communauté qui peut être vue comme une réponse à moyen ou long terme (d'après Brandt et al., 2015). | 38 |
| Figure 9 : Résumé des chapitres, en lien avec le devenir des antibiotiques dans les différentes fractions (minéralisées, facilement, difficilement et non extractibles), et leurs effets sur les microorganismes du sol (biomasse microbienne totale et fongique) et leurs activités (minéralisation de C et N), lorsque les antibiotiques sont apportés seuls ou en mélange de contaminants (ATB + ATB et ATB + ETM). | 46 |
| Figure 10 : Schéma du dispositif expérimental Qualiagro (partie avec apport de N minéral « optimal »)..... | 47 |
| Figure 11 : Schéma du dispositif d'incubation des sols traités par des solutions de ¹⁴ C_ATB apportés seuls ou en mélange pour le suivi du devenir des ¹⁴ C_ATB. | 53 |
| Figure 12 : Schéma récapitulatif des principales expérimentations. | 59 |
| Figure 13 : Schéma récapitulatif des expérimentations du chapitre 4. | 62 |
| Figure 14 : Cumulative ¹⁴ C-SMX mineralization in the control soil and in the soils that have received 9 applications of a co-compost of sewage sludge and green waste (SGW) or farmyard manure (FYM). (Article : Figure 1 page 610). | 68 |
| Figure 15 : Distribution of ¹⁴ C-SMX in the different soil fractions (mineralized, HPCD and MeCN extractable fractions, non-extractable residues), at (A) day 3, and (B) day 156, in the control soil (CONT) and the soils amended with a sewage sludge-green waste compost (SGW) or farmyard manure (FYM). (Article : Figure 2 page 611)..... | 69 |
| Figure 16 : Cumulative ¹⁴ C N-ac-SMX mineralization in the control soil (CONT) and the soils amended with a sewage sludge-green waste compost (SGW) or farmyard manure (FYM). (Article : Figure 3 page 611)..... | 69 |
| Figure 17 : Distribution of ¹⁴ C-N-ac-SMX in the different soil fractions (mineralized, HPCD and MeCN extractable fractions, non-extractable residues), at (A) day 3, and (B) day 156, in the control soil (CONT) and the soils amended with a sewage sludge-green waste compost (SGW) or farmyard manure (FYM). (Article : Figure 4 page 612)..... | 70 |
| Figure 18 : Distribution of ¹⁴ C-CIP in the different soil fractions (mineralized, HPCD and MeCN extractable fractions, non-extractable residues), at (A) day 3, and (B) day 156, in the control soil (CONT) and the soils amended with a sewage sludge-green waste compost (SGW) or farmyard manure (FYM). (Article : Figure 5 page 613)..... | 71 |
| Figure 19 : Schéma récapitulatif des expérimentations du chapitre 5. | 80 |

| | |
|--|-----|
| Figure 20 : Biomasse microbienne (BM) dans le sol témoin de Qualiagro non traité aux antibiotiques (Ø), traité au sulfaméthoxazole (SMX), ou à la ciprofloxacine (CIP), à J0 pour le sol non traité, et J3, J31 et J156 pour les sols traités ou non. | 81 |
| Figure 21 : Biomasse fongique dans le sol témoin de Qualiagro non traité aux antibiotiques (Ø), traité au sulfaméthoxazole (SMX), ou à la ciprofloxacine (CIP), à J3, J31 et J156. | 82 |
| Figure 22 : Cinétiques de respiration carbonée totale dans le sol témoin QualiAgro non traité aux antibiotiques (Ø), traité au sulfaméthoxazole (SMX) ou à la ciprofloxacine (CIP). | 82 |
| Figure 23 : Cinétiques de minéralisation de N dans le sol témoin de QualiAgro non traité aux antibiotiques (Ø), traité au sulfaméthoxazole (SMX) ou à la ciprofloxacine (CIP). | 83 |
| Figure 24 : Schéma récapitulatif des expérimentations du chapitre 6. | 88 |
| Figure 25 : pH du sol non traité Ø ; traité aux antibiotiques apportés dans de l'eau, ATB (eau) (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX ± CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl ₂ , ATB (CaCl ₂) (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX, + ETMx1 ± CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl ₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl ₂ + HCl) (modalités ¹⁴ C-SMX uniquement) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX, + ETMx5 ± CIP) à J0 et J156. | 91 |
| Figure 26 : Minéralisation jusqu'à 156 jours d'incubation, du ¹⁴ C-SMX (à gauche) et du ¹⁴ C-N-ac-SMX (à droite) dans le sol traité aux antibiotiques apportés dans de l'eau, ATB (eau) (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX ± ¹² C-CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl ₂ , ATB (CaCl ₂) (modalités ¹⁴ C-SMX (CaCl ₂) ou ¹⁴ C-N-ac-SMX (CaCl ₂)) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX, + ETMx1 ± ¹² C-CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl ₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl ₂ + HCl) (modalités ¹⁴ C-SMX (CaCl ₂ + HCl) uniquement) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX, + ETMx5 ± ¹² C-CIP). | 93 |
| Figure 27 : Distribution du ¹⁴ C à J3 dans les fractions minéralisées, facilement extractibles (HPCD), difficilement extractibles (MeCN), et non extractibles du ¹⁴ C-SMX et du ¹⁴ C-N-ac-SMX dans le sol traité aux antibiotiques apportés dans de l'eau, ATB (eau) (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX ± ¹² C-CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl ₂ , ATB (CaCl ₂) (modalités ¹⁴ C-SMX (CaCl ₂) ou ¹⁴ C-N-ac-SMX (CaCl ₂)) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX, + ETMx1 ± ¹² C-CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl ₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl ₂ + HCl) (modalités ¹⁴ C-SMX (CaCl ₂ + HCl) uniquement) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX, + ETMx5 ± ¹² C-CIP). | 95 |
| Figure 28 : Distribution du ¹⁴ C à J156 dans les fractions minéralisées, facilement extractibles (HPCD), difficilement extractibles (MeCN), et non extractibles, du ¹⁴ C-SMX et du ¹⁴ C-N-ac-SMX dans le sol traité aux antibiotiques apportés dans de l'eau, ATB (eau) (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX ± ¹² C-CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl ₂ , ATB (CaCl ₂) (modalités ¹⁴ C-SMX (CaCl ₂) ou ¹⁴ C-N-ac-SMX (CaCl ₂)) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX, + ETMx1 ± ¹² C-CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl ₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl ₂ + HCl) (modalités ¹⁴ C-SMX (CaCl ₂ + HCl) uniquement) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX, + ETMx5 ± ¹² C-CIP). | 99 |
| Figure 29 : Schéma récapitulatif des expérimentations du chapitre 7. | 107 |
| Figure 30 : Biomasse microbienne (BM) dans le sol témoin de Qualiagro non traité aux antibiotiques (Ø), et traité avec le cocktail d'antibiotiques (SMX + CIP), à J3, J31 et J156. | 108 |
| Figure 31 : Biomasse fongique dans le sol témoin de Qualiagro non traité aux antibiotiques (Ø), et traité au cocktail d'antibiotiques (SMX + CIP), à J3, J31 et J156. | 108 |
| Figure 32 : Cinétiques de respiration carbonée totale dans le sol témoin QualiAgro non traité aux antibiotiques (Ø), et traité au cocktail d'antibiotiques (SMX + CIP) | 109 |
| Figure 33 : Cinétiques de minéralisation de N dans le sol témoin de QualiAgro non traité aux antibiotiques (Ø) et traité au cocktail d'antibiotiques (SMX + CIP). | 109 |

| | |
|--|-----|
| Figure 34 : pH du sol non traité Ø et traité aux antibiotiques ATB (SMX ou CIP) apportés dans une solution de CaCl ₂ , (ATB + CaCl ₂) ; en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; dans une solution de CaCl ₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl ₂ + HCl) ; en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 ; à J3, J31 et J149..... | 110 |
| Figure 35 : % de Cuivre (A) Zinc (B) disponible dans les sols traités aux antibiotiques ATB (SMX ou CIP) apportés en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; et apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB+ ETMx5 ; à J3, J31 et J149. | 111 |
| Figure 36 : Biomasse microbienne totale (BM) dans le sol témoin de Qualiagro non traité, Ø, traité aux antibiotiques ATB, (A) SMX ou (B) CIP, apportés dans une solution de CaCl ₂ , ATB (CaCl ₂) ; en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; dans une solution de CaCl ₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl ₂ + HCl) ; et en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 ; à J0 pour le sol non traité, et à J3, J31 et J149. | 112 |
| Figure 37 : Biomasse fongique (BF) dans le sol témoin de Qualiagro non traité, Ø, dans les sols traités aux antibiotiques ATB, (A) SMX ou (B) CIP, dans une solution de CaCl ₂ , ATB (CaCl ₂) ; en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; dans une solution de CaCl ₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl ₂ + HCl) ; et en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 ; à J0 pour le sol non traité, et à J3, J31 et J149. | 113 |
| Figure 38 : Cinétiques de respiration carbonée totale dans le sol témoin QualiAgro non traité, Ø, dans les sols traités aux antibiotiques ATB, (A) SMX ou (B) CIP, apportés dans une solution de CaCl ₂ , ATB (CaCl ₂) ; en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; dans une solution de CaCl ₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl ₂ + HCl) ; et en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5. | 114 |
| Figure 39 : Cinétiques de minéralisation de N dans le sol témoin de QualiAgro non traité, Ø, dans les sols traités aux antibiotiques ATB, (A) SMX ou (B) CIP, apportés dans une solution de CaCl ₂ , ATB (CaCl ₂) ; en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; dans une solution de CaCl ₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl ₂ + HCl) ; et en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5. | 115 |
| Figure 40 : Réponse brève apportée à chaque question posée par chapitre, en lien avec le devenir des antibiotiques dans les différentes fractions (minéralisées, facilement, difficilement et non extractibles), et leurs effets sur les microorganismes du sol (biomasse microbienne totale et fongique) et leurs activités (minéralisation de C et N), lorsque les antibiotiques sont apportés seuls ou en mélange de contaminants (ATB + ATB et ATB + ETM)..... | 122 |
| Figure 41 : Devenir et impact du SMX apporté seul au sol. | 123 |
| Figure 42 : Devenir et impact du SMX apporté en mélange avec ETMx1. | 125 |
| Figure 43 : Devenir et impact du SMX apporté en mélange avec ETMx5. | 126 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Quantités des différents produits ou déchets épandus sur les sols agricoles de France (ADEME-SOGREAH, 2007). | 9 |
| Tableau 2 : Teneurs moyennes en CTO des produits d'origine non agricole épandus sur sols agricoles et limite réglementaire pour les boues (ADEME-SOGREAH, 2007). | 11 |
| Tableau 3 : Flux d'ETM maximaux autorisés dans le cadre de l'homologation de matières fertilisantes et support de culture (ADEME-SOGREAH, 2007). | 11 |
| Tableau 4 : Concentrations des antibiotiques dans les PRO et les sols amendés, en µg ou mg par kg de matière sèche (MS). | 15 |
| Tableau 5 : Teneurs en ETM dans les différents types de composts (ADEME-SOGREAH, 2007). | 18 |
| Tableau 6 : Effets à long terme de l'application de boues, composts de déchets verts et fumiers sur les concentrations en ETM dans des sols d'Europe (Smolders et al., 2012 ; Jones et al., 1987). | 19 |
| Tableau 7 : Kd et DT50 de familles d'antibiotiques et exemples de molécules. | 23 |
| Tableau 8 : Principaux types d'interactions impliqués dans les mécanismes d'adsorption des antibiotiques sur les surfaces adsorbantes du sol. | 24 |
| Tableau 9 : Caractéristiques des PRO appliqués en 2013 sur les sols prélevés en 2014 pour cette étude (nd : non détecté). | 48 |
| Tableau 10 : Caractéristiques des sols T, DVB et FUM étudiés (pH du sol mesuré dans l'eau, C et N par analyseur élémentaire, CEC par la méthode à la Cobaltihexamine, et ETM après digestion totale à l'acide fluorhydrique). (nd : non détecté) | 49 |
| Tableau 11 : Caractéristiques des molécules étudiées. | 50 |
| Tableau 12 : Structure et spéciation chimique des molécules (* marquage au ¹⁴ C). | 51 |
| Tableau 13 : Extraits sélectionnés pour l'analyse qualitative de la radioactivité par HPLC. | 55 |
| Tableau 14 : Physicochemical properties of soils (CONT, SGW, FYM) and OWP used as amendment in 2013. (Article : Table 1 page 609) | 67 |
| Tableau 15 : Sorption coefficients (Kd) of SMX and N-ac-SMX (L.kg ⁻¹) added at a concentration of 0.02 mg g ⁻¹ soil in sterilized CONT, SGW and FYM soils. (Article : Table 2 page 610) | 68 |
| Tableau 16 : Qualitative analysis of ¹⁴ C by HPLC after addition of SMX or N-ac-SMX in the easily extractable fraction (HPCD), hardly extractable fraction at pH9 (MeCN pH9) and hardly extractable fraction (upper phase) at pH2 (MeCN pH2) of CONT, SGW and FYM respectively after 3 (d3) and 156 days (d156) of incubation: detection of SMX, N-ac-SMX and 9 other metabolites (M1-M9). Results are expressed as % of extractable ¹⁴ C or % of total ¹⁴ C. (Article : Table 3 page 612) | 70 |
| Tableau 17 : Comparaison des valeurs exprimées en % du ¹⁴ C mesuré (bilan à 100%), des fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, et non extractibles, entre SMX et N-ac-SMX, dans les sols T, DVB et FUM après 3 jours d'incubation. | 75 |
| Tableau 18 : Rapport entre les pourcentages de ¹⁴ C-SMX et ¹⁴ C-N-ac-SMX dans les fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, et non-extractibles à J3. | 76 |
| Tableau 19 : Comparaison des valeurs exprimées en % du ¹⁴ C mesuré (bilan à 100%), des fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, et non extractibles, entre SMX et N-ac-SMX, dans les sols T, DVB et FUM après 156 jours d'incubation. | 77 |
| Tableau 20 : Rapport entre les pourcentages de ¹⁴ C-SMX et ¹⁴ C-N-ac-SMX dans les fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, et non-extractibles à J156. | 77 |
| Tableau 21 : Concentrations utilisées des antibiotiques ¹⁴ C-SMX, ¹⁴ C-N-ac-SMX et ¹² C-CIP, ainsi que des éléments traces métalliques Cu et Zn (µg.g ⁻¹ sol). | 89 |
| Tableau 22 : Effets comparés entre les traitements. ¹⁴ C-ATB correspond à ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX. | 89 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 23 : pH du sol non traité Ø ; traité aux antibiotiques apportés dans de l'eau : ATB (eau) (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX ± CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl ₂ : ATB (CaCl ₂) (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX) ; traité aux antibiotiques apportés avec les métaux à faible dose : ATB + ETMx1 (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX, + ETMx1 ± CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl ₂ acidifiée avec HCl : ATB (CaCl ₂ + HCl) (modalités ¹⁴ C-SMX uniquement) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose : ATB + ETMx5 (modalités ¹⁴ C-SMX ou ¹⁴ C-N-ac-SMX, + ETMx5 ± CIP) à J0 et J156. | 91 |
| Tableau 24 : Rapport des quantités de résidus ¹⁴ C SMX / N-ac-SMX dans les fractions minéralisées, HPCD, MeCN et non extractibles à J3. | 96 |
| Tableau 25 : Rapport des quantités de résidus ¹⁴ C SMX / N-ac-SMX dans les fractions minéralisées, HPCD, MeCN et non extractibles à J156. | 98 |
| Tableau 26 : Concentrations utilisées des antibiotiques ¹² C-SMX et ¹² C-CIP, ainsi que des éléments traces métalliques Cu et Zn (µg.g ⁻¹ sol). | 107 |
| Tableau 27 : Teneurs en cuivre et en zinc disponibles (mg.kg ⁻¹), dans les sols traités aux antibiotiques ATB (SMX ou CIP) apportés en mélange avec les métaux à faible dose ATB + ETMx1 ; traités aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5, à J3, J31 et J149. | 111 |

A mes parents

I : INTRODUCTION GENERALE

II : ETAT DE L'ART

1. INTRODUCTION GENERALE

Le recyclage des PRO en agriculture, sous forme brute ou après traitement (compostage, méthanisation, chaulage, déshydratation...), est une pratique largement développée en France et dans le monde, (Sarmah et al., 2006). Cette pratique peut permettre de réduire la consommation d'engrais chimiques et par conséquent d'énergie et de matières premières non renouvelables comme les phosphates (PRO ayant des propriétés fertilisantes), et/ou d'améliorer les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol (PRO ayant des propriétés amendantes), avec des coûts modérés de mise en œuvre. Toutefois la pérennité de cette filière ne peut être assurée que si les différentes étapes dans la mise en place de la pratique de recyclage sont maîtrisées afin de garantir la qualité des PRO épandus et leur innocuité pour l'homme et l'environnement.

Or cette valorisation soulève des questions d'évaluation des risques à long terme, du fait de la présence potentielle d'antibiotiques et d'autres contaminants organiques ou minéraux susceptibles de s'accumuler dans les sols après épandage et d'affecter négativement les agrosystèmes et écosystèmes. Les éléments traces métalliques (ETM), qui bien que connus et réglementés pour les épandages de boues de STEP depuis les années 1980, peuvent s'accumuler dans les horizons de surface des sols recevant régulièrement des effluents d'élevage ou des boues de STEP (ADEME-SOGREAH, 2007 ; Houot et al., 2009b).

Depuis une dizaine d'années, la présence des antibiotiques (ATB) dans les sols, les eaux de surfaces et les nappes phréatiques est devenue un sujet de plus en plus préoccupant pour les pouvoirs publics, la communauté scientifique et le grand public, du fait des risques environnementaux (impacts sur les organismes non ciblées, pollution des eaux...) et sanitaires (Boxall et al., 2012). En ce qui concerne la santé, la présence des ATB dans les sols peut entraîner le développement de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, dont la dissémination dans l'environnement représente un risque d'exposition accrue pour l'homme (Richter et al., 1996).

Depuis leur découverte au début du XX^e siècle, les antibiotiques sont administrés pour traiter les infections en médecine humaine et vétérinaire (Kumar et al., 2004), et favoriser la croissance des animaux d'élevage dans certains pays (Gaskins et al., 2002). A l'échelle mondiale, près de 80% de la production pharmaceutique est consommée par l'Europe, l'Amérique du Nord, le Japon (Rapport de l'académie nationale de pharmacie, 2008) et surtout la Chine. La Chine a consommé en 2003 respectivement 60% et 65% de la production globale de pénicilline et d'oxytétracycline (Yang et al., 2010a). La France reste le 4^{ème} consommateur mondial de médicaments bien que la consommation globale ait diminué de 16% sur la période 1999-2009 (AFSSAPS, 2011). D'après l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire, le volume total d'ATB à usage vétérinaire vendu en France représentait 1014 tonnes en 2010, soit le double de la consommation humaine. Les familles d'antibiotiques les plus utilisées pour traiter les bovins, les porcs, les animaux domestiques (chats, chiens) ou encore les poissons (pisciculture) étaient alors les tétracyclines (46.5%) suivies par les sulfamides (17.2%) (ANSES, 2010). Les classes d'antibiotiques consommés évoluent au fil des années. Entre 1999 et 2010, les traitements de bovins aux fluoroquinolones, macrolides et tétracyclines ont augmenté alors que les traitements aux aminosides et pénicillines ont diminué. En 2010, la quantité d'antibiotiques utilisés en

production animale a été estimée à 63 151 tonnes à travers le monde. D'ici 2030, une augmentation de plus de 60% est à prévoir (Van Boeckel et al., 2015).

Les antibiotiques peuvent se retrouver dans les sols agricoles à la suite de leur consommation. En effet, les ATB étant peu assimilés par les organismes humains et animaux, ils sont excrétés rapidement dans les urines ou les fèces à raison de 10 à 90% de la dose administrée (Kümmerer, 2003), sous forme de molécule mère, ou sous une forme dégradée en métabolites. Par exemple, les sulfonamides sont excrétés soit sous leur forme parentale, soit sous leur forme acide acétique conjuguée (Boxall et al., 2002). Les antibiotiques ou leurs produits de dégradation peuvent ensuite être disséminés directement dans les sols via le pâturage ou indirectement via l'épandage des produits résiduels organiques (PRO), comme les effluents d'élevage ou les boues de stations d'épuration. En effet, les ATB sont peu éliminés lors du traitement des eaux usées (e.g., Miao et al., 2004) et ont tendance à s'accumuler dans les boues. Différentes études ont mis en évidence la présence d'ATB dans les sols après épandage de PRO. Les PRO peuvent atteindre des concentrations en antibiotiques de l'ordre du $\mu\text{g.kg}^{-1}$ voire du mg.kg^{-1} de matière sèche (Göbel et al., 2005 ; Kinney et al., 2006) comme cela a été observé pour des antibiotiques de la famille des sulfonamides tels que la sulfadimidine (sulfaméthazine) (Christian et al., 2003) ou de la famille des fluoroquinolones tels que la ciprofloxacine (Martínez-Carballo et al., 2007).

Les effets des ATB dépendent de leur devenir dans les sols, qui dépend de leurs propriétés physico-chimiques intrinsèques, des caractéristiques du sol et d'autres facteurs environnementaux. Depuis quelques années, de plus en plus d'études se focalisent sur le devenir des ATB dans les sols (e.g. Tamtam et al., 2011), montrant qu'ils peuvent s'adsorber sur différents constituants, être transférés dans les eaux ou être dégradés par voie biotique ou abiotique. Si certains ATB ont des demi-vies très longues, pouvant atteindre plusieurs mois dans les sols (Marengo et al., 1997), d'autres sont rapidement biodégradés et disparaissent en quelques jours (Al-Ahmad et al., 1999 ; Burkhardt et Stamm, 2007 ; Kotzerke et al., 2008). L'adsorption des ATB sur les constituants du sol peut contribuer à la persistance de ces molécules dans le sol, en diminuant leur biodisponibilité et leur biodégradabilité (Ingerslev et Halling-Sørensen, 2000). La présence d'éléments traces métalliques peut moduler le devenir des ATB, en augmentant leur adsorption sur les constituants du sol par la formation de complexes ATB-ETM-Surface ou ETM-ATB-Surface (Morel et al., 2014 ; Pan et al., 2012), ou en augmentant leur biodisponibilité, du fait de compétitions électrostatiques priorisant la fixation des ETM sur les sites d'adsorption (Pei et al., 2014).

Les ATB peuvent impacter notamment la biomasse microbienne non cible (Thiele-Bruhn et Beck, 2005 ; Zielezny et al., 2006), les ratios bactéries/champignons (Demoling et al., 2009 ; Schauss et al., 2009b ; Ding et He, 2010 ; Kotzerke et al., 2011b), la structure des communautés microbiennes (Westergaard et al., 2001 ; Schmitt et al., 2004, 2005 ; Kong et al., 2006) et leurs activités (Bailey et al., 2003 ; Vaclavik et al., 2004 ; Thiele-Bruhn et Beck, 2005), et ainsi affecter le fonctionnement des écosystèmes du fait du rôle clé des microorganismes dans les sols. De même, les métaux-traces seuls et à des teneurs relativement faibles peuvent affecter la microflore du sol et ses activités (Chander et Brookes, 1993 ; Giller et al., 1998).

La bibliographie montre que les études sur le devenir et les impacts des polluants considèrent, dans la grande majorité des cas, un seul type de polluant. Mais très peu

d'études ont abordé le devenir et les effets des ATB sur la microflore du sol en mélange avec d'autres d'ATB (Topp et al., 2013) ou en combinaison avec des métaux (Gao et al., 2013).

Or on peut émettre l'hypothèse que des contaminations multiples peuvent avoir des effets additifs, synergiques, antagonistes voir suppressifs par rapport à des contaminations simples.

Le projet ANR-CESA CEMABS « Exposition chronique aux antibiotiques et métaux dans les sols : impact sur les processus microbiens incluant la dynamique de l'antibio-résistance », a pour objectifs d'évaluer :

- i) si des apports concomitants et répétés d'antibiotiques et de métaux dans des sols (tels que ceux réalisés lors des épandages de PRO) ont un impact sur la diversité et les fonctions des communautés microbiennes, et
- ii) si cela conduit à l'émergence de mécanismes de résistance aux antibiotiques.

La thèse s'inscrit dans le premier volet de ce projet. En effet son objectif général est de mieux comprendre le devenir et les impacts des antibiotiques sur les microorganismes du sol et leurs activités de dégradation, apportés seuls ou en mélange (ATB + ATB ou ATB + ETM).

2. ETAT DE L'ART

2.1. Conséquences des apports aux sols agricoles de produits résiduaux organiques

2.1.1. Origine et enjeux de la valorisation agricole des déchets organiques

La valorisation agricole des déchets organiques est une pratique multiséculaire, importante depuis le néolithique (Mazoyer et Roudart, 2002), jusqu'au 19^{ème} siècle et l'essor de l'industrie. Les déchets organiques sont délaissés au début du 20^{ème} siècle avec l'invention des engrais chimiques, passant alors d'un statut de fertilisant ou d'amendement à un statut de produit sans valeur à éliminer (Barles, 2005). Les stations d'épuration se développent, assainissant les villes. Mais dès les années 1960, avec l'expansion urbaine, les quantités de déchets solides en décharge augmentent considérablement (Baudrillard, 1986), et mettent en évidence les impacts des matières en putréfaction, en termes de pollution des eaux, de l'air, et de nuisances olfactives pour les riverains. C'est dans les années 1990 que la gestion des déchets organiques commence à s'inscrire dans une logique environnementale, avec l'exigence d'un retour au sol. Les déchets étant de plus en plus transformés et commençant de nouveau à être considérés comme des produits, les années 2000 voient émerger la notion de « produit résiduaire organique ». Selon Houot et al. (2004), l'expression « Produits résiduaux organiques » désigne les matières organiques ou organominérales, qui peuvent être des effluents agro-industriels et d'élevage, et certains déchets organiques d'origine non agricole (boues de station d'épuration de collectivités ou d'industries, composts de boues ou d'ordures ménagères). C'est l'ensemble des résidus ou sous-produits organiques engendrés par l'agriculture, les industries ou les collectivités. Le développement du retour aux sols de ces produits s'accompagne d'un encadrement par la réglementation. En 2004 la Norme Française (NF) U 44-095 est définie et rendue obligatoire pour la transformation des boues de station d'épuration en produits amendants pour les sols. Puis en 2007, l'application de la norme (NF) U 44-051 est rendue obligatoire pour la mise sur le marché des autres matières organiques (effluents agricoles, compost de déchets verts).

Aujourd'hui la valorisation est le mode de traitement prioritaire dans la hiérarchie de traitement des déchets. En 2012, selon Eurostat, 45 % des déchets non dangereux, non minéraux, et traités ont été envoyés dans une filière de valorisation matière. Avec l'augmentation et de l'urbanisation de la population, les volumes de déchets ménagers solides devraient augmenter de 70 % d'ici 2025 et plus que doubler d'ici vingt ans à l'échelle mondiale (Hoorweg et Bhada-Tata, 2012). La question de la réduction des quantités de déchets urbains n'est pas le seul enjeu auquel la valorisation des produits résiduaux organiques doit répondre.

La population mondiale devant atteindre neuf milliards d'individus d'ici 2050, la FAO estime que la production agricole devra augmenter de 70 % pour nourrir l'ensemble de la planète. Or cette augmentation de la demande en produits agricoles intervient dans un contexte général d'épuisement des ressources naturelles productives, du fait de l'intensification des cultures par l'utilisation massive d'engrais minéraux et de pesticides.

La valorisation des produits résiduaux organiques peut contribuer à répondre à la diversité des besoins des populations tout en préservant les écosystèmes. En effet, l'épandage de PRO permet de restaurer la fertilité des sols et/ou d'améliorer les propriétés

physiques des sols (structure, porosité et pouvoir de rétention en eau), en réduisant le ruissellement et l'érosion, en augmentant les quantités de carbone organique et autres éléments majeurs (azote, phosphore, potassium, calcium et magnésium), ainsi que la biomasse et l'activité microbienne (Gruiz and Klebercz, 2014 ; Houot et al., 2009a).

Toutefois la valorisation des PRO doit répondre à des réglementations environnementales visant essentiellement à limiter les risques de pollution.

2.1.2. Epandage sous forme brute ou après traitement des PRO

Les PRO présentent des formes physiques variées (solides, liquides, pâteuses), et peuvent se répartir en deux catégories. Les PRO épandus après traitement, et les PRO épandus sous forme brute.

Les PRO pouvant bénéficier d'un traitement avant épandage sont :

i) Les déchets agro-industriels et industriels, comme les déchets de transformation des matières végétales ou animales, les boues de papeterie, les sciures de bois.

ii) Les déchets d'origine urbaine, comme les déchets verts (déchets végétaux issus des jardins publics ou privés : tontes d'herbe, élagage, feuilles), les ordures ménagères (déchets ménagers produits par les collectivités ne pratiquant pas la collecte sélective), les ordures ménagères résiduelles (fraction résiduelle des déchets ménagers obtenue après séparation des papiers, cartons, verres et emballages collectés séparément), la fraction fermentescible des ordures ménagères (désignée sous le nom de biodéchets : déchets de cuisine, fleurs), et les boues de stations d'épuration des eaux usées.

Le traitement des déchets a trois objectifs :

- La réduction du volume de déchet par épaissement, déshydratation, séchage par exemple, ce qui facilite leur transport et leur stockage.
- L'hygiénisation.

Elle est obtenue par exemple lors d'une phase de fermentation du compostage (dégradation aérobie de la matière organique fraîche par les micro-organismes), pendant laquelle un maintien minimal de température à 60°C durant quelques jours élimine les germes pathogène (Cercle national du recyclage, 2000).

- La stabilisation.

Elle empêche ou réduit les problèmes de fermentation en limitant l'évolution de la composition des déchets, et évite les nuisances olfactives. La stabilisation peut être chimique (chaulage), ou biologique (compostage, méthanisation). En France, le chaulage concerne environ 30 % des tonnages de matière sèche de boues, la digestion anaérobie est utilisée dans plus de 200 stations d'épuration, et le compostage se pratique pour environ 30% des boues produites. Les boues peuvent être méthanisées, mais pour être compostés elles doivent être mélangées à un structurant (déchets verts, broyats de palettes de bois ou de résidus de culture) du fait de leur faible porosité et de leur forte humidité (97% d'eau).

La stabilité des PRO est liée au degré de décomposition et d'humification de leur matière organique, ce qui influence leurs effets dans les sols. Une stabilisation croissante de la matière organique se traduit par une augmentation de sa résistance à la biodégradation du fait de son enrichissement en composés humiques, induisant une diminution de sa biodégradabilité résiduelle (Kirchmann et Bernal, 1997 ; Francou, 2003). Cette stabilité peut être définie par un indice à partir de mesures au laboratoire de fractions biochimiques et du carbone et de l'azote potentiellement minéralisable (CINET C et N : NF XPU 44-163) :

l'indice de stabilité de matière organique (ISMO), qui reflète le potentiel de stockage de matière organique dans le sol. Ainsi un PRO est d'autant plus stable que son indice de stabilité de matière organique est élevé. La stabilité requise lors du traitement d'un PRO est atteinte lorsque sa biodégradabilité est similaire à celle de la matière organique des sols. Après stabilisation, les boues par exemple acquièrent un fort pouvoir amendant, qui améliore la qualité du sol sur le long terme.

Les PRO épandus directement sur les sols agricoles sans traitement préalable concerne en France 94 % des effluents d'élevage récupérables (Houot et al., 2014) comme les fumiers (bovin, porcin et avicole), les lisiers (bovin et porcin) et les fientes de volailles. Leur épandage permet un recyclage naturel des matières organiques. Sous forme brute, les PRO se décomposent généralement plus rapidement avec des effets à court terme, ce qui en fait des fertilisants plutôt que des produits amendant.

Les histogrammes de la Figure 1 indiquent les gammes d'ISMO issus de l'analyse de 440 produits résiduaux organiques différents (Lashermes et al., 2009) classés en quatre catégories : boues de l'agro-industrie ou du traitement des eaux usées, composts, effluents d'élevage, et autres. Les ISMO sont très variables pour certains PRO et plus constants pour d'autres. Les composts ont des ISMO généralement supérieurs à 60, alors que les fumiers, lisiers et fientes, peu stables, présentent les ISMO les plus faibles.

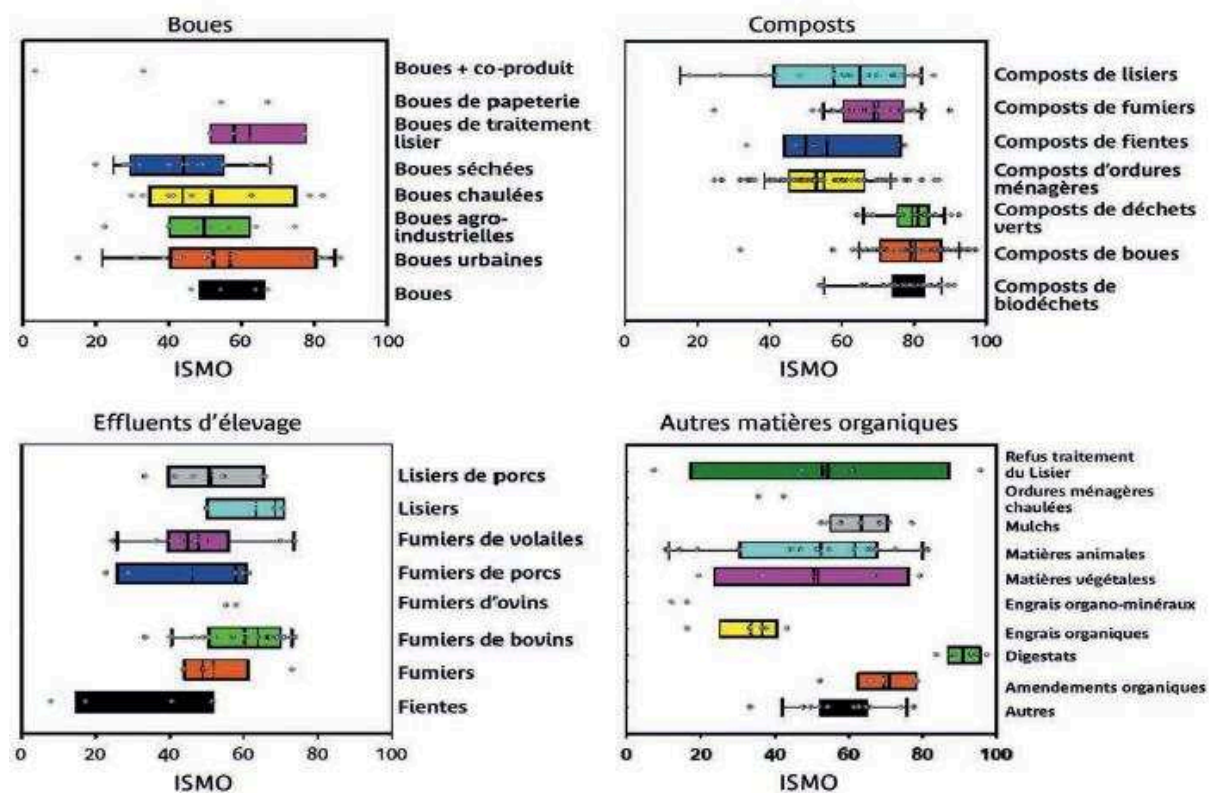
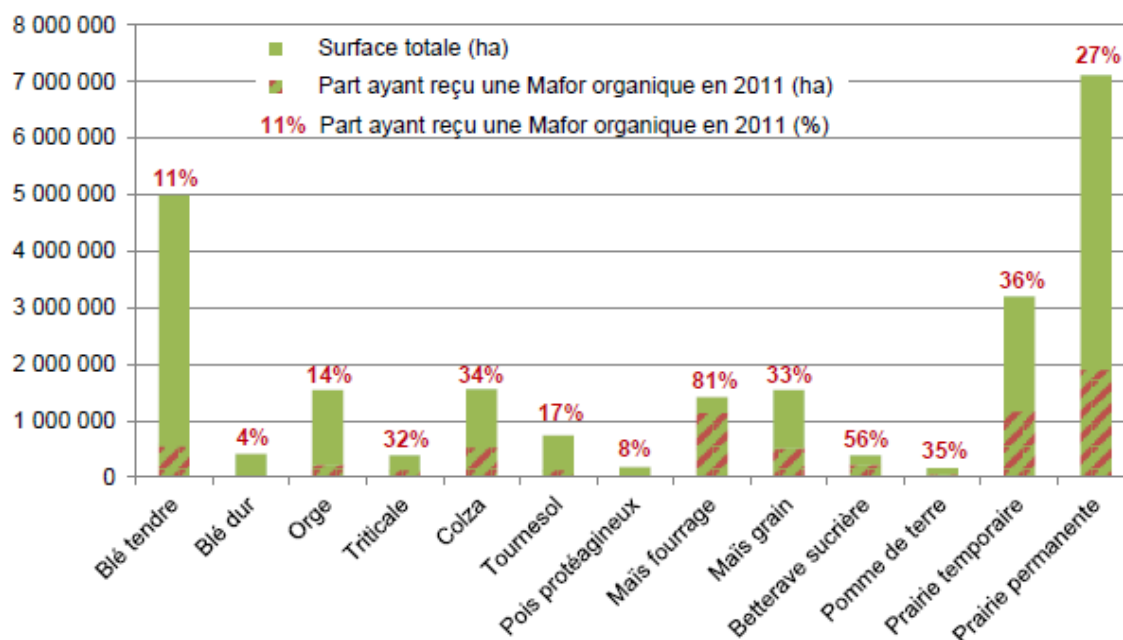


Figure 1 : Indices de stabilité de la matière organique (ISMO) issus de l'analyse de 440 produits résiduaux organiques différents répartis en quatre catégories : Boues ; Composts ; Effluents d'élevage ; Autres matières organiques (Lashermes et al., 2009).

2.1.3. Flux de PRO épanchés

En 2011, 13.3 millions d'hectares (Mha) de grandes cultures et 10.4 Mha de prairies temporaires et permanentes ont fait l'objet d'une enquête sur les pourcentages de parcelles ayant reçu un épandage de PRO sur le territoire français (Houot, 2014, Figure 2 : Le terme « Mafor organiques » correspond au terme « PRO »). Les PRO ont été épanchés sur 26.5% des surfaces de grandes cultures et 29.8% des surfaces de prairies temporaires et permanentes. Le pourcentage de surfaces amendées par les PRO varie de 4% (Blé dur) à 81% (Maïs fourrage) en fonction des cultures. Environ 1/3 des surfaces de colza et de maïs grain ont été amendées. Bien que le pourcentage de surfaces de blé tendre ayant reçu des PRO soit faible (11%), les quantités de PRO épanchées dépassent celles des autres cultures du fait de l'étendue de la surface agricole (5 Mha). A l'inverse, les cultures de betterave sucrière et de pomme de terre sont peu étendues, mais le pourcentage de surfaces amendées en PRO est important (respectivement 56 et 35%).



Source : Agreste – Enquête "Pratiques culturales" 2011

Figure 2 : Répartition des surfaces (hectares) qui ont reçu un épandage de PRO par type de grande culture et de prairies en 2011.

Le Tableau 1 ci-dessous présente les quantités de PRO par type de PRO épanchées dans les années 2000 (ADEME-SOGREAH, 2007). Comparées aux quantités de déjections animales et engrais minéraux épanchés (près de 300 millions de tonnes de matière brute), les quantités des boues, composts et autres déchets épanchés sur les sols agricoles restent faibles (entre 1 et 8 millions de tonnes de matière brute).

Tableau 1 : Quantités des différents produits ou déchets épandus sur les sols agricoles de France (ADEME-SOGREAH, 2007).

| | Quantités (tonnes de matière brute) | Année de référence | Source |
|---|-------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Produits phytosanitaires/ cuivre (Quantités livrées ≈ quantités épandues en agriculture) | 2082 | 2004 | Aubertot et al., (2005) |
| Engrais minéraux (Quantités livrées ≈ quantités épandues en agriculture) | 10 575 664 | Campagne 2004-2005 | UNIFA |
| dont simple P | 413985 | | |
| dont binaires PK | 954652 | | |
| Déjections animales (Quantités produites ≈ quantités épandues en agriculture) | 297 800 000 | 2000 | MEDD |
| dont bovins | 243 080 000 | | |
| dont porcins | 24 710 000 | | |
| dont ovins, caprins et équidés | 21 020 000 | | |
| dont volailles et lapins | 8 990 000 | | |
| Boues résiduaires urbaines (Quantités épandues en agriculture) | 5 à 6 000 000 | 2002 | ADEME, SOGREAH. (2007) |
| Composts d'origine résiduaire (Production, toutes destinations confondues, agricole ou non) | 2 040 000 | | Bordeau et al., (2005) |
| dont composts ordures ménagères non triées | 500 000 | 2002 | |
| dont composts bio-déchets des ménages | 170 000 | 2004 | |
| dont composts déchets verts seuls | 920 000 | 2005 | |
| dont composts boues d'épuration | 450 000 | 2005 | |
| Déchets des activités industrielles hors agroalimentaire (Quantités épandues en agriculture) | 1 400 000 | 2000 | MATE 2002a |
| dont industrie du papier | 880 000 | | |
| dont industrie de la chimie | 250 000 | | |
| dont industrie sidérurgique | 118 000 | | |
| Sous-produits des industries agroalimentaires (Quantités épandues en agriculture) | 8 500 000 | 2000 | MATE 2002b |
| dont filière betteravière | 5 933 000 à 7 100 000 | | |
| dont secteurs distilleries (autres que betteravières) | 1 535 000 à 1 725 000 | | |

Cependant, certains contaminants s'y retrouvent en quantités plus importantes que dans les déjections animales et engrais minéraux (ADEME-SOGREAH, 2007), avec un risque potentiel pour le fonctionnement du sol et la santé humaine.

2.1.4. Contaminants dans les PRO et réglementations

Les PRO peuvent contenir des contaminants biologiques et abiotiques, ces derniers pouvant être organiques ou inorganiques (minéraux).

Les contaminants biologiques correspondent à des microorganismes entériques : virus, parasites, prions, pathogènes, bactéries résistantes et non résistantes. Ils sont retrouvés dans les produits résiduaires organiques d'origine fécale (boues d'épuration ou lisier/fumier d'animaux) ou pouvant contenir des matières fécales (par exemple les déchets d'abattoir). Depuis les sols agricoles, les contaminants biologiques peuvent rejoindre la chaîne alimentaire par transfert dans les eaux de surfaces et souterraines, ou via les plantes. La réglementation et les pratiques concernant la gestion de ces matières vise à réduire les risques d'exposition (Houot et al., 2014).

Les contaminants organiques et inorganiques sont aussi appelés micropolluants, car présents en très faible quantité dans les PRO (concentrations de l'ordre du ng.kg⁻¹ au mg.kg⁻¹

¹⁾ (Lega et al., 1997 ; Pérez et al., 2001). Cependant, ils peuvent engendrer des effets négatifs sur les organismes vivants à très faibles concentrations (Chèvre et Rossi, 2007). Dans les PRO, les micropolluants organiques peuvent être dégradés en composés organiques intermédiaires ou métabolites pouvant aussi avoir un effet toxique (Zhang et al., 2017), contrairement aux micropolluants inorganiques qui ne peuvent pas être dégradés.

Les micropolluants organiques sont aussi appelés composés traces organiques (CTO). Les CTO comprennent de nombreux types de composés présentant un ou plusieurs atomes de carbone : les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), les PCB (polychlorobiphényles), les pesticides, les dioxines, les furanes, les dérivés de détergents, plastifiants, hormones naturelles et synthétiques, mais aussi les résidus de médicaments autrement appelés composés pharmaceutiques, comme les antibiotiques (ATB).

Les micropolluants inorganiques sont aussi appelés éléments traces métalliques, ou élément traces minéraux (ETM). Ils regroupent des oligoéléments, indispensables à faibles doses aux organismes vivants, mais toxiques à partir d'un certain seuil de concentration (Chang et al., 1992 ; Cripps et al., 1992) : cuivre (Cu), zinc (Zn), bore (B), manganèse (Mn), fer (Fe), nickel (Ni), vanadium (V), molybdène (Mo), chrome (Cr), ainsi que des métaux lourds pour lesquels aucun rôle positif pour l'activité biologique n'a été identifié : le mercure (Hg), le plomb (Pb) et le cadmium (Cd). Les ETM sont bien connus depuis plusieurs décennies et examinés de près en raison de leur toxicité pour l'homme, les animaux et les plantes (Mamindy-Pajany et al., 2014 ; McBride, 2003 ; Nicholson et al., 2003 ; Novak et al., 2004), et de leur rôle fréquent dans les situations de pollution de l'environnement (Xue et al., 2003; Xue et al., 2005). Pour la France, selon la base de donnée BASOL, 7 ETM (Pb, Cr, Cu, As, Zn, Ni, Cd) figurent parmi les 10 polluants les plus souvent trouvés dans les sites et sols pollués de la base.

Non éliminés complètement lors du traitement des eaux usées, les micropolluants organiques et inorganiques se concentrent dans les boues. Leur nature et leur concentration sont dépendantes des activités dont leur rejet est issu. L'essentiel des contaminations chimiques vient des rejets industriels, mais aussi agricoles, hospitaliers, et dans une moindre mesure des rejets domestiques (utilisation de solvants, déchets de bricolage, consommation de produits pharmaceutiques).

Les micropolluants organiques et inorganiques se retrouvent aussi dans les effluents d'élevage. Les CTO retrouvés peuvent être des composés pharmaceutiques. Comme en médecine humaine, les antibiotiques administrés aux animaux sont peu assimilés par les organismes et excrétés rapidement dans les urines ou les fèces à raison de 10 à 90% de la dose administrée (Kümmerer, 2003). On y trouve aussi des produits antiparasitaires, ainsi que des polluants organiques provenant d'activités humaines, comme les HAP et PCB (ADEME-SOGREAH, 2007). Les ETM retrouvés dans les effluents sont principalement le cuivre et le zinc. En effet ces deux ETM sont des facteurs de croissances et préviennent certaines maladies. Ils sont donc couramment administrés en tant que complément alimentaire aux animaux d'élevage. Comme ces ETM sont peu assimilables, les quantités administrées sont importantes. En conséquence les quantités excrétées le sont aussi. Les effluents contiennent également d'autres ETM mais en quantités plus faibles (ADEME-SOGREAH, 2007).

Pour garantir l'innocuité des épandages de PRO à court et moyen terme, les concentrations en éléments traces, composés traces organiques, inertes et pathogènes (Houot et al., 2009a), sont limitées par les normes françaises NFU 44-095 pour les composts de boues urbaines (AFNOR, 2002) et NFU 44-051 pour les autres amendements organiques

(AFNOR, 2005). La Directive Cadre sur l'Eau (Directive 2000/60/EC ou DCE) et la dernière Directive 2013/39/UE réglementent en Europe les teneurs de 45 substances prioritaires parmi lesquels figurent des éléments traces métalliques et des composés traces organiques (exemples Tableau 2 et Tableau 3).

Tableau 2 : Teneurs moyennes en CTO des produits d'origine non agricole épandus sur sols agricoles et limite réglementaire pour les boues (ADEME-SOGREAH, 2007).

| Teneurs en mg.kg ⁻¹ MS | Boues d'épuration urbaines (1) | Composts OM résiduelles (2) | Composts biodéchets ménagères (2) | Boues de papeterie (3) (primaires et mixtes) | Limite réglementaire pour les boues |
|--------------------------------------|---|--------------------------------------|--|--|--|
| Fluoranthène | 0.80 | 0.46 | 0,5 | < 0.005 | 5 |
| Benzo(b)fluoranthène | 0.50 | 0.18 | 0.2 | < 0.02 | 2.5 |
| Benzo(a)pyrène | 0.25 | 0.09 | 0.2 | <0.02 | 2 |
| Total 7 PCB | 0.38 | 0.11 | 0 | <0.5 | 0.8 |

Sources : (1) : Wolf Environnement, SGS, SAS, 2002 (2) : Thauvin, 2005 (3) MATE, 2002a

Tableau 3 : Flux d'ETM maximaux autorisés dans le cadre de l'homologation de matières fertilisantes et support de culture (ADEME-SOGREAH, 2007).

| Elément trace métallique | Flux maximal annuel autorisé (moyen sur 10 ans) – g.ha ⁻¹ | Flux maximal autorisé par apport – g.ha ⁻¹ |
|-----------------------------|---|--|
| Arsenic (As) | 90 | 270 |
| Cadmium (Cd) | 15 | 45 |
| Chrome (Cr) | 600 | 1800 |
| Cuivre* (Cu) | 1000 | 3000 |
| Mercurure (Hg) | 10 | 30 |
| Nickel (Ni) | 300 | 900 |
| Plomb (Pb) | 900 | 2700 |
| Sélénium (Se) | 60 | 1800 |
| Zinc* (Zn) | 3000 | 9000 |

* sauf en cas de besoin reconnu, en accord avec la réglementation sur les oligo-éléments

Les composés pharmaceutiques, dont les antibiotiques, sont dits « polluants émergents », et ne font à l'heure actuelle l'objet d'aucune réglementation. Si leur usage n'est pas nouveau, ils ne sont étudiés que depuis quelques années, grâce d'une part à l'émergence d'outils analytiques modernes capables de mesurer des concentrations de plus en plus faibles, et d'autre part à l'apport de preuves scientifiques d'effets biologiques même à de très faibles doses (Halling-Sorensen et al., 1998 ; Hirsch et al., 1999 ; Beausse, 2004). Mais les données sur leurs impacts, leur toxicité et leur persistance dans l'environnement sont encore limitées.

Dans notre étude nous nous intéressons donc à des polluants inorganiques non dégradables réglementés, les ETM, ainsi qu'à des polluants organiques dégradables non réglementés, les antibiotiques (ATB). Les parties suivantes visent donc à approfondir les connaissances sur l'origine et l'importance de leur présence dans les PRO et les sols.

2.1.5. Antibiotiques dans les PRO et dans les sols

Un antibiotique est un composé organique capable de détruire les cellules bactériennes (effet bactéricide), ou d'inhiber leur multiplication (effet bactériostatique) (Berthet and Amar-Costesec, 2005), en agissant sur des mécanismes cellulaires tels que (Ona-Nguema et al., 2015) (Figure 3) :

- l'inhibition de la synthèse de précurseurs de la paroi bactérienne
- l'inhibition de la synthèse de la membrane cytoplasmique
- l'inhibition de la synthèse des protéines
- l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques
- l'inhibition compétitive (antimétabolites)

Le mécanisme d'action des antibiotiques dépendra de leur structure chimique. Les molécules aux propriétés physico-chimiques communes sont regroupées en familles d'antibiotiques. On distingue par exemple les β -lactames, les sulfonamides, les fluoroquinolones, les macrolides et les tétracyclines. Ainsi les molécules utilisées dans cette étude présentent des modes d'actions différents : le sulfaméthoxazole de la famille des sulfonamides agit sur le métabolisme de l'acide folique, tandis que la ciprofloxacine affecte la synthèse de l'ADN gyrase Figure 3.

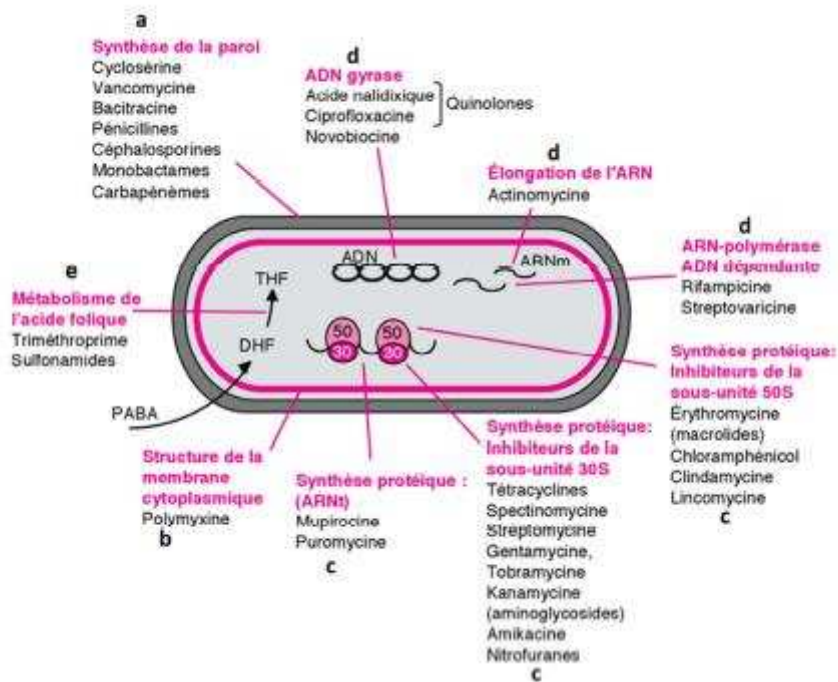


Figure 3 : Modes d'action des antibiotiques et principales familles d'antibiotiques (Ona-Nguema et al., 2015).

Les antibiotiques sont les seules substances médicamenteuses produites naturellement par les microorganismes des sols, afin de coloniser leur niche écologique ou de communiquer au sein des populations (Fajardo et Martinez, 2008).

La découverte de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming a conduit à une production massive d'antibiotiques synthétiques ou semi-synthétiques. A l'échelle mondiale la consommation d'antibiotique a été estimée entre 100 000 et 200 000 tonnes par an (Wise, 2002). Ils sont utilisés en traitement préventif ou curatif en médecine humaine et vétérinaire. Durant près de 60 ans, les antibiotiques étaient aussi utilisés comme facteurs de croissance

dans l'élevage, entraînant le développement et la dissémination dans l'environnement de souches bactériennes antibio-résistantes. En 2001, l'émergence de ce phénomène est reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé comme problème majeur de santé publique. En 2006, cette pratique très répandue a alors été interdite en Europe (Kemper, 2008). Par conséquent, la vente d'antibiotique à usage vétérinaire a diminué en France de 1330 tonnes à 1014 tonnes entre 1999 et 2010 (ANSES, 2010). En médecine humaine, la consommation d'antibiotique est particulièrement élevée dans le milieu hospitalier (Frédéric and Yves, 2014; Orias and Perrodin, 2013). Les β -lactames sont la famille la plus prescrite en France suivie des macrolides et des fluoroquinolones (Rapport ANSM, 2014). En médecine vétérinaire, les premières familles d'antibiotiques sont les tétracyclines suivies des sulfonamides (Rapport ANSES, 2015).

Comme évoqués précédemment, une fois administrés, les antibiotiques ne sont pas complètement métabolisés dans les organismes humains ou animaux et se retrouvent dans les excréments sous forme parentale ou sous forme de métabolites. La proportion du composé parent ou métabolite excrété varie suivant le composé. Ainsi le taux d'excrétion du composé parent des sulfonamides varie entre 50% et 100% et entre 70% et 90% pour les tétracyclines (Mojica et Aga, 2011).

La dissémination dans l'environnement des antibiotiques peut ensuite être directe par rejet des eaux usées d'aquaculture, ou via le pâturage. La dissémination des antibiotiques peut aussi être indirecte par épandage dans les sols des PRO comme les effluents d'élevage, ou les composts de boues de station d'épuration. En effet, les antibiotiques ne sont pas entièrement éliminés lors du traitement des eaux usées. Leur élimination dépend de la structure et des propriétés moléculaires du composé, ainsi que du fonctionnement de la STEP (Batt et al., 2006 ; Giger et al., 2003 ; Ternes, 1998). Une fois au sol, les antibiotiques peuvent rejoindre les eaux de surface ou souterraines par ruissellement ou lessivage/lixiviation. Le sol constitue donc un lieu de transit des antibiotiques vers d'autres compartiments de l'environnement. De nombreuses études ont montré la présence d'antibiotiques dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les sédiments et les sols (Hirsch et al., 1999 ; Hu et al., 2010 ; Kim et Carlson, 2007 ; Kemper, 2008 ; Kümmerer, 2009a,b). La Figure 4 présente les sources possibles et voies de dissémination des antibiotiques dans les différents compartiments de l'environnement.

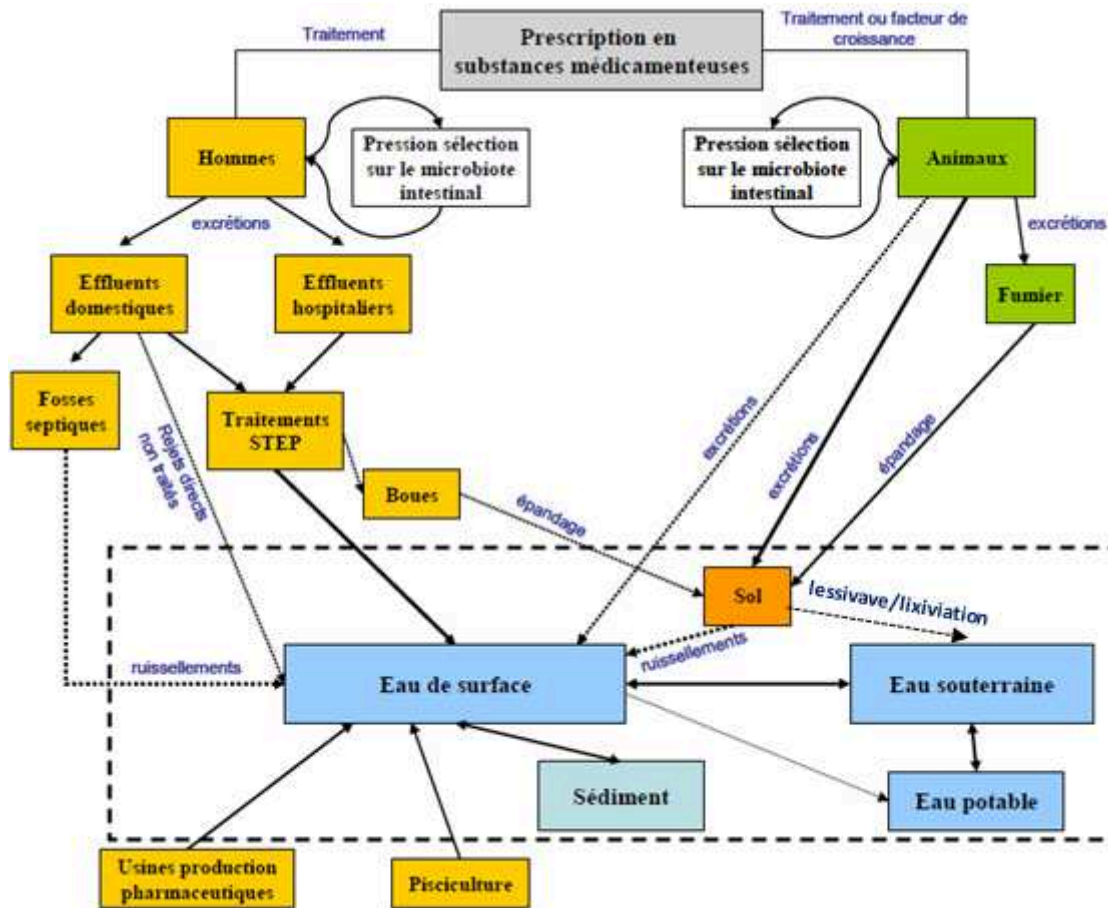


Figure 4 : Sources possibles et voies de dissémination des antibiotiques dans les différents compartiments de l'environnement. L'épaisseur des flèches est fonction de l'importance des contributions en contaminants à l'environnement.

Le Tableau 4 récapitule les concentrations d'antibiotiques retrouvées dans les PRO et les sols amendés.

Tableau 4 : Concentrations des antibiotiques dans les PRO et les sols amendés, en µg ou mg par kg de matière sèche (MS).

Les valeurs dans les boues et les effluents d'élevage sont issues du Rapport d'expertise collective MAFOR (2014), sauf si une autre référence est spécifiée. Les valeurs indiquées pour les teneurs dans les PRO représentent les valeurs minimum - moyenne - maximum retrouvées.

| Antibiotiques | Boues de station d'épuration mg kg ⁻¹ MS (sauf si autre unité spécifiée) | Effluents d'élevage mg kg ⁻¹ MS (sauf si autre unité spécifiée) | Sols amendés (PRO apporté) µg kg ⁻¹ MS |
|--------------------------------|---|--|---|
| Sulfaméthoxazole | 0.03 µg.kg ⁻¹ – 1.5 – 68 | 1 µg.kg ⁻¹ – 0.9 – 5.7 | 6.2 (fumier de vaches ; Watanabe et al., 2010) 0.03-0.9 (lisier ; Hu et al., 2010) 50-100 (fumiers ; Karci et Bacioğlu, 2009) 19.3-54.5 (DeVries et Zhang, 2016) |
| Sulfaméthazine | 0.74 – 40 – 360 µg.kg ⁻¹ | 0.14 – 4.0 - 20 | ≤ 10,4 (effluents de bétail ; Aust et al., 2008) ≤ 2 (lisiers de porcs ; Hamscher et al., 2005) 3.2-74 (DeVries et Zhang, 2016) |
| Ciprofloxacine | 0.004 µg.kg ⁻¹ – 2.6 – 11.7 | 2.2 µg.kg ⁻¹ – 0.9 – 4.3 | 0.8-30 (lisier ; Hu et al., 2010) 101-5600 (DeVries et Zhang, 2016) |
| Norfloxacine | 21 µg.kg ⁻¹ – 2.9 – 11.1 | 0.85 – 2.2 – 4.6 | 21.5-2160 (DeVries et Zhang, 2016) |
| Ciprofloxacine Norfloxacine | 3 (Golet et al., 2003) | | 290-400 (boues ; Golet et al., 2002) 370 (lisier/fumiers ; Martínez-Carballo et al., 2007) |
| Tylosine | | 2.4-55 (lisiers ; Jacobsen et al., 2004) | 0.05-116 (Song et Guo, 2014) 23-679 (DeVries et Zhang, 2016) |
| Tétracyclines (en mélange) | | | 86-199 (lisiers ; Hamscher et al., 2002) 8.8-105 (fumier de vaches ; Watanabe et al., 2010) |
| Chlortétracycline | 6.2 µg.kg ⁻¹ – 0.65 – 0.35 | 1.3 µg.kg ⁻¹ – 27.4 - 879 | ≤ 87 (effluents de bétail ; Aust et al., 2008) 10-15 (lisiers ; Jacobsen et al., 2004) 102.3-12900 (DeVries et Zhang, 2016) |
| Tétracycline | 0.6 µg.kg ⁻¹ – 0.4 – 1.9 | 1.2 µg.kg ⁻¹ – 6.5 – 43.5 | 105-1010 (DeVries et Zhang, 2016) |

Pour un même antibiotique, les gammes de concentration retrouvées dans les PRO et les sols sont larges. Les PRO peuvent atteindre des concentrations en antibiotiques de l'ordre du $\mu\text{g.kg}^{-1}$ voire du mg.kg^{-1} de matière sèche. Dans les sols, leur concentration est plus faible, de l'ordre du $\mu\text{g.kg}^{-1}$. La compréhension de l'impact des PRO sur les stocks d'antibiotiques retrouvés dans les sols est difficile car les évaluations de concentrations dans les sols sont peu nombreuses et englobent souvent des données de sols dont on ne connaît pas l'historique (Beausse, 2004).

La présence des antibiotiques dans le sol peut induire le développement de populations microbiennes résistantes et d'organismes pathogènes avec un risque de transfert dans les plantes et les eaux, et donc in fine vers l'homme (Goni-Urriza et al., 2000 ; Nwosu, 2001 ; Sengelov et al., 2003 ; Davies et Davies, 2010 ; Negreanu et al., 2012). De plus, les antibiotiques peuvent aussi altérer la structure des populations microbiennes naturelles et l'activité des microorganismes, avec un risque sur le fonctionnement des sols (Martinez, 2009 ; Schauss et al., 2009b).

2.1.6. Eléments Traces Métalliques dans les PRO et dans les sols

Les éléments traces métalliques sont naturellement présents dans l'environnement. Les teneurs naturelles dans les sols constituent le fond pédo-géochimique local, et proviennent de la dégradation des roches ou des émissions volcaniques. Cependant les activités anthropiques y ajoutent des ETM sous des formes chimiques assez réactives, qui s'accumulent dans les sols, étant donné qu'ils ne sont pas dégradables (Khalis et al., 1997 ; Caussy et al., 2003 ; Sekhar et al., 2004). Les teneurs en ETM peuvent alors atteindre des niveaux toxiques pour les écosystèmes et la dépollution par leur extraction est difficilement envisageable étant donné le nombre et l'étendue des sites contaminés.

Les ETM arrivent dans les sols agricoles via différentes sources de contamination comme le montre la Figure 5 : l'épandage de déjections animales, de boues et de composts, l'utilisation d'engrais minéraux, les traitements phytosanitaires, les retombées atmosphériques, les amendements calciques et magnésiens.

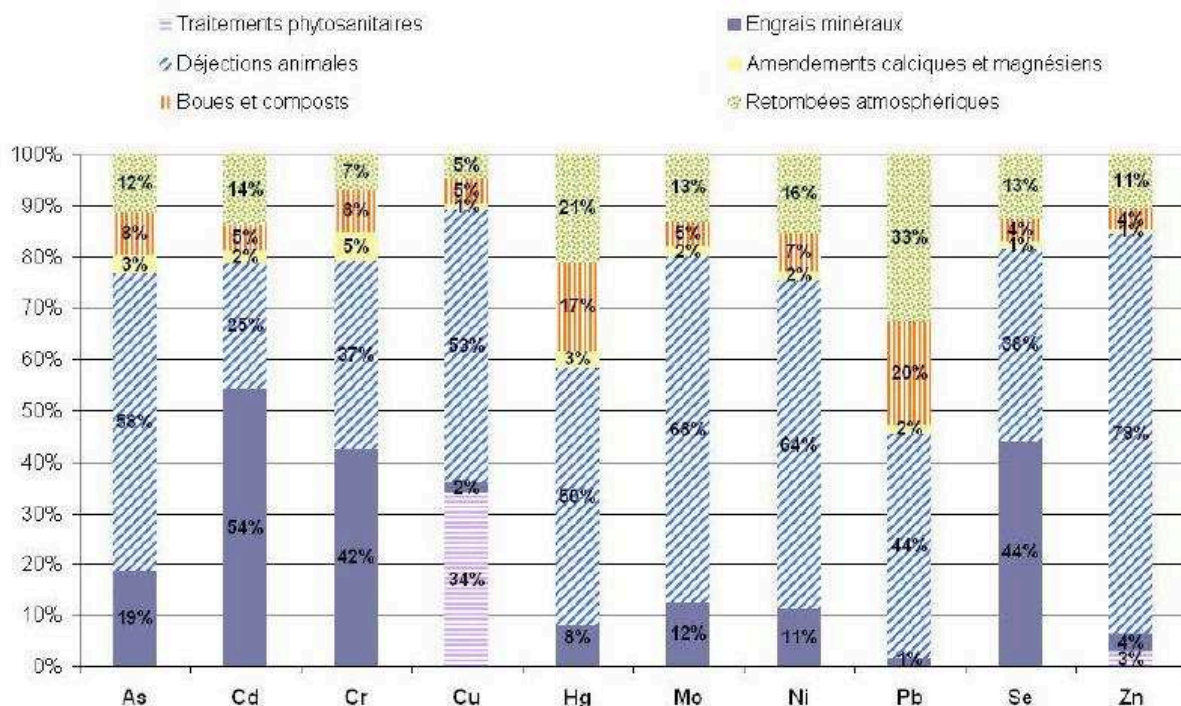


Figure 5 : Part des différentes sources de contamination dans l'estimation des quantités totales d'ETM entrant sur les sols agricoles en France (ADEME-SOGREAH, 2007).

Ainsi l'épandage d'effluents d'élevage est l'une des voies principales d'entrée des ETM dans les sols, tandis que les boues et composts jouent un rôle relativement faible en pourcentages d'ETM entrant dans les sols agricoles français (entre 4 et 8%) sauf pour le mercure (17%) et le plomb (20 %) (ADEME-SOGREAH, 2007).

Les teneurs totales en ETM varient considérablement dans les PRO (boues de STEP, fumiers, fientes) (tableau 5, ADEME-SOGREAH, 2007). Dans les sols, les teneurs en ETM sont fonction des concentrations en ETM dans les PRO, de la quantité de PRO apportée, et de la fréquence d'apport. Toutefois, les concentrations en ETM augmentent significativement dans les horizons superficiels des sols ayant reçu des épandages répétés de boues de STEP (Mantovi et al., 2005 ; Wei et Liu, 2005). C'est ce qu'illustre le tableau 6 (Houot et al., 2014), présentant l'effet à long terme de différents épandages de PRO sur les teneurs en métaux. Les teneurs en Zn et Cu sont généralement les plus élevées (Wang et al., 2005 ; Wang et al., 2013) et croissent linéairement avec des doses croissantes d'application de boues de STEP (Li et al., 2012). En France, parmi toutes les sources d'entrées d'ETM dans les sols agricoles, les effluents d'élevage sont responsables de 78% des entrées de Zn et 53% des entrées de Cu dans les sols agricoles, tandis que les boues de STEP et autres PRO sont responsables de 4% des entrées de Zn et 5 % des entrées de Cu (Belon et al., 2012).

Tableau 5 : Teneurs en ETM dans les différents types de composts (ADEME-SOGREAH, 2007).

| Type de compost | | As | Cd | Cr | Cu | Hg | Mo | Ni | Pb | Se | Zn |
|---------------------|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ |
| Verts | Moyenne | 8,94 | 1,37 | 45,60 | 50,78 | 0,52 | 3,15 | 22,41 | 87,33 | 1,14 | 186,45 |
| | Ecart-type | 4,87 | 2,09 | 37,40 | 33,99 | 0,78 | 4,40 | 14,58 | 75,99 | 2,24 | 109,88 |
| | Nombre | 22 | 106 | 102 | 120 | 89 | 19 | 120 | 123 | 32 | 119 |
| | Médiane | 7,32 | 0,80 | 34,16 | 43,75 | 0,30 | 1,60 | 18,54 | 63,00 | 0,36 | 170,00 |
| | Max | 21,20 | 17,10 | 204,00 | 287,20 | 5,50 | 19,5 | 95,00 | 560,50 | 12,27 | 795 |
| | Min | 2,7 | 0,10 | 5,01 | 1,75 | 0,02 | 1,05 | 1,30 | 2,00 | 0,02 | 3,4 |
| Biodéchets | Moyenne | 9,05 | 1,07 | 42,81 | 109,77 | 0,63 | 1,81 | 25,51 | 106,05 | 0,78 | 325,66 |
| | Ecart-type | 3,63 | 0,71 | 35,93 | 92,50 | 0,51 | 0,87 | 18,37 | 62,88 | 1,30 | 178,00 |
| | Nombre | 12 | 26 | 26 | 25 | 23 | 9 | 26 | 26 | 14 | 27 |
| | Médiane | 9,20 | 0,86 | 30,20 | 89,00 | 0,50 | Nbre≤10 | 20,20 | 92,95 | 0,50 | 241,70 |
| | Max | 17,30 | 3,50 | 189,00 | 497,13 | 2,06 | 3,08 | 74,01 | 291,00 | 5,20 | 773,00 |
| | Min | 4,00 | 0,50 | 11,20 | 28,20 | 0,10 | 0,70 | 4,30 | 31,70 | 0,08 | 143,00 |
| OM | Moyenne | 12,69 | 4,62 | 126,34 | 164,37 | 1,64 | 2,95 | 60,35 | 325,92 | 0,37 | 554,28 |
| | Ecart-type | 8,54 | 11,30 | 99,27 | 144,95 | 1,11 | 0,82 | 61,78 | 189,92 | 0,67 | 313,93 |
| | Nombre | 9 | 46 | 38 | 55 | 41 | 5 | 44 | 50 | 14 | 56 |
| | Médiane | Nbre≤10 | 1,66 | 109,82 | 153,00 | 1,50 | Nbre≤10 | 44,35 | 313,75 | 0,14 | 559,50 |
| | Max | 27,00 | 74,90 | 573,40 | 977,90 | 5,80 | 4,30 | 366,50 | 912,80 | 2,60 | 1 722,00 |
| | Min | 1,43 | 0,24 | 22,60 | 3,80 | 0,04 | 2,24 | 10,70 | 35,70 | 0,01 | 118,18 |
| STEP | Moyenne | 3,30 | 1,62 | 50,59 | 152,136 | 2,20 | 2,24 | 25,81 | 61,81 | 4,02 | 404,92 |
| | Ecart-type | 1,93 | 1,88 | 38,55 | 106,09 | 1,68 | 1,16 | 25,34 | 65,23 | 3,39 | 308,90 |
| | Nombre | 12 | 91 | 96 | 99 | 84 | 10 | 95 | 97 | 12 | 99 |
| | Médiane | 3,75 | 1,08 | 38,87 | 119,03 | 1,75 | 1,16 | 18,06 | 39,00 | 2,75 | 293,78 |
| | Max | 6,80 | 12,00 | 183,10 | 503,08 | 9,10 | 12,00 | 165,00 | 403,30 | 11,60 | 1564,50 |
| | Min | 0,31 | 0,10 | 2,80 | 19,90 | 0,10 | 0,20 | 1,00 | 0,43 | 0,20 | 35,70 |
| Déjections animales | Moyenne | 5,49 | 1,00 | 53,52 | 249,50 | 0,20 | | 34,74 | 45,17 | | 626 |
| | Ecart-type | 2,80 | 0,40 | 40,98 | 189,28 | 0,17 | | 22,21 | 82,56 | | 414 |
| | Nombre | 15 | 18 | 17 | 22 | 10 | | 16 | 23 | | 22 |
| | Médiane | 4,40 | 1,05 | 47,60 | 215,40 | 0,10 | nd | 38,35 | 19,50 | nd | 600 |
| | Max | 13,10 | 1,50 | 182,90 | 718,20 | 0,60 | | 81,80 | 404,60 | | 2 018 |
| | Min | 2,10 | 0,07 | 7,50 | 11,00 | 0,10 | | 6,80 | 2,90 | | 75 |
| Mélanges | Moyenne | | 1,02 | 48,44 | 114,10 | 0,64 | | 28,73 | 54,08 | | 361,06 |
| | Ecart-type | | 0,59 | 35,56 | 91,54 | 0,36 | | 18,29 | 35,25 | | 231,65 |
| | Nombre | | 12 | 14 | 14 | 10 | | 14 | 14 | | 14 |
| | Médiane | nd | 1,00 | 34,35 | 106,00 | 0,70 | nd | 24,21 | 52,63 | nd | 316,85 |
| | Max | | 2,30 | 153,00 | 300,50 | 1,10 | | 63,20 | 123,90 | | 787,00 |
| | Min | | 0,20 | 13,60 | 16,00 | 0,02 | | 4,70 | 12,60 | | 92,40 |

Unité : mg/kg de matière sèche

Nombre = nombre d'échantillons

nb : non déterminé

Nbre≤10 : la médiane n'est pas calculée quand Nbre≤10

Source : Etude Composition des composts Anjou Valorisation/Ademe (2001)

Tableau 6 : Effets à long terme de l'application de boues, composts de déchets verts et fumiers sur les concentrations en ETM dans des sols d'Europe (Smolders et al., 2012 ; Jones et al., 1987).

| Site | Apports cumulés | Nombre d'années d'application | Nombre d'années avant prélèvement | Cu | Ni | Pb | Zn | Cd | As | Cr |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|----|-----|-----|------|----|-----|
| | T.ha ⁻¹ de MS | | | mg.kg ⁻¹ de sol | | | | | | |
| Boues | | | | | | | | | | |
| Madrid, Espagne | 0 | 8 | 14 | 13 | 9 | 16 | 28 | 0.2 | 7 | 14 |
| | 400 | | | 141 | 14 | 64 | 208 | 6.9 | 7 | 27 |
| | 800 | | | 232 | 16 | 100 | 316 | 11.9 | 7 | 35 |
| Composts de déchets verts | | | | | | | | | | |
| Boutersem, Belgique | 0 | 9 | 1 | 8 | 9 | 19 | 43 | 0.3 | 5 | 21 |
| | 280 | | | 11 | 8 | 23 | 54 | 0.3 | 5 | 20 |
| Fumier | | | | | | | | | | |
| Rothamsted, Angleterre | 0 | 140 | | 19 | 25 | 46 | 80 | | | 120 |
| Broadbalk | 35 | 140 | | 30 | 23 | 67 | 118 | | | 113 |

Une fois dans les sols, les ETMs peuvent affecter la microflore du sol et ses activités même à des teneurs relativement faibles (Chander et Brookes, 1993 ; Giller et al, 1998), avec un risque sur le fonctionnement du sol. Ils peuvent aussi être prélevés par les plantes, et par conséquent contaminer l'homme via la chaîne alimentaire, ou bien migrer vers les nappes d'eau souterraines (Moreno et al., 1996 ; Wong et al., 1996 ; Gove et al., 2001). Ainsi l'augmentation des teneurs totales en ETM avec l'application des PRO dans les terres agricoles représente un risque potentiel d'écotoxicité de ces ETM dans les agrosystèmes ou dans l'environnement. Toutefois, l'écotoxicité des ETM ne dépend pas uniquement de leur concentration totale, mais de leur spéciation (Ure and Davidson, 2001), terme qui désigne les différentes formes chimiques sous lesquelles les ETM sont présents et interagissent avec les divers constituants du sol, et qui varie avec les propriétés des PRO et des sols. En effet selon leur spéciation, les ETM seront solubles, mobilisables ou inertes dans les PRO puis dans les sols (Cambier et al., 2018) et donc potentiellement plus ou moins toxiques.

Les teneurs en ETM retrouvées dans les PRO comme dans les sols, de l'ordre du mg.kg⁻¹, sont bien plus élevées que celle des ATB, de l'ordre du µg.kg⁻¹. L'impact des contaminants ne dépend pas uniquement leur teneur totale mais de leur teneur **biodisponible** dans les sols. De plus, même de faibles teneurs en contaminant peuvent perturber le fonctionnement biologique du sol. Les sections suivantes visent donc à mieux connaître le devenir et les effets des antibiotiques dans les sols, seuls puis en mélange antibiotique-antibiotique et antibiotique-métaux.

2.2. Devenir des antibiotiques dans les sols agricoles

Une fois dans le sol, les antibiotiques se répartissent dans la phase solide, liquide ou gazeuse du sol. La phase solide du sol est composée d'agrégat organo-minéraux de taille variable. Les espaces vides entre ces agrégats définissent la porosité structurale du sol. La phase liquide et la phase gazeuse correspondent respectivement à l'eau et l'air qui circulent entre les agrégats, (dans les macropores) ou bien à l'intérieur des agrégats, (dans les micropores). L'eau peut prendre deux états : un état lié où l'eau est peu mobile sous forme de pellicule à la surface des constituants et un état libre lorsqu'elle circule dans la macroporosité du sol. Par ailleurs, la solution du sol est au contact des microorganismes du sol qui assurent les cycles biogéochimiques des éléments (carbone, azote, phosphore), et la qualité physico-chimique des sols (nutriments, rôle de filtre), par une multitude de fonctions telles que la dégradation de la matière organique, et la biodégradation des contaminants organiques.

L'eau est le principal vecteur de transport des molécules, depuis la structure poreuse du sol vers les eaux de surface ou souterraines par lessivage ou lixiviation, ainsi que vers les plantes (Puckowski et al., 2016).

La mobilité des molécules diminue avec l'augmentation de leur rétention (sorption) sur la matrice organo-minérale. L'intensité de la rétention dépend des propriétés intrinsèques des molécules (solubilité, polarité, masse moléculaire) et des caractéristiques des constituants du sol (quantité et qualité de la matière organique, composition de la fraction minérale, concentrations des ions en solution et aux interfaces et notamment pH). Les antibiotiques dits persistants vont s'accumuler dans les sols. Toutefois sur le long terme, la transformation des matières organiques par les microorganismes et le transfert des matières organiques dissoutes peuvent mobiliser de nouveaux les molécules, favorisant leur transfert dans les eaux de surface ou souterraines. D'autres antibiotiques dits non persistants peuvent être facilement mobilisés et transférés vers les eaux de surface et souterraines.

D'autre part, la rétention limite la biodisponibilité des antibiotiques, et limite par conséquent leur toxicité potentielle pour la biomasse du sol mais également leur dégradation biotique. La dégradation des antibiotiques peut aussi être abiotique (photodégradation, hydrolyse).

Lors de leur dégradation, les ATB peuvent être complètement minéralisés si la dégradation est totale ou conduire à la production de métabolites si la dégradation est partielle.

Il est à noter que ces mécanismes (rétention, dégradation partielle ou totale) ont aussi lieu dans les PRO avant leur apport au sol. En conséquence, lors des épandages, les antibiotiques peuvent arriver au sol sous forme de métabolites, qui à leur tour peuvent être ou retenus, mobilisés ou transformés dans le sol.

La dissipation d'un antibiotique s'exprime par des temps de demies-vies (DT50), c'est-à-dire le temps nécessaire pour que la concentration dans le sol diminue de 50%. La dissipation regroupe différents processus tels que la dégradation et la rétention. En effet, la rétention des ATB est parfois si forte qu'ils ne sont plus extractibles par voie chimique et participent à la formation de résidus liés (ou non extractibles).

Dans la majorité des cas, la volatilisation des antibiotiques peut être considérée comme négligeable (Dorival-García et al., 2013 ; Verlicchi et Zambello, 2015 ; Geng et al., 2015).

Ainsi la répartition des antibiotiques entre la phase aqueuse, solide et gazeuse est régie par des phénomènes de transport et de transformation des molécules. Les mêmes facteurs

que pour la rétention et d'autres entrent en jeu : les propriétés intrinsèques de la molécule (charge, structure), les caractéristiques physico-chimiques (carbone organique, pH, teneur en eau, force ionique) et biologique du sol (abondance, diversité et activité microbienne, distribution spatiale des microorganismes), les conditions climatiques (température, précipitations, rayonnement UV) et les pratiques agricoles (fréquence des épandages, type de PRO...), ainsi que la présence d'autres contaminants. In fine ces différents processus influent sur le transfert de ces molécules vers d'autres compartiments de l'environnement, tels que les eaux de surfaces, les eaux souterraines et les plantes.

La figure 6 récapitule le devenir des antibiotiques et de leurs produits de transformation après épandage de PRO sur les sols agricoles (inspiré de Jechalke et al., 2014).

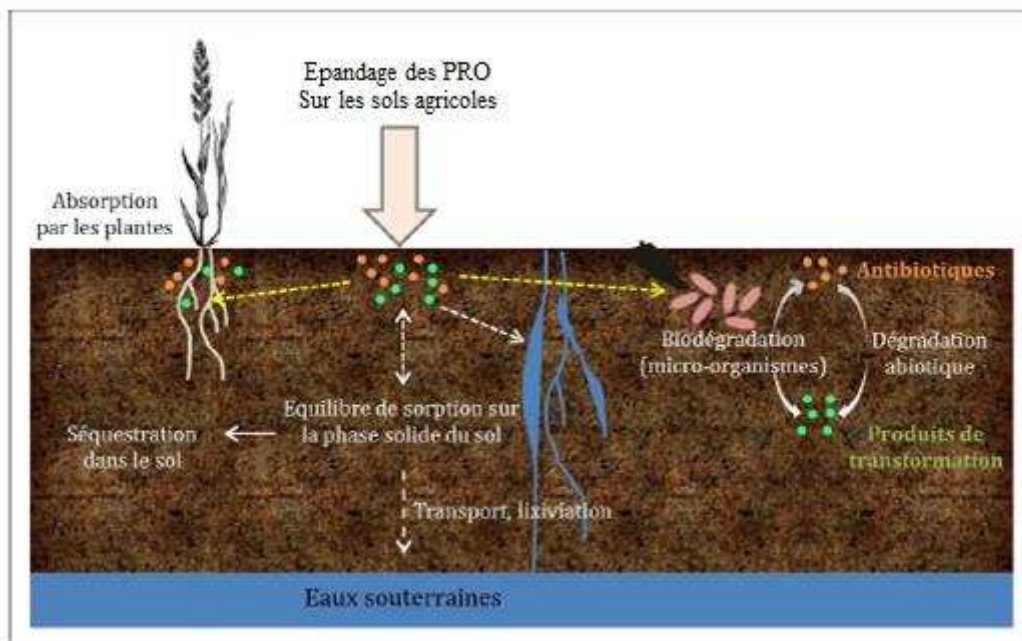


Figure 6 : Devenir des antibiotiques et de leurs produits de transformation après épandage de PRO sur les sols agricoles.

2.2.1. Mécanismes en jeu

2.2.1.1. Rétention

La rétention des ATB dans des sols met en jeu au moins deux processus, la diffusion et l'adsorption. La diffusion, qui a lieu dans la phase aqueuse et/ou en surface des constituants, entraîne la molécule dans la porosité de la matrice solide de plus en plus fine, si bien qu'elle paraît devenir absorbée dans cette matrice. L'absorption au sens biologique correspond plus précisément à l'entrée de la molécule dans une cellule vivante, souvent suivie d'une dégradation (voir plus loin). L'adsorption correspond à la fixation de la molécule à la surface des constituants organo-minéraux, dans la (micro-)porosité des sols ou en périphérie des agrégats.

L'adsorption est généralement rapide. Par exemple, Allaire et al. (2006) observent après l'apport d'antibiotiques ($400 - 12\,000 \text{ mg.kg}^{-1}$) dans un sol amendé avec du lisier, que

plus de 95% de chlorotétracycline sont adsorbées dans les 10 premières minutes, et 95% de tylosine sont adsorbées dans les 3 premières heures. Mais compte-tenu de l'hétérogénéité des sols à différentes échelles (agrégats, pores, surfaces des constituants), et du processus de diffusion, les mécanismes d'adsorption pourront intervenir sur des temps plus longs et faire varier plus lentement la fraction adsorbée.

L'adsorption des antibiotiques est globalement caractérisée par un coefficient de partage (ou de distribution) entre les phases liquide et solide, appelé K_d , correspondant au ratio entre la concentration des molécules adsorbées, et la concentration des molécules en solution, dans un état jugé être à l'équilibre. Plus le K_d est élevé, plus les molécules sont fortement adsorbées et moins elles sont mobiles et assimilables par les microorganismes. Le K_d varie suivant l'affinité de la famille des antibiotiques avec les constituants du sol.

Les K_d des sulfonamides sont généralement faibles : par exemple, de 0.9 à 1.8 L.kg⁻¹ pour la sulfachloropyridazine dans des sols limoneux et argileux (Boxall et al., 2002) ; de 0.6 à 3.2 L.kg⁻¹ pour le sulfathiazole (Langhammer, 1989) et 4.9 L.kg⁻¹ pour la sulfaméthazine (Thurman et Lindsey, 2000). Ces molécules faiblement retenues par les constituants du sol peuvent être transportées par ruissellement dans les eaux de surface, ou bien être transférées dans les profils du sol par percolation, et atteindre les nappes phréatiques (Pedersen et al., 2003 ; Kim et al., 2010 ; Chen et al., 2011).

En revanche, les fluoroquinolones ont une forte affinité pour les boues d'épuration, les sols et les sédiments (Golet et al., 2003 ; Picó et Andreu, 2007 ; Vieno et al., 2007 ; Yang et al., 2010), avec des K_d pouvant dépasser 5000 L.kg⁻¹. Il en résulte un long temps de résidence dans l'environnement et des temps de demi vie pouvant dépasser 580 jours dans le sol (Rosendahl et al., 2012).

Les antibiotiques s'adsorbent préférentiellement sur la matière organique du sol plutôt que sur les minéraux argileux. L'adsorption peut alors aussi être définie par le coefficient d'adsorption K_{oc} , correspondant au K_d normalisé par la teneur en carbone organique du sol (f_{oc}) : $K_{oc} = K_d / f_{oc}$ (He et Zhang, 2014). Néanmoins, d'après He et Zhang (2014), les interactions des ATB avec les argiles sont également à considérer car souvent en teneur très supérieure aux MOS et en particulier dans les sols agricoles. D'ailleurs, Tolls (2001) note que les valeurs de K_d des antibiotiques varient fortement avec le type de sol, indépendamment des teneurs en C, ce qui suggère que la teneur en matière organique n'est pas le seul facteur en jeu dans l'adsorption des ATB, et que les minéraux argileux sont aussi importants dans la rétention des antibiotiques.

Le Tableau 7 présente des exemples de K_d et DT50 de différentes familles d'antibiotiques. La forte variabilité des valeurs pour un même antibiotique peut s'expliquer par la variation des caractéristiques physicochimiques des sols (pH, matière organique, texture) dans lesquels les antibiotiques ont été étudiés (Rabølle et Spliid, 2000 ; Thiele-Bruhn, 2003 ; Wegst- Urich et al., 2014).

Tableau 7 : Coefficient de distribution Kd et Durée de demi-vie DT50 de familles d'antibiotiques et exemples de molécules.

| Familles et Exemples d'antibiotiques | Kd (L.kg ⁻¹) | DT50 (jours) |
|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Sulfonamides | | |
| Sulfaméthoxazole Sulfaméthazine | 0,6-4,9 (a, b, c, d) | 5-150 (a, g, h, i) |
| Fluoroquinolones | | |
| Ciprofloxacine Norfloxacine | 427-591 (b, e) | 25-2300 (a, h, j) |
| Macrolides | | |
| Erythromycine Tylosine | 8-130 (b, f) | 8-89->1000 (a, g) |
| Tétracyclines | | |
| Tétracycline Chlortétracycline | 400-2386 (a, b, c) | 30-180 (a, h) |

a DeVries et Zhang, 2016 ; b Pan et Chu, 2016 ; c Sarmah et al., 2006 ; d Höltge et Kreuzig, 2007 ; e Nowara et al., 1997 ; f Rabølle et Spliid, 2000 ; i Kodešová et al., 2016 ; j Thiele-Bruhn, 2003 ; k Lin et Gan, 2011 ; l Girardi et al., 2011.

Les mécanismes d'adsorption des antibiotiques sur la phase solide sont : les liaisons covalentes, les liaisons ioniques, les liaisons de complexation, les liaisons hydrogènes, les liaisons de Van-der-Waals et les interactions hydrophobes (MacKay et Canterbury, 2005 ; Gu et al., 2007 ; Sibley et Pedersen, 2008). Ces mécanismes varient avec la famille d'antibiotiques et les propriétés physico-chimiques de la surface adsorbante. Les minéraux argileux et la matière organique des sols (MOS) contiennent différents groupes fonctionnels, présentant différentes charges, mais sont globalement chargés négativement. De manière générale, l'adsorption des ATB sur les minéraux argileux s'effectue principalement par des interactions hydrophiles et ioniques, tandis que l'adsorption sur la matière organique peut être hydrophobe.

Le tableau 8 présente les principaux types d'interactions impliqués dans les mécanismes d'adsorption des antibiotiques sur les surfaces adsorbantes du sol (Calvet et al., 2005 ; Tolls, 2001).

Tableau 8 : Principaux types d'interactions impliqués dans les mécanismes d'adsorption des antibiotiques sur les surfaces adsorbantes du sol (d'après Calvet et al., 2005; Tolls, 2001).

| Type d'interaction | Propriétés de la surface adsorbante du sol | Propriétés et exemples d'antibiotiques |
|---|--|--|
| Liaison ionique, échange d'ions | Charges électriques portées par les minéraux argileux, les oxydes et hydroxydes métalliques, les sites de surface chargés (O ⁻ ou OH ₂ ⁻) Charges électriques portées par les groupes chimiques polaires (RCOO ⁻ , RO ⁻ , RNH ₂ ⁺) de la matière organique | Charges électriques portées par les antibiotiques ionisés : la plupart des antibiotiques , en fonction de leurs pKa Formation de ponts cationiques : sulfonamides |
| Liaison de complexation, transfert d'électrons | Cations de la phase minérale | Présence d'atomes porteurs d'électrons libres (O, N, S, P) : Formation de complexes cationiques : tétracyclines, fluoroquinolones |
| Liaison hydrogène | Groupes chimiques porteurs de proton : - groupes OH dans la phase minérale - RCOOH, ROH, RNH et atomes possédant des électrons libres (O, N, S, P) dans la phase organique | Présence d'atomes porteurs d'électrons libres (O, N, S, P) : la plupart des antibiotiques |
| Interactions polaires | | Molécules polaires : la plupart des antibiotiques |
| Interactions hydrophobes | Groupes chimiques apolaires aliphatiques ou aromatiques de la matière organique | Présence de groupes chimiques aliphatiques, aromatiques ; formes neutres des antibiotiques : sulfonamides et macrolides |

Les liaisons covalentes correspondent à un partage d'électrons entre deux atomes au niveau de leurs couches externes respectives, et sont caractérisées par des énergies de liaison très élevées. Elles s'établissent essentiellement avec la matière organique du sol.

Les liaisons ioniques sont des liaisons formées entre la charge cationique ou anionique de certains groupes fonctionnels des antibiotiques et, respectivement, les charges négatives ou positives situées à la surface de l'adsorbant. L'adsorbant peut être minéral (cations sur les argiles, oxydes de fer) et/ou organique (formes cationiques ou anioniques). Les liaisons ioniques sont possibles pour tous les antibiotiques (Tolls, 2001 ; Figueroa-Diva et al., 2010). La spéciation des antibiotiques dépend en premier lieu de leurs constantes de dissociation acide (pK_a), et du pH imposé par la matrice.

Lorsque les charges du polluant organique et de l'adsorbant sont de même signe, des ponts ioniques entre les polluants et le sol peuvent se former grâce à des ions compensateurs, de charge opposée à la surface du constituant adsorbant. Les ions compensateurs peuvent être des cations métalliques monovalents, divalents ou trivalents (ex : Li⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ ou Al³⁺). Lorsque la liaison est covalente entre un site de surface et un soluté, on parle de complexation de surface. Ainsi, en présence de cuivre Cu (II), les sulfonamides peuvent s'adsorber en formant des complexes avec le cuivre et la phase solide du sol (Morel et al., 2014 ; Xu et al., 2015). La complexation s'opère facilement pour les tétracyclines et les fluoroquinolones au niveau de leur groupe céto-carboxylique déprotoné (Figueroa-Diva et al., 2010).

Les liaisons hydrogènes sont des liaisons électrostatiques établies entre des atomes électronégatifs (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. L'intensité d'une liaison hydrogène est intermédiaire entre celle d'une liaison covalente et une liaison de van der Waals.

Les liaisons de Van der Waals correspondent à des interactions dipolaires de faible intensité 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.

Les interactions hydrophobes s'effectuent entre des composés organiques contenant plusieurs groupements hydrophobes, non ionisables, peu polaires et peu hydrosolubles, et des constituants du sol de nature hydrophobe. Les molécules hydrophobes sont caractérisées par un fort coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}). Le logarithme du coefficient de partition octanol-eau (K_{ow}) permet d'évaluer l'hydrophobicité des composés. Il s'écrit : $\log K_{ow} = \log (C_o/C_w)$, où C_o est la concentration du composé dans l'octanol, et C_w la concentration du composé non ionisé dans l'eau. Par exemple, dans l'étude de Gruber et al. (1990), l'adsorption d'ivermectine B1a augmente avec la concentration de matière organique dans trois sols de textures différentes, K_d est positivement corrélé avec le coefficient f_{oc} , suggérant le partage hydrophobe comme mode d'adsorption prédominant de cet antibiotique. Les sulfonamides peuvent aussi interagir avec la matière organique via des interactions hydrophobes en fonction de leurs groupements de substitution (Figuerola-Diva et al., 2010 ; Schwarz et al., 2012).

Etant donné que les antibiotiques sont des molécules ionisables, leur adsorption et leur solubilité dépendent fortement du pH (Yu et al., 1994). En effet, le pH du sol détermine la spéciation des antibiotiques, c'est à dire la protonation ou déprotonation des groupes fonctionnels constitutifs de certains antibiotiques (les groupements amines, carboxyles, et hydroxyles), engendrant des charges positives ou négatives, en fonction du pK_a des molécules. Les antibiotiques positivement chargés se lient aux particules du sol par des échanges cationiques/attractions électrostatiques (Gao et Pedersen, 2005). Les molécules anioniques peuvent former des complexes avec les cations qui sont adsorbés sur les constituants du sol négativement chargés, ou se fixer directement sur des sites positivement chargés des oxydes de Fe, Al, Mn et des bords des feuillets d'argiles.

Les sulfonamides notamment sont des molécules amphotères, qui peuvent exister sous forme anionique, cationique, et/ou zwitterionique, en fonction du pH du milieu (Kumar et al., 2005). En effet, les sulfonamides sont constitués d'un noyau benzénique, d'une fonction amine (NH_2), et d'un groupe sulfonamide (SO_2NH_2) (Sarmah et al., 2006). La plupart des sulfonamides ont au moins deux fonctions amines, avec l'amine attaché au sulfure, référencé « N1 », qui est déprotoné à des pH > 5.5-7. L'amine attachée au cycle aromatique est référencée « N4 », et est protonée à pH < 2.5. La plupart des sulfonamides sont donc caractérisées par deux valeurs de pK_a (Ingerslev et Halling-Sørensen, 2000). Ces ATB sont positivement chargés dans des conditions acides, pour des pH compris entre 2.5 et 6 (approximativement), et négativement chargés dans des conditions neutres et alcalines (Haller et al., 2002). Ainsi, ils se comportent comme des acides faibles dans les gammes de pH couramment retrouvées dans les sols agricoles, c'est-à-dire autour du pH = 6-7 (Sarmah et al., 2006), et forment des sels à pH fortement acide ou basique (Thiele-Bruhn, 2003).

Pour les fluroquinolones comme la ciprofloxacine, l'adsorption augmente lorsque le pH diminue (Vasudevan et al., 2009), mais le pH aura moins d'influence que la capacité

d'échange cationique et la texture du sol (Figuerola-Diva et al., 2010 ; Leal et al., 2013 ; Vasudevan et al., 2009). Les valeurs de K_d augmentent avec la CEC et la teneur en argile.

L'adsorption des antibiotiques sur les minéraux argileux varie aussi en fonction de la nature des argiles (Pinck et al., 1961a, b). Certains antibiotiques peuvent être adsorbés sur des surfaces latérales, sur les surfaces basales d'oxygène et d'hydroxyles de minéraux argileux type 1 :1 (kaolinite), mais aussi dans des espaces entre les feuillets des argiles type 2 :1 (principalement la montmorillonite) (Nowara et al., 1997). L'adsorption dans les feuillets d'argiles, en particulier des argiles gonflantes, peut immobiliser les ATB à long terme, de plusieurs mois à plusieurs années, dans les sols (Roger et Jacq, 2000).

Les caractéristiques des sols les plus importantes pour la rétention des antibiotiques sont au final la teneur en matière organique, le pH, la capacité d'échange cationique (CEC) et la texture (teneurs en argiles, limons, sables). Mais d'autres facteurs influencent la rétention des antibiotiques dans les sols : concentration de l'antibiotique, activité biologique, temps d'exposition, (Ehlers et Loibner, 2006 ; Riding et al., 2013 ; Adedigba et Semple, 2015). Les conditions environnementales telles que la teneur en eau ou la température peuvent également impacter l'adsorption des ATB dans les sols (Kumar et al., 2005), de manière indirecte, en modulant les activités de dégradation des microorganismes. En effet lorsque les conditions du milieu sont défavorables au développement des populations microbiennes et à leurs activités, la persistance des antibiotiques augmente (Gavalchin et Katz et al., 1994 ; Wang et al., 2006).

L'adsorption des antibiotiques peut être réversible et les ATB peuvent donc repasser en solution au bout d'un temps plus ou moins long. Toutefois, la désorption des ATB dépend de la force de leur rétention. La désorption des sulfonamides sera par exemple plus importante que celle des fluoroquinolones qui présentent des K_d très élevés. L'adsorption des fluoroquinolones est dite « irréversible » et entraîne la formation de résidus dit « liés » ou « non-extractibles » (Kästner et al., 2014). Cependant, les résidus liés ne sont pas exclus d'un éventuel transport vers les eaux (Amiard, 2011), lors de l'érosion des sols sous l'action du ruissellement (Kim et al., 2010 ; Chen et al., 2011). De plus, les résidus liés aux colloïdes et à la matière organique dissoute peuvent migrer dans le profil des sols à travers des flux préférentiels (He et Zhang, 2014), tels que des fissures de dessiccation et des galeries de vers de terre (Kay et al., 2004). Cette remobilisation des molécules sous forme particulière est un mécanisme dit de « transport facilité » (Amiard, 2011).

Outre la mobilité des antibiotiques, la sorption contrôle la quantité d'antibiotique dans la solution sol, donc potentiellement disponible pour être assimilée et dégradée par les microorganismes du sol, ou exercer des effets toxiques sur les communautés non dégradantes.

2.2.1.2. Biodisponibilité

On peut distinguer la disponibilité environnementale, la biodisponibilité environnementale et la biodisponibilité toxicologique (Figure 7).

La disponibilité environnementale correspond à la présence des molécules dans la solution du sol. Lorsque les molécules en solution sont absorbées par les microorganismes, on parle de biodisponibilité environnementale. Tant que la concentration en ATB dans l'organisme ne dépasse pas la concentration corporelle critique (CBR, critical body residues ;

McCarty et Mackay, 1993 ; Lanno et al., 2004), on parle de bioaccumulation. Et dès lors que la concentration en résidus bioaccumulés induit une réponse biologique, le stade de biodisponibilité toxicologique est franchi (Lanno et al., 2004 ; Harmsen, 2007).

La disponibilité environnementale peut être approchée par des méthodes chimiques, tandis que les biodisponibilités environnementale ou toxicologique sont évaluées par des méthodes biologiques. L'association des deux types de méthodes permet d'estimer la biodisponibilité des contaminants (Harmsen, 2007). Le choix des méthodes varie en fonction des propriétés physico-chimiques des contaminants.

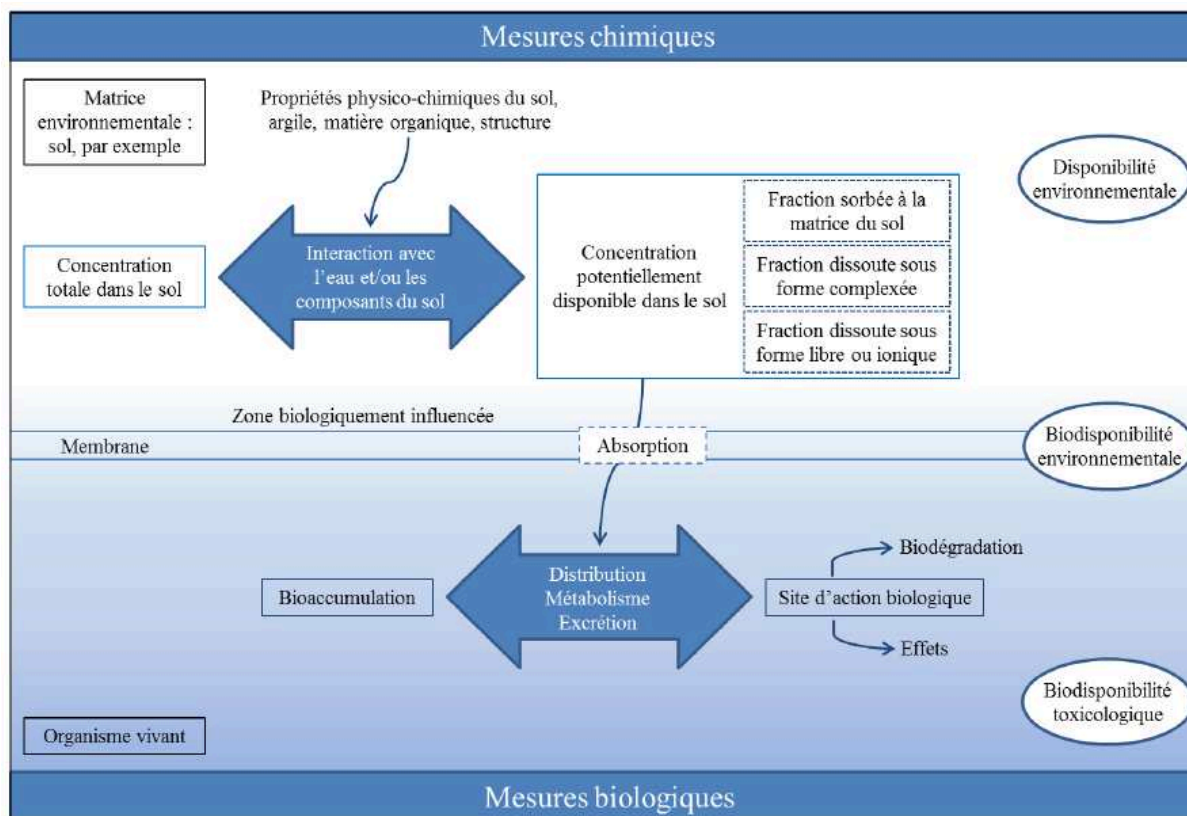


Figure 7 : Description des processus de biodisponibilité d'un contaminant dans le sol jusqu'à son effet biologique au sein d'un organisme (d'après Lanno et al., 2004 ; Harmsen, 2007).

2.2.1.3. Dégradation

La dégradation des antibiotiques dans le sol peut être d'origine abiotique, ou biotique.

Les réactions entraînant une dégradation abiotique des antibiotiques dans les sols sont la photolyse et l'hydrolyse.

La photolyse peut se produire lorsque les antibiotiques sont exposés à la lumière du jour à l'interface sol-atmosphère. Les quinolones, très stables, et les tétracyclines, sont particulièrement sensibles à la photoradiation (Thiele-Bruhn, 2003 ; Doi et Stoskopf, 2000). La photo-dégradation des antibiotiques reste cependant mineure dans les sols car leur exposition à la lumière est limitée (Beausse, 2004).

L'hydrolyse peut être un mécanisme important de la dissipation et l'élimination de certains antibiotiques dans l'environnement, en particulier pour les β -lactamines (Huang et

al., 2001), alors que les sulfonamides et quinolones sont connues pour y être résistantes (Cetecioglu et al., 2013).

La dégradation biotique peut s'effectuer à condition que les antibiotiques soient biodisponibles. Elle a lieu majoritairement en condition aérobie, dans l'horizon superficiel du sol où la présence d'oxygène est plus importante qu'en profondeur (Sollic et al., 2016).

Les microorganismes (bactéries et champignons) dégradent les antibiotiques par des réactions enzymatiques, qui provoquent une hydroxylation ou une décarboxylation (Ingerslev et Halling-Sørensen, 2001 ; Marengo et al., 2001). La dégradation peut être spécifique (Dantas et al., 2008), auquel cas les microorganismes utilisent les antibiotiques comme source de carbone ou d'azote et d'énergie. Le métabolisme spécifique est la principale voie de dégradation de la ciprofloxacine (Dorival-Garcia et al., 2013) ou du sulfaméthoxazole (Ricken et al., 2013). Les antibiotiques peuvent aussi être dégradés de façon non spécifique par co-métabolisme s'ils sont en présence d'une autre source de carbone.

La biodégradation peut être partielle, induisant la formation de métabolites, ou totale. La minéralisation des antibiotiques conduit à un dégagement de CO₂, de NO₃ ou SO₄ en conditions suffisamment oxydantes et en présence des bactéries dégradantes. Par ailleurs, pour certains antibiotiques, comme les sulfonamides, les métabolites peuvent être re-transformés en molécule mère (Jechalke et al., 2014).

La dégradation biotique est généralement la voie majeure de transformation des antibiotiques dans le sol (Kumar et al., 2005) mais varie selon la molécule. Par exemple, Bertelkamp et al. (2014) ont observé que le triméthoprime était plus biodégradable que le sulfaméthoxazole.

Comme pour toute activité microbienne, les facteurs du milieu conditionnant la biodégradation des antibiotiques sont multiples.

La biodégradation dépend de la température. De faibles températures réduisent les vitesses de dégradation (Kumar et al., 2005), et augmentent la persistance des antibiotiques dans les sols. Gavalchin et Katz (1994) ont étudié la persistance de la chlorotétracycline, suivant trois températures d'incubation (30, 20, et 4°C). Après 30 jours, 44% de chlorotétracycline avait persisté dans le sol à 30°C, 88% à 20°C et presque 100% à 4°C. Les temps de demi-vie de ceftiofur (289 jours à 15°C) ont été réduits à 96, 21 et 5 jours, respectivement, lorsque la température a été augmentée à 25, 35 et 45°C (Li et al., 2011).

La dégradation des antibiotiques est aussi influencée par la disponibilité en oxygène. Lin et Gan (2011) ont mis en évidence une dégradation du sulfaméthoxazole et du triméthoprime plus importante en aérobie qu'en anaérobie.

La biodégradation augmente avec la teneur en eau en condition d'aérobie. Wang et al. (2006) rapportent que le temps de demi-vie de la sulfadiméthoxine dans un sol limoneux est de 10.4, 6.9 jours et 4.9 jours pour des teneurs en eau de 15%, 20% et 25% respectivement.

La biodégradation dépend de la quantité et la qualité des argiles et de la MO des sols. En effet celles-ci conditionnent i) les phénomènes d'adsorption-désorption des antibiotiques (Roger et Jacq, 2000) les rendant plus ou moins biodisponibles à la dégradation par les microorganismes, ainsi que ii) l'abondance et la diversité des populations microbiennes dégradantes. Par exemple, la dégradation de la clindamycine, du sulfaméthoxazole, et de la triméthoprime est plus faible dans un sol sableux que dans un sol argilo-limoneux, probablement du fait d'une diversité microbienne dégradante moins abondante (Koba et al., 2017).

2.2.2. Impact des PRO sur le devenir des ATB

Une partie de cette étude s'intéresse au devenir des antibiotiques dans des sols avec un historique d'amendement. Comme l'épandage de PRO modifie les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol (augmentation des teneurs de matière organique, diminution de la densité du sol, augmentation de la porosité et de la stabilité structurale, augmentation de l'activité biologique), cette section vise à comprendre en quoi ces modifications influent sur le devenir des antibiotiques.

Généralement, la dissipation des antibiotiques augmente avec la quantité de PRO (Wang et al., 2006). Cependant, autant l'augmentation de la biodégradation des antibiotiques (Ingerslev et Halling-Sørensen, 2001 ; Wang et al., 2006), que de leur rétention (Xing et al., 2015), peut en être la cause. En effet, en générant une plus grande activité microbienne dans les sols, l'apport de PRO favorise la biodégradation des antibiotiques (Ingerslev et Halling-Sørensen, 2001 ; Wang et al., 2006). Par exemple, dans l'étude de Zhang et al. (2017) la dégradation de la sulfadiazine et du sulfaméthoxazole augmente par co-métabolisme à l'apport de fumier, du fait de la stimulation de la biomasse microbienne dégradante. Toutefois, l'apport de colloïdes (minéraux argileux, d'oxydes métalliques ou de macromolécules organiques) par les PRO peut également protéger les molécules de la biodégradation par adsorption (Xing et al., 2015).

La stimulation de la dégradation ou de la rétention des ATB par des apports de PRO est en partie conditionnée par le degré de stabilité du PRO apporté. En effet, les PRO frais sont plus facilement biodégradables et peuvent favoriser i) la croissance des microorganismes du sol et en particulier les microorganismes dégradant les ATB et/ou ii) stimuler la biodégradation des antibiotiques par co-métabolisme (Zhang et al., 2017). Les PRO plus stables et moins biodégradables peuvent à contrario favoriser la rétention des antibiotiques.

Le transport des antibiotiques peut également être facilité, comme pour les sulfonamides, après apport de fumiers (Chabauty et al., 2016) via la diminution de la densité du sol et de l'augmentation de la porosité.

Ainsi il est difficile d'anticiper les effets des PRO sur le devenir des ATB. Cela dépend de divers facteurs tels que la nature de l'ATB, la stabilité des PRO, la quantité de PRO, ou la fréquence d'épandage.

2.2.3. Devenir des antibiotiques en mélange de contaminants

2.2.3.1. ATB+ATB

Peu d'études portent sur le devenir des antibiotiques en mélange. L'interaction entre ATB pourrait influencer leur devenir respectif en agissant sur leur rétention ou leur dégradation. En effet, un apport concomitant d'antibiotiques pourrait limiter la biodégradation de l'ATB 1 par exemple du fait d'effets de l'ATB 2 sur les populations dégradantes de l'ATB 1 (et inversement). Ou du fait d'un abattement plus important des communautés microbiennes et de la diminution de la dégradation par co-métabolisme. A l'inverse, à plus long terme, la biodégradation des ATB pourrait aussi être stimulée par le développement de populations

résistantes, résultante d'une pression de sélection induite par la présence des antibiotiques en mélanges.

Les quelques études sur le devenir des antibiotiques en cocktail montrent des résultats contrastés. Ma et al. (2014) observent par exemple que l'application combinée de sulfamonométhoxine, ciprofloxacine et tétracycline dans un sol ($100 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour chaque molécule) favorise la dissipation de chaque antibiotique (ex : 64% de sulfamonométhoxine ont été dissipés en 7 jours dans le traitement combiné contre 1% dans le traitement seul). Une explication serait que le traitement combiné entraînerait une prolifération plus importante de bactéries antibio-résistantes comparé aux traitements seuls, en cohérence avec l'augmentation de la respiration basale, stimulant alors la biodégradation des antibiotiques. Au contraire, Fang et al. (2014) montrent que les apports combinés de sulfadiazine et de chlorotétracycline dans une large gamme de concentrations (entre 0 et $500 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour les deux molécules), ne modifient pas significativement leur devenir. Les études décrites dans la bibliographie étant très peu nombreuses et très descriptives, des travaux complémentaires seraient nécessaires pour compléter les résultats existants et étudier les facteurs expliquant les différences de résultats, en prenant en compte les familles d'antibiotiques engagées, le nombre de molécules apportées en combinaison, ou le rapport entre les doses d'antibiotiques.

2.2.3.2. ATB+ETM

2.2.3.2.1. Devenir des ETM dans le sol

Peu d'études portent sur l'impact des ETM sur le devenir des antibiotiques. Il est donc important de comprendre dans un premier temps les processus et facteurs qui régissent le devenir des ETM dans les sols. Comme les antibiotiques, la mobilité et la biodisponibilité des ETM dépendent de leur rétention sur les constituants du sol. Contrairement aux antibiotiques, les ETM ne sont pas dégradables par les microorganismes. Ils sont présents sous différentes formes chimiques (spéciation) plus ou moins solubles qui déterminent leur accumulation dans les sols ou leur transfert vers les eaux de surface ou souterraine. Bien qu'il existe diverses méthodes pour une détermination approchée de la spéciation des ETM, leur détermination exacte est souvent difficile et dans la plupart des cas impossible (Quevauviller 1997).

Les principaux paramètres physico-chimiques du sol influençant la mobilité et la biodisponibilité des ETM sont : le pH, les conditions d'oxydo-réduction (Eh) et la température.

En effet, une diminution du pH correspond à une augmentation du nombre de protons, qui entrent alors en compétition avec les cations métalliques adsorbés, ce qui peut provoquer leur libération dans la phase aqueuse (Swift et McLaren, 1991), et inversement avec les oxyanions tels que les ions arséniate, molybdate, etc. (Deneux-Mustin et al. 2003).

Les conditions d'oxydo-réduction (Eh) agissent également sur la solubilité des ETM susceptibles d'avoir au moins deux degrés d'oxydation (exemple : Cu(II) et Cu(I)), en contrôlant leur degré d'oxydation. L'Eh correspond à l'aptitude d'un milieu à fournir des électrons à un agent oxydant ou à retirer des électrons à un agent réducteur. Suivant l'Eh, le degré d'oxydation des ETM et d'autres éléments diffèrent, rendant les ETM plus ou moins

capables de se fixer sur les constituants du sol. Par exemple des conditions faiblement réductrices peuvent libérer des ETM liés aux oxydes de Mn et Fe, mais des conditions très réductrices, plus courantes dans les sédiments, forment des sulfures (avec Fe(II), Cu(II), Zn(II) par exemple) très stables et très insolubles (Charlatchka et Cambier, 1999).

Quant à la température, elle augmente la dissolution des ETM, dans des intervalles de température différents selon la nature du métal. Par exemple, l'adsorption du Cu, Zn et Cd diminue entre 30°C et 40°C, tandis que cet intervalle de température n'influe pas sur le plomb (Serpaud et al., 1994).

Les microorganismes du sol vont aussi jouer sur la mobilité et la biodisponibilité des ETM, par différentes actions telles que : le transport intra (ou extra) cellulaire des ETM, la modification de la charge de l'ETM (catalyse des réactions redox), la biosorption ou la complexation des ETM avec des acides organiques ou d'autres composés produits par les microorganismes, l'accumulation et la mobilisation des ETM par les microorganismes, la méthylation de certains ETM par les microorganismes, la dégradation des matières organiques exogènes qui contribue au relargage des ETM libérés dans le sol.

Les processus principaux en jeu dans la rétention et l'échange des ETM à l'interface solide - liquide sont : l'adsorption, la précipitation, et la complexation, qui font intervenir les facteurs physico-chimiques et biologiques développées précédemment.

L'adsorption des ETM peut être spécifique ou non. L'adsorption non spécifique est réversible, les énergies de liaisons étant relativement faibles (forces électrostatiques de type Van der Waals ou coulombiennes) entre les ETM et les charges des constituants du sol telles que les particules argileuses (Majone et al. 1996), les oxydes (Martinez et McBride., 1998) et les substances humiques (Andreux, 1997; Hatira et al. 1990). L'adsorption spécifique est une liaison chimique forte, faisant intervenir des liaisons ioniques, covalentes ou une combinaison des deux (Blanchard, 2000), plus stables que la liaison électrostatique.

La précipitation est définie comme le passage à l'état solide des solutés d'une solution. Les ETM précipitent principalement sous la forme d'hydroxydes, de carbonates et, en milieu très réducteur, de sulfures. Pour les cations métalliques, des pH élevés favorisent leur précipitation, car la concentration en solution des ions d'hydroxyde ou de carbonate augmente avec le pH. Les ETM peuvent aussi co-précipiter. La co-précipitation est définie comme la précipitation simultanée d'un élément chimique (Zn, Pb, Cu, Ni, Cd) conjointement avec d'autres éléments tels que des oxydes de fer, de manganèse et des phyllosilicates (Alloway, 1995; Sposito, 1989).

Les ETM peuvent se complexer avec des atomes d'oxygène par des liaisons covalentes, ou avec des groupements hydroxylés de la surface par des liaisons hydrogène. De plus, les cations métalliques, ainsi que les oxyanions tel que AsO_4^{3-} et du Sb peuvent former des complexes avec différents ligands organiques et inorganiques présents dans la phase aqueuse du milieu (Evans, 1989). La matière organique contenant beaucoup de groupements réactifs (OH, COOH, C=O, SH), elle est très réactive vis-à-vis des ions métalliques, et complexes facilement par une réaction d'échange entre le H^+ du groupe fonctionnel et les ions métalliques en solution (McBride, 1994).

2.2.3.2.2. Devenir des ATB en mélange avec les ETM

Les quelques études portant sur le devenir des antibiotiques dans le sol en combinaison avec des métaux, montrent que la présence des métaux peut modifier le devenir des antibiotiques et en particulier leur adsorption. Les effets varient en fonction de la concentration, de la spéciation et de la nature des ETM.

Lorsque les éléments traces métalliques sont sous forme cationique dans la solution du sol, ils peuvent entrer en compétition avec les antibiotiques chargés positivement pour les sites d'adsorption du sol. Les métaux sous forme cationique peuvent également jouer le rôle de pont entre les constituants du sol et les antibiotiques chargés négativement, augmentant alors leur adsorption par la formation de complexes ATB-ETM-constituants du sol. Dans certains cas, ce sont les ATB qui jouent le rôle de ponts entre les métaux et les constituants du sol : ETM-ATB-constituants sol. La formation des ponts dépend du pH, de la spéciation des antibiotiques et des ETM, et du type de minéraux argileux prédominant.

Morel et al. (2014) ont montré par exemple que si l'adsorption du sulfaméthoxazole sur les constituants du sol à pH 6 était faible du fait de sa forme anionique, elle augmentait d'un facteur 6 en présence de cuivre du fait de la formation de complexes ternaires SMX-Cu-Sol. Des résultats similaires ont été observés par Wang et al. (2008) pour la tétracycline (TC) ($pK_a = 3.3 ; 7.49 ; 9.88$), en présence de Cu^{2+} sur une large gamme de pH d'un sol. Mais à des pH < 6.5, le complexe Cu-TC prend une forme neutre. L'affinité des minéraux argileux de type montmorillonite pour le Cu devient alors inférieure à celle pour la TC, qui est sous forme zwitterionique. C'est alors la tétracycline qui augmente l'adsorption du cuivre en jouant le rôle de pont entre le Cu et l'argile. De même, selon l'étude de Pan et al. (2012), le cuivre augmente les interactions entre l'ofloxacin OFL et la matière organique dissoute MOD par la formation de complexes MOD-Cu-OFL et MOD-OFL-Cu.

Pei et al. (2014) ont montré que le cuivre limitait l'adsorption de sulfathiazole (STZ) à des pH de sol < 5.0 à cause de compétitions électrostatiques entre Cu^{2+} et STZ^+ au niveau des sites d'adsorption d'une tourbe et d'un sol à 6,9% de MO alors qu'il stimulait son adsorption à des pH > 5.0 à cause de la formation de complexes STZ-Cu-surface. Au contraire, l'ajout d'aluminium diminuait l'adsorption de STZ à pH < 6.0 et exerçait un faible effet sur l'adsorption de STZ à pH > 6.0 sans doute parce que STZ ne complexe pas Al^{3+} au contraire de Cu^{2+} . Le cuivre et l'aluminium inhibent l'adsorption de la tylosine sur les constituants du sol sur la gamme entière de pH, ce que Pei et al. (2014) attribuent à trois raisons : 1) les compétitions électrostatiques entre le cuivre ou l'aluminium et la forme cationique de la tylosine pour des pH < 6.2) l'adsorption de Cu ou Al qui diminue la charge négative de la surface des sols, et réduit l'accessibilité des sites de fixation sur la MO du sol ou de la tourbe, 3) la grande taille des molécules de tylosine qui retarde leur diffusion dans les petits pores des sols, comblés plus facilement par les ions métalliques.

La force de complexation des cations métalliques avec les constituants du sol varie également avec la nature de l'ETM dans l'ordre décroissant suivant, d'après Manceau et Matynia (2010) : $Cu > Zn > Cd > Mn > Pb > Mg > Ca$. Plus l'agent complexant est fort, plus il recouvre en priorité les sites de fixation, empêchant généralement l'adsorption des antibiotiques de charge identique, ou à l'inverse favorisant l'adsorption des antibiotiques de charge opposée lorsqu'un complexe entre le cation et l'antibiotique est susceptible de se former.

Dans l'étude de Graouer-Bacart et al. (2013), la présence de cuivre augmente de 35% l'adsorption sur le sol d'enrofloxacin (ENR), une fluoroquinolone, dans des gammes de pH comprises entre 6 et 10 de par la formation de complexes ternaires ENR-Cu²⁺-surface, le Cu²⁺ jouant le rôle de pont entre l'ENR et les sites de fixation des surfaces du sol. En revanche, le zinc n'augmente que faiblement l'adsorption de l'ENR à des pH compris entre 7 et 10 (Graouer-Bacart et al., 2015), ce qui est attribuable à la faible proportion de complexes ENR-Zn²⁺ formée. Le cuivre possède une capacité généralement plus élevée que le zinc à former des complexes, que ce soit avec les sites réactifs des sols ou avec nombre de molécules organiques comme les antibiotiques, ce qui entraîne une augmentation plus importante de l'adsorption de l'enrofloxacin en présence de Cu²⁺ que de Zn²⁺. Dans les travaux de Pei et al. (2014), la présence de Cu²⁺ augmente l'adsorption de STZ à pH > 5 contrairement à Al³⁺. De même, le cuivre favorise les interactions entre l'enrofloxacin (OFL) et la matière organique dissoute MOD, alors que le magnésium Mg diminue les liaisons MOD-OFL, car le Mg entre en compétition avec l'OFL sur les sites de fixation avec la MOD, limitant son adsorption, alors que le Cu se complexe avec l'OFL via des liaisons hydrogène et des interactions ioniques au niveau des atomes d'oxygène de l'antibiotique (Pan et al., 2012).

2.3. Effets des antibiotiques sur les communautés microbiennes du sol

Les microorganismes (bactéries, champignons, archées, protozoaires, virus), sont majoritairement concentrés dans les horizons superficiels du sol, car leur distribution dans le sol est pour bon nombre d'entre eux, conditionnée au moins en partie, par la distribution du C organique.

Les bactéries sont les plus nombreuses dans le sol (10^6 - 10^9 UFC/g sol), suivies des champignons (10^4 - 10^6 UFC/g sol). Mais de par leur structure mycélienne, les champignons représentent une biomasse microbienne plus importante que les bactéries (500-5 000 kg/ha sol contre 300-3 000 kg/ha pour les bactéries). Les protozoaires (10^4 à 10^5 /g de sol) représentent une biomasse moins importante comparée à celle des bactéries et champignons.

Les microorganismes du sol jouent un rôle clef dans la qualité des sols du fait de leur importante diversité à différents niveaux (genres, espèces), et des nombreuses fonctions qu'ils assurent. Les fonctions peuvent être relativement globales, c'est-à-dire assurées par une grande diversité de microorganismes, comme les activités enzymatiques ou la respiration du sol. Une grande diversité de microorganismes capables d'assurer une même fonction confère au sol une forte résistance et résilience aux stress. D'autres fonctions comme la nitrification peuvent être plus spécifiques et réalisées par un nombre restreint de microorganismes. Dans ce cas la redondance et la complémentarité fonctionnelle étant plus faibles, la résilience et la résistance le sont aussi.

Les antibiotiques, en fonction de leurs mécanismes et spectres d'action plus ou moins larges, (voir section 2.1.5) peuvent affecter de manière plus ou moins sélective l'abondance, la diversité et les activités des microorganismes du sol. Ces effets peuvent être transitoires ou plus durables selon l'exposition des microorganismes à des concentrations plus ou moins fortes en ATB et sur des durées plus ou moins longues. On distingue alors la « toxicité aigüe » de la « toxicité chronique ». Les fonctions globales ou spécifiques peuvent être affectées d'une manière directe sur l'abondance microbienne (toxicité), ou d'une manière indirecte sur la structure des communautés (Brandt et al., 2015). C'est pourquoi l'étude des effets des contaminants s'effectue généralement sur l'abondance, la diversité, la structure et les activités des communautés microbiennes.

2.3.1. Abondance ou biomasse

L'effet des antibiotiques sur les bactéries du sol dépend de leur mode d'action qui peut être bactéricide ou bactériostatique. Les antibiotiques bactéricides (comme les fluoroquinolones) entraînent la mort des bactéries alors que les antibiotiques bactériostatiques (comme les sulfonamides), empêchent la croissance des populations microbiennes tout en maintenant leurs fonctions. Donc selon les cas, on peut s'attendre avec les ATB à une diminution de l'abondance microbienne ou à l'inhibition de leur croissance. Demoling et al. (2009) ont par exemple observé que le sulfaméthoxazole (sulfonamide) (20 à 500 mg.kg⁻¹) inhibait la croissance bactérienne.

Toutefois, un stress provoqué par la présence des antibiotiques peut être suivi d'une augmentation de la biomasse microbienne. Dans l'étude de Kotzerke et al. (2011b), la biomasse microbienne augmente dans un sol traité à la difloxacin (fluoroquinolone) le premier jour d'incubation aux concentrations 1 , 10 et 100 mg.kg⁻¹, et le 8^{ème} jour à la

concentration 1 mg.kg^{-1} . Cet effet n'est plus observable le 32^{ème} jour. L'augmentation de la biomasse microbienne en début d'incubation peut être due à l'utilisation par certains microbes de la difloxacin comme source de C avant qu'elle soit indisponible du fait de sa rapide et forte adsorption au sol, ou plus probablement à la consommation par des microorganismes résistants de la biomasse qui est morte sous l'effet bactéricide de l'antibiotique.

Par ailleurs, les effets des ATB sur les microorganismes du sol peuvent être plus spécifiques. Dans l'étude de Thiele-Bruhn et Beck (2005), l'application de sulfapyridine (sulfonamide) ($1000 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) diminue la biomasse microbienne sans affecter la biomasse fongique, alors que l'oxytétracycline (tétracycline) ($100, 1000 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) augmente la biomasse fongique sans affecter la biomasse bactérienne. Kumar et al. (2005) indiquent que la tylosine (5 mg.kg^{-1}) inhibe la croissance des bactéries *Azobacter chroococcum*.

2.3.2. Diversité et structure

La diversité des communautés microbiennes telluriques peut être caractérisée par différentes approches permettant l'analyse de la structure des communautés, c'est-à-dire l'assemblage de différentes populations au sein de la communauté.

L'impact des apports d'ATB sur la biodiversité peut être appréhendée de manière très globale via les effets sur le ratio champignons/bactéries (Thiele-Bruhn, 2005 ; Hammesfahr et al., 2008 ; Demoling et al., 2009 ; Yang et al., 2009). De manière générale, des apports d'ATB favorisent le développement des champignons au détriment des bactéries. Ce résultat a été observé avec des sulfonamides tels que la sulfadiazine (Hammesfahr et al., 2008), la sulfapyridine (Thiele-Bruhn et Beck, 2005) et le sulfaméthoxazole (Demoling et al., 2009 ; Molaei et al., 2017) ou des fluoroquinolones comme la ciprofloxacine (Thiele-Bruhn, 2005 ; Rousk et al., 2008). La stimulation des champignons suite à un traitement bactéricide comme les fluoroquinolones s'expliquerait par l'augmentation de la biodisponibilité du C provenant de la mort des bactéries (Molaei et al., 2017).

Les effets sur la biodiversité bactérienne ont également été étudiés en considérant les bactéries Gram positives (G+) et Gram négatives (G-) qui réagissent différemment à un grand nombre d'antibiotiques à cause de la différence de structure membranaire. Par exemple, la sulfadiazine, antibiotique à large spectre, affecte autant les bactéries G+ que G- (Hammesfahr et al., 2008), tandis que la tétracycline diminue le ratio G+/G-, les bactéries G- étant plus résistantes à la tétracycline (Schnabel et Jones, 1999 ; Hund-Rinke et al., 2004).

La diversité bactérienne peut aussi être appréhendée par des méthodes moléculaires après extraction de l'ADN du sol et amplification par PCR (polymérase chain reaction) d'un fragment cible (Faugier, 2010). Différentes techniques permettent la caractérisation des fragments d'ADN cibles. La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et la TGGE (Temperature gradient Electrophoresis) permettent l'étude des communautés microbiennes, par obtention de séquences spécifiques de fragment d'ADN 16S, en les soumettant à un gradient de concentration d'un agent dénaturant ou à un gradient de température. La SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) permet de rendre compte de la diversité des gènes ribosomiques, en générant des profils de bandes d'ADN 16S spécifiques, suivant la mobilité des ADN dans un gel de polyacrylamide non dénaturant à partir d'amorces radioactives. La RFLP (restriction fragment length polymorphism), ou ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) permet l'étude des structures des communautés microbiennes, en obtenant des fragments d'ADN de longueurs différentes selon les

individus, après digestion enzymatique. La RISA (Ribosomal Interferic Spacer Analysis) ou ARISA (Automated Ribosomal Interferic Spacer Analysis) permet de différencier des espèces très proches, en obtenant une variabilité de taille et de séquences entre individus supérieurs à celle des gènes, par amplification de la région IGS (intergenic spacer), région comprise entre les sous unités ribosomales 16S et 23S, puis séparation des produits générés de différentes tailles avec un gel de polyacrylamide dénaturant (Faugier, 2010).

Le séquençage permet une analyse plus fine de la diversité des espèces composant les communautés microbiennes du sol. Il consiste à amplifier des séquences d'ADN afin d'identifier des espèces présentes au sein de la communauté (Nocker et al., 2007). Le séquençage de haut débit (pyroséquençage, SOLiD, illumina) permet d'obtenir plusieurs centaines de milliers de séquences d'ADN, à partir d'un seul échantillon extrait du sol. Cette méthode est à ce jour la plus puissante pour quantifier précisément et caractériser la diversité microbienne (Roesch et al., 2007 ; Fulthorpe et al., 2008).

La diversité des espèces microbiennes peut ensuite être caractérisée par des indices de diversité, comme les indices de Shannon (H') et d'équitabilité (E_H). Dans l'étude de Kong et al. (2006), l'oxytétracycline (OTC) ($11\mu\text{M}$) diminue l'indice de Shannon de 20% (H') et l'équitabilité, alors que, dans l'étude de Toth et al. (2011), une application de monensine ($25, 50$ et $100\ \mu\text{g.kg}^{-1}$) augmente la biodiversité (H') de 5%. Les raisons de cette augmentation ne sont pas claires, mais l'absence d'effets inhibiteurs pourrait être attribuée aux faibles concentrations utilisées.

Comme évoqué précédemment, la modification de la structure des populations microbiennes résulte d'une pression sélective des antibiotiques, soit sur des groupes de microorganismes (Mohamed et al., 2005) ou sur des espèces isolées (Moenne-Loccoz et al., 2001). La plupart du temps, ces effets sélectifs entraînent l'apparition ou la disparition de différentes espèces microbiennes (Binh et al., 2007 ; Mohamed et al., 2005 ; Zielezny et al., 2006 ; Hammesfahr et al., 2008). Ainsi, la structure des communautés, peut être modifiée alors que la taille et la diversité des populations microbiennes sont conservées, mais les espèces qui la composent sont différentes (Westergaard et al., 2001). Par ailleurs, les antibiotiques les plus étudiés sont les antibiotiques bactériostatiques, comme les sulfonamides, largement utilisés en médecine vétérinaire. Les changements de structure de communautés microbiennes des sols sous l'effet des antibiotiques bactéricides, comme les β -lactamines ou fluoroquinolones, sont beaucoup moins connus (Ding et He, 2010) alors qu'en médecine humaine, les antibiotiques β -lactamines et fluoroquinolones sont les plus fréquemment utilisés, comptant pour 50 à 70% de la totalité des antibiotiques utilisés (Kümmerer, 2009a).

2.3.3. Activités

Les ATB peuvent impacter des activités globales comme la minéralisation de C ou N. Divers antibiotiques, comme la ciprofloxacine (Naslund et al., 2008), la sulfadiazine (Zielezny et al., 2006 ; Kotzerke et al., 2008) et la tylosine (Müller et al., 2002) peuvent inhiber la respiration. A l'inverse, Patten et al. (1980) montrent que l'oxytétracycline et la chlorotétracycline stimulent la minéralisation du C, probablement en réaction au stress causé par la présence des antibiotiques, et/ou du fait du développement de bactéries résistantes. Dans l'étude de Kong et al. (2006), l'oxytétracycline ($1, 5, 11, 43, 109, 217\ \mu\text{M}$) diminuait l'utilisation par les microorganismes de 95 substrats répartis en six catégories (acides

aminés, carbohydrates, acides carboxyliques, polymères, amines, divers), avec une diminution allant jusqu'à 65% dès l'ajout de 1 μM .

Certains antibiotiques inhibent aussi des activités plus spécifiques, comme les activités enzymatiques (Liu et al., 2009), la réduction des sulfates (Sommer et Bibby, 2002), ou la réduction du fer (Thiele-Bruhn, 2005). Halling-Sørensen (2001) a montré que l'oxytétracycline, la chlorotétracycline, la tiamuline, et la streptomycine inhibaient la nitrification dans les sols. Des antibiotiques à spectre large comme les tétracyclines, les aminoglycosides et les sulfonamides inhibent les processus de nitrification, car ces antibiotiques agissent sur les bactéries Gram-négatives telles que les *Nitrosomonas* spp, bactéries responsables de la nitrification dans les sols (Halling-Sørensen, 2001). Dans l'étude de Ingham et Coleman (1984), l'application de streptomycine (1mg.g^{-1}), de la famille des aminoglycosides, augmente significativement la concentration en ammonium, supposant une diminution significative des populations bactériennes nitrifiantes, ou bien une ammonification de l'azote provenant de l'ATB, ou encore une stimulation de la minéralisation. Des antibiotiques à spectre court comme l'acide oxolinique, l'olaquinox et la tylosine stimulent les processus de nitrification, probablement en supprimant seulement certaines espèces bactériennes, permettant à d'autres espèces de se développer plus rapidement, comme les bactéries responsables de la nitrification (Kumar et al., 2005).

Malgré quelques travaux dans la littérature, les connaissances des effets des antibiotiques sur les fonctions écologiques du sol sont encore limitées (Ding et He, 2010).

2.3.4. Toxicité aigüe vs toxicité chronique

Dans le cas d'une toxicité aigüe, les effets des ATB peuvent être transitoires avec un retour à un état initial des activités microbienne voire de la diversité (Schauss et al., 2009a ; Ding et He, 2010 ; Kotzerke et al., 2011a ; Hammesfahr et al., 2011). Zielezny et al. (2006) ont montré que la diversité des microorganismes des sols diminuait significativement au début de l'expérience avec $1-10\text{ mg.kg}^{-1}$ de sulfadiazine avant de revenir à son niveau initial après 48 jours d'incubation. Cependant, la structure des communautés peut être différente (Westergaard et al., 2001), du fait de l'émergence de populations non sensibles (par exemple, les champignons ou les archées) ou tolérantes (Schauss et al., 2009a ; Ollivier et al., 2013 ; Jechalke et al., 2014).

Ces changements structurels n'induisent pas d'effet sur le fonctionnement du sol si les populations tolérantes ou résistantes sont fonctionnellement redondantes par rapport aux populations sensibles (Hammesfahr et al., 2011). Par exemple, la diminution des bactéries nitrifiantes après apport de sulfadiazine à des concentrations de $10-100\text{ mg.kg}^{-1}$ peut être compensée par l'augmentation d'archaea nitrifiantes (Schauss et al., 2009b).

Une toxicité chronique aux ATB conduit à une sélection préférentielle de bactéries ayant acquis une antibiorésistance (gènes de résistance) (Heuer et al., 2011), générant ainsi une tolérance communautaire acquise, spécifique de l'antibiotique. Plus la pression de sélection est forte, plus la tolérance est élevée (Ding et He, 2010 ; Brandt et al., 2015).

La présence et la dissémination de gènes de résistances dans le sol peut être amplifiée par l'épandage de PRO contaminés aux antibiotiques (Kumar et al., 2005). Heuer et al. (2007, 2011) ont montré en conditions de laboratoire, qu'un fumier traité à la sulfadiazine SDZ peut être à l'origine d'une augmentation de l'abondance de gènes de

résistance Sulf1 et Sulf2 dans les sols recevant ce fumier, en comparaison à un sol contrôle ou à un sol amendé avec un fumier non contaminé à la SDZ. Dans une autre étude, après application d'un fumier contenant de la pénicilline, tétracycline, ou streptomycine dans un sol de jardin, la résistance des microorganismes de ce sol a augmenté de 70% (Esiobu et al., 2002), sans doute par un transfert d'information génétique à des espèces bactériennes non cibles. Le transfert des gènes de résistances dans les différents compartiments de l'environnement représente un risque pour la santé humaine et animale (Wright, 2010).

Enfin, les microorganismes résistants aux ATB peuvent avoir la capacité de dégrader les ATB par métabolisme spécifique en les utilisant comme source d'énergie ou de nutriments (Topp et al., 2013).

La Figure 8 résume les effets possibles des antibiotiques sur la structure et les fonctions des communautés microbiennes du sol ainsi que sur la tolérance d'une communauté qui peut être vue comme une réponse à moyen ou long terme (d'après Brandt et al., 2015).

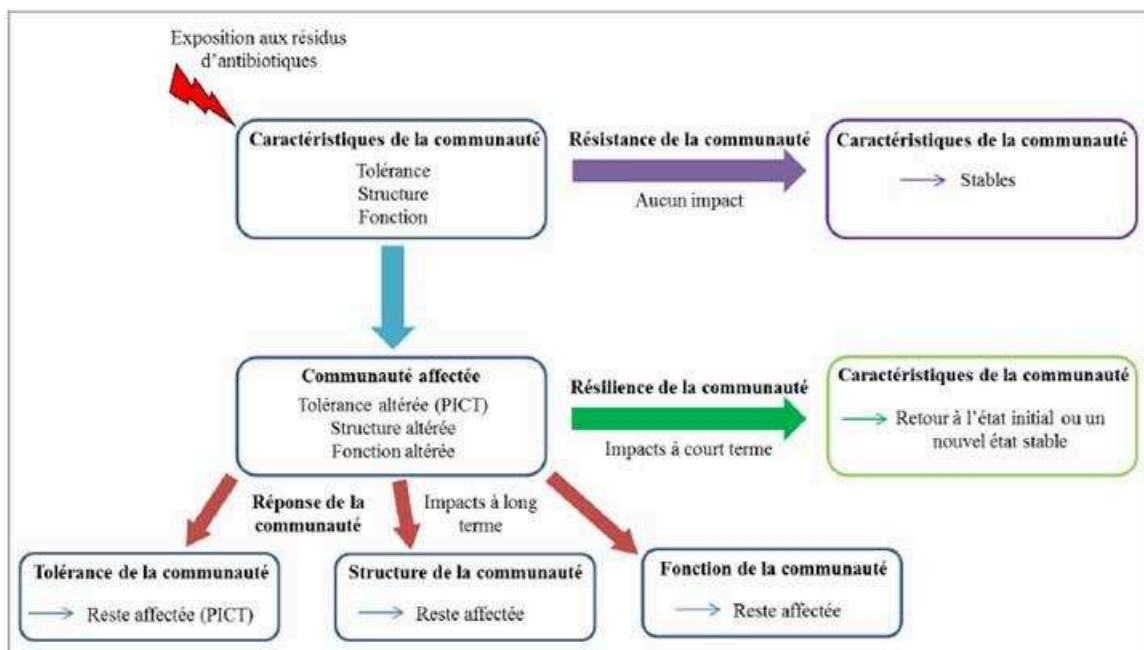


Figure 8 : Effets possibles des antibiotiques sur la structure et les fonctions des communautés microbiennes du sol ainsi que sur la tolérance d'une communauté qui peut être vue comme une réponse à moyen ou long terme (d'après Brandt et al., 2015).

2.3.5. Facteurs influant

Les effets des ATB sur les microorganismes du sol dépendent principalement des concentrations totales et biodisponibles des ATB et des durées d'exposition.

Une relation dose-réponse existe pour la plupart des antibiotiques étudiés et leurs effets sur les communautés microbiennes (Mohamed et al., 2005 ; Naslund et al., 2008 ; Brandt et al., 2009 ; Demoling et al., 2009). En général, les effets des antibiotiques augmentent avec les concentrations. Dans l'étude de Toth et al. (2011), la nitrification diminue avec l'augmentation des concentrations en sulfadiméthoxine jusqu'à l'inhibition complète aux plus fortes doses (0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Demoling et al. (2009) ont observé que le sulfaméthoxazole apporté à faible concentration (0, 0.1, 1 mg.kg^{-1})

n'impactait pas la biomasse microbienne. Mais lorsque le SMX était apporté à forte dose (20 mg.kg⁻¹ et 500 mg.kg⁻¹), il inhibait la croissance microbienne et impactait la structure des communautés avec des effets d'autant plus importants que la concentration était forte.

Toutefois, comme développé dans le chapitre précédent, le niveau d'exposition des microorganismes ne dépend pas des concentrations totales en antibiotiques des sols, mais plutôt de leur teneur biodisponible. Par exemple, apportée à une dose plus de mille fois supérieure (300 mg.kg⁻¹) à la concentration minimale d'inhibition, la sarafloxacin n'a pas d'effet sur ses bactéries cibles. Marengo et al. (1997) attribuent ce résultat à la forte adsorption de la sarafloxacin dans le sol.

Généralement, les effets des antibiotiques dans les sols diminuent au cours du temps du fait d'une diminution de leur teneur biodisponible. La dégradation des antibiotiques, leur adsorption ou la formation de résidus liés, conduisent à une réduction (Thiele-Bruhn, 2005 ; Córdova-Kreylos et Scow, 2007 ; Kotzerke et al., 2008) ou même à la disparition (Hund-Rinke et al., 2004) de la biodisponibilité des ATB et donc de leurs effets sur les communautés microbiennes.

Cependant, la dégradation des antibiotiques ne conduit pas nécessairement à leur désactivation. Les produits de dégradation ou métabolites des ATB peuvent également exercer des effets toxiques. Les métabolites de la tétracycline, chlortétracycline et de l'oxytétracycline peuvent avoir un impact sur les microorganismes du sol, avec un mode d'action différent de celui des molécules mères en étant bactéricides plutôt que bactériostatiques (Halling-Sørensen et al., 2002). Leurs effets toxiques peuvent être plus faibles (Halling-Sørensen et al., 2003) ou plus importants, comme par exemple dans le cas des métabolites de la sulfadiazine et du sulfaméthoxazole (Zhang et al., 2017). De plus, l'adsorption ne supprime pas non plus les effets de certains ATB sur les microorganismes. C'est le cas de la tétracycline et la tylosine dans l'étude de Chander et al. (2005), qui adsorbés sur deux sols de texture différente, maintiennent leur pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne.

Par ailleurs, les effets n'apparaissent pas toujours immédiatement après l'apport, mais après une certaine durée d'exposition aux ATB, alors que la fraction biodisponible a fortement diminué. Ainsi dans l'étude de Thiele-Bruhn et Beck (2005), la respiration induite par le substrat (SIR) n'est pas impactée 4h après application de 1 mg.kg⁻¹ de sulfapyridine et d'oxytétracycline dans deux types de sol, un sol sableux et un sol limoneux. Les effets apparaissent respectivement après 24 et 48 heures pour chaque sol. Ces deux résultats suggèrent, soit qu'une durée minimale est requise de temps de sortie de dormance des microorganismes, avant que les antibiotiques exercent leurs effets bactériostatiques, soit que les effets des antibiotiques ont été compensés par le développement d'organismes moins sensibles.

2.3.6. Effet des antibiotiques en mélange de contaminants

2.3.6.1. ATB+ATB

Les effets de cocktails d'antibiotiques sur les communautés microbiennes ont été principalement étudiés dans les eaux de surface (Halling-Sørensen et al., 1998 ; Christian et al., 2003 ; Liu et al., 2009), les sédiments (Bjorklund et al., 1991 ; Tang et al., 2009) et les boues (Liu et al., 2009 ; Watkinson et al., 2009). Par exemple, Christensen et al. (2006) ont mis en évidence un effet toxique synergique de la combinaison érythromycine et

oxytétracycline sur la croissance des microorganismes de boues activées, et des effets additifs de la combinaison de deux quinolones, la fluméquine et l'acide oxolinique.

Dans les sols, on s'attend également à ce que l'effet d'antibiotiques en mélange soit différent de leurs effets individuels. Durant une incubation de sol conduite sur 20 jours, Ma et al. (2014) ont étudié les effets d'apports combinés de tétracycline (TC), sulfamonométhoxine (SMM) et ciprofloxacine (CIP) sur la résistance microbienne, le cycle de l'azote, la respiration totale du sol et la diversité métabolique des microorganismes (réponse de la respiration à divers substrats de culture). L'augmentation du nombre de bactéries résistantes à chacun des ATB a été plus importante après l'application combinée des antibiotiques qu'après leur application seule, avec en particulier une prolifération de bactéries résistantes au SMM (+1123% de bactérie résistante au SMM 7 jour après l'apport combiné, par rapport au traitement avec SMM seul). Concernant le cycle de l'azote, ils ont observé une stimulation de la nitrification et une inhibition de la dénitrification dans les sols 20 jours après l'apport des antibiotiques en mélange ou de SMM seul, par rapport à un apport des antibiotiques TC et CIP seuls. Par ailleurs, la combinaison d'antibiotiques a diminué plus fortement et sur une plus longue durée la quantité de 6 gènes fonctionnels, connus pour jouer un rôle dans le cycle biochimique de l'azote. De plus, la respiration du sol a été stimulée après l'apport combiné d'antibiotiques ou du SMM seul, probablement en réponse des microorganismes au stress causé par les antibiotiques. La diversité métabolique apparaît particulièrement diminuée par le SMM et le traitement combiné, avec une synergie pour une partie des substrats utilisés.

Fang et al. (2014) observent aussi un effet sur les activités microbiennes des sols après un apport combiné de sulfadiazine (SDZ) et de chlortétracycline (CTC) dans un sol amendé par du fumier en conditions de laboratoire. La respiration du sol est inhibée en début d'incubation avec le traitement combiné, avant de rattraper et dépasser celle du sol contrôle et des traitements individuels. Ce résultat peut être attribué à un effet inhibiteur initial des antibiotiques sur les populations microbiennes sensibles, suivi par la formation et la prolifération de populations microbiennes tolérantes ou résistantes, menant à un changement dans la structure des communautés microbiennes. Les activités uréase et déhydrogénase ne sont pas affectées, sauf après le 5^{ème} apport (avec un intervalle de 60 jours entre deux apports) de CTC seul, ou en combinaison avec la sulfadiazine.

Ainsi l'apport combiné d'antibiotiques peut perturber la diversité comme les activités microbiennes du sol, mais pour des concentrations d'ATB en général largement supérieures (100 à 1000 fois) aux teneurs retrouvées dans l'environnement.

2.3.6.2. ATB+ETM

2.3.6.2.1. Effet des ETM dans le sol

Comme les antibiotiques, les métaux peuvent affecter les microorganismes à une échelle individuelle, avec des répercussions à l'échelle des communautés microbiennes.

A l'échelle de l'organisme, les ETM peuvent entraîner une altération du comportement d'une cellule par des effets biochimiques, avec des répercussions à l'échelle d'un organe ou d'un organisme entier à mesure de la bioaccumulation des ETM. Ces effets biochimiques se déroulent essentiellement à l'échelle moléculaire et génotoxique.

A l'échelle moléculaire, certains ETM sont essentiels au bon fonctionnement cellulaire des organismes. Mais en cas de bioaccumulation, les ETM en surplus qui entrent dans la cellule peuvent affecter son bon fonctionnement par divers mécanismes :

- En bloquant des groupements fonctionnels essentiels des biomolécules
- En déplaçant des métaux essentiels de leurs sites dans des biomolécules. Ce déplacement est possible car la liaison des ETM avec les molécules organiques sont des réactions de complexation et non des liaisons covalentes (Pelletier et al., 2004). Le nouvel ETM impliqué dans la liaison devient alors toxique s'il est inapproprié pour le fonctionnement de la molécule (Mason et al., 1995).
- En modifiant la conformation (et donc l'activité) des biomolécules.

A l'échelle des gènes, les ETM peuvent causer une perte d'information génétique sur l'ADN, induisant une production de protéines incapables d'assurer leurs fonctions biochimiques.

A l'échelle des populations, comme les antibiotiques, la toxicité des ETM peut être aiguë ou chronique, avec des réponses similaires de la communauté microbienne (retour à un état initial des communautés en cas de toxicité aiguë, ou développement de résistance microbienne en cas de toxicité chronique).

Par ailleurs, comme pour les antibiotiques, l'impact des ETM sur le fonctionnement du sol dépend de la nature des espèces affectées de la communauté, et de la capacité des espèces restantes à compenser ces fonctions.

2.3.6.2.2. Effet des ATB en mélange avec les ETM

Des apports combinés d'antibiotiques et d'éléments traces métalliques peuvent modifier leur toxicité et exercer des effets différents par rapport à des apports sous forme séparée sur l'abondance, la structure et les activités des communautés microbiennes.

Les travaux de Xu et al. (2016) montrent que l'apport combiné de sulfadiazine (SDZ) (10 mg.kg^{-1} et 100 mg.kg^{-1}) et de cuivre (20 mg.kg^{-1} et 200 mg.kg^{-1}) diminue la concentration d'acides gras phospholipides totaux, indicateurs d'abondance microbienne et le ratio bactéries/champignons par rapport au sol contrôle. Cependant ces effets sont inférieurs à la somme des effets individuels de la sulfadiazine et du cuivre, laissant présager des effets antagonistes lorsqu'ils sont apportés en mélange. De même, l'addition de sulfaméthoxazole (0, 5, 25, 50, 100 mg.kg^{-1}), seul ou en combinaison avec du zinc (500 mg.kg^{-1}), diminue la biomasse microbienne du sol, mais les effets négatifs sur la biomasse microbienne du sol avec le traitement combiné ne sont pas aussi importants que les effets du traitement SMX seul (Aiju et al., 2014). A l'inverse, Lu et al. (2013) ont montré que l'effet biocide d'une application combinée de Cd et de pyrène était significativement plus important que celui d'une application de Cd ou pyrène seuls. L'effet était cette fois-ci synergique (supérieur à la somme des effets individuels des contaminants).

Des mélanges d'ATB et de métaux peuvent également impacter la structure des communautés microbiennes en révélant des interactions entre les contaminants, comme cela a été montré avec la sulfadiazine et le Cu, les effets étant antagonistes les 7 premiers jours, puis additifs (équivalents à la somme des effets individuels des contaminants) et synergiques (supérieurs à la somme des effets individuels des contaminants) jusqu'au 28^{ème} jour d'incubation (Xu et al., 2016).

Les activités microbiennes peuvent également être affectées par les mélanges ATB + ETM. Xu et al. (2016) ont observé une diminution significative des activités microbiennes d'hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA), de la déshydrogénase (DHA) et de la respiration basale à la suite d'un apport combiné de cuivre et sulfadiazine durant les 28 jours d'incubation. Comme pour les impacts sur la structure, les effets sont antagonistes les 7

premiers jours, puis additifs ou synergiques. De même dans l'étude de Kong et al. (2006), la combinaison d'oxytétracycline et de Cu réduit la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes plus nettement que les apports simples, avec un effet synergique des deux polluants. Dans l'étude de Aiju et al. (2014), l'activité déshydrogénase (DHA) et la nitrification sont davantage inhibées sous le traitement combiné de sulfaméthoxazole et de zinc que sous le traitement seul. Cependant, comme pour la biomasse microbienne, l'activité uréase diminue sous le traitement combiné SMX+Zn, mais moins fortement que sous le traitement SMX seul.

Ainsi, ces quelques études montrent que les antibiotiques exercent des effets différents lorsqu'ils sont apportés en mélange avec des métaux et lorsqu'ils sont apportés seuls. Cependant, les effets des mélanges sur les microorganismes du sol et leurs activités peuvent révéler des interactions très diverses avec des effets antagonistes, additifs ou synergiques. La nature des contaminants, leur mode d'action, leurs concentrations ainsi que leurs propriétés physico-chimiques et celles du milieu, sont autant de facteurs pouvant générer ces différents résultats.

Les mécanismes explicatifs les plus étudiés à ce jour sont essentiellement la complexation ATB-ETM et l'induction par les métaux de résistances bactériennes aux antibiotiques.

Les antibiotiques ont une grande capacité à se complexer avec les cations métalliques, notamment avec Cu^{2+} et Zn^{2+} . Plusieurs antibiotiques sont connus pour se lier au Zn, incluant les aminoglycosides, les tétracyclines, les macrolides, les quinolones et une variété de β -lactames. Des liaisons avec le cuivre ont aussi été mises en évidence avec les tétracyclines, le chloramphénicol, la novobiocine, les macrolides, les isoniazides, les quinolones, les vancomycines et une variété de β -lactamines incluant les céphalosporines et les pénicillines (Poole, 2017). C'est principalement cette capacité de complexation qui pourrait influencer sur les effets des antibiotiques sur les microorganismes du sol et leurs activités. Elle peut diminuer voire inhiber les impacts des antibiotiques, soit en les inactivant, soit en réduisant leur activité, en limitant leur biodisponibilité.

Cependant, la complexation peut aussi favoriser l'expression de la toxicité du métal, si l'antibiotique est utilisé comme vecteur intracellulaire. Ainsi une fois dans la cellule, le métal peut exercer son activité toxique, soit sous forme complexée, soit après s'être dissocié de l'antibiotique. De même, la complexation avec les métaux peut aussi permettre aux antibiotiques de franchir les membranes de bactéries résistantes aux antibiotiques, comme observé pour les fluoroquinolones (Uivarosi 2013). Enfin, les interactions ATB+ETM peuvent se produire une fois les deux éléments dans la cellule microbienne (Poole, 2017).

Les études sur l'effet des antibiotiques en interaction avec les métaux dans les sols agricoles ont aussi porté sur les résistances bactériennes aux antibiotiques induites par la présence de métaux (Wales et Davies, 2015). En effet, le développement de résistances aux métaux souvent accroît les résistances bactériennes aux antibiotiques (Baker-Austin et al., 2006) en exerçant une pression de co-sélection (Hölzel et al., 2012). L'exposition de bactéries *in vitro* ou dans des organismes hôtes à des éléments comme Hg ou Cu induit des résistances qui s'étendent aux ATB (Hasman & Aarestrup, 2005). Des corrélations entre expositions aux ETM et résistances aux ATB ont également été observées dans l'environnement, notamment dans les sols (Huysman et al., 1994 ; Berg et al., 2010).

2.4. Questions de recherche et démarche expérimentale

Alors que les études sur le devenir et les impacts des antibiotiques apportés seuls au sol se sont multipliées ces dernières années, le présent état de l'art confirme le manque de connaissances relatives au devenir et aux impacts dans les sols agricoles des cocktails d'antibiotiques (ATB + ATB) et des mélanges d'antibiotiques et de métaux (ATB + ETM), et relève que les travaux décrits dans la littérature présentent des résultats contrastés. De plus, les concentrations en antibiotiques testées dans les mélanges ATB + ATB ou ATB + ETM sont en général très fortes, 100 à 1000 fois supérieures aux doses environnementales. Enfin, très peu d'études ont étudié en parallèle le devenir et les effets des ATB apportés seuls ou en mélange.

A partir de ce constat, cette étude vise à mieux comprendre le devenir des antibiotiques et leurs impacts sur les microorganismes du sol et leurs activités de dégradation (ATB, C, N), apportés seuls ou en mélange (ATB + ATB ou ATB + ETM).

Pour ce faire, trois antibiotiques et deux métaux ont été étudiés, dans trois sols, différant par leurs historiques d'amendements.

Les antibiotiques sélectionnés sont :

- i) Deux antibiotiques de la famille des sulfonamides : la molécule mère sulfaméthoxazole (SMX), et son principal métabolite acétylé (N-ac-SMX).
- ii) Un antibiotique de la famille des fluoroquinolones : la ciprofloxacine (CIP).

Le SMX et la CIP ont été choisis car ils sont couramment retrouvés dans les boues de STEP et/ou les fumiers (Lindberg et al, 2005 pour SMX ; Topp et al., 2008 pour CIP) et du fait d'un comportement contrasté dans les sols.

La CIP, active contre un large spectre de bactéries Gram- et Gram+ (Davis et al., 1996), est la fluoroquinolone la plus prescrite (Pico et Andreu, 2007). Elle est fréquemment retrouvée dans l'environnement et il a été montré qu'elle avait des effets génotoxiques (Kümmerer et al., 2000). Elle est également le premier métabolite de l'enrofloxacin, une fluoroquinolone à usage vétérinaire (Pico et Andreu, 2007). Golet et al. (2003) ont montré que 45 à 62% de la CIP administrée à l'homme était excrétée sous forme non métabolisée dans les urines et 15 à 25% via les fèces. Dans les sols, des concentrations en CIP de 0,37 à 0,40 mg.kg⁻¹ ont été mesurées (Golet et al., 2002 ; Martinez-Carballo, 2007). La CIP est peu biodégradable (Kümmerer et al., 2000 ; Girardi et al., 2011). Elle s'adsorbe fortement sur les constituants du sol (Strauss et al., 2011).

Le SMX, utilisé à la fois en médecine humaine et vétérinaire, est en revanche beaucoup plus mobile (Strauss et al., 2011). Sa dégradation est faible (Lindberg et al., 2005) même si Liu et al. (2009) ont montré que le sulfaméthoxazole était principalement dégradé par voie biotique, la dégradation abiotique étant négligeable.

Enfin, les études sur le devenir et les effets des ATB se focalisent essentiellement sur les molécules mères, alors que les ATB peuvent arriver au sol sous forme de métabolites, après dégradation dans les organismes humains ou animaux, ou par biodégradation dans les PRO sous l'action des microorganismes. C'est pourquoi le devenir du principal métabolite du SMX, sa forme acétylée N-ac-SMX, a aussi été étudié. Il peut représenter 50% de la dose administrée de SMX excrétée (Göbel et al., 2005).

Les éléments traces métalliques sélectionnés sont : le cuivre (Cu) et le zinc (Zn). Ce sont les métaux dont les teneurs dans les sols sont les plus couramment accrues par des amendements de PRO. De plus Cu est (avec Hg) le métal le plus souvent cité pour ses effets sur le développement de bactéries multi-résistantes, en particulier dans des études concernant les sols contaminés par des biocides ou via des effluents d'élevage. Ces 2 ETM dans des sols modérément contaminés, peuvent perturber la diversité et les activités de la microflore tellurique (Chander et Brookes, 1993 ; Lock et Jansen, 2005). Enfin Chaudri et al. (2000) ont démontré que le Zn apporté dans des boues provoquait des effets sur les bactéries plus rapidement que le Cu. Cette différence a certainement à voir avec des propriétés chimiques distinguant les deux métaux : Zn en solution est sous forme de cation libre en proportion beaucoup plus élevée que Cu dans les solutions de sols et les eaux naturelles. Le choix de ces deux ETM est donc pertinent par rapport aux enjeux du recyclage agricole de PRO, des effets écotoxiques et des interactions potentielles avec le devenir des ATB, et, du point de vue scientifique, de la prise en compte de deux métaux intrinsèquement différents.

De plus, le présent travail tient compte de l'influence potentielle de l'historique d'amendement des sols agricoles sur le devenir et les impacts des antibiotiques. En effet, un apport régulier de PRO modifie à long terme la structure, les propriétés physico-chimiques, ainsi que la biologie des sols (Li et al., 2015). L'apport de PRO peut jouer un rôle majeur dans la dégradation, la rétention et le transport de polluants organiques (Briceno et al., 2007 ; Vieublé Gonod et al., 2009). Concernant les ATB, les résultats sont parfois contradictoires. Par exemple, Accinelli et al. (2007) ou Zhang et al. (2017) montrent une stimulation de la biodégradation des ATB après l'addition de PRO, tandis que Li et al. (2015) montrent une augmentation de leur adsorption, et une diminution de leur minéralisation. Cependant ces études ont été réalisées en conditions de laboratoire avec un seul apport de PRO dans les sols. En conséquence elles ne prennent pas en compte les effets à long terme des apports répétés des PRO sur les propriétés des sols agricoles, et leurs effets indirects sur le devenir des ATB. Ainsi trois sols ont été retenus dans notre étude : un sol qui n'a jamais reçu de PRO (sol témoin), et deux sols amendés tous les deux ans depuis 1998, l'un par un compost de déchets verts et boues de station d'épuration, l'autre par du fumier.

Plus spécifiquement, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Quel est l'impact sur le devenir des ATB :
 - De la nature de l'antibiotique en considérant des ATB présentant des comportements contrastés dans les sols ?
 - De la forme arrivant au sol : molécule mère ou métabolite ?
 - D'apports répétés de PRO dans un sol ?
 - De la nature du PRO appliqué régulièrement (MO plus ou moins stable) ?
 - Des apports seuls ou en mélanges (ATB + ATB ou ATB + ETM) ?
 - De la concentration en ETM ?
- Quel est l'impact des ATB sur les microorganismes du sol et leurs activités ?
 - Des antibiotiques présentant des comportements contrastés dans les sols ?
 - Des apports seuls ou en mélanges (ATB + ATB ou ATB + ETM) ?
 - De la concentration en ETM ?

Les hypothèses principales à vérifier dans le cadre de ce travail sont :

- (1) Les épandages réguliers de PRO apportent des ATB et des métaux en quantités faibles mais susceptibles à long terme d'affecter la microflore du sol et de faire apparaître des microorganismes capables de dégrader les ATB (Topp et al., 2013).
- (2) Le devenir des antibiotiques et de leurs métabolites dans les sols est dépendant de leurs propriétés, les ATB qui s'adsorbent fortement sur les constituants du sol étant moins minéralisés et moins toxiques pour les microorganismes du sol.
- (3) Le devenir et les effets des ATB sont impactés par la présence d'autres contaminants lorsqu'ils sont apportés en mélange par rapport à des apports seuls.

Pour répondre à ces questions, des expérimentations en microcosmes en conditions de laboratoire ont été mises en place. En effet, les microcosmes, même s'ils représentent des systèmes simplifiés par rapport au terrain, permettent, contrairement aux systèmes réels, de : i) faire varier les différents paramètres étudiés en contrôlant certains paramètres tels que la température d'incubation, la teneur en eau des sols... ; ii) multiplier les réplicas ; iii) maîtriser l'augmentation de la complexité du système, afin de, in fine, le rendre plus représentatif d'un système réel.

Le devenir des ATB dans les sols a été suivi avec des molécules marquées au ^{14}C . Nous avons quantifié au cours du temps, la répartition de la radioactivité issue des ATB dans des fractions :

- i) minéralisées ;
- ii) facilement extractibles ;
- iii) difficilement extractibles ;
- iv) non extractibles.

Ce qui a permis de réaliser des bilans. Ces fractions correspondent respectivement au devenir des antibiotiques dans :

- i) la phase gazeuse du sol ;
- ii) la phase liquide où les antibiotiques sont biodisponibles, ainsi que faiblement adsorbés et facilement désorbables ;
- iii) la phase solide où les antibiotiques sont fortement adsorbés et difficilement désorbables ;
- iv) la phase solide où les antibiotiques sont considérés comme résidus liés.

En outre, nous avons cherché à qualifier la radioactivité dans les fractions extractibles pour obtenir des informations sur la nature des molécules marquées (ATB ou métabolites). La Figure 9 ci-dessous illustre les différentes fractions de ^{14}C ciblées.

Des incubations similaires ont été réalisées en parallèle avec des ATB non marqués (^{12}C) pour le suivi des effets des ATB sur les microorganismes du sol et la disponibilité des ETM, avec des mesures de biomasse microbienne, de biomasse fongique, de minéralisation du carbone et de l'azote, et des teneurs disponibles en métaux (extractions chimiques), les appareils permettant ces différentes analyses n'étant pas conçus pour recevoir du ^{14}C .

Les incubations ont été suivies pendant 6 mois et les différentes variables (devenir des ATB, ETM extractibles, microflore totale, microflore fongique, minéralisation de C et N) ont été analysées au cours du temps.

Le devenir et les effets des antibiotiques en mélange de contaminant ont été comparés à ceux des antibiotiques apportés seuls dans les sols. Ainsi le manuscrit est organisé en 8 chapitres. Après l'introduction générale, l'état de l'art, et la description du matériel et méthodes communs aux différentes expérimentations, l'étude a été conduite en quatre étapes, correspondant aux 4 chapitres suivants du mémoire (Figure 9) :

- Devenir des antibiotiques apportés seuls dans les sols ;
- Effet des antibiotiques apportés seuls au sol ;
- Devenir des antibiotiques apportés en mélange de contaminants ;
- Effet des antibiotiques apportés en mélange de contaminants.

Ce rapport se termine par une conclusion et les perspectives qui peuvent être envisagées à la suite de ce travail.

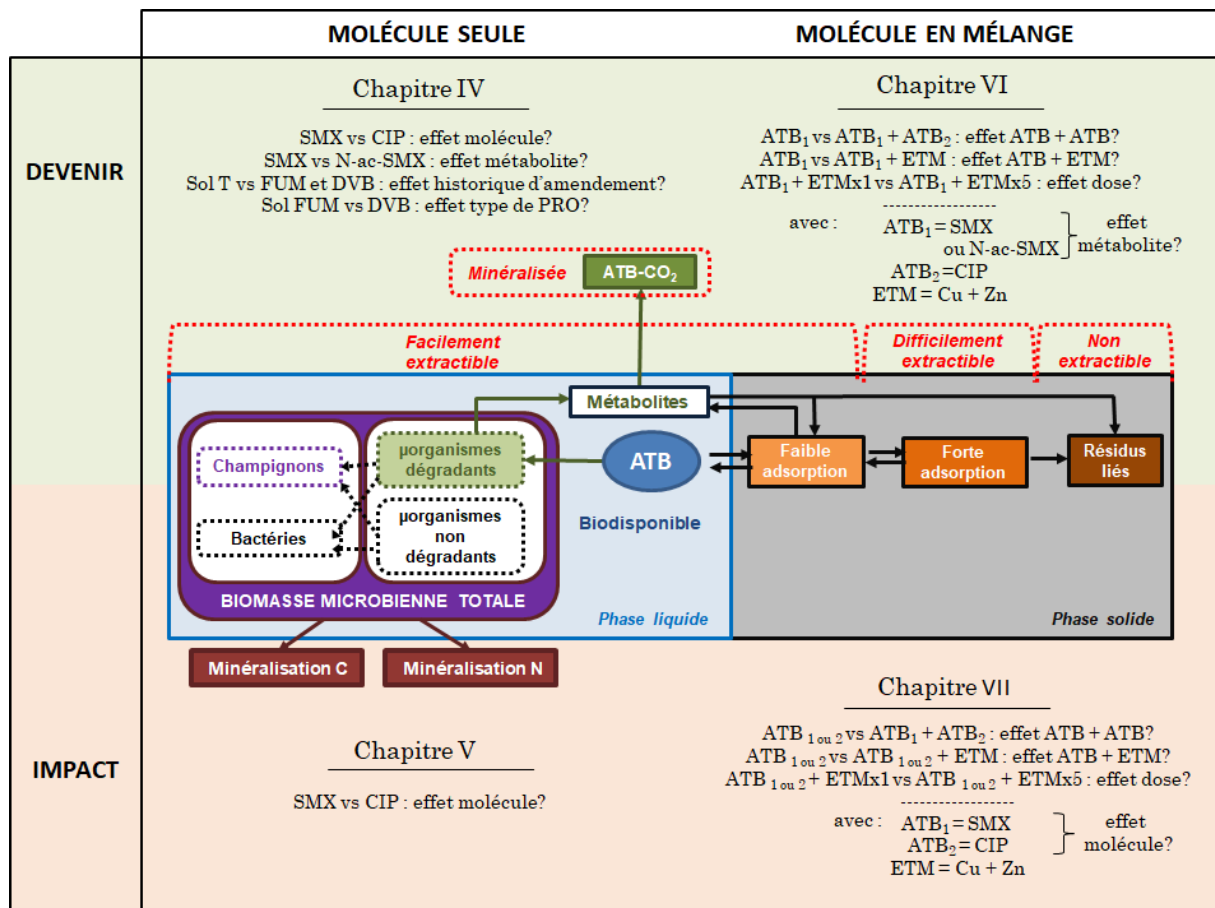


Figure 9 : Résumé des chapitres, en lien avec le devenir des antibiotiques dans les différentes fractions (minéralisées, facilement, difficilement et non extractibles), et leurs effets sur les microorganismes du sol (biomasse microbienne totale et fongique) et leurs activités (minéralisation de C et N), lorsque les antibiotiques sont apportés seuls ou en mélange de contaminants (ATB + ATB et ATB + ETM).

III : MATERIEL ET METHODES

3. MATERIEL ET METHODES

3.1 Site de prélèvement et conditionnement des échantillons de sol

Les échantillons de sol utilisés au cours de cette étude ont été prélevés dans un sol agricole Luvisol Glossic (argiles 14%, limons 79%, sables 7%), d'une profondeur supérieure à 1.2m. Ce sol provient d'un dispositif expérimental, le site « Qualiagro », situé en France dans les Yvelines, entre les communes de Feucherolles et d'Orgeval sur le plateau des Alluets-le-Roi (Figure 10). Ce dispositif a été mis en place en 1998 (collaboration INRA-VEOLIA Environnement) dans le but de mieux comprendre l'impact à long terme de la valorisation agricole de Produits Résiduaire Organiques (**PRO**) sur la qualité des sols, des eaux et des cultures. Les PRO testés sont le fumier d'une ferme d'élevage laitier (parcelle **FUM**), un compost d'ordures ménagères et résiduelles (parcelle **OMR**), un compost de la fraction fermentescible d'ordures ménagères ou biodéchets (parcelle **FFOM**) et un compost de déchets verts et de boues de station d'épuration (parcelle **DVB**). Les sols sont amendés tous les 2 ans avec les PRO à raison de 4t C/ha et sont comparés à un sol témoin (**T**) n'ayant jamais reçu de PRO. L'apport de PRO est combiné à deux niveaux de fertilisation azotée (un apport optimal et un apport minimal). Toutes les parcelles sont cultivées selon une rotation biennale blé-maïs.

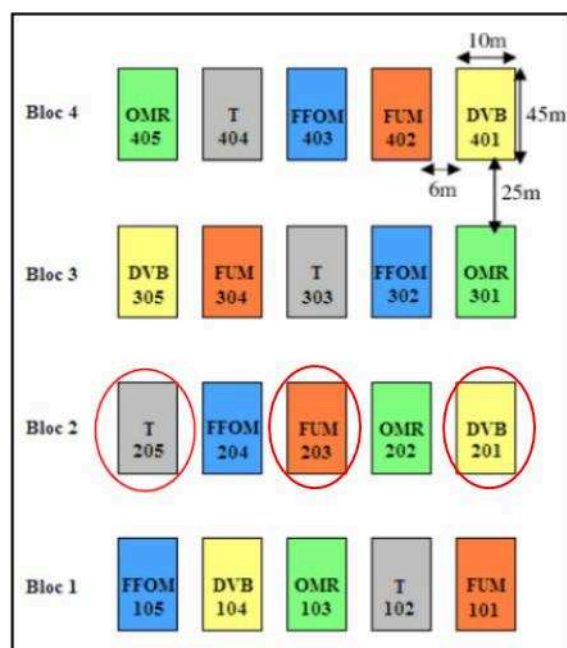


Figure 10 : Schéma du dispositif expérimental Qualiagro (partie avec apport de N minéral « optimal »).

FUM : fumier, **OMR** : Compost d'ordures ménagères et résiduelles, **FFOM** : compost de biodéchets, **DVB** : compost de déchets verts et boues de station d'épuration, **T** : traitement témoin sans apport.

Trois parcelles ont été utilisées au cours de cette étude (cerclées en rouge Figure 10) : le sol témoin (T 205), le sol amendé par un compost de déchets verts et boues de station d'épuration (DVB 201), et le sol amendé par du fumier (FUM 203). Les sols ont été prélevés

en surface (0-25 cm) en novembre 2014 (après la récolte du maïs). Les sols ont ensuite été homogénéisés, tamisés à 4 mm, avant d'être conservés à 4°C en attente de leur utilisation pour les trois ans de l'étude.

3.2 Caractéristiques des PRO appliqués aux sols

Les principales caractéristiques des PRO épandus en septembre 2013 sont présentées dans le Tableau 9. Le rapport C/N et l'indice de stabilité des Matières Organiques (ISMO) calculé à partir de mesures au laboratoire de la cinétique de minéralisation et de fractions biochimiques montrent une plus grande stabilité du compost de déchets verts et boues de station d'épuration, épandu sur la parcelle DVB, par rapport au fumier appliqué sur la parcelle FUM (ISMO = 70 et 56 respectivement, C/N = 9.9 et 17.6 respectivement). Le pH du compost de déchets verts et boues de station d'épuration est légèrement inférieur à celui du fumier (pH = 7.7 et 8.8 respectivement). Des analyses d'antibiotiques sur les PRO ont permis de mettre en évidence l'absence de sulfaméthoxazole (SMX) et la présence de ciprofloxacine (CIP) dans le compost DVB.

Tableau 9 : Caractéristiques des PRO appliqués en 2013 sur les sols prélevés en 2014 pour cette étude (nd : non détecté).

| PRO | ISMO | C _{org} g.kg ⁻¹ MS | N _{total} g.kg ⁻¹ MS | C/N | pH | Cu mg.kg ⁻¹ MS | Zn mg.kg ⁻¹ MS | Détection de SMX ou CIP µg.kg ⁻¹ |
|--|------|--|--|------|-----|---------------------------------|---------------------------------|---|
| Compost de déchets verts et boues de station d'épuration | 70 | 257.3 | 25.5 | 9.9 | 7.7 | 209 | 471.3 | SMX : nd CIP : 309±22 |
| Fumier | 56 | 354.7 | 20.1 | 17.6 | 8.8 | 43.6 | 215 | SMX : nd CIP : nd |

3.3 Caractéristiques des échantillons de sols

Les caractéristiques des sols DVB et FUM ayant reçu respectivement un compost de déchets verts et boues de station d'épuration et un fumier depuis 1998, et du sol témoin T n'ayant jamais été amendé, sont rassemblées dans le Tableau 10. Le pH des parcelles T et DVB sont très proches (respectivement pH = 6.7 et 6.8) et celui du sol FUM un peu plus élevé (pH 7.3), montrant un effet légèrement alcalinisant du fumier épandu.

Ces 3 sols se différencient surtout par leur teneur en carbone organique C_{org} : les parcelles DVB et FUM sont plus riches que la parcelle T (facteurs 1.5 à 1.7). On observe également un effet du type de PRO apporté, la parcelle DVB présentant une teneur en C_{org} significativement plus élevée que la parcelle FUM (respectivement 17.6 et 15.5 g.kg⁻¹ MS). Les PRO étant apportés à quantités de C équivalentes, le compost de déchets verts et de boues, plus stable, augmente davantage les stocks de C du sol que le fumier, ce qui est cohérent avec les valeurs ISMO mesurées.

Les parcelles amendées en PRO présentent également une CEC plus importante que la parcelle T (CEC = 10 cmol⁺.kg⁻¹ pour les parcelles amendées et 7.6 cmol⁺.kg⁻¹ pour T).

Enfin, les concentrations en cuivre et en zinc sont plus élevées dans les sols amendés que dans le sol témoin. Les concentrations en cuivre s'élèvent à 13.6, 18.1, 17.1 mg.kg⁻¹, et celles en zinc à 50.1, 63.8, 60.6 mg.kg⁻¹ respectivement dans les sols T, DVB et FUM.

Tableau 10 : Caractéristiques des sols T, DVB et FUM étudiés (pH du sol mesuré dans l'eau, C et N par analyseur élémentaire, CEC par la méthode à la Cobaltihexamine, et ETM après digestion totale à l'acide fluorhydrique). (nd : non détecté)

| Sol | pH | C _{org} g.kg ⁻¹ MS | N _{total} g.kg ⁻¹ MS | CEC cmol ⁺ .kg ⁻¹ | Cu mg.kg ⁻¹ MS | Zn mg.kg ⁻¹ MS | Détection de SMX ou CIP µg.kg ⁻¹ |
|-----|-----|--|--|--|---------------------------------|---------------------------------|---|
| T | 6.7 | 10.2 | 1.0 | 7.6 | 13.6 | 50.1 | SMX : nd CIP : nd |
| DVB | 6.8 | 17.6 | 1.7 | 10 | 18.1 | 63.8 | SMX : nd CIP : 8.7±0.6 |
| FUM | 7.3 | 15.5 | 1.4 | 10 | 17.1 | 60.6 | SMX : nd CIP : nd |

3.4 Choix des antibiotiques

Les antibiotiques étudiés sont le sulfaméthoxazole (SMX) et son métabolite, le N-ac-SMX de la famille des sulfonamides et la ciprofloxacine (CIP) de la famille des fluoroquinolones (Tableau 11).

Les interactions entre les antibiotiques et les constituants du sol dépendent entre autres de la spéciation chimique des molécules, elle-même déterminée par le pH du sol. Au pH des sols étudiés (voir Tableau 10), le SMX et le N-ac-SMX sont sous forme neutre ou anionique alors que la ciprofloxacine est majoritairement cationique (Tableau 12).

Pour suivre spécifiquement le devenir des antibiotiques dans les sols, les molécules utilisées étaient marquées au ¹⁴C (¹⁴C-SMX, ¹⁴C-N-ac-SMX ou ¹⁴C-CIP) sur leur cycle aromatique (Tableau 12). En revanche, pour étudier les effets des antibiotiques sur les microorganismes du sol et leurs activités, nous avons travaillé avec des molécules non marquées (¹²C-SMX ou ¹²C-CIP) (Tableau 12).

Les antibiotiques marqués ou non ont été apportés en solution au sol soit seuls, soit en mélange (antibiotique-antibiotique ou antibiotique-métaux) en fonction de l'objectif de l'étude.

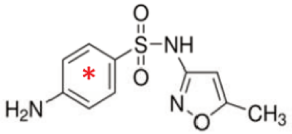
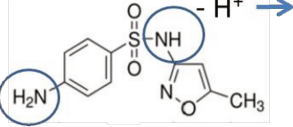
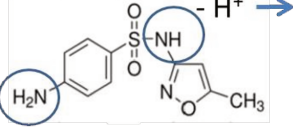
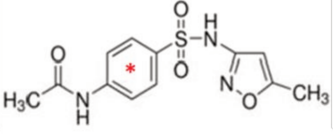
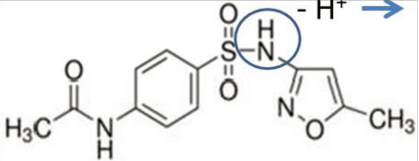
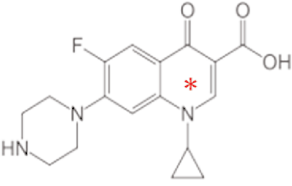
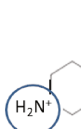
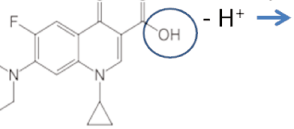
Quelle que soit l'expérimentation, les concentrations d'antibiotiques appliquées au sol étaient de 0.02, 0.02 ou 0.15 µg.g⁻¹ respectivement pour le SMX, N-ac-SMX et CIP, ce qui correspond à des doses réalistes retrouvées dans les sols amendés.

Tableau 11 : Caractéristiques des molécules étudiées.

| ATB | Concentrations $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | ^{14}C devenir des ATB | | | ^{12}C effets des ATB |
|----------|---|--|----------------------|---------------------|--------------------------------|
| | | Activité spécifique $\text{mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$ | Pureté chimique % | Provenance | CAS |
| SMX | 0.02 | 77 | 98 | Isobio (ARC) | 723-46-6 |
| N-ac-SMX | 0.02 | 77 | 93 | Isobio (ARC) | .* |
| CIP | 0.15 | 15 | 98.4 | Moravek Biochemical | 93107-08-05 |

*Les effets du N-ac-SMX n'ont pas été étudiés

Tableau 12 : Structure et spéciation chimique des molécules (* marquage au ¹⁴C).

| Antibiotique | Structure moléculaire | pK _a ¹ | Spéciation à pH 5.6 | Spéciation à pH 9.5 | logK _{ow} ² | Solubilité dans l'eau ³ g.L ⁻¹ |
|--------------------------------------|--|--|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--|
| Sulfaméthoxazole (SMX) |  | <p>pK_a 1.7 + H⁺ →</p>  <p>pK_a 5.6 - H⁺ →</p>  | Neutre (50%) Anion (50%) | Anion (100%) | 0.89 | 0.6 |
| N-acétyl-Sulfaméthoxazole (N-ac-SMX) |  | <p>pK_a 5.6 - H⁺ →</p>  | Anion | Anion | | |
| Ciprofloxacine (CIP) |  | <p>pK_a 8.8 ← - H⁺</p>  <p>pK_a 6.2 - H⁺ →</p>  | Cation (80%) Zwitterion (20%) | Anion (83.4%) Zwitterion (16.6%) | 0.28 | 30 |

¹ Les valeurs de pK_a et les pourcentages d'espèces ioniques de SMX, N-ac-SMX et CIP sont issus de Lucida et al. (2000), Stoob et al. (2006) et Vazquez et al. (2001) respectivement. ² DeVries et Zhang (2016). ³ Valeurs estimées par Ma et al. (2015).

3.5 Choix des métaux

Pour étudier l'impact de l'apport concomitant d'antibiotiques et de métaux sur le comportement des antibiotiques (devenir et effets), nous avons sélectionné le cuivre et le zinc comme éléments traces métalliques (ETM).

Ces ETM ont été apportés dans une solution de chlorure de cuivre CuCl_2 et chlorure de zinc ZnCl_2 . Deux doses ont été testées, une dose réaliste $\text{ETM} \times 1$ correspondant à des teneurs en cuivre et zinc respectivement de 20 mg.kg^{-1} et 30 mg.kg^{-1} , et une dose cinq fois plus forte $\text{ETM} \times 5$ correspondant à des teneurs en cuivre et zinc respectivement de 100 mg.kg^{-1} et 150 mg.kg^{-1} .

3.6 Devenir des antibiotiques dans le sol

3.6.1 Coefficient de distribution K_d de SMX et N-ac-SMX

Les coefficients d'adsorption K_d des sulfonamides SMX et N-ac-SMX ont été mesurés sur des échantillons des trois sols T, DVB et FUM, préalablement stérilisés aux rayons gamma (40-70 kGy). 3 g équivalents secs de sol ont été mélangés, à :

- 10 ml d'une solution de CaCl_2 0.01 M stérilisée au préalable par filtration à $0.2 \mu\text{m}$,
- $7.96 \mu\text{l}$ de ^{14}C -SMX ($1.48 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sol) ou $10.14 \mu\text{l}$ de ^{14}C -N-ac-SMX ($1.73 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sol). La radioactivité initiale par microcosme était de 2 250 000 DPM.

Le mélange a été agité à 15 trs.min^{-1} durant 24h à l'obscurité et à 20°C . Les échantillons ont ensuite été centrifugés 10 min à 34155 g à 20°C et le ^{14}C restant dans le surnageant a été quantifié au compteur à scintillation liquide.

Trois répétitions par traitement ont été réalisées.

Le K_d (L.kg^{-1}) a été calculé à partir de l'équation :

$$K_d = \text{Cads}/\text{Ce}$$

Avec Cads la concentration des antibiotiques adsorbés par le sol (mg.kg^{-1}) et Ce, la concentration des antibiotiques dans la solution du sol à l'équilibre (mg.L^{-1}). Cads est déduit par différence de la quantité initiale apportée et la quantité restée en solution.

3.6.2 Incubations

Des incubations de 10 g équivalent sec de sol ont été préparées dans des tubes PPCO 250 ml (Figure 11). La teneur en eau a été ajustée avec de l'eau sur les échantillons témoins, ou avec les solutions d'antibiotiques marquées pour les échantillons traités, à 80% de la capacité de rétention ($\text{pF } 2.5 = 0.26 ; 0.27 ; 0.27 \text{ g H}_2\text{O.g}^{-1} \text{ MS}$ respectivement pour T, DVB et FUM) pour se placer dans des conditions favorables aux activités microbiennes. La radioactivité initiale par microcosme était de 150 000 DPM. Trois répétitions par modalité et date d'analyse ont été préparées. Les sols ont été incubés pendant 156 jours à l'obscurité et à 28°C dans des bocaux de 1L en présence de 10 ml d'eau déionisée afin de maintenir l'humidité constante et 6 ml d'hydroxyde de sodium NaOH 1N pour piéger le CO_2 dégagé.

L'humidité des échantillons a été contrôlée par pesée et réajustée à la valeur initiale si besoin. Les conditions aérobies ont été maintenues via une ouverture régulière des bouchons.

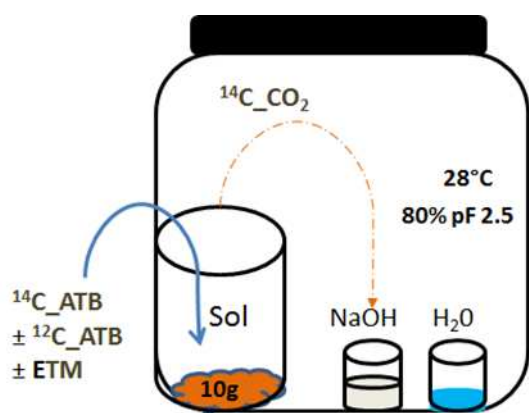


Figure 11 : Schéma du dispositif d'incubation des sols traités par des solutions de $^{14}\text{C_ATB}$ apportés seuls ou en mélange pour le suivi du devenir des $^{14}\text{C_ATB}$.

3.6.3 Mesure du $^{14}\text{C_CO}_2$

Le $^{14}\text{C_CO}_2$ dégagé au cours du temps a été piégé dans 6 ml de NaOH 1N. La soude a été changée après 3, 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 59, 66, 73, 80, 94, 115, 122, 136 et 156 jours d'incubation. A chaque renouvellement des pièges à soude, une aliquote de 2 ml de soude de l'échantillon traité au $^{14}\text{C_ATB}$ a été mélangée à 10 ml de liquide scintillant UltimaGold XR avant dosage avec un compteur à scintillation Tri-Carb 2100TR. Les échantillons ont été conservés au minimum 24h à l'obscurité avant dosage pour éviter toute perturbation des mesures par chimioluminescence. Les résultats obtenus en désintégrations par minute ont été convertis en % de ^{14}C minéralisé par rapport à la quantité de ^{14}C initiale.

3.6.4 Quantification des résidus ^{14}C

La radioactivité des fractions facilement, difficilement et non extractibles a été quantifiée après une succession d'extractions, après 3 et 156 jours d'incubation dans le but de faire des bilans ^{14}C en début et fin d'incubation.

Les résidus ^{14}C extractibles ont été quantifiés en différentes étapes successives selon le protocole développé par Ferhi et al. (2016) et Goulas et al. (2016). Une première étape d'extraction douce a été réalisée avec une solution de 2 β -cyclodextrine HPCD pour estimer les résidus ^{14}C facilement extractibles. Pour ce faire, 30 ml de cette solution (0.05 mol.L⁻¹, pH7) ont été ajoutés à chaque échantillon de sol. Après 16 heures d'agitation à une vitesse de 15 rotations par minute, les échantillons ont été centrifugés (20 min, 20°C, 34155 g) et le surnageant a été récupéré et pesé. Une aliquote de 2 ml du surnageant a été dosé par scintillation liquide après mélange à 10 ml de liquide scintillant. Le culot restant a été utilisé pour la deuxième extraction pour quantifier les résidus ^{14}C difficilement extractibles.

La deuxième extraction a été réalisée avec de l'acétonitrile MeCN (99.9% Acetonitrile Carlo Erba Reagents Dasit Group, 27.5 ml) combinée dans un premier temps avec un tampon McIlvaine à pH9 (9.3 mL de 1/29 (v/v) acide citrique/phosphate). L'ajustement à pH 9 a été réalisé avec NaOH 10N. Les échantillons ont été soumis aux ultrasons 10 min, agités, puis soumis aux ultrasons 10 min une seconde fois avant leur centrifugation (20 min, 20°C, 34155 g). Le surnageant obtenu après centrifugation a ensuite été récupéré et la radioactivité a été dosée par scintillation liquide dans 2 ml après mélange avec 10 ml de liquide scintillant Ultima Gold (Perkin Elmer).

Au culot issu de l'extraction au McIlvaine à pH9 ont été ajoutés 11 ml McIlvaine-EDTA à pH2 (27/3 (v/v) acide citrique/phosphate) et 27.5 ml de MeCN. L'acidification à pH2 a été obtenue avec du HCl dilué (0,1%). Les étapes suivantes étaient similaires à celles réalisées avec le McIlvaine pH9. A cause d'un effet de relargage de sel due à la grande quantité de sel EDTA, elles ont conduit à l'obtention de deux phases distinctes, une phase supérieure ou phase organique pH2 sup et une phase inférieure, ou phase aqueuse pH2 inf, d'un volume beaucoup plus faible. La radioactivité des 2 phases a été mesurée par scintillation liquide dans 2 ml.

Les culots résiduels ont été séchés à 35°C pendant 48 heures, puis broyés au broyeur à billes. La radioactivité résiduelle non extractible a été mesurée sur des aliquotes de 400 mg de sol à raison de 3 répétitions par traitement, après combustion catalytique (900°C) à l'Oxidizer (Biological Oxidizer OX 700, ZINSSER ANALYTIC, Frankfurt, Germany). Le ^{14}C -CO₂ produit par combustion sous courant d'oxygène a été récupéré et mélangé à un liquide scintillant (OXY SOLVE C-400). La radioactivité a ensuite été comptée par scintillation en milieu liquide.

3.6.5 Analyse des résidus ^{14}C dans les fractions extractibles de SMX et N-ac-SMX

Une analyse qualitative du ^{14}C a été effectuée à J3 et J156, dans les extraits des fractions contenant une radioactivité supérieure à 250 Bq.ml⁻¹, c'est-à-dire les fractions facilement extractibles (HPCD) et difficilement extractibles (MeCN pH9 et MeCN pH2 sup), par HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) avec un dispositif chromatographique (Systemcontroller 610, Autosampler 717 Waters Milford, MA, USA) couplé avec un détecteur de flux radioactif (Flo-one A-500, Packard–Radiomatic).

Dans certains cas, les trois répétitions par extraits ont été mélangées afin d'obtenir une radioactivité suffisante pour l'analyse (Tableau 13). Les extraits HPCD ont été concentrés sur des cartouches SPE (Strata X-A 33 µm Polymetric Stron Anion, Phenomenex), puis sous flux d'azote avant l'analyse HPLC. La radioactivité dans les extraits HPCD était trop faible après 156 jours d'incubation pour être analysée. Les extraits MeCN ont été évaporés avant d'être mélangés à 2 ml de méthanol. Après centrifugation, les échantillons ont été analysés par HPLC. La radioactivité dans la phase inférieure MeCN pH2 était insuffisante pour être analysée par HPLC.

Tableau 13 : Extraits sélectionnés pour l'analyse qualitative de la radioactivité par HPLC.

| Molécule | sol | jour | Extraits HPCD | | Extraits MeCN pH9 | | Extraits MeCN pH2 phase supérieure | |
|----------|-----------------|------|---|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|---------|
| | | | Concentration | mélange | Concentration | mélange | Concentration | mélange |
| N-ac-SMX | T DVB FUM | 3 | Sur cartouche SPE strata XA type | non | Evaporation | non | Evaporation | oui |
| N-ac-SMX | T DVB FUM | 156 | | Evaporation | non | Evaporation | oui | |
| SMX | T DVB FUM | 3 | Sur cartouche SPE strata XA type | non | Evaporation | non | Evaporation | oui |
| SMX | T DVB FUM | 156 | | Evaporation | non | Evaporation | oui | |

3.7 Effets des antibiotiques dans le sol

Deux séries de microcosmes ont été préparées dans les mêmes conditions que celles présentées dans le chapitre "Devenir" mais avec des ATB non marqués pour le suivi d'une part de la biomasse microbienne totale, la biomasse fongique, la respiration totale et pour les expérimentations avec des ETM, de la biodisponibilité des ETM, et d'autre part de la minéralisation de l'azote. Trois répétitions par modalité et date d'analyse ont été mises en place.

3.7.1 Incubations pour la mesure des biomasses, de la respiration totale et des métaux disponibles

20 g équivalent secs de sol ont été incubés à une humidité de 80% de la capacité au champ (pF 2.5) après apport de 1 ml d'eau sur les échantillons non traités aux ATB, ou de solution d'antibiotiques en mélange ou non ($^{12}\text{C_ATB} \pm ^{12}\text{C_ATB} \pm \text{ETM}$) sur les échantillons traités. Sur les 20g de sol, 10g étaient dédiés à la mesure de la biomasse microbienne, 5g à la mesure de la biomasse fongique, et les 5g restants n'ont été utilisés que lorsque les antibiotiques étaient apportés en mélange avec les métaux, pour la mesure de biodisponibilité des métaux. Les mesures des biomasses microbiennes et fongiques étant destructives, 9 répétitions par traitement ont été préparées pour des mesures à 3, 31 et 156 jours (3 répétitions par date). Les microcosmes voués à être détruits aux dates J3 et J31 ont été incubés en présence d'un flacon contenant 10ml d'eau déionisée afin de maintenir l'humidité constante. Les microcosmes détruits au bout de 156 jours contenaient en plus un flacon de 6 ml d'hydroxyde de sodium NaOH 1N afin de piéger le CO₂ dégagé par les microcosmes pour la mesure de la minéralisation du carbone C sur toute la durée de l'expérimentation. Les microcosmes ont été incubés à l'obscurité à 28 °C.

3.7.1.1 Mesure de la biomasse microbienne totale

Aux dates J3, J31 et J156, 5g de sol ont été fumigés pendant 12h dans une enceinte sous vide saturée en vapeur de chloroforme. Les échantillons de sol ont ensuite été agités dans 20 ml de K_2SO_4 0.05 N pendant 1h30 avec une vitesse de 17 trs.min⁻¹, puis centrifugés pendant 10 minutes à 7500 trs.min⁻¹. Des aliquotes de 5g de sol non fumigé ont été extraits dans les mêmes conditions. Les surnageants récupérés ont été stockés à -20°C avant analyse du carbone organique total au COT-mètre (Shimadzu). Un blanc de la matrice K_2SO_4 a aussi été conservé et analysé dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le C extractible microbien (E_c en mg C.kg⁻¹ MS) a été calculé par différence entre le carbone organique extrait de l'échantillon fumigé, et le carbone organique extrait de l'échantillon non fumigé. La biomasse microbienne carbonée a été estimée par la relation suivante : $B_c = 2.64 E_c$ (Vance et al, 1987).

3.7.1.2 Mesure de la biomasse fongique

La biomasse fongique a été quantifiée par dosage de l'ergostérol (μ g d'ergostérol.kg⁻¹ MS), stérol de la membrane fongique (Montgomery et al., 2000).

Aux dates J3, J31 et J156, une aliquote de 3g de sol congelé a été extraite avec 120ml d'éthanol à 96° en présence de billes dans un flacon sérum mis en agitation par retournement pendant 30 minutes. L'extrait a ensuite été filtré sur fibre de verre 1.2 μ m de porosité et récupéré dans un ballon de 250 ml taré. Les extraits ont ensuite été concentrés sur évaporateur rotatif à l'abri de la lumière à une température de 42°C afin d'obtenir un volume final d'environ 1-2 ml d'extrait (pas d'évaporation à sec). L'extrait a ensuite été repris avec de l'éthanol 96° dans une fiole de 10 ml et complété avec de l'éthanol à 96°. L'extrait a été stocké dans un flacon en vert brun de 18 ml. Une aliquote a ensuite été transférée dans un tube eppendorf de 2 ml puis centrifugé à 13400 trs.min⁻¹ pendant 10 minutes. Le surnageant a été prélevé et transféré dans un vial HPLC en attente de l'analyse dans les 48h par chromatographie en phase liquide-HPLC.

3.7.1.3 Mesure de la respiration totale

La respiration totale du sol a été suivie au cours du temps par des mesures régulières du CO_2 dégagé et piégé dans la soude. A chacune des dates de suivi : 3, 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 59, 66, 73, 80, 94, 115, 122, 136 et 156 jours, le flacon de soude ayant piégé le CO_2 total issu de la minéralisation du C du sol, a été récupéré et changé. Le CO_2 total a alors été mesuré en analysant la soude par colorimétrie en flux continu (Skalar Analyzer, Breda, the Netherlands).

3.7.1.4 Suivi de la biodisponibilité des ETM

La biodisponibilité des métaux a été évaluée aux dates J3, J31 et J156, par extraction de la fraction soluble dans le chlorure de calcium CaCl_2 0.01M (3g de sol dans 30 mL). Après 2h d'agitation à 17 trs.min⁻¹, et de centrifugation pendant 10 min à 7500 trs.min⁻¹, les surnageants ont été acidifiés à pH2 avec une solution d'acide nitrique (HNO_3) dans l'attente d'analyse en ICP/MS.

3.7.2 Incubation pour la mesure de la minéralisation de l'azote

Ces incubations avaient pour objectif d'estimer le potentiel microbien de minéralisation d'azote organique. C'est pourquoi nous nous sommes placés dans des conditions optimales et notamment en ce qui concerne les teneurs en N minéral initiales ($\geq 35 \text{ mg.kg}^{-1}$, cf norme XP U 44-143). Un dosage de la teneur initiale en N minéral total du sol (voir paragraphe 2.5.2.1 pour la démarche expérimentale) a révélé nécessaire l'apport au sol d'un complément en N minéral par l'ajout d'une solution de KNO_3 (1.44 g.L^{-1}).

20 g équivalent secs de sol ont été incubés dans des flacons plastiques de 250 ml à une humidité de 80% de la capacité au champ (pF 2,5), avec l'apport de 1 ml de solution d'antibiotique apporté en mélange ou non ($^{12}\text{C_ATB} \pm ^{12}\text{C_ATB} \pm \text{ETM}$). La mesure d'azote minéral étant destructive, 3 répétitions par traitement et par date d'analyse ont été préparées. Les microcosmes ont été incubés à l'obscurité à 28 °C pour une durée maximale d'incubation de 156 jours. Les mesures de minéralisation d'azote ont été réalisées à J0, J2, J10, J17, J31, J52, J94, J108 et J156.

A chaque date d'analyse, l'azote minéralisé a été extrait avec 80 ml d'une solution de chlorure de potassium, KCl 1N. Les échantillons ont ensuite été agités pendant 1 heure à une vitesse de 17 trs.min⁻¹, filtrés sur fibre de verre (porosité 1.2 μm). Le filtrat a été analysé par un spectrophotomètre à flux continu à détection visible (Skalar, San++ système), qui mesure l'azote sous forme ammoniacale (NH_4^+) et sous forme de nitrates (NO_3^-), l'azote minéral total correspondant à la somme des deux formes de l'azote.

3.8 Mesure du pH des solutions et des sols

Dans certaines expériences, des mesures de pH ont été effectuées, sur les solutions d'antibiotiques avant leur apport au sol, mais également sur les sols juste après apport (J0), puis sur ces mêmes sols à la fin des incubations (J156). Le pH des solutions a été mesuré à l'aide d'une sonde aquatrode (Metrohm certifiée ISO 9001 n°10872). Le pH des sols a été mesuré à l'aide d'une sonde profitrode (Metrohm certifiée ISO 9001 n°10872), après dilution des sols dans l'eau (rapport 1:5) puis deux heures d'agitation (ISO 103090 :2015).

3.9 Analyses statistiques

Des analyses statistiques, ont été effectuées à l'aide du logiciel R via des tests ANOVA et Tukey pour les valeurs paramétriques, et des tests Kruskal et Dunn pour les valeurs non paramétriques, afin de comparer le devenir et les effets des antibiotiques SMX, N-ac-SMX et CIP. Une P-value inférieure à 0.05 a été considérée comme statistiquement significative.

3.10 Récapitulatif des principales expérimentations

La Figure 12 résume pour chaque chapitre respectif : les ATB, les sols étudiés ainsi que les mesures réalisées.

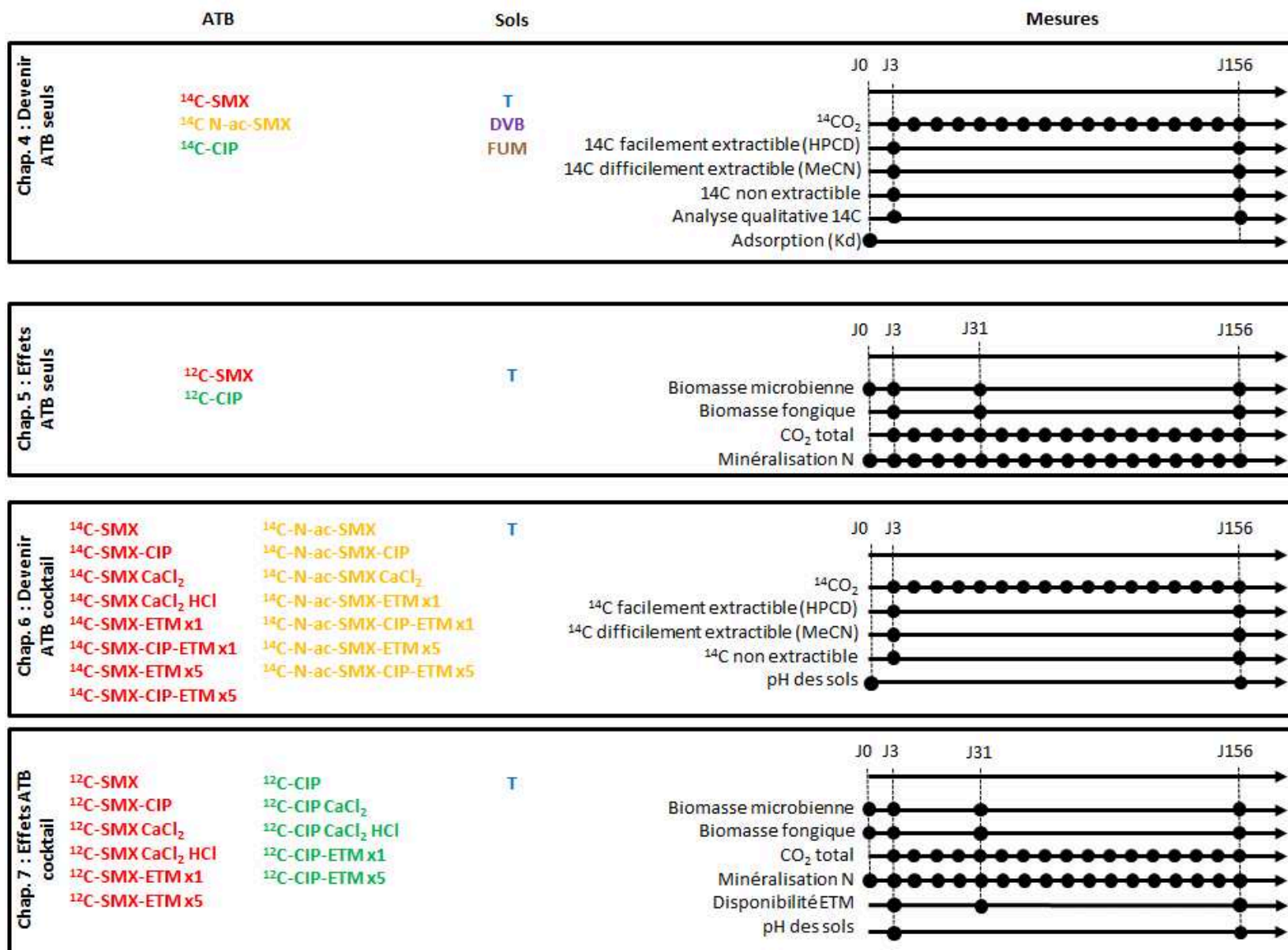


Figure 12 : Schéma récapitulatif des principales expérimentations.

**IV : DEVENIR
DES ANTIBIOTIQUES
SMX, N-AC-SMX ET CIP
APPORTES SEULS
DANS LES SOLS T, DVB ET FUM**

4 DEVENIR DES ANTIBIOTIQUES SMX, N-AC-SMX ET CIP APPORTES SEULS DANS LES SOLS T, DVB ET FUM

Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans le journal *Chemosphere* (Andriamalala et al., 2018). Cet article est repris intégralement après une introduction en français, et est suivi d'un complément de la section : 3.1.4. Comparison between SMX and N-ac-SMX at d3 and d156, avant une transition vers les chapitres suivants.

4.1 Introduction

Les objectifs de ce chapitre sont d'étudier d'une part le devenir d'antibiotiques ou de métabolites aux propriétés contrastées dans les sols et d'autre part de considérer les effets à long terme des apports répétés de différents types de PRO sur le devenir de ces molécules.

Les antibiotiques utilisés sont deux sulfonamides : le sulfaméthoxazole SMX (la molécule mère) et le N-acétyl-sulfaméthoxazole, son principal métabolite, N-ac-SMX, et une fluoroquinolone, la ciprofloxacine CIP. Ces deux familles sont couramment retrouvées dans les PRO épandus (Lindberg et al., 2005 ; Topp et al., 2008). Les sulfonamides sont généralement plutôt mobiles dans le sol, (Strauss et al., 2011), leur dégradation est faible (Lindberg et al., 2005) et principalement d'origine biotique (Liu et al., 2009). La ciprofloxacine s'adsorbe fortement sur les constituants du sol (Strauss et al., 2011), et sa biodégradation est très faible voire négligeable (Kümmerer et al., 2000 ; Girardi et al., 2011).

On compare aussi le devenir du SMX à sa forme acétylée N-ac-SMX, correspondant à 50% de la dose administrée de SMX excrétée (Göbel et al., 2005), car une molécule d'antibiotique peut arriver au sol sous sa forme parentale, ou bien sous une forme dégradée. De plus, les ATB peuvent être dégradés de manière incomplète par les microorganismes du sol, libérant des métabolites dans les sols. Il est donc important de considérer à la fois les molécules parentales et les métabolites issus de la dégradation de la molécule mère.

Les antibiotiques ont été apportés dans trois sols issus de 3 parcelles d'un essai au champ différenciées par leurs historiques d'amendement : un sol non amendé (sol T), et deux sols amendés tous les deux ans depuis 1998 par un compost de déchets verts et boues de station d'épuration (sol DVB) ou du fumier (sol FUM). Le choix d'échantillons de sols amendés ou non vise à déterminer si les apports réguliers de PRO favorisent l'adsorption et/ou la biodégradation des ATB. La stimulation de la biodégradation peut résulter :

- d'un apport de microorganismes par les PRO adaptés aux contaminants
- d'une adaptation des microorganismes initialement présents dans les sols par leur exposition répétée aux apports d'ATB (Topp et al., 2013)
- d'une stimulation de la microflore des sols par les apports de MO (Vieublé Gonod et al., 2009)

Les propriétés de rétention des sols, en particulier d'adsorption des ATB peuvent quant à elles, être augmentées par l'accumulation, l'humification d'une partie de la MO apportée par les PRO (Li et al., 2015). En choisissant deux types de PRO, FUM et DVB, ayant des

propriétés biochimiques distinctes, on vise aussi à tester l'hypothèse de l'influence du type de MO apportée.

Ainsi ce chapitre vise à déterminer quel est l'impact sur le devenir des ATB :

- i) de la nature de l'antibiotique en considérant des familles présentant des comportements contrastés dans les sols ?
- ii) de la forme arrivant au sol : molécule mère ou métabolite ?
- iii) d'apports répétés de PRO dans un sol ?
- iv) de la nature du PRO appliqué régulièrement (plus ou moins stable) ?

On peut envisager 4 hypothèses concernant le devenir des antibiotiques dans les sols :

- i) des antibiotiques de familles différentes présentent une distribution différente dans le sol ;
- ii) un métabolite présente un comportement différent de celui de sa molécule mère ;
- iii) des sols amendés régulièrement stimulent la dégradation des antibiotiques, ou favorisent leur adsorption
- iv) les effets sur le devenir des ATB diffèrent en fonction de la nature du PRO appliqué.

4.2 Matériels et méthodes

La conduite des incubations et les différentes méthodes analytiques ont été détaillées dans le chapitre 3. La Figure 13 ci-dessous récapitule les mesures réalisées dans ce chapitre :

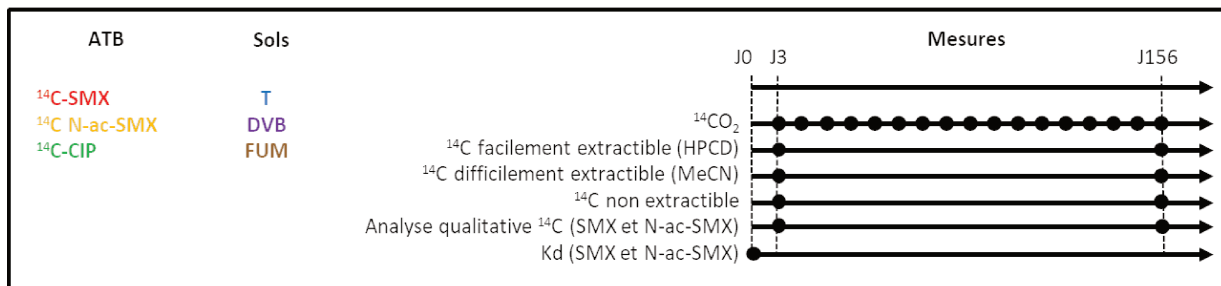


Figure 13 : Schéma récapitulatif des expérimentations du chapitre 4.

4.3 Article : Fate of sulfamethoxazole, its main metabolite N-ac-sulfamethoxazole and ciprofloxacin in agricultural soils amended or not by organic waste products

Ci-dessous la correspondance *entre l'article et le manuscrit de leurs* numéros de pages, tableaux et figures.

Pages de l'article → Pages du manuscrit :

607 → 65

608 → 66

609 → 67

610 → 68

611 → 69

612 → 70

613 → 71

614 → 72

615 → 73

Tableaux de l'article → Tableaux du manuscrit :

1 → 14

2 → 15

3 → 16

Figures de l'article → Figures du manuscrit :

1 → 14

2 → 15

3 → 16

4 → 17

5 → 18



Fate of sulfamethoxazole, its main metabolite N-ac-sulfamethoxazole and ciprofloxacin in agricultural soils amended or not by organic waste products



Aurore Andriamalala^a, Laure Vieublé-Gonod^b, Valérie Dumeny^a, Philippe Cambier^{a,*}

^a UMR ECOSYS, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

^b UMR ECOSYS, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

HIGHLIGHTS

- N-ac-SMX slightly more mobile and more mineralized than SMX during soil incubations.
- Differences in fates of N-ac-SMX and SMX partly due to a step of deacetylation.
- SMX more available in soil than CIP but both mainly non-extractable after 156 days.
- Regular organic amendments enhance sorption and lower mineralization of antibiotics.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2017

Received in revised form

10 October 2017

Accepted 15 October 2017

Available online 16 October 2017

Handling Editor: Klaus Kümmerer

Keywords:

Soil

Antibiotic

Metabolite

Organic waste products

Biodegradation

Adsorption

ABSTRACT

Spreading organic waste products (OWP) issued from sewage sludge or manures into soil may disseminate antibiotics with unknown risks for human health and environment. Our objectives were to compare the fate of two sulfonamides, sulfamethoxazole (SMX) and its metabolite N-acetyl-sulfamethoxazole (N-ac-SMX), and one fluoroquinolone, ciprofloxacin (CIP), in an unamended soil, and two soils regularly amended since 1998 with a sewage sludge and green waste compost and with farmyard manure respectively. Incubations of soil spiked with ¹⁴C labelled SMX or N-ac-SMX (0.02 mg kg⁻¹) or CIP (0.15 mg kg⁻¹) allowed a quantification of radiolabeled molecules in the mineralized, easily, hardly and non-extractable fractions after 3 and 156 days. Nature of ¹⁴C molecules was also analyzed by HPLC in extractable fractions after 3 and 156 days.

SMX and N-ac-SMX dissipation was fast and due to i) mineralization (~10% of recovered ¹⁴C after 156 days) or incomplete degradation (production of metabolites), ii) adsorption, even if both sulfonamides present low Kd (<3 L kg⁻¹) and iii) formation of non-extractable residues (NER), representing more than 50% of recovered radioactivity.

N-ac-SMX was more mineralized than SMX, and formed more progressively NER, after a step of deacetylation. Adsorption of CIP was fast and formed mainly NER (>72%) whereas its mineralization was negligible. Repeated applications of OWP tend to enhance adsorption of antibiotics and lower their degradation, through the quantity and quality of the built up soil organic matter. If applications of sewage sludge compost favor adsorption and inhibit mineralization, applications of manure boost the formation of non-extractable residues.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The increasing occurrence of antibiotics (ATB) in soils, surface

water and groundwater becomes of more and more concern because of environmental and human health threat (Boxall et al., 2012).

Once in the soil, ATB may be degraded by biotic or abiotic path, retained on soil constituents and/or transferred to surface and groundwater through runoff and infiltration (Jechalke et al., 2014). Volatilization and photodegradation of antibiotics are generally

* Corresponding author.

E-mail addresses: laure.vieuble@agroparistech.fr (L. Vieublé-Gonod), philippe.cambier@inra.fr (P. Cambier).

negligible processes in soils (Ozaki et al., 2011; Jechalke et al., 2014). Indeed, the fate of antibiotics depends on antibiotics and soil properties. Generally detected in the μg – mg per kg range (Golet et al., 2002; Boxall et al., 2004), ATB may persist for years in soils (Du and Liu, 2012) while maintaining an activity even at a low dose (Boxall et al., 2004).

One of the entry routes of veterinary and human antibiotics into agricultural soils is the application of organic waste products (OWP) (Kümmerer, 2001), which is a worldwide increasingly common practice of recycling valuable nutrients and organic matter (Chang et al., 1995). However OWP may contain antibiotics. When administered to livestock, 10–90% of ATB are excreted as parent compounds or metabolites (Sarmah et al., 2006). Consequently ATB and metabolites can be present directly in livestock effluents (Boxall et al., 2004). ATB in human's urine and feces are not completely eliminated in waste water plants and can persist in effluents and/or sludge (Nieto et al., 2010).

OWP addition may also impact the fate of antibiotics in soils, through changing soil physical, chemical and biological properties (Li et al., 2015). Contradictory results were obtained under laboratory conditions. Some works highlighted a stimulation of ATB biodegradation after OWP addition (Accinelli et al., 2007; Zhang et al., 2017) while others showed an increase of ATB adsorption and inhibition of mineralization (Li et al., 2015).

However studies based on addition of OWP into soils in the lab miss the long-term effects of OWP applications on soil and their indirect effect on the fate of ATB. In this study, we compared the fate of ATB in three soils from the same field experiment. Two have been amended every two years since 1998, with a farmyard manure (FYM) or a co-compost of sewage sludge and green waste (SGW), and the third one has never been amended (CONT). We focused on two ATB widely used in human and veterinary medicine, sulfamethoxazole (SMX) and ciprofloxacin (CIP), belonging respectively to sulfonamides and fluoroquinolones families. These molecules are among the most frequently detected ATB in the environment (Barnes et al., 2004; Kolpin et al., 2002), and present contrasting behavior in soils. SMX is relatively mobile and rapidly degraded with half-lives ranging from a few hours to a few days (Salvia et al., 2014; Srinivasan and Sarmah, 2014), while CIP is known to have a high affinity to soils (Nowara et al., 1997; Vasudevan et al., 2009) and may persist for several months to years (Hamscher et al., 2005; Rosendahl et al., 2012). However some studies suggested that sulfonamides may be more persistent than would be predicted from laboratory controlled studies (Bialk et al., 2005). The different characteristics of CIP and SMX make them good candidates to represent a range of antibiotics in the environment (Chen et al., 2011).

We also considered the main metabolite of SMX, the N-acetyl-sulfamethoxazole (N-ac-SMX). When excreted, this metabolite accounts for approximately 50% of the administered SMX. But N-ac-SMX may undergo deacetylation in the environment and SMX can be regenerated (Göbel et al., 2005).

Thus the objectives of this study were to determine i) the fate of antibiotics with contrasted characteristics in soils and ii) how long-term applications of different OWP to soils impacted the fate of these antibiotics.

We monitored ^{14}C -labelled antibiotics during 6 months incubations by quantifying radioactivity in the mineralized, extractable and non-extractable fractions, and by qualifying radioactivity (parent molecules or metabolites) in the extractable fractions.

2. Materials and methods

2.1. Antibiotics

^{14}C -ring-labelled sulfamethoxazole (chemical purity 98%, specific activity 77 mCi mmol^{-1}) and ^{14}C -ring-labelled N-acetyl-sulfamethoxazole (chemical purity 93%, specific activity 77 mCi mmol^{-1}) were purchased from Isobio (ARC). ^{14}C -ring-labelled ciprofloxacin (chemical purity 98.4%, specific activity 15 mCi mmol^{-1}), was purchased from Moravek Biochemical. The structures, pKa, and labelling of molecules are presented in Fig. S1.

2.2. Soil sampling

Soils were sampled in 2014 from the ploughed layers (0–25 cm) of the experimental field QualiAgro ($48^{\circ}53' \text{ N}$, $1^{\circ}58' \text{ E}$) located at Feucherolles (Yvelines, France): a soil control that has never received OWP and 2 soils amended every 2 years since 1998 with a co-compost of green waste and sewage sludge (SGW) or farmyard manure (FYM) (Houot et al., 2002). At sampling, amended soils (SGW or FYM) have received 9 applications of OWP. The soil is a silt loam Glosic Luvisol and contains on average 19% clay, 75% silt and 6% sand in the ploughed layer. Clay minerals identified are kaolinite, illite and smectite, with traces of chlorite (Cornu, personal communication). The field is cropped with a biannual rotation winter wheat-maize. Selected properties of the soil samples and of the OWP applied in 2013 are listed in Table 1. The soils were homogenized, sieved through a 4-mm mesh and stored 3 weeks at 4°C in the dark before using.

2.3. Sorption coefficient of SMX and N-ac-SMX

Sorption coefficients (K_d) of SMX and N-ac-SMX were determined on gamma-ray sterilized (40–70 kGy) samples of the 3 studied soils as follows: three replicates of 3 g equivalent dry soil were mixed with 10 ml of CaCl_2 0.01 M solution sterilized by filtration at $0.2 \mu\text{m}$ and $7.96 \mu\text{l}$ of ^{14}C labelled SMX or $10.14 \mu\text{l}$ of ^{14}C labelled N-ac-SMX ($0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ soil), before shaking at 15 rotations. min^{-1} for 24 h in the dark at 20°C . Samples were then centrifuged 10 min at 34155 g at 20°C and the ^{14}C remaining in the supernatants was quantified by liquid scintillation counting.

Then K_d (L.kg^{-1}) was calculated as follows:

$$K_d = \text{Cads}/\text{Ce}$$

Cads was the concentration of ATB adsorbed on soil (mg.kg^{-1}) and Ce, the concentration of ATB in soil solution after equilibrium (mg.L^{-1}).

2.4. Incubations

Ten grams (equivalent dry soil) of CONT, SGW and FYM soils were amended with 1 ml of solutions of ^{14}C -SMX, ^{14}C -N-ac-SMX or ^{14}C -CIP to provide final concentrations of 0.02, 0.02 or $0.15 \mu\text{g g}^{-1}$ soil respectively (1543 MBq.mM^{-1} per sample) and a moisture content corresponding to 80% of maximum water holding capacity (0.22 g of water per g of soil). Six replicates per treatment were prepared. Spiked soils were incubated in 1 L airtight jars in presence of 2 vials containing respectively 10 ml of deionized water and 6 ml of sodium hydroxide 1 N, at 28°C for 156 days.

At 3 days and then weekly, ^{14}C -activity in the NaOH solutions was measured with a TriCarb liquid scintillation counter after mixing with 10 mL of UltimaGold liquid scintillation cocktail. Samples were kept for at least 24 h in the dark before counting to avoid potential chemiluminescence. The counting time was 10 min.

Table 1
Physicochemical properties of soils (CONT, SGW, FYM) and OWP used as amendment in 2013.

| | Soils | | | OWP | |
|--|-------|-----------|------|-----------------------------------|-----------------|
| | CONT | SGW | FYM | Compost sewage sludge-green waste | Farmyard manure |
| Organic carbon (g.kg ⁻¹ dw) | 10.2 | 17.6 | 15.5 | 257.3 | 354.7 |
| Total nitrogen (g.kg ⁻¹ dw) | 1.0 | 1.7 | 1.4 | 25.5 | 20.1 |
| pH | 6.7 | 6.8 | 7.3 | 7.7 | 8.8 |
| CEC (cmol+.kg ⁻¹) | 7.6 | 9.8 | 9.9 | – | – |
| C/N | 10.2 | 10.4 | 11.1 | 9.9 | 17.6 |
| I _{roc} ^a | – | – | – | 78 | 67 |
| [SMX] (μg.kg ⁻¹ soil dw) ^b | nd | nd | nd | nd | nd |
| [CIP] (μg.kg ⁻¹ soil dw) ^b | nd | 7.3 ± 1.9 | nd | 309 ± 22 | nd |

nd: not detected.

^a Proportion of total organic carbon potentially incorporated into soil organic matter (Lashermes et al., 2009).

^b Concentrations of ATB were analyzed in OWP of 2013 and soil sampled in November 2104 (Bourdat-Deschamps et al., 2017).

The opening of the jars to replace the NaOH traps ensured aerobic conditions during all incubation time. The soil moisture was checked over time and readjusted when necessary to 80% of WHC by adding deionized water.

2.5. Quantification of ¹⁴C residues

At days 3 and 156, three successive extractions were performed to quantify the distribution of radioactivity from ¹⁴C-SMX, ¹⁴C-N-ac-SMX and ¹⁴C-CIP in the easily and hardly extractable and the non-extractable fractions. The extraction protocol was adapted from Ferhi et al. (2016).

To measure the easily extractable fractions, 30 ml of cyclodextrin HPCD (0.05 mol.L⁻¹) were added to soil samples in 250 ml PPCO tubes. After shaking during 16 h at 15 rotations. min⁻¹, samples were centrifuged (20 min, 20 °C, 34155 g). Supernatants were weighted and mixed with 10 ml of Ultima Gold XR scintillation liquid (Perkin Elmer) for counting. The next extraction was performed by adding acetonitrile MeCN (99.9% Acetonitrile Carlo Erba Reagents Dasit Group, 27.5 ml) combined with a Mc Ilvaine pH9 buffer solution (9.3 mL of 1/29 (v/v) citric acid/phosphate). pH9 was reached with addition of NaOH 10 N. Samples were ultra-sonicated twice 10 min before centrifugation (20 min, 20 °C, 34155 g). Radioactivity was quantified in the supernatants by liquid scintillation. The last extraction was performed by addition of MeCN (99.9% Acetonitrile Carlo Erba Reagents Dasit Group, 27.5 ml) combined with a Mc Ilvaine pH2 buffer solution (11 mL of 27/3 (v/v) citric acid/phosphate). pH2 was reached by adding HCl 37%. Samples were ultra-sonicated twice for 10 min, before centrifugation (20 min, 20 °C, 34155 g). Because of a salting out effect due to the high quantity of EDTA salt, two phases were obtained. Radioactivity was quantified in the lower and upper phases by liquid scintillation. The hardly extractable fraction was defined as the sum of pH9 and pH2 extracts.

After extractions, soil samples containing non-extractable ¹⁴C-residues (NER) were air dried at 35 °C. Radioactivity from NER was measured by combustion (Biological Oxidizer OX 700, Zinsser Analytic, Frankfurt, Germany) and trapping of the ¹⁴CO₂ in Carbosorb and liquid scintillation counting (Packard Instruments, Meriden, CT, USA).

2.6. Qualitative analysis of ¹⁴C residues in extractable fractions

A qualitative analysis of ¹⁴C in HPCD and MeCN extracts was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a Waters (Milford, MA, USA) chromatography appliance (Systemcontroller 610, Autosampler 717) coupled with a radioactive flow detector (Flo-one A-500, Packard–Radiomatic) when radioactivity in samples was greater than 250 Bq. mL⁻¹. In certain

cases, the 3 repetitions per extracts were pooled to obtain sufficient radioactivity for analysis (Table S1). HPCD extracts were concentrated on SPE cartridges (Strata X-A 33 μm Polymeric Stron Anion, Phenomenex) and then with nitrogen before HPLC analyses. Radioactivity in HPCD extracts was too low after 156 days of incubation to be analyzed. MeCN-McIlvaine extracts were evaporated before addition of 2 mL methanol. After centrifugation, samples were analyzed by HPLC. Radioactivity in the lower phase after MeCN-McIlvaine extraction was insufficient to be analyzed. Samples analyzed by HPLC (Perkin Elmer: Flexar System Quaternary Pump, Automatic Sample, PDA detector, Chromera® CDS piloting and acquisition Software; Column: Waters X-Bridge C18 5μ/4.6 × 250 mm; detector: Radio-HPLC FLO ONE/Beta/Gamma C150TR; elution method: ACN + 0.01% TFA and H₂O + 0.01% TFA) are synthesized in Table S1.

2.7. Statistical analyses

Statistical analyses, using R software, were performed via ANOVA and Tukey tests when values were parametric, Kruskal and Dunn tests when values were non-parametric, to compare the fate of ¹⁴C SMX, N-ac-SMX and CIP in the 3 studied soils at d3 and d156. P-values less than 0.05 were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Fate of SMX and N-ac-SMX into soils amended or not with OWP

3.1.1. Kd of SMX and N-ac-SMX

Kd of SMX was lower in CONT than in SGW and intermediate in FYM (Table 2). Kd of N-ac-SMX was significantly different in the three soils, in the following order: SGW > CONT > FYM (Table 2).

Kd of SMX appeared highly correlated to the C content of soils (R² = 0.94) in contrast to N-ac-SMX (R² = 0.008).

In the three soils, Kd of SMX was two to three folds higher than Kd of N-ac-SMX. In all cases, at a concentration of 0.02 μg g⁻¹, Kd values were low, whatever the molecules and whatever the soils.

3.1.2. Fate of SMX

SMX mineralization started without latency in the 3 soils and reached 6.6, 8.9 and 10.5% of added ¹⁴C-SMX in the SGW, FYM and CONT soils respectively after 156 days (Fig. 1). Although low in all cases, SMX mineralization was significantly greater in CONT than in FYM and SGW.

The total recovery of ¹⁴C in the mineralized, extractable (HPCD and MeCN) and non-extractable ¹⁴C fractions reached 87.4–88.8% of added ¹⁴C-SMX after 3 days and 81.7–91% after 156 days. For interpretation, the results were expressed as percentages of recovered ¹⁴C. The sum of all fractions corresponds therefore to

Table 2

Sorption coefficients (Kd) of SMX and N-ac-SMX ($L \cdot kg^{-1}$) added at a concentration of $0.02 \mu g \cdot g^{-1}$ soil in sterilized CONT, SGW and FYM soils (mean \pm standard-deviation from 3 replicates). Different letters indicate statistical differences ($P < 0.05$) between the three soils.

| Kd ($L \cdot kg^{-1}$) | SMX | | N-ac-SMX | | SMX/N-ac-SMX |
|--------------------------|-----------------|----|-----------------|---|--------------|
| CONT | 2.58 ± 0.11 | b | 1.21 ± 0.03 | b | 2.1 |
| SGW | 3.20 ± 0.10 | a | 1.33 ± 0.00 | a | 2.4 |
| FYM | 2.95 ± 0.07 | ab | 1.02 ± 0.02 | c | 2.9 |

100% (Fig. 2).

At d3 (Fig. 2A), ^{14}C was mainly distributed in the extractable and non-extractable fractions. SMX mineralization was negligible and varied between 1.1% (FYM) and 1.7% (CONT and SGW). Radioactivity in easily extractable (HPCD) fraction ranged between 17.9% (FYM) and 20.9% (SGW) of recovered ^{14}C . In hardly extractable (MeCN) fraction, ^{14}C ranged between 21.3% (FYM) and 27.3% (SGW). HPCD and MeCN extractable fractions were significantly lower in FYM. NER represented more than half of the recovered radioactivity as early as 3 days (Fig. 2A). They were significantly higher in FYM than in CONT and SGW.

Between 3 and 156 days, we observed mainly a decrease of the HPCD fraction (from about 20% to 6.1–7.7%) and an increase of the mineralized fraction. During the same period, mineralization was multiplied by a factor of about 6.5 and reached 7.4% (SGW), 11.0% (FYM) and 11.5% (CONT) of recovered ^{14}C (Fig. 2B).

The MeCN fraction slightly but significantly increased to reach 24.1–28.7%, whereas NER did not significantly vary between d3 and d156.

After 156 days, CONT presented the highest SMX mineralization and SGW the lowest mineralization and the highest HPCD extractable fraction. At last, FYM presented the lowest MeCN ^{14}C fraction.

3.1.3. Fate of N-ac-SMX

As for SMX, N-ac-SMX was immediately mineralized and cumulative $^{14}C-CO_2$ ranged between 8.5 and 11.6% at d156 (Fig. 3). As for SMX, N-ac-SMX mineralization was higher in CONT than in amended soils and higher in FYM compared to SGW.

The total recovery of ^{14}C in the different fractions ranged from 71.7 to 82.2% of added ^{14}C N-ac-SMX after 3 days and from 82.1 to 86.8% after 156 days. For interpretation, the results were expressed as percentages of recovered ^{14}C (Fig. 4).

After 3 days, N-ac-SMX mineralization was low (2.1–3.0%) and followed the order $CONT \geq FYM > SGW$. The HPCD fractions represented 22.9–25.6% of recovered ^{14}C and were significantly higher in SGW than in CONT, FYM presenting intermediate values. Hardly (MeCN) extractable fractions were not significantly different in the

3 soils (34.4–37.3%). NER varied between 35% (SGW) and 37.7% (FYM).

Between 3 and 156 days, mineralization increased by a 4.4–4.8 factor. NER increased to reach 49.7% (CONT), 55.9% (SGW) and 60.1% (FYM) of recovered ^{14}C . On the contrary, the HPCD and MeCN ^{14}C fractions decreased and ranged between 6.3–7.3% and 21.2–30.6% respectively. At d156, the HPCD fractions were not significantly different between the 3 soils. CONT presented the highest mineralized and MeCN fractions. FYM was characterized by a lower MeCN fraction and higher NER. The majority of ^{14}C was concentrated in the NER for the 3 soils.

3.1.4. Comparison between SMX and N-ac-SMX at d3 and d156

At d3, radioactivity in the mineralized, HPCD and MeCN extractable fractions was significantly lower for SMX than for N-ac-SMX (Table S2). The mineralization from ^{14}C -SMX was about half of that of N-ac-SMX. So, at d3, N-ac-SMX was more mineralized and remained more extractable than SMX. At the opposite, addition of SMX produced more NER than N-ac-SMX. After 156 days, the HPCD fraction was significantly higher for SMX than N-ac-SMX except in CONT where it was similar. The MeCN fraction was similar for SMX and N-ac-SMX in the three soils. NER were significantly higher in CONT after addition of SMX while they were similar for SMX and N-ac-SMX in SGW and FYM. When comparing fraction by fraction, differences between SMX and N-ac-SMX were similar for the 3 soils.

3.1.5. Qualitative analysis of ^{14}C in extractable fractions

Three days after SMX addition, HPCD fractions that represented around 20% of recovered ^{14}C , were mainly composed of ^{14}C -SMX (71.3–80.5% of extractable ^{14}C). Four other metabolites including N-ac-SMX were detected but in smaller quantities. Metabolites differed among the 3 soils (Table 3).

In the MeCN pH9 fraction, we quantified no SMX but polar metabolites (M1, M2, M3) and an apolar metabolite (M9) at d3. Results were similar for the 3 soils. Between 3 and 156 days, metabolites evolved differently in the MeCN pH9 extracts. M2 and M3 disappeared while M9 and especially M1 increased. M1 (66.7–83.4% of extractable ^{14}C and 10.1–11.9% of total ^{14}C), the main metabolite and M9 were present in the 3 soils. M5 seemed specifically appear in the amended soils after 156 days.

SMX was present in the upper phase of MeCN pH2 extracts and represented 46.1–100% of extractable ^{14}C (3.9 and 7.7% of total ^{14}C) in CONT and SGW respectively. SMX was predominant in this fraction for the 3 soils but metabolites (M6, M8, M9) were detected at smaller doses in one or another soil. CONT contained a greater diversity of metabolites than amended soils. In the MeCN pH2 extracts, SMX decreased over time but was still present at d156 in CONT and SGW. M8 and M9 disappeared and M4 and M6 remained the only quantifiable metabolites, representing 22.8–66% of extractable ^{14}C (2.4–7% of total ^{14}C).

Three days after its addition, N-ac-SMX has almost completely disappeared in the HPCD fraction, subsisting only in CONT at about 12% of recovered ^{14}C , and was converted into SMX and other metabolites (M6 et M7). SMX was present in the 3 soils but in larger quantities in the amended soils compared to CONT. CONT also presented a higher diversity of metabolites.

The metabolites present in the MeCN pH9 fraction 3 days after N-ac-SMX addition were the same in the 3 soils (M1, M2, M3, M9) with similar distributions to those obtained after SMX addition.

In the MeCN pH2 extracts at d3, N-ac-SMX subsisted around 12% of extractable ^{14}C in the 3 soils and was mostly transformed into SMX (70%–87%).

At d156, only the MeCN pH9 extracts contained a sufficient radioactivity and could be analyzed by HPLC. Between d3 and d156,

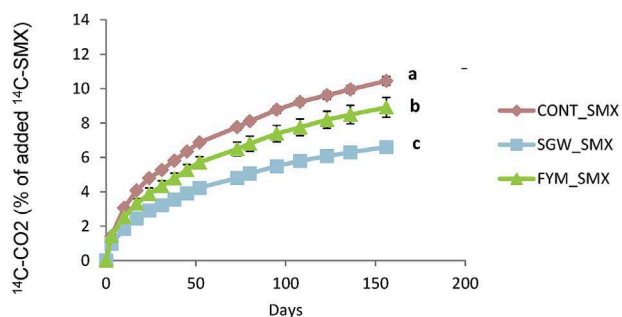


Fig. 1. Cumulative ^{14}C -SMX mineralization in the control soil and in the soils that have received 9 applications of a co-compost of sewage sludge and green waste (SGW) or farmyard manure (FYM). Error bars indicate standard deviations of 3 replicates.

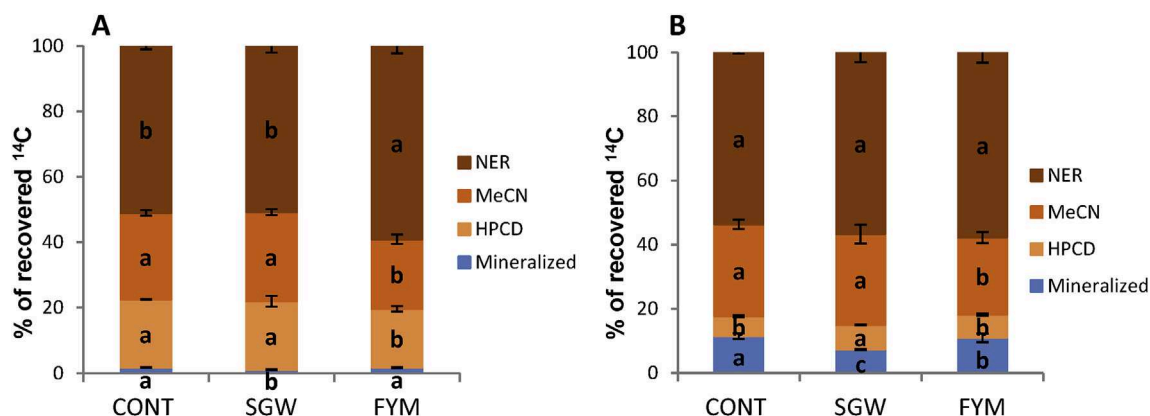


Fig. 2. Distribution of ^{14}C -SMX in the different soil fractions (mineralized, HPCD and MeCN extractable fractions, non-extractable residues), at (A) day 3, and (B) day 156, in the control soil (CONT) and the soils amended with a sewage sludge-green waste compost (SGW) or farmyard manure (FYM).

the polar metabolite M1 increased by a factor of 2.3–3.5 and represented 59–71% of extractable ^{14}C in the 3 soils. M2 and M3 decreased or disappeared and M9 increased to reach around 20% of extractable ^{14}C in CONT and SGW. As for SMX, M5 appeared only in amended soils. The evolution of the MeCN pH9 metabolites was the same for SMX and N-ac-SMX (Table 3).

3.2. Fate of CIP into soils amended or not with OWP

The ^{14}C balances ranged from 76 to 91.7% of added ^{14}C -CIP after 3 days and from 73.8 to 83.2% after 156 days. Presented results are expressed as percentages of recovered ^{14}C (Fig. 5).

We observed few evolutions between d3 and d156 in all of the ^{14}C fractions. CIP mineralization was considered as negligible since % of mineralization (0.5–0.6%) were below the impurity threshold (1.6%) in the 3 soils after 156 days. The radioactivity present in the HPCD fraction represented only a few percent of recovered ^{14}C . At d156, radioactivity was concentrated in MeCN fractions (20.4–25.9%) and mainly in NER (72.2–77.6%). CIP became rapidly strongly adsorbed or non-extractable. When comparing the 3 soils, NER were significantly higher in FYM while MeCN residues were higher in CONT. SGW presented intermediate values.

4. Discussion

4.1. Fate of SMX and N-ac-SMX

After addition of ^{14}C -SMX and ^{14}C N-ac-SMX as a solution, the

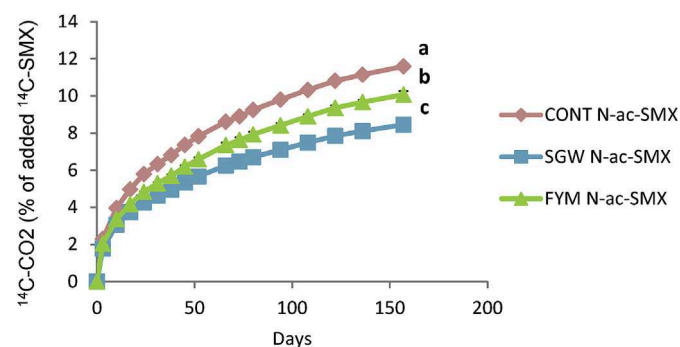


Fig. 3. Cumulative ^{14}C -N-ac-SMX mineralization in the control soil (CONT) and the soils amended with a sewage sludge-green waste compost (SGW) or farmyard manure (FYM). Error bars indicate standard deviations of 3 replicates.

fraction of easily extractable ^{14}C dropped in all soils till d3 and then decreased more slowly between 3 and 156 days. The decrease with time of SMX and N-ac-SMX in the HPCD fraction can be due to i) sorption on soil constituents, ii) physical sequestration in soil and/or iii) degradation. Then, radioactivity was quickly transferred to the hardly extractable fraction and NER. SMX and N-ac-SMX sorption affinity to soils was relatively low as shown by the K_d values in the 3 soils ($1\text{--}3.2\text{ L kg}^{-1}$) that are in the same range of other studies (Drillia et al., 2005; Hölting and Kreuzig, 2007; Kodešová et al., 2015). Different interactions may be involved in sorption of sulfonamides in soils, including surface complexation, ionic and hydrophobic interactions, some of them being pH-dependent (Leal et al., 2013; Tolls, 2001; Gao and Pedersen, 2010). In this study, soil pH ranged between 6.7 and 7.3, above the pKas of SMX and N-ac-SMX (Fig. S1), so that these molecules mainly existed in their anionic form, limiting ionic interactions with clay minerals (Gao and Pedersen, 2005). But sorption also depends on hydrophobicity, and SMX and its metabolites may thus interact with soil OM (Gao and Pedersen, 2010; Leal et al., 2013; Li et al., 2015). Thiele-Bruhn et al. (2004) highlighted the strong affinity between soil organic carbon and the sulfonamides. Furthermore, according to Martínez-Hernández et al. (2016), sorption is fast and can play a key role during the first 48 h of soil incubations. Gulkowska et al. (2014) attributed the fast formation of NER to chemical bonds between humic substances and the sulfonamide sulfamethazine. Thus sorption and chemical reactions of SMX and its metabolites could partially explain the high increase of ^{14}C in the MeCN and non-extractable fractions at d3, leading to unavailability of these compounds to soil microorganisms. This hypothesis was also confirmed by HPLC analyses showing that after 3 days, SMX, N-ac-SMX and other metabolites were partially transferred to the MeCN fraction. Then sulfonamides may desorb with time from this fraction to be transferred to readily extractable or non-extractable fractions (Drillia et al., 2005; Sukul et al., 2008). At the end of incubation, NER represented more than 50% of recovered ^{14}C for SMX and N-ac-SMX. NER can have a chemical origin with binding of ATB and their metabolites to soil constituents (Gulkowska et al., 2014) but can also result from a physical sequestration of compounds or a microbial transformation of ATB and subsequent incorporation into microbial biomass (Kästner et al., 2014).

Previous work showed that SMX and N-ac-SMX are mainly degraded by soil microorganisms and that abiotic degradation is negligible (Accinelli et al., 2007; Alvarino et al., 2016). Our results showed that SMX and N-ac-SMX biodegradation could be complete (~10% of mineralization at d156) or incomplete with metabolite production as previously showed by Liu et al. (2009) and Martínez-

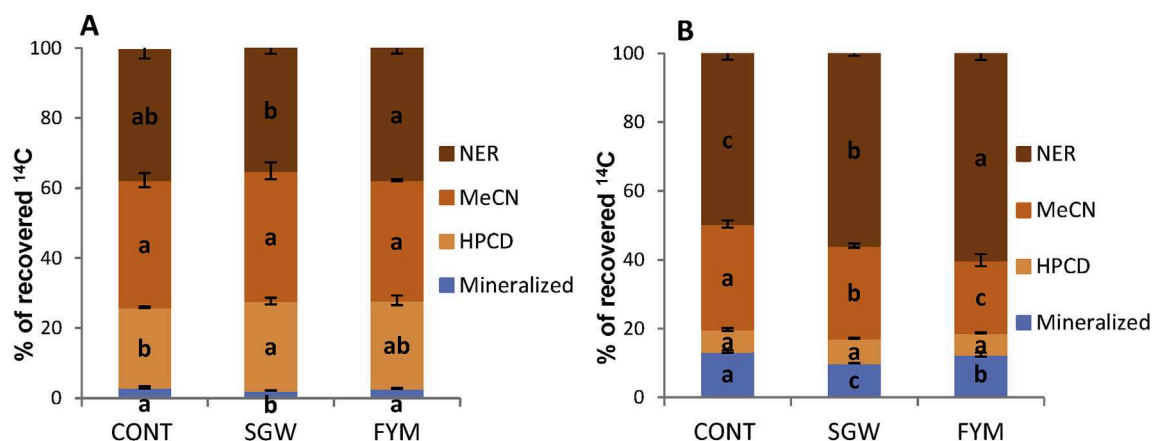


Fig. 4. Distribution of ^{14}C -N-ac-SMX in the different soil fractions (mineralized, HPCD and MeCN extractable fractions, non-extractable residues), at (A) day 3, and (B) day 156, in the control soil (CONT) and the soils amended with a sewage sludge-green waste compost (SGW) or farmyard manure (FYM).

Table 3
Qualitative analysis of ^{14}C by HPLC after addition of SMX or N-ac-SMX in the easily extractable fraction (HPCD), hardly extractable fraction at pH9 (MeCN pH9) and hardly extractable fraction (upper phase) at pH2 (MeCN pH2) of CONT, SGW and FYM respectively after 3 (d3) and 156 days (d156) of incubation: detection of SMX, N-ac-SMX and 9 other metabolites (M1-M9). Results are expressed as % of extractable ^{14}C or % of total ^{14}C .

| | | SMX | | | | | | N-ac-SMX | | | | | | |
|------|------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------|
| | | CONT | | SGW | | FYM | | CONT | | SGW | | FYM | | |
| | | Extractable ^{14}C (%) | Total ^{14}C (%) | Extractable ^{14}C (%) | Total ^{14}C (%) | Extractable ^{14}C (%) | Total ^{14}C (%) | Extractable ^{14}C (%) | Total ^{14}C (%) | Extractable ^{14}C (%) | Total ^{14}C (%) | Extractable ^{14}C (%) | Total ^{14}C (%) | |
| d3 | HPCD | M6 (24.4') | 0 | 0 | 8.7 | 1.8 | 10.3 | 1.8 | 27.8 | 6.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | SMX (25.4') | 74.7 | 15.6 | 71.3 | 14.9 | 80.5 | 14.4 | 36.1 | 8.3 | 67.9 | 17.3 | 100 | 25.1 |
| | | M7 (26.3') | 18.6 | 3.9 | 13.2 | 2.8 | 0 | 0 | 24.2 | 5.5 | 32.1 | 8.2 | 0 | 0 |
| | | N-ac-SMX (27.8') | 0 | 0 | 6.9 | 1.4 | 0 | 0 | 11.9 | 2.7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | M9 (37.3') | 6.7 | 1.4 | 0 | 0 | 9.2 | 1.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Total | 100 | 20.9 | 100 | 20.9 | 100 | 17.9 | 100 | 22.9 | 100 | 25.5 | 100 | 25.1 |
| | MeCN | M1 (3.7') | 23.6 | 4.1 | 24.0 | 4.5 | 27.3 | 3.4 | 30.6 | 7.3 | 21.0 | 5.6 | 28.7 | 6.7 |
| | pH9 | M2 (6.5') | 37.8 | 6.6 | 27.1 | 5.0 | 20.9 | 2.6 | 20.1 | 4.8 | 20.0 | 5.4 | 17.6 | 4.1 |
| | | M3 (9.8') | 31.0 | 5.4 | 42.0 | 7.8 | 44.7 | 5.6 | 43.1 | 10.3 | 50.0 | 13.5 | 42.8 | 10.0 |
| | | M9 (37.3') | 7.7 | 1.3 | 7.0 | 1.3 | 7.2 | 0.9 | 6.2 | 1.5 | 8.8 | 2.4 | 11.0 | 2.6 |
| | | Total | 100 | 17.4 | 100 | 18.6 | 100 | 12.5 | 100 | 23.8 | 100 | 26.9 | 100 | 23.3 |
| | MeCN | M6 (24.4') | 10.3 | 0.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.8 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | pH2 | SMX (25.4') | 46.1 | 3.9 | 100 | 7.7 | 76.7 | 5.2 | 74.7 | 6.9 | 87.4 | 8.2 | 69.9 | 6.5 |
| | | N-ac-SMX (27.8') | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12.5 | 1.2 | 12.6 | 1.2 | 10.1 | 0.9 |
| | | M8 (35.0) | 16.2 | 1.4 | 0 | 0 | 23.3 | 1.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | M9 (37.3') | 27.4 | 2.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10.1 | 0.9 | 0 | 0 | 20.0 | 1.9 |
| | | Total | 100 | 8.4 | 100 | 7.7 | 100 | 6.8 | 100 | 9.2 | 100 | 9.4 | 100 | 9.3 |
| d156 | MeCN | M1 (3.7') | 66.7 | 10.1 | 67.1 | 11.9 | 69.6 | 11.6 | 71.2 | 13.1 | 61.0 | 9.4 | 58.8 | 7.0 |
| | pH9 | M2 (6.5') | 12.4 | 1.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7.8 | 1.4 | 0 | 0 | 12.9 | 1.5 |
| | | M5 (21.6') | 0 | 0 | 16.2 | 2.9 | 17.0 | 2.8 | 0 | 0 | 19.5 | 3.0 | 22.3 | 2.7 |
| | | M9 (37.3') | 20.9 | 3.2 | 16.7 | 3.0 | 13.5 | 2.3 | 21.0 | 3.9 | 19.6 | 3.0 | 6.0 | 0.7 |
| | | Total | 100 | 15.2 | 100 | 17.8 | 100 | 16.7 | 100 | 18.4 | 100 | 15.4 | 100 | 11.9 |
| | MeCN | M4 (16.7') | 22.8 | 2.4 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| | pH2 | M6 (24.4') | 66.0 | 7.0 | 43.8 | 3.5 | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a |
| | | SMX (25.4') | 11.2 | 1.2 | 56.2 | 4.4 | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a |
| | | Total | 100 | 10.6 | 100 | 7.9 | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a | ^a |

^a Extracts non analyzed by HPLC because of a too low radioactivity.

Hernández et al. (2016). The production of metabolites, mainly more polar than parent compounds, started quickly after spiking soils with SMX and N-ac-SMX and confirmed results previously observed by Richardson and Ternes (2011) and Koba et al. (2017). Few metabolites were identified but the degradation pathway of SMX and N-ac-SMX path remained unclear. The main metabolite of sulfonamides is their acetylated form (Baran et al., 2011), whose formation can be reversible (Höltge and Kreuzig, 2007). Metabolites may also vary according to microbial species (Larcher and Yargeau, 2012) and environmental conditions (Müller et al., 2013).

Mineralization was significantly greater for N-ac-SMX than for SMX in the first days of incubation. These results are consistent with the lower adsorption and the higher extractability of N-ac-SMX in soil, leading to a higher availability of N-ac-SMX to soil microorganisms. At the opposite, the higher K_d of SMX can partially explain the higher production of abiotic NER. Höltge and Kreuzig (2007) previously observed higher K_d for SMX compared to N-ac-SMX in most of soils and OWP they studied. Considering HPLC analyses, N-ac-SMX has almost completely disappeared from the HPCD extracts after 3 days and was present only in the MeCN pH2

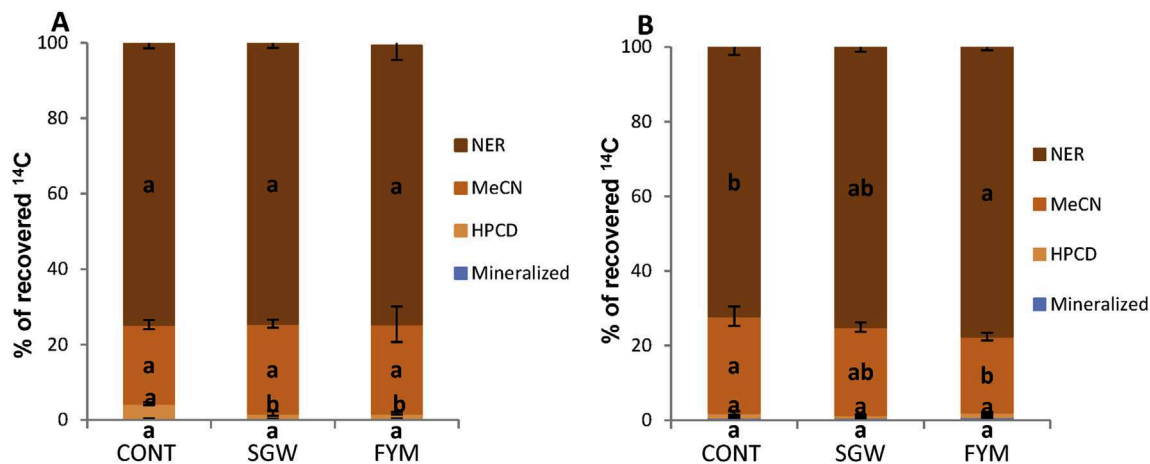


Fig. 5. Distribution of ¹⁴C–CIP in the different soil fractions (mineralized, HPCD and MeCN extractable fractions, non-extractable residues), at (A) day 3, and (B) day 156, in the control soil (CONT) and the soils amended with a sewage sludge-green waste compost (SGW) or farmyard manure (FYM).

fractions. The quantification of SMX as the most abundant molecule in the HPCD and MeCN pH2 extracts after N-ac-SMX addition in the 3 soils confirmed the reversible transformation of N-ac-SMX to SMX (Höltge and Kreuzig, 2007; Zarfl et al., 2009).

The fate of SMX and N-ac-SMX also differs in the second part of incubation. For SMX, the production of MeCN and non-extractable residues was very fast up to 3 days and then evolved little between d3 and d156. For N-ac-SMX, hardly extracted residues increased till 3 days before decreasing. The production of NER was more progressive with N-ac-SMX than for SMX and was explained by a decrease of easily and hardly extractable fractions. Zarfl et al. (2009) suggested by simulation that NER were formed directly from easily extractable residues after sulfonamide addition. This would mean that some of the hardly extractable residues would go back to soil solution before contributing to the formation of NER.

Even if evolution with time was different for the 2 compounds, the HPCD, MeCN and non-extractable fractions were very similar at d156. For SMX and N-ac-SMX, radioactivity was mainly concentrated in NER and represented more than 50% of recovered ¹⁴C. Besides, Zarfl et al. (2009) also showed that the formation of NER from an acetylated metabolite of sulfadiazine was negligible. Therefore, deacetylation of N-ac-SMX to reform the parent compound should be necessary before its transfer to NER. Thus the transformation of N-ac-SMX into SMX leads at long term to a similar distribution of radioactivity in extractable and non-extractable fractions for N-ac-SMX and SMX. On the other hand, the mineralization of the 2 molecules started from the first days of incubation and explains why in this case, differences persisted over time.

4.2. Fate of CIP

The fate of the fluoroquinolone CIP is very different from sulfonamides. No significant mineralization (less than 1%) was detected after 156 days. Except in artificial conditions, e.g., pure cultures with optimal growth conditions, liquid media, bioreactor (Dorival-García et al., 2013) or specific conditions with microorganisms from drinking water biofilter and adapted to high concentrations in CIP (Liao et al., 2016), most of the studies concluded that ciprofloxacin was recalcitrant to biodegradation (Girardi et al., 2011; Jechalke et al., 2014; Goulas et al., 2016).

The low CIP mineralization is due to its strong sorption and its resulting low bioavailability. *K_d* of CIP was not measured in this study, but the literature reports very high values of *K_d*, > 500 kg.L⁻¹

(Leal et al., 2013; Vasudevan et al., 2009). Different mechanisms such as cation exchange, cation bridging, complexation, and H-binding may be responsible for sorption of fluoroquinolones in soils (Tolls, 2001; Vasudevan et al., 2009). At soil pH, zwitterionic species predominate in the soil solution. Hence a strong attraction between positive charges of CIP and negative charges of soil constituents can explain fast and strong CIP adsorption in soil. Drillia et al. (2005) measured very high desorption coefficients of fluoroquinolones, meaning that they mainly remained sorbed in the soil. Furthermore CIP addition in soil induces a high production of NER (Girardi et al., 2011). The decline of extractable CIP is thus mainly governed by sorption and formation of NER. In our study, from 3 days and throughout the incubation time, the radioactivity was concentrated in the hardly extractable fraction (20.4–25.9% at d156) and even more in NER (72.2–77.6% at d156). Girardi et al. (2011) comparing CIP degradation in biotic and abiotic conditions concluded that NER were mainly from abiotic origin.

But no mineralization does not mean no biodegradation. Due to the low radioactivity in the extracts, HPLC analyses could not be performed in this work. But other studies highlighted a possible incomplete degradation and the appearance of metabolites (Girardi et al., 2011), especially in presence of fungi (Parshikov et al., 1999; Wetzstein et al., 1999).

4.3. Influence of soil properties on the fate of antibiotics

The use of soils amended or not with OWP had for objective to study how long term applications of different OWP to soils impacted the fate of ATB. Two hypotheses were tested:

- OWP repeated application may increase ATB biodegradation (Accinelli et al., 2007) stimulating the soil indigenous microorganisms, introducing exogenous degrading microorganisms in soils or promoting the development of an adapted microflora due to the presence of antibiotics in OWP (Topp et al., 2013)
- OWP repeated application may enhance antibiotics sorption limiting their bioavailability and decreasing their mineralization (Li et al., 2015).

We found SMX and N-ac-SMX mineralization lower in OWP amended soils compared to CONT. Li et al. (2015) previously observed that the addition of biosolids and compost to soil decreased SMX mineralization but the level of inhibition depended on the quantity of OM.

When comparing results of HPLC analyses between amended and unamended soils after SMX addition, the differences mainly appeared in the MeCN pH2 fraction, with less SMX and more metabolites present in CONT, as if the biodegradation was more advanced while remaining incomplete. These effects appeared at d3 and persisted over time. In soils incubated with N-ac-SMX, the main effect of amendments appeared in HPCD fractions, where organic matter seemed to have accelerated the de-acetylation into SMX and inhibited the formation of one metabolite (M6). The M5 metabolite present at d156 after addition of SMX and N-ac-SMX seemed specifically produced in amended soils.

On another side, differences were observed between SGW and FYM, i.e., SMX and N-ac-SMX mineralization was more inhibited in SGW than in FYM. HPLC analyses also showed that the proportion of easily extractable SMX was higher in FYM while strongly adsorbed SMX was higher in SGW. These results are consistent with soil organic carbon contents higher in SGW than in FYM (17.6 vs 15.5 g kg⁻¹) and values of Kd higher in SGW than in FYM for both SMX and N-ac-SMX. Furthermore, Racke and Lichtenstein (1985) reported that the quality of OM and its degree of decomposition were also key factors. OM is more stable and less degradable in compost of sewage sludge and green waste than in manure.

Finally organic amendments stimulated the production of NER whatever the studied antibiotic (SMX, N-ac-SMX, CIP). The increase of NER occurred very quickly with SMX and CIP and later with N-ac-SMX. In addition, this effect was more pronounced in FYM than in SGW. Li et al. (2015) also showed that OWP amendment increased the formation and accumulation of NER in a soil spiked with SMX from the first days of incubation. They suggested that OWP provide additional sites facilitating binding or conjugation interactions between contaminants and soil constituents and/or promoted microbial transformation leading to the formation of intermediates that were readily bound to the matrix.

5. Conclusion

The fate of two sulfonamides, SMX and N-ac-SMX, and one fluoroquinolone, CIP, in soils amended or not with manure or a co-compost of sludge and green waste depends on molecules and soil characteristics. Antibiotic mineralization was nil or low after 156 days (CIP \ll SMX < N-ac-SMX) while the production of NER accounted for more than 50% of recovered ¹⁴C.

Organic amendments decrease antibiotics degradation and mineralization (SMX and N-ac-SMX) and increase the production of NER (SMX, N-ac-SMX and CIP). The effects also depend on the quantity and quality of added OM. The SGW compost further inhibits mineralization while FYM enhances the production of NER. Land application of OWP is an increasing practice in agriculture and urban gardening and so the impact of OWP on the fate of ATB and its associated health and environmental risks are of great interest to be studied. But OWP often contain multiple contaminants (other xenobiotics, metals ...), as well as a complex organic matrix that interacts with the contaminants during storage or treatment (composting, methanisation, liming, drying ...), and then after soil spreading. Consequently it would be interesting to evaluate whether the concomitant addition of contaminants (cocktail effects) in soils and/or the evolution of OM-ATB interactions over time have an impact on the fate of antibiotics.

Acknowledgements

Acknowledgements are due to ADEME and INRA, Department of Environment and Agronomy, for the PhD grant of the first author, and to the French National Research Agency who financed the project CEMABS (ANR-13-CESA-0016-01). Soil samples came from

the QualiAgro field experiment supported by Veolia Research and Innovation and by AnaEE-France. We also thank the staff of ECOSYS who helped us during sampling, experiments and data treatments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.093>.

Bibliography

- Accinelli, C., Koskinen, W.C., Becker, J.M., Sadowsky, M.J., 2007. Environmental fate of two sulfonamide antimicrobial agents in soil. *J. Agric. Food. Chem.* 55, 2677–2682. <https://doi.org/10.1021/jf063709j>.
- Alvarino, T., Nastold, P., Suarez, S., Omil, F., Corvini, P.F.X., Bouju, H., 2016. Role of biotransformation, sorption and mineralization of 14 C-labelled sulfamethoxazole under different redox conditions. *Sci. Total Environ.* 542, 706–715. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.140>.
- Baran, W., Adamek, E., Ziemiańska, J., Sobczak, A., 2011. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *J. Hazard. Mater.* 196, 1–15.
- Barnes, K.K., Christenson, S.C., Kolpin, D.W., Focazio, M., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., 2004. Pharmaceuticals and other organic waste water contaminants within a leachate plume downgradient of a municipal landfill. *Ground Water Monit. Rem.* 24 (2), 119–126.
- Bialk, H.M., Simpson, A.J., Pedersen, J.A., 2005. Cross-coupling of sulfonamide antimicrobial agents with model humic constituents. *Env. Sci. Technol.* 39 (12), 4463–4473. <https://doi.org/10.1021/es0500916>.
- Bourdat-Deschamps, M., Ferhi, S., Bernet, N., Feder, F., Crouzet, O., Patureau, P., Montenach, D., Moussard, G.D., Mercier, V., Benoit, P., Houot, S., 2017. Fate and impacts of pharmaceuticals and personal care products after repeated applications of organic waste products in long-term field experiments. *Sci. Total Environ.* 607–608, 271–280.
- Boxall, A.B.A., Kay, P., Blackwell, P.A., Fogg, L.A., 2004. Fate of veterinary medicines applied to soils. In: Kümmerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 165–180.
- Boxall, A.B.A., Rudd, M.A., Brooks, B.W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J.P., Beazley, K.F., 2012. Review pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ. Health Perspect.* 120 (9), 1221–1229. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104477>.
- Chang, A.C., Pan, G., Page, A.L., Asano, T., 1995. Developing Human Health-related Chemical Guidelines for Reclaimed Waster and Sewage Sludge Applications in Agriculture. World Health Organization, Geneva, 1995., WHO/EOS/95.20.
- Chen, H., Gao, B., Li, H., Ma, L.Q., 2011. Effects of pH and ionic strength on sulfamethoxazole and ciprofloxacin transport in saturated porous media. *J. Contam. Hydrol.* 126 (1–2), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2011.06.002>.
- Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Navalón, A., González, J., Hontoria, E., Vilchez, J.L., 2013. Removal of quinolone antibiotics from wastewaters by sorption and biological degradation in laboratory-scale membrane bioreactors. *Sci. Total Environ.* 442, 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.026>.
- Drillia, P., Stamatelatos, K., Lyberatos, G., 2005. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere* 60, 1034–1044. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.032>.
- Du, L., Liu, W., 2012. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agroecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 309–327. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0062-9>.
- Ferhi, S., Bourdat-Deschamps, M., Daudin, J.J., Houot, S., Nélieu, S., 2016. Factors influencing the extraction of pharmaceuticals from sewage sludge and soil: an experimental design approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 6153–6168.
- Gao, J., Pedersen, J., 2005. Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9509–9516.
- Gao, J., Pedersen, J., 2010. Sorption of sulfonamide antimicrobial agents to humic acid – clay complexes. *J. Environ. Qual.* 39, 228–235. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0274>.
- Girardi, C., Greve, J., Lamshöft, M., Fetzter, I., Miltner, A., Schäffer, A., Kästner, M., 2011. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. *J. Hazard. Mater.* 198, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.004>.
- Göbel, A., Thomsen, A., McArdell, C.S., Joss, A., Giger, W., 2005. Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Env. Sci. Technol.* 39, 3981–3989. <https://doi.org/10.1021/es048550a>.
- Golet, E.M., Strehler, A., Alder, A.C., Giger, W., 2002. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Anal. Chem.* 74 (21), 5455–5462.
- Goulas, A., Haudin, C., Bourdat-Deschamps, M., Benoit, P., Ferhi, S., 2016. A new extraction method to assess the environmental availability of ciprofloxacin in agricultural soils amended with exogenous organic matter. *Chemosphere* 165, 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.040>.

- Gulkowska, A., Thalmann, B., Hollender, J., Krauss, M., 2014. Nonextractable residue formation of sulfonamide antimicrobials: new insights from soil incubation experiments. *Chemosphere* 107, 366–372.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Höper, H., Nau, H., 2005. Different behaviour of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 861–868.
- Höltge, S., Kreuzig, R., 2007. Laboratory testing of sulfamethoxazole and its metabolite acetyl-sulfamethoxazole in soil. *Clean. Soil Air Water* 35 (1), 104–110. <https://doi.org/10.1002/clen.200600019>.
- Houot, S., Clergeot, D., Michelin, J., Francou, C., Bourgeois, S., Caria, G., Ciesielski, H., 2002. Agronomic value and environmental impacts of urban composts used in agriculture. In: Insam, H., Klammer, S. (Eds.), *Microbiology of Composting*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 457–472.
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., Smalla, K., 2014. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol.* 22 (9), 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>.
- Kästner, M., Nowak, K.M., Miltner, A., Trapp, S., Schaffer, A., 2014. Classification and modelling of non extractable residue (NER) formation of xenobiotics in soil – a synthesis. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 44 (19), 2107–2171.
- Koba, O., Golovko, O., Kodešová, R., Fér, M., Grabic, R., 2017. Antibiotics degradation in soil: a case of clindamycin, trimethoprim, sulfamethoxazole and their transformation products. *Environ. Pollut.* 220, 1251–1263.
- Kodešová, R., Grabic, R., Kocárek, M., Klement, A., Golovko, O., Fér, M., Nikodem, A., Jaksík, O., 2015. Pharmaceuticals' sorptions relative to properties of thirteen different soils. *Sci. Total Environ.* 511, 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.088>.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36 (6), 1202–1211.
- Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* 45, 957–969.
- Larcher, S., Yargeau, V., 2012. Biodegradation of sulfamethoxazole: current knowledge and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 309–318.
- Lashermes, G., Nicolardot, B., Parnaudeau, V., Thuriès, L., Chaussod, R., Guillotin, M.L., Linères, M., Mary, B., Metzger, L., Morvan, T., Tricaud, A., Vilette, C., Houot, S., 2009. Indicator of potential residual carbon in soils after exogenous organic matter application. *Eur. J. Soil Sci.* 60 (2), 297–310.
- 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 (8), 979–985. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.018>.
- Li, J., Ye, Q., Gan, J., 2015. Influence of organic amendment on fate of acetaminophen and sulfamethoxazole in soil. *Environ. Pollut.* 206, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.019>.
- Liao, X., Li, B., Zou, R., Dai, Y., Xie, S., Yuan, B., 2016. Biodegradation of antibiotic ciprofloxacin: pathways, influential factors, and bacterial community structure. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23 (8), 7911–7918. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6054-1>.
- Liu, F., Ying, G.G., Tao, R., Zhao, J.L., Yang, J.F., Zhao, L.F., 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ. Pollut.* 157 (5), 1636–1642. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.021>.
- Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Herrera, S., Bustamante, I.D., 2016. The role of sorption and biodegradation in the removal of acetaminophen, carbamazepine, caffeine, naproxen and sulfamethoxazole during soil contact: a kinetics study. *Sci. Total Environ.* 559, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.131>.
- Müller, M., 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.
- Nieto, A., Borruli, F., Pocurull, E., Marce, R.M., 2010. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1484–1489.
- Nowara, A., Burhenne, J., Spittler, M., 1997. Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 1459–1463. <https://doi.org/10.1021/jf960215l>.
- Ozaki, N., Bester, K., Moldrup, P., Henriksen, K., Komatsu, T., 2011. Photodegradation of the synthetic fragrance OTNE and the bactericide triclosan adsorbed on dried loamy sand – results from models and experiments. *Chemosphere* 83 (11), 1475–1479. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.006>.
- Parshikov, I.A., Freeman, J.P., Lay, J.O., Beger, R.D., Williams, A.J., Sutherland, J.B., 1999. Regioselective transformation of ciprofloxacin to N-acetylciprofloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 131–135.
- Racke, K.D., Lichtenstein, E.P., 1985. Effects of soil microorganisms on the release of bound 14C residues from soils previously treated with [14C] parathion. *J. Agric. Food Chem.* 33, 938–943.
- Richardson, S.D., Ternes, T.A., 2011. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 83, 4614–4648.
- Rosendahl, I., Siemens, J., Kindler, R., Groeneweg, J., Zimmermann, J., Czerwinski, S., Lamshöft, M., Wilke, B.M., Vereeken, H., Amelung, W., 2012. Persistence of the fluoroquinolone antibiotic difloxacin in soil and lacking effects on nitrogen turnover. *J. Environ. Qual.* 41, 1275–1283. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0459>.
- Salvia, M.-V., Experton, J., Geandel, C., Cren-Olivé, C., Vulliet, E., 2014. Fate of pharmaceutical compounds and steroid hormones in soil: study of transfer and degradation in soil columns. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 10525–10535. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3038-x>.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B., 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. <https://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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.034>.
- Sukul, P., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spittler, M., 2008. Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. *Chemosphere* 73 (8), 1344–1350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.066>.
- Thiele-Bruhn, S., Seibicke, T., Schulten, H.R., Leinweber, P., 2004. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *J. Environ. Qual.* 33, 1331–1342.
- Tolls, J., 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ. Sci. Technol.* 35 (17), 3397–3406.
- Topp, E., Chapman, R., Devers-Lamrani, M., Hartmann, A., Marti, R., Martin-Laurent, F., Sabourin, L., Scott, A., Sumarah, M., 2013. Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of a sulfamethazine-degrading sp. *J. Environ. Qual.* 42 (1), 173–178. <https://doi.org/10.2134/jeq2012.0162>.
- Vasudevan, D., Bruland, G.L., Torrance, B.S., Upchurch, V.G., MacKay, A.A., 2009. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma* 151, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.03.007>.
- Wetzstein, H.G., Stadler, M., Tichy, H.V., Dalhoff, A., Karl, W., 1999. Degradation of ciprofloxacin by basidiomycetes and identification of metabolites generated by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (4), 1556–1563.
- Zarfl, C., Klasmeier, J., Matthies, M., 2009. A conceptual model describing the fate of sulfadiazine and its metabolites observed in manure-amended soils. *Chemosphere* 77 (6), 720–726. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.035>.
- Zhang, Y., Hu, S., Zhang, H., Shen, G., Yuan, Z., Zhang, W., 2017. Degradation kinetics and mechanism of sulfadiazine and sulfamethoxazole in an agricultural soil system with manure application. *Sci. Total Environ.* 607–608, 1348–1356. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.08>.

4.4 Complément de la section de l'article : 3.1.4. Comparison between SMX and N-ac-SMX at d3 and d156

Ce complément vise à apporter des données qualitatives supplémentaires pour la comparaison des bilans du SMX et du N-ac-SMX à J3 et J156, en s'appuyant sur des tableaux i) de valeurs exprimées en pourcentage du ^{14}C mesuré et ii) de rapport entre les pourcentages de ^{14}C -SMX et ^{14}C -N-ac-SMX, dans les fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, et non-extractibles, dans les sols T, DVB et FUM, à J3 et J156.

4.4.1 Comparaison des bilans ^{14}C du SMX et du N-ac-SMX à J3

La fraction HPCD du SMX est inférieure de 0.7 à 0.9 fois à la fraction facilement extractible du N-ac-SMX (Tableau 18).

La minéralisation après 3 jours est très faible, de 1.1% (DVB) à 1.6% (T) pour SMX, et de 2.1% (DVB) à 3% (T) pour N-ac-SMX, mais est environ deux fois plus faible pour le SMX que pour le N-ac-SMX (Tableau 17).

Pour SMX comme pour N-ac-SMX, la radioactivité est majoritairement présente dans les fractions difficilement extractibles et non extractibles (Tableau 17). Ces fractions représentent à elles deux pour les trois sols de 77.5% (T) à 80.4% (FUM) pour le SMX, et de 72.1% (FUM) à 73.5% (T) pour le N-ac-SMX. La fraction difficilement extractible du SMX est 0,6 à 0,7 fois inférieure à la fraction difficilement extractible du N-ac-SMX, et la fraction non extractible est supérieure à celle du N-ac-SMX de 1.4 à 1.6 fois (Tableau 18). Ainsi, dès les trois premiers jours d'incubation, le SMX est plus fortement adsorbé et moins biodisponible pour la biodégradation que le N-ac-SMX, ce qui est cohérent avec la minéralisation plus faible du SMX.

La répartition du ^{14}C est globalement similaire dans les sols T, DVB et FUM, pour SMX et N-ac-SMX (Tableau 17). Toutefois, la minéralisation des deux molécules est plus faible dans le sol DVB. Par ailleurs pour SMX seulement, le sol FUM se distingue par sa fraction non extractible significativement supérieure, indiquant une affinité plus forte du SMX ou de ses produits de dégradations aux constituants de ce sol dès les premiers jours (Tableau 17).

Tableau 17 : Comparaison des valeurs exprimées en % du ^{14}C mesuré (bilan à 100%), des fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, et non extractibles, entre SMX et N-ac-SMX, dans les sols T, DVB et FUM après 3 jours d'incubation.

| % ^{14}C | Fraction minéralisée | | Fraction extractible HPCD | | Fraction extractible MeCN | | Fraction non extractible | |
|-------------------|----------------------|----------|---------------------------|----------|---------------------------|----------|--------------------------|----------|
| | SMX | N-ac-SMX | SMX | N-ac-SMX | SMX | N-ac-SMX | SMX | N-ac-SMX |
| J3 | | | | | | | | |
| T | 1.7 | 3.0 | 20.8 | 22.9 | 26.4 | 36.3 | 51.1 | 37.1 |
| DVB | 1.1 | 2.1 | 20.9 | 25.6 | 27.3 | 37.3 | 50.8 | 35.0 |
| FUM | 1.7 | 2.7 | 17.9 | 25.1 | 21.3 | 34.4 | 59.1 | 37.7 |

Tableau 18 : Rapport entre les pourcentages de ^{14}C -SMX et ^{14}C -N-ac-SMX dans les fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, et non-extractibles à J3.

* signifie que les pourcentages de radioactivité dans les fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, et non-extractibles sont significativement différentes entre SMX et N-ac-SMX.

| SMX/N-ac-SMX J3 | Fraction minéralisée | Fraction extractible HPCD | Fraction extractible MeCN | Fraction non extractible |
|--------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| T | 0.56 * | 0.91 * | 0.73 * | 1.35 * |
| DVB | 0.48 * | 0.82 * | 0.73 * | 1.45 * |
| FUM | 0.62 * | 0.71 * | 0.62 * | 1.57 * |

4.4.2 Comparaison des bilans ^{14}C du SMX et du N-ac-SMX à J156

Entre J3 et J156, la fraction facilement extractible diminue pour les deux molécules, passant pour le SMX de 17.9 – 20.9% à 6.1 – 7.2% et pour le N-ac-SMX de 22.9 – 25.6% à 6.3 – 7.3% (Tableau 19). La diminution est plus importante pour N-ac-SMX, si bien que le rapport de ces fractions entre le SMX et N-ac-SMX passe de 0.7-0.9 à J3 (Tableau 18) à 1.1 environ à J156 (Tableau 20).

La fraction minéralisée des deux molécules augmente, et celle du N-ac-SMX reste supérieure à celle du SMX (Tableau 20).

La fraction difficilement extractible augmente très faiblement pour le SMX, passant de 21.3 – 27.3% à 24.1 – 28.7%, alors qu'elle diminue pour N-ac-SMX, passant de 34.4 – 37.3% à 21.2 – 30.6% (Tableau 19) si bien que les différences observées à J3 entre les 2 molécules pour cette fraction disparaissent à J156. Les fractions MeCN deviennent similaires à J156, dans chaque sol (Tableau 19).

La fraction non extractible de SMX ne varie pas significativement entre J3 à J156, alors que celle de N-ac-SMX augmente de 35.0 – 37.7% à 49.7 à 60.1% (Tableau 19). Cette fraction est similaire pour SMX et N-ac-SMX dans les sols DVB et FUM, et 1.1 fois supérieure pour le N-ac-SMX par rapport au SMX uniquement dans le sol T (Tableau 20). La fraction non extractible est la fraction majoritaire à J156 et représente au minimum 50% du ^{14}C mesuré.

On peut donc considérer qu'au bout de 156 jours, le ^{14}C en provenance du SMX et du N-ac-SMX se répartit de manière similaire dans les différentes fractions étudiées, malgré des comportements différents en début d'incubation. Seule la fraction minéralisée du N-ac-SMX demeure supérieure à celle du SMX en fin d'incubation.

Le devenir du SMX et N-ac-SMX varie dans les sols T, DVB et FUM. Comparé aux sols amendés, le sol T présente la fraction minéralisée la plus élevée pour SMX et N-ac-SMX, et la fraction difficilement extractible la plus élevée pour N-ac-SMX (Tableau 19). Le sol DVB présente la fraction minéralisée la plus faible pour SMX et N-ac-SMX, et la fraction facilement extractible la plus élevée pour SMX (Tableau 19). Le sol FUM présente la fraction difficilement extractible la plus faible pour SMX et N-ac-SMX, et la fraction non extractible la plus élevée pour N-ac-SMX (Tableau 19).

Tableau 19 : Comparaison des valeurs exprimées en % du ¹⁴C mesuré (bilan à 100%), des fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, et non extractibles, entre SMX et N-ac-SMX, dans les sols T, DVB et FUM après 156 jours d'incubation.

| % ¹⁴ C J156 | Fraction minéralisée | | Fraction extractible HPCD | | Fraction extractible MeCN | | Fraction non extractible | |
|---------------------------|----------------------|----------|---------------------------|----------|---------------------------|----------|--------------------------|----------|
| | SMX | N-ac-SMX | SMX | N-ac-SMX | SMX | N-ac-SMX | SMX | N-ac-SMX |
| T | 11.5 | 13.3 | 6.1 | 6.5 | 28.7 | 30.6 | 53.6 | 49.7 |
| DVB | 7.4 | 10.0 | 7.7 | 7.3 | 28.3 | 26.9 | 56.6 | 55.9 |
| FUM | 11.0 | 12.4 | 7.2 | 6.3 | 24.1 | 21.2 | 57.7 | 60.1 |

Tableau 20 : Rapport entre les pourcentages de ¹⁴C-SMX et ¹⁴C-N-ac-SMX dans les fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, et non-extractibles à J156.

* signifie que les pourcentages de radioactivité dans les fractions minéralisées, facilement extractibles HPCD, difficilement extractibles MeCN, ou non-extractibles sont significativement différentes pour SMX et N-ac-SMX.

| SMX/N-ac-SMX J156 | Fraction minéralisée | Fraction extractible HPCD | Fraction extractible MeCN | Fraction non extractible |
|----------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| T | 0.9 * | 1.0 | 0.9 | 1.1 * |
| DVB | 0.7 * | 1.1 * | 1.1 | 1.0 |
| FUM | 0.9 | 1.1 * | 1.1 | 1.0 |

4.5 Conclusion sur le devenir de 3 antibiotiques apportés seuls dans des sols régulièrement amendés ou non amendés par des PRO

La minéralisation des sulfonamides étudiés est de l'ordre de 10% après 156 jours. Du fait d'une adsorption plus faible, la minéralisation de N-ac-SMX est significativement supérieure à celle de SMX et les différences sont générées dès le début de l'incubation. Le N-ac-SMX est également rapidement dé-acétylé et transformé en SMX, ce qui explique qu'après 156 jours, les bilans ^{14}C dans les fractions facilement et difficilement extractibles et non extractibles soient similaires pour SMX et N-ac-SMX. Globalement les différences entre ces deux sulfonamides restent donc faibles.

La minéralisation des fluoroquinolones et plus spécifiquement de la CIP est négligeable après 156 jours du fait d'une adsorption très forte et très rapide et de la formation de résidus non extractibles.

Les mécanismes d'adsorption des sulfonamides et des fluoroquinolones diffèrent du fait de leur spéciation chimique : la forme cationique des fluoroquinolones favorise une adsorption plus rapide et plus importante que la forme anionique ou neutre des sulfonamides dans les gammes de pH des sols étudiés.

Quelles que soient les molécules, les résidus non extractibles sont majoritaires en fin d'incubation et peuvent être d'origine biotique ou abiotique

Le devenir des ATB est impacté par des apports réguliers de PRO et par la nature de la MO des PRO. L'apport régulier de PRO favorise l'adsorption des molécules dans les sols et diminue leur biodégradation. Dans le sol DVB, la minéralisation est diminuée et la fraction difficilement extractible favorisée. Le sol FUM favorise la formation de résidus non extractibles.

A partir de ces résultats, nous avons fait le choix de ne conserver que le sol témoin pour lequel la minéralisation des sulfonamides était maximale pour l'étude des effets et du devenir des ATB en mélanges.

**V : EFFET
DES ANTIBIOTIQUES
SMX ET CIP
APPORTES SEULS
SUR LES MICROORGANISMES
DU SOL ET LEURS ACTIVITES DE
MINERALISATION C ET N**

5 EFFET DES ANTIBIOTIQUES SMX ET CIP APPORTES SEULS SUR LES MICROORGANISMES DU SOL ET LEURS ACTIVITES DE MINERALISATION C ET N

5.1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est de mieux appréhender les impacts de deux antibiotiques, le sulfaméthoxazole et la ciprofloxacine, apportés seuls au sol, au mode d'action différent, sur les microorganismes du sol (biomasse microbienne totale et biomasse fongique), et leurs activités globales de minéralisation du carbone et de l'azote. Le SMX a un effet bactériostatique. Il inhibe la croissance de certaines bactéries cibles en empêchant la synthèse de l'acide folique (Madigan et al., 2009), sans effet létal. La CIP a en revanche un effet bactéricide. Elle inhibe l'ADN gyrase, ce qui entraîne la mort des bactéries (Córdova-Kreylos et Scow, 2007). Le SMX et la CIP n'affectent que les bactéries en croissance et n'ont pas d'effet sur les bactéries dormantes qui représentent la majorité des microorganismes du sol (Stenström et al., 2001).

Un des facteurs importants régissant l'impact des antibiotiques dans le sol est la dose appliquée (Cui et al., 2014). Si la concentration engagée est suffisamment forte, plusieurs effets peuvent être observés sur la biomasse microbienne et ses activités : diminution de la biomasse microbienne totale sous l'effet inhibiteur de la croissance bactérienne du SMX (Demoling et al., 2009), ou effet létal de la CIP sur les bactéries (Naslund et al., 2008). Mais la biomasse totale peut aussi augmenter, du fait de l'augmentation de la biomasse fongique qui utilise comme substrat pour sa croissance les bactéries mortes intoxiquées (Kotzerke et al., 2011b). L'augmentation de la biomasse microbienne totale peut aussi provenir de la prolifération de bactéries résistantes aux ATB (Patten et al., 1980). Ces impacts sur la biomasse bactérienne peuvent entraîner i) une diminution de la respiration totale (Naslund et al., 2008 ; Zielezny et al., 2006 ; Kotzerke et al., 2008), ii) une augmentation, en réponse au stress causé par les antibiotiques, ou en conséquence d'un développement de bactéries résistantes (Patten et al., 1980) ou iii) n'avoir aucun effet sur la minéralisation de C et de N du fait d'une redondance fonctionnelle (Ding et He, 2010 ; Murray, 1997).

Une absence d'effet peut être due à une concentration initiale d'ATB trop faible ou une "inactivation" des ATB du fait de l'adsorption des antibiotiques (Girardi et al., 2011), ce qui se traduirait suivant sa vitesse, par une absence d'effet ou une diminution dans le temps de l'impact des antibiotiques, respectivement attendues pour la CIP et le SMX au vu de leur devenir étudié au chapitre 4. La diminution d'effet dans le temps pourrait également provenir de la biodégradation des antibiotiques par les microorganismes, totale ou partielle, si les métabolites produits ne sont pas plus toxiques que la molécule mère, comme ce peut être le cas pour le SMX (Zhang et al., 2017) et la CIP (Liao et al., 2016).

Aux doses étudiées, les résultats délivreront aussi des informations quant au risque potentiel de la présence de ces deux antibiotiques dans les sols agricoles.

Ainsi ce chapitre vise à répondre aux questions suivantes :

- i) L'apport d'antibiotiques à des doses environnementales impacte-t-il les microorganismes du sol et leur fonction de minéralisation du C et de N ?
- ii) Y-at-il un effet molécule d'antibiotiques SMX ou CIP du fait des modes d'action différents ?

5.2 Matériels et méthodes

Les ATB et sols étudiés ainsi que les mesures réalisées dans ce chapitre sont résumés sur la Figure 19.

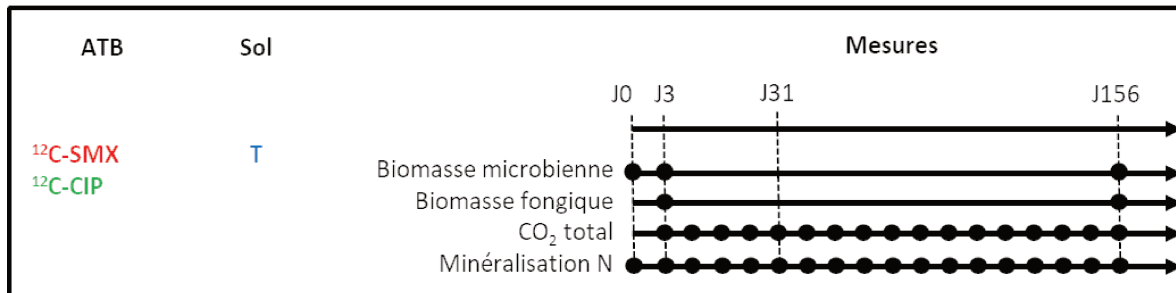


Figure 19 : Schéma récapitulatif des expérimentations du chapitre 5.

5.3 Résultats

5.3.1 Biomasse microbienne totale

Dans le sol non traité aux antibiotiques (\emptyset), la biomasse microbienne n'évolue pas entre J0 et J3 (J0 : 135 mg C.kg⁻¹ ; J3 : 130 mg C.kg⁻¹) puis diminue au cours du temps pour atteindre une valeur de 72 mg C.kg⁻¹ après 156 jours (Figure 20).

A J3, la biomasse microbienne dans le sol traité au sulfaméthoxazole (SMX ; 113 mg C.kg⁻¹) est légèrement inférieure à celle du sol non traité aux antibiotiques (\emptyset ; 130 mg C.kg⁻¹), le sol ayant reçu la ciprofloxacine donnant une valeur intermédiaire (CIP : 122 mg C.kg⁻¹). Cette différence disparaît par la suite, la biomasse microbienne devenant non significativement différente dans le sol non traité \emptyset , traité au SMX ou à la CIP à J31 (respectivement 109 mg C.kg⁻¹ ; 110 mg C.kg⁻¹ ; 108 mg C.kg⁻¹) et à J156 (respectivement 72 mg C.kg⁻¹ ; 77 mg C.kg⁻¹ ; 75 mg C.kg⁻¹). L'apport d'antibiotiques dans les sols affecte très peu (et de manière très transitoire) la biomasse microbienne totale.

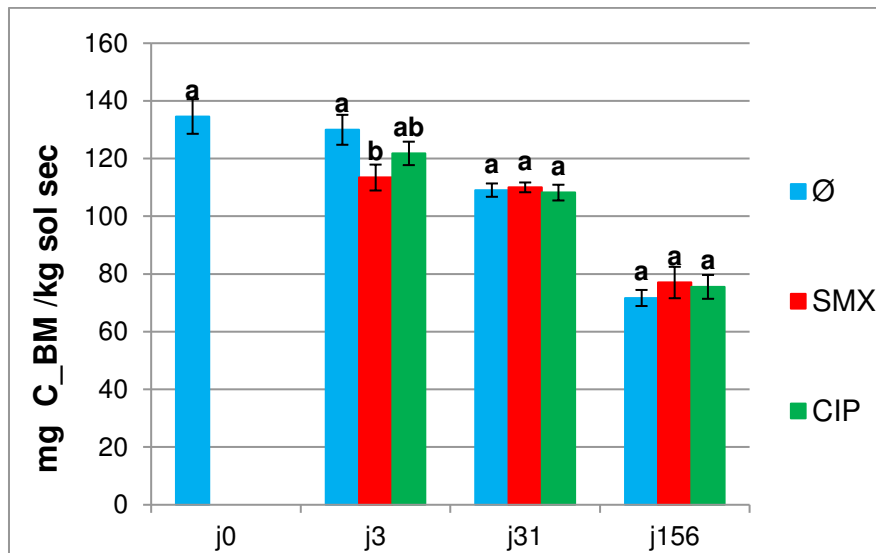


Figure 20 : Biomasse microbienne (BM) dans le sol témoin de Qualiagro non traité aux antibiotiques (\emptyset), traité au sulfaméthoxazole (SMX), ou à la ciprofloxacine (CIP), à J0 pour le sol non traité, et J3, J31 et J156 pour les sols traités ou non. Traitements statistiques par date, ou pour J0 et J3 rassemblés.

5.3.2 Biomasse fongique

Comme la biomasse microbienne, la biomasse fongique dans le sol non traité diminue au cours du temps avec une diminution de 36% entre J3 et J156 (Figure 21). La biomasse fongique dans les sols traités aux ATB suit la même tendance que dans le sol non traité (SMX : - 32%, et CIP : - 35% entre J3 et J156). Nous n'avons pas observé de différence significative entre les sols traités et non traités à chacune des dates d'analyse.

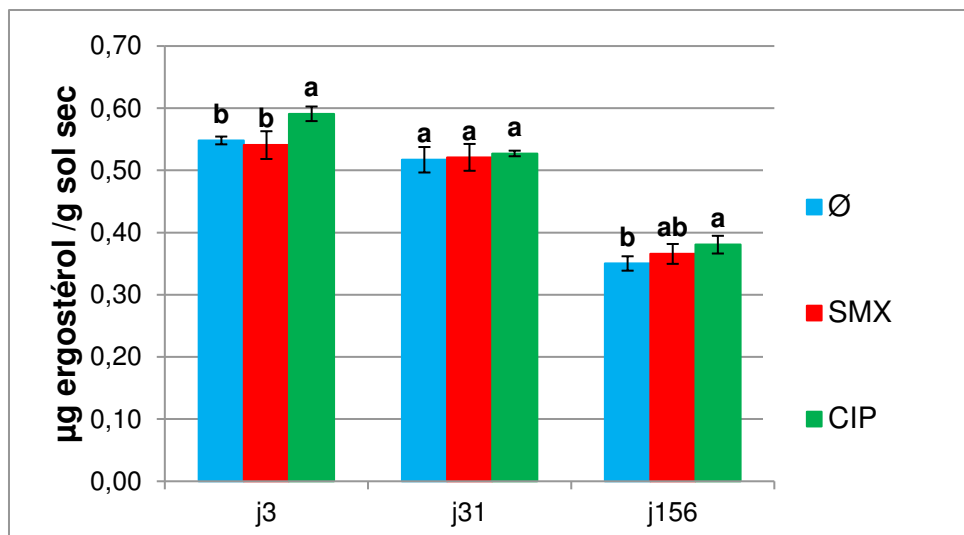


Figure 21 : Biomasse fongique dans le sol témoin de Qualiagro non traité aux antibiotiques (Ø), traité au sulfaméthoxazole (SMX), ou à la ciprofloxacine (CIP), à J3, J31 et J156. Traitements statistiques par date.

5.3.3 Respiration totale

La respiration totale cumulée augmente linéairement au cours du temps dans les 3 sols. A J156, la respiration rapportée à la teneur en C initiale du sol est similaire dans les 3 traitements et varie entre 4.5 et 5% (Figure 22). L'apport d'antibiotiques à des doses environnementales n'affecte pas la minéralisation du carbone dans ce sol.

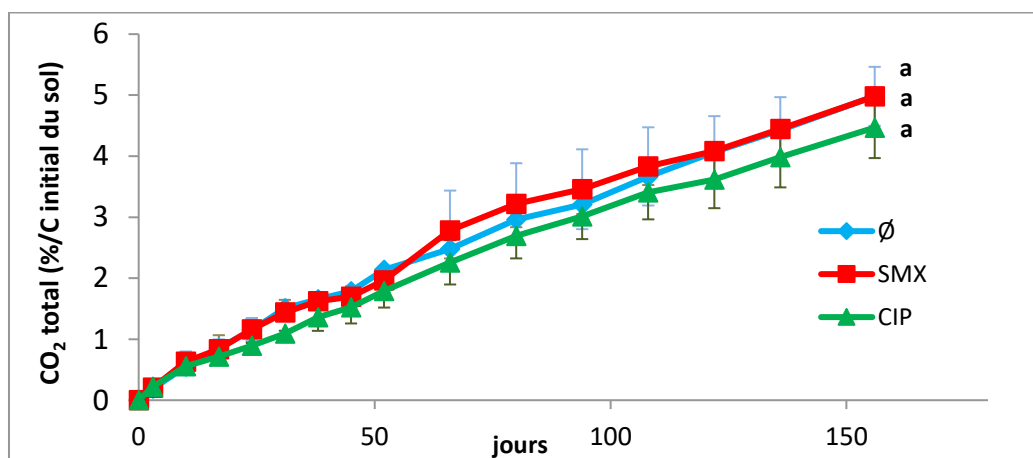


Figure 22 : Cinétiques de respiration carbonée totale dans le sol témoin QualiAgro non traité aux antibiotiques (Ø), traité au sulfaméthoxazole (SMX) ou à la ciprofloxacine (CIP). Traitements statistiques à J156.

5.3.4 Minéralisation de N

La minéralisation de l'azote augmente au cours du temps dans les 3 traitements sans atteindre de plateau. A J156, la minéralisation azotée exprimée par rapport à l'azote total du sol (Figure 23) est similaire dans le sol non traité Ø, traité au SMX ou à la CIP (respectivement 4.2%, 4.3% et 4.4%). L'apport d'antibiotique n'affecte pas l'activité microbienne de minéralisation de l'azote dans le sol.

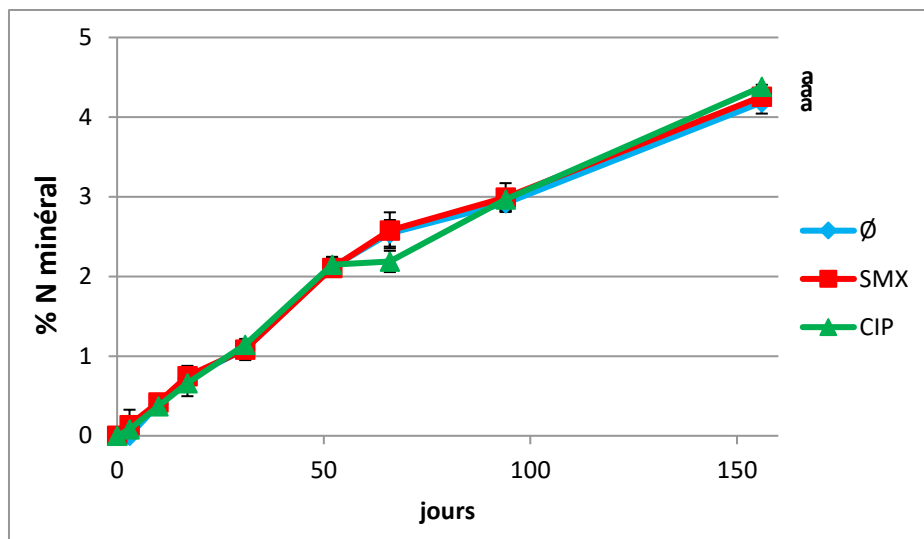


Figure 23 : Cinétiques de minéralisation de N dans le sol témoin de QualiAgro non traité aux antibiotiques (Ø), traité au sulfaméthoxazole (SMX) ou à la ciprofloxacine (CIP). Traitements statistiques à J156.

5.4 Discussion

Les résultats relatifs à l'effet des ATB sur les microorganismes du sol et leurs activités présentés dans la littérature sont contrastés (pas d'effet, effets inhibiteurs, effets stimulants). Accinelli et al. (2007) n'ont pas observé d'effet sur la structure des communautés à la suite d'un apport de sulfaméthazine ou de sulfachloropyridine (jusqu'à $100 \mu\text{g.g}^{-1}$). De même, Hammesfahr et al. (2011) n'ont pas observé d'impact de la sulfadiazine sur la biomasse microbienne totale (PLFA totaux) et la respiration basale alors que dans les travaux de Kotzerke et al. (2008), le même ATB a été à l'origine d'une diminution de la production de CO_2 . D'autres travaux ont montré un effet des ATB sur la biomasse microbienne totale, la structure des communautés et notamment sur le ratio bactéries/champignons et sur leurs activités réelles ou potentielles (Demoling et al., 2009 avec le SMX ($0.1 - 500 \text{ mg.kg}^{-1}$); Zielezny, et al., 2006 avec la sulfadiazine et la chlorotétracycline ($1 - 50 \text{ mg.kg}^{-1}$); Ding et He, 2010; Gutiérrez, et al, 2010 avec 3 sulfonamides : la sulfamidéthoxine, le sulfaméthoxazole et la sulfaméthazine ($0 - 900 \text{ mg.kg}^{-1}$); Thiele-Bruhn et Beck, 2005 avec la sulfapyridine et l'oxytétracycline ($10 - 1000 \text{ mg.kg}^{-1}$). Liu et al. (2009) ont mis en évidence des effets de deux sulfonamides (sulfaméthoxazole et sulfaméthazine) et du triméthoprime sur la respiration du sol alors que des ATB comme la tétracycline, la chlortétracycline et la tylosine n'avaient que peu d'effet. Une augmentation de la respiration a également été mise en évidence dans certains travaux après application de sulfonamides et d'aminosides (Ingerslev et Halling-Sørensen, 2000; Halling-Sørensen et al., 2003).

Dans notre étude, l'effet bactériostatique du sulfaméthoxazole ou bactéricide de la ciprofloxacine n'ont pas eu d'impact, ni sur les biomasses fongiques, ni sur les activités de minéralisation du carbone ou d'azote. Seul un effet inhibiteur très transitoire du SMX sur la biomasse microbienne totale a été observé à J3. La biomasse fongique n'ayant pas été impactée, la diminution de la biomasse totale est certainement due à une diminution de la biomasse bactérienne.

En fonction des caractéristiques de la microflore (proportion de microorganismes dégradants, tolérants, résistants), des propriétés des ATB et de leur devenir dans les sols (adsorption, biodégradation plus ou moins complète qui vont impacter la biodisponibilité), les effets des ATB dans les sols peuvent s'exercer sur des durées plus ou moins longues.

Généralement, les effets des antibiotiques sur les microorganismes ne s'observent que sur un court laps de temps. Reichel et al. (2013) qui se sont intéressés aux effets de lisiers de porc traités à la sulfadiazine et à la difloxacin sur la structure des communautés microbiennes d'un sol amendé, ont observé un appauvrissement en bactéries G⁺ et en champignons par rapport au sol témoin dès le 14^{ème} jour d'incubation. Mais ces effets n'ont pas perduré au-delà du 42^{ème} jour. Dans l'étude de Kotzerke et al. (2008), deux concentrations de sulfadiazine (10 et 100 mg.kg⁻¹) ont eu un effet inhibiteur sur la respiration totale, effet qui a totalement disparu au bout de 32 jours. De même, la diminution de la biomasse totale en présence d'oxytétracycline et de sulfaméthoxazole, 0-100 mg.kg⁻¹ (Molaei et al., 2017) ou la diminution de la respiration totale en présence de sulfaméthoxazole, de sulfaméthazine et de triméthoprime, 0-300 mg.kg⁻¹ (Liu et al., 2009) s'est estompée rapidement après quelques jours. Les effets délétères de la ciprofloxacines (de 0.2 à 100 µg.g⁻¹) sur la respiration totale et la nitrification potentielle, ne perdurent pas au-delà d'un mois (Girardi et al., 2011, Cui et al., 2014).

Ces résultats indiquent que, pour observer un effet des antibiotiques sur les microorganismes, les mesures doivent être effectuées particulièrement dans le premier mois suivant l'introduction des antibiotiques dans le sol. Or dans notre étude, l'effet du SMX sur la biomasse microbienne totale a été très transitoire et a disparu après 3 jours, ce qui permet de considérer que globalement les deux antibiotiques n'affectent pas les microorganismes et leurs activités aux doses utilisées.

Une première hypothèse est que la concentration initiale des antibiotiques dans la solution du sol était insuffisante pour impacter les microorganismes du sol et leurs activités de minéralisation de C et N. En effet la toxicité des antibiotiques est étroitement liée à un effet dose (Cui et al., 2014). Accinelli et al. (2007) n'ont pas observé d'impact de sulfaméthazine et sulfachoropyridine jusqu'à 100 µg.g⁻¹ sur la diversité microbienne du sol (PCR-DGGE) et sur les activités de minéralisation du glucose et du glyphosate. Demoling et al., (2009) n'ont observé aucun effet du SMX à des concentrations inférieures à 1 µg.g⁻¹ sur les bactéries. Seules de plus fortes concentrations, 20 et 500 µg.g⁻¹, inhibaient la croissance bactérienne et changeaient la structure de la communauté. Liu et al. (2009) ont montré que la respiration du sol diminuait d'autant plus que la concentration en SMX, sulfaméthazine et triméthoprime était importante. L'effet du SMX sur la respiration basale du sol était observable uniquement à partir de 10 mg.kg⁻¹. Concernant les fluoroquinolones, la respiration totale et la nitrification potentielle diminuaient avec l'augmentation des doses de ciprofloxacine (de 0.2 à 100 µg.g⁻¹) (Girardi et al., 2011, Cui et al., 2014). Ces différents résultats sont donc cohérents avec ceux observés dans cette étude et suggèrent qu'il faut des concentrations en ATB bien supérieures aux concentrations environnementales testées dans cette étude (0.02 µg.g⁻¹ et 0.15 µg.g⁻¹ respectivement pour SMX et CIP) pour observer des effets. En effet, les concentrations environnementales sont généralement inférieures à la CMI (capacité minimale d'inhibition), rendant la probabilité d'engendrer des effets toxiques négligeable (Harris et al., 2013).

Des effets à faibles doses ont toutefois été observés dans quelques études sur des activités très spécifiques. Toth et al. (2011) ont observé durant 8 jours un effet inhibiteur sur la nitrification de la sulfadiméthoxine aux concentrations 0.025 et 0.05 µg.g⁻¹. Yang et

al.(2012) ont suggéré que la norfloxacine pouvait avoir de faibles effets sur les activités microbiennes à la concentration environnementale ($<1 \mu\text{g.g}^{-1}$).

Une seconde hypothèse est que la concentration en antibiotiques dans la solution du sol devient rapidement insuffisante du fait i) de l'adsorption des antibiotiques ou ii) de leur biodégradation, totale ou partielle, par les microorganismes.

La sorption des ATB et de leurs produits de dégradation est l'un des principaux mécanismes contrôlant la toxicité par la réduction de la biodisponibilité (Girardi et al., 2011). ThieleBrünn et Beck (2005) ont observé que les effets des ATB étaient retardés et diminués lorsqu'ils étaient adsorbés par rapport aux effets lorsqu'ils sont dans la solution du sol. Kotzerke et al. (2011b) ont montré que l'impact de la difloxacine apportée à forte dose ($100 \mu\text{g.g}^{-1}$) était quasi négligeable sur la biomasse totale, la structure des communautés microbiennes, la respiration et la dénitrification du fait entre autres de sa forte et rapide adsorption sur les particules du sol. Dans notre étude, au bout de 3 jours la disponibilité a diminué de 80% pour le SMX, et de plus de 95% pour la CIP (20% et 4% du ^{14}C dans la fraction HPCD pour SMX et CIP respectivement à J3). Si les deux antibiotiques s'adsorbent vite et fortement au sol, le SMX s'adsorbe moins que la CIP et reste disponible tout au long de l'incubation, tandis que la fraction de CIP disponible est très faible dès le début de l'incubation et devient ensuite négligeable (6% et 2% du ^{14}C dans la fraction HPCD pour SMX et CIP respectivement à J156). L'impact potentiel des antibiotiques sur les bactéries serait donc faible pour le SMX, et quasi nul pour la CIP dès le début de l'incubation, et l'impact du SMX diminuerait avec le temps à mesure de sa dégradation et de son adsorption.

Cependant, certains auteurs ont observé des effets différents. Hammesfahr et al. (2011) ont montré que l'effet antibactérien des sulfonamides augmentait après plusieurs semaines d'incubation malgré la réduction de la biodisponibilité des antibiotiques en dessous de la limite de détection. Ils ont attribué ce résultat à une remobilisation des antibiotiques, induite par la dégradation microbienne de la MO. Dans l'étude de Thiele-Bruhn et Beck (2005), alors que la sulfapyridine ($1 \mu\text{g.g}^{-1}$) n'était plus détectable au bout de 14 jours, ses effets sur la diminution de la biomasse microbienne étaient toujours visibles. Facilement adsorbée à la matrice du sol, la ciprofloxacine peut conserver son efficacité, même à une concentration similaire à celle de notre étude $0.2 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Girardi et al., 2011). Les antibiotiques adsorbés peuvent exercer leurs effets notamment lorsqu'ils sont adsorbés conjointement avec les microorganismes sur les mêmes surfaces (Reichel et al., 2013). Ainsi, on notera toutefois que même adsorbés, les antibiotiques peuvent conserver une efficacité.

La dégradation des ATB par co-métabolisme ou dégradation spécifique peut conduire à une dégradation totale ou partielle des ATB, en particulier dans la solution du sol. Par conséquent, la concentration des ATB diminue, induisant à priori une diminution de leurs effets toxiques. Cependant, dans notre étude la minéralisation du SMX est faible, de l'ordre de 10% (Chapitre 4) et celle de la CIP est négligeable en fin d'incubation. De plus les métabolites produits peuvent dans certains cas, être plus ou moins toxiques que la molécule mère (Kotzerke et al., 2008). Des métabolites plus toxiques que la molécule parentale ont été décrits par exemple pour des sulfonamides tels que la sulfadiazine (Reichel et al., 2013) et la sulfapyridine (García-Galán et al. 2012). Les résultats de Zhang et al. (2017) révèlent que les produits de transformation du sulfaméthoxazole peuvent aussi être plus toxiques que la molécule mère. On peut alors supposer que les métabolites du SMX mis en évidence par

nos mesures, pourraient aussi affecter les populations microbiennes. Par ailleurs Liao et al. (2016) ont montré que les produits de dégradation de la CIP changeaient la structure des communautés microbiennes, indiquant un effet toxique des métabolites de la CIP sur certaines espèces bactériennes. Ainsi dans notre étude il n'est pas exclu que les produits de dégradation du SMX et de la CIP affectent la biodiversité même si la biomasse totale n'est pas affectée.

Les microorganismes pourraient également avoir développé des mécanismes de tolérance (Gao et Pedersen, 2010) ou de résistance pour survivre et se développer en présence d'ATB. Hammesfahr et al. (2011) ont observé que les effets de la sulfadiazine apporté via un fumier sur les bactéries nitrifiantes étaient plus modérés lorsque le fumier était préalablement stocké avant son apport au sol, le stockage ayant favorisé le développement de bactéries résistantes à l'ATB. Des gènes de résistances à la sulfadiazine ont pu être détectés dans les sols durant plus de deux mois après épandage du fumier. Girardi et al. (2011), ont également mis en évidence la présence du gène de résistance *qnrS* dans des échantillons de sol traité avec de la CIP (0.2, 2 et 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) entre le 14^{ème} et le 113^{ème} jour d'incubation. Cui et al. (2014) supposent que les bactéries résistantes sont capables d'utiliser la CIP ou la biomasse morte comme substrat organique pour leur croissance.

Enfin, l'absence d'effet observé sur des mesures très globales peut être due à la redondance fonctionnelle des microorganismes. Par exemple, les sulfonamides et les fluoroquinolones présents à des doses environnementales n'inhibent pas les archaea ou les champignons (Kotzerke et al., 2008 ; Girardi et al., 2011), qui sont capables de compenser les fonctions bactériennes perturbées par les antibiotiques, rendant non observables les effets sur la minéralisation du C et de l'azote.

5.5 Conclusion

La diversité des conditions testées (nature des ATB, concentration, type de sol...) et des méthodes utilisées peuvent expliquer la grande diversité des résultats présents dans la littérature. Dans notre cas, quasiment aucun effet n'a été observé après apport de SMX ou CIP sur la biomasse microbienne, la biomasse fongique et la minéralisation du carbone et de l'azote. L'absence d'effet est principalement attribuée à la concentration environnementale engagée, trop faible pour qu'un effet soit observable. Il n'a donc pas été possible de statuer sur un effet molécule d'antibiotique. Deux hypothèses sont retenues : i) soit la concentration initiale des antibiotiques dans la solution du sol était insuffisante pour exercer un quelconque effet, la majeure partie des publications indiquant des doses minimales d'effets plus élevées ; ii) soit la forte et rapide adsorption des antibiotiques rend insuffisante les concentrations qui initialement étaient biodisponibles aux microorganismes, puisque les ATB ont été apportés directement en solution sur les sols. Plus globalement, la présence de ces deux antibiotiques à des doses environnementales ne devrait pas affecter à priori pas le fonctionnement des sols agricoles.

**VI : DEVENIR
DES SULFONAMIDES
SMX ET N-AC-SMX
APPORTES EN MELANGE
AVEC DE LA CIP, ET/OU
EN PRESENCE DE METAUX
A FAIBLE OU FORTE DOSE**

6 DEVENIR DES SULFONAMIDES SMX ET N-AC-SMX APPORTES EN MELANGE AVEC DE LA CIP, ET/OU EN PRESENCE DE METAUX A FAIBLE OU FORTE DOSE

6.1 Introduction

Le devenir des ATB en mélange avec d'autres contaminants conditionne leurs impacts sur le fonctionnement biologique du sol. Ce chapitre a pour objectif d'étudier le devenir du SMX et du N-ac-SMX en mélange avec un autre ATB, la ciprofloxacine et/ou avec des ETM (Cu+Zn).

Peu d'études abordent les effets cocktails ATB + ATB ou ATB + ETM sur le devenir des antibiotiques. Les quelques résultats sur les effets cocktails ATB + ATB sont contrastés : le mélange peut augmenter la dissipation des antibiotiques (Ma et al., 2014), ou bien ne pas avoir d'effet (Fang et al., 2014), les facteurs explicatifs demeurant à ce jour incertains. Les mécanismes en jeu dans l'impact de cocktails ATB + ETM sur le devenir des ATB sont un peu mieux connus. La présence d'éléments traces métalliques peut moduler le devenir des ATB, en augmentant leur adsorption sur les constituants du sol par la formation de complexes (Morel et al., 2014 ; Pan et al., 2012), ou en augmentant leur biodisponibilité, par compétitions électrostatiques sur les sites de fixation (Pei et al., 2014).

Nous nous sommes focalisés sur le devenir des sulfonamides, à savoir le SMX et le N-ac-SMX, la CIP s'adsorbant très fortement et très rapidement dans les sols (cf chapitre 4).

L'effet cocktail ATB + ATB est testé en mélangeant les molécules marquées ^{14}C -SMX ou ^{14}C -N-ac-SMX pour suivre spécifiquement leur devenir respectif, avec la molécule ^{12}C -CIP non marquée.

L'effet métaux ainsi qu'un effet dose de métaux ont été testés en mélangeant les molécules marquées ^{14}C -SMX ou ^{14}C -N-ac-SMX, avec une solution de cuivre et zinc, suivant deux doses, une dose réaliste ETMx1 et une dose 5 fois plus concentrée ETMx5. Le cuivre et le zinc sont les métaux dont les teneurs augmentent le plus couramment dans les sols recevant des produits résidus organiques, et leur comportement est différent dans les sols. Le Zn est mobile sous forme de cation libre dans la solution du sol, tandis que le cuivre a une affinité forte pour les constituants du sol (Chaudri et al., 2000).

Enfin l'effet cocktail est complexifié en ajoutant en parallèle la ^{12}C -CIP aux deux doses de métaux.

Pour mettre en évidence des effets cocktails sur le devenir des ATB, les résultats de ce chapitre ont été comparés à ceux au chapitre 4.

Les hypothèses à tester sont que :

- i) Le devenir des antibiotiques est différent lorsqu'ils sont apportés seuls ou en mélange avec d'autres contaminants du fait des interactions entre contaminants qui peuvent être de 2 types :
 - de nature biologique : les autres contaminants inhibent l'activité des microorganismes dégradant les sulfonamides (SMX ou N-ac-SMX)

- de nature physicochimique : les métaux en particulier forment des complexes avec les sulfonamides ou plus généralement modifient les conditions physico-chimiques du milieu (pH, force ionique, propriétés de surface des constituants du sol).
- ii) Les effets augmentent avec la concentration en métaux ;
- iii) Les effets diffèrent suivant l'ATB : molécule mère ou métabolite ;
- iv) Une plus grande complexité des mélanges (sulfonamide + CIP + ETM) augmente la probabilité d'observer des effets de synergie ou d'antagonisme entre contaminants.

6.2 Matériels et méthodes

Les ATB, les conditions étudiées ainsi que les mesures réalisées dans ce chapitre sont résumés sur la Figure 24.

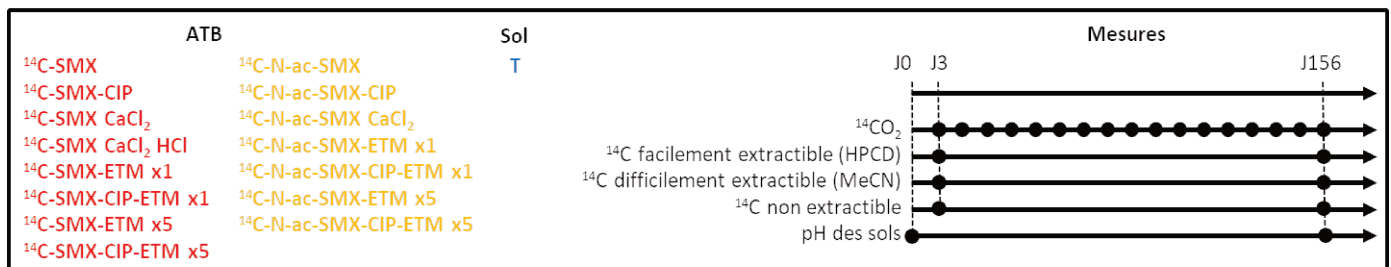


Figure 24 : Schéma récapitulatif des expérimentations du chapitre 6.

Les ATB et les ETM ont été apportés dans les sols de la manière suivante :

- i) pour le cocktail ATB + ATB : $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX}$ + $^{12}\text{C-CIP}$, ont été apportés dans l'eau pure ;
- ii) pour le cocktail ATB + ETM : $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX}$ ont été apportés en mélange avec une solution de sels de chlorure (CuCl_2 + ZnCl_2) aux deux doses ETMx1 et ETMx5 ;
- iii) le cocktail ATB + ATB + ETM correspond au mélange des ATB marqués et non marqués avec les solutions de sel de chlorure : $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX}$ + $^{12}\text{C-CIP}$ + (CuCl_2 + ZnCl_2).

Les concentrations testées sont rappelées dans le Tableau 21. Les valeurs ont été choisies telles que la faible dose de métaux soit du même ordre que celles retrouvées dans des horizons de sols comparables (Baize et al., 2006). Finalement, pour tester l'effet dose de métaux, on dispose d'une dose qui correspond à des concentrations en métaux inférieures aux PNEC (Predicted No Effect Concentration), évaluées par le calculateur Metal_PNECsoil_calculator (Arche-consulting ; Smolders et al 2009) avec $\text{PNEC} = 40 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour le cuivre et $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour le zinc, ainsi que d'une dose 5 fois plus forte, correspondant à des concentrations supérieures aux mêmes PNEC.

Tableau 21 : Concentrations utilisées des antibiotiques ¹⁴C-SMX, ¹⁴C-N-ac-SMX et ¹²C-CIP, ainsi que des éléments traces métalliques Cu et Zn (µg.g⁻¹ sol).

| ¹⁴ C-N-ac-SMX | ¹⁴ C-SMX | ¹² C-CIP | ETMx1 | | ETMx5 | |
|--------------------------|---------------------|---------------------|-------|----|-------|-----|
| | | | Cu | Zn | Cu | Zn |
| 0.02 | 0.02 | 0.15 | 20 | 30 | 100 | 150 |

Des apports d'ETM à fortes concentrations peuvent impacter le pH et la force ionique du sol. Pour différencier les effets ETM des effets pH et force ionique), les ATB ont été apportés dans l'eau ou dans une solution de CaCl₂ acidifiée ou non à l'acide chlorhydrique HCl. Ainsi, les traitements ¹⁴C-SMX (CaCl₂), ¹⁴C-N-ac-SMX (CaCl₂), ¹⁴C-SMX + ETMx1 et ¹⁴C-N-ac-SMX + ETMx1 présentaient des pH similaires. Les solutions de ¹⁴C-SMX (CaCl₂ + HCl) et ¹⁴C-SMX + ETMx5 ont été préparées de manière à ce qu'elles aient un pH et une force ionique similaires.

Le Tableau 22 récapitule les effets pouvant être comparés entre les différents traitements.

Tableau 22 : Effets comparés entre les traitements. ¹⁴C-ATB correspond à ¹⁴C-SMX ou ¹⁴C-N-ac-SMX.

| | ¹⁴ C-ATB (eau) | ¹⁴ C-ATB (CaCl ₂) | ¹⁴ C-ATB + ETMx1 | ¹⁴ C-ATB (CaCl ₂ + HCl) | ¹⁴ C-ATB + ETMx5 |
|---|-------------------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------------------|
| ¹⁴ C-ATB + ¹² C-CIP | Effet cocktail | | | | |
| ¹⁴ C-ATB (CaCl ₂) | Effet pH ou force ionique | | | | |
| ¹⁴ C-ATB + ETMx1 | Effet pH ou force ionique ou métaux | Effet force ionique ou métaux | | | |
| ¹⁴ C-ATB + ¹² C-CIP + ETMx1 | | | Effet cocktail | | |
| ¹⁴ C-ATB (CaCl ₂ + HCl) | Effet pH ou force ionique | Effet pH | | | |
| ¹⁴ C-ATB + ETMx5 | Effet pH ou force ionique ou métaux | | Effet dose | Effet métaux | |
| ¹⁴ C-ATB + ¹² C-CIP + ETMx5 | | | | | Effet cocktail |

6.3 Résultats

6.3.1 Mesures des pH

Les pH du sol ont été mesurés à J0 pour s'assurer que les traitements correspondaient bien aux conditions à tester, et à J156 pour suivre l'évolution des pH pendant l'incubation.

Les ATB aux concentrations apportées n'ayant pas d'effet sur le pH du sol, les valeurs de pH mesurées avec le SMX et le N-ac-SMX ont été moyennées pour chacune des modalités testées avec les 2 ATB. En conséquence le nombre de répétitions (n) diffère entre les modalités (Tableau 23). Les valeurs étant non paramétriques, les analyses statistiques ont été effectuées via les tests de Kruskal Wallis et de Dunn (Figure 25).

A J0, trois groupes de pH se distinguent. Les pH des sols non traités (\emptyset) et traités aux antibiotiques apportés dans l'eau déionisée (SMX \pm CIP, N-ac-SMX \pm CIP), de l'ordre de 6.7, présentent un écart inférieur à 0.1 unité. Ainsi l'apport d'antibiotiques n'impacte pas le pH du sol. Ces modalités forment le groupe 1.

Les pH du sol traité aux antibiotiques apportés dans une solution de CaCl_2 (SMX, N-ac-SMX), et du sol traité aux antibiotiques apportés en mélange avec des métaux à la dose faible (SMX + ETMx1, N-ac-SMX + ETMx1) sont similaires avec une valeur de 6.4 ± 0.03 . Ces modalités forment le groupe 2. Le pH du groupe 2 est inférieur au pH du groupe 1.

Lorsque les antibiotiques sont apportés dans une solution de $\text{CaCl}_2 + \text{HCl}$ (SMX), ou en mélange avec des métaux à la dose élevée (SMX + ETMx5, N-ac-SMX + ETMx5), les pH, proches de 5.9, présentent un faible écart de 0.14 unité. Ces deux modalités forment le groupe 3. Le pH du groupe 3 est inférieur au pH des deux autres groupes.

L'écart maximal de pH entre le groupe 1 et le groupe 3 est de 0.91 unité.

A J156, les pH des trois groupes ont diminué. Plus le pH initial est élevé, plus la diminution est importante. Ainsi le groupe 1 perd 1 unité de pH, le groupe 2 perd 0.7 unité de pH, et le groupe 3, 0.3 - 0.4 unité de pH.

L'ordre des pH entre chaque groupe reste inchangé, le pH du groupe 1 restant le plus élevé (pH \sim 5.8), le pH du groupe 3 le plus faible (pH \sim 5.5) et le pH du groupe 2 étant intermédiaire (pH \sim 5.7).

Bien que les pH des trois groupes soient significativement différents, les écarts de pH entre chaque groupe ont toutefois diminué. Entre les groupes 1 et 2, l'écart passe d'environ 0.3 à 0.06 unité. Entre les groupes 2 et 3, l'écart passe de 0.6 à 0.18 unité. Les pH de chaque groupe tendent donc à se rejoindre avec le temps.

Tableau 23 : pH du sol non traité \emptyset ; traité aux antibiotiques apportés dans de l'eau : ATB (eau) (modalités $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX} \pm \text{CIP}$) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl_2 : ATB (CaCl_2) (modalités $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX}$) ; traité aux antibiotiques apportés avec les métaux à faible dose : ATB + ETMx1 (modalités $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX}$, + ETMx1 \pm CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl_2 acidifiée avec HCl : ATB (CaCl_2 + HCl) (modalités $^{14}\text{C-SMX}$ uniquement) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose : ATB + ETMx5 (modalités $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX}$, + ETMx5 \pm CIP) à J0 et J156.

| pH | J0 | J156 |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| \emptyset | 6,74 \pm 0.03 ; n=3 | 5,79 \pm 0.02 ; n=3 |
| ATB (eau) | 6,68 \pm 0.01 ; n=4 | 5,77 \pm 0.02 ; n=3 |
| ATB (CaCl_2) | 6,39 \pm 0.02 ; n=4 | 5,72 \pm 0.02 ; n=6 |
| ATB + ETMx1 | 6,36 \pm 0.03 ; n=6 | 5,72 \pm 0.04 ; n=9 |
| ATB (CaCl_2 + HCl) | 5,83 \pm 0.00 ; n=3 | 5,54 \pm 0.01 ; n=3 |
| ATB + ETMx5 | 5,97 \pm 0.08 ; n=6 | 5,52 \pm 0.06 ; n=9 |

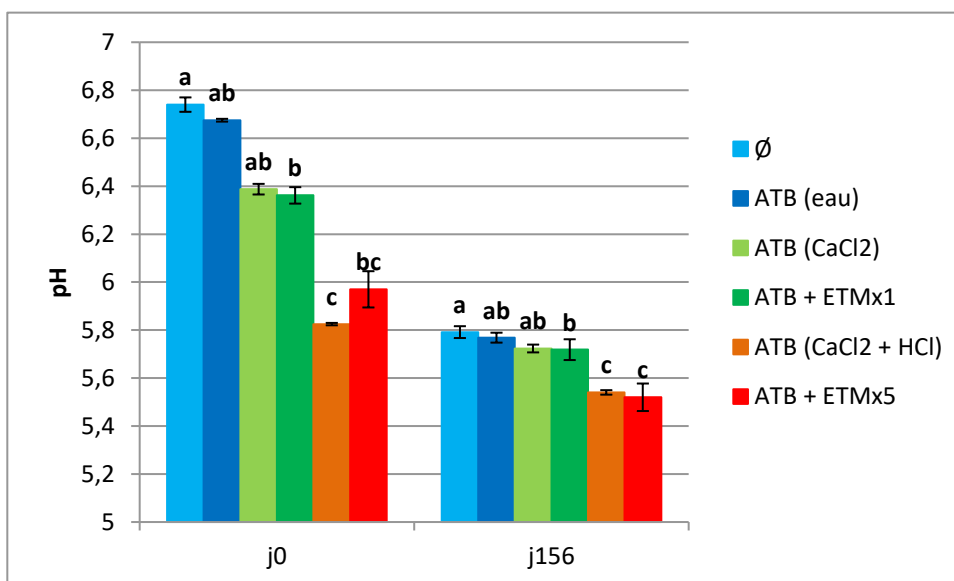


Figure 25 : pH du sol non traité \emptyset ; traité aux antibiotiques apportés dans de l'eau, ATB (eau) (modalités $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX} \pm \text{CIP}$) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl_2 , ATB (CaCl_2) (modalités $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX}$) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 (modalités $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX}$, + ETMx1 \pm CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl_2 acidifiée au HCl, ATB (CaCl_2 + HCl) (modalités $^{14}\text{C-SMX}$ uniquement) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 (modalités $^{14}\text{C-SMX}$ ou $^{14}\text{C-N-ac-SMX}$, + ETMx5 \pm CIP) à J0 et J156. Traitement statistique par date.

6.3.2 Minéralisation du SMX et du N-ac-SMX

La minéralisation du SMX (Figure 26) est maximale lorsque l'antibiotique est apporté dans l'eau (10.5% à J156). L'ajout de CIP en cocktail avec SMX dans l'eau n'a pas d'impact sur la minéralisation du SMX (10.5%).

La minéralisation du SMX est similaire lorsque la solution de CaCl_2 est acidifiée (4.6%) ou non (4.4%). Donc la minéralisation du SMX n'est pas impactée pour des valeurs de pH comprises entre 6.4 (pH du sol après application de la solution CaCl_2) et 5.8 (pH du sol après application de la solution $\text{CaCl}_2 + \text{HCl}$).

En comparant la minéralisation du SMX apporté dans une solution d'eau et de $\text{CaCl}_2 (\pm \text{HCl})$, on observe que la minéralisation est diminuée d'un facteur supérieur à 2. Cette diminution peut être attribuée, i) à la diminution du pH du sol, ou ii) à un effet de la force ionique de ces solutions $\text{CaCl}_2 \pm \text{HCl}$. Or, les résultats précédents nous ont permis de montrer que la diminution du pH du sol n'impactait pas la minéralisation du SMX. De plus, le pH du sol traité au CaCl_2 (pH ~ 6.4) est très proche de celui des sols recevant les antibiotiques dans l'eau (pH ~ 6.7). La diminution de la minéralisation du SMX semble donc plutôt attribuée à un effet de la force ionique des solutions CaCl_2 avec ou sans ajout d'HCl.

La minéralisation du SMX en mélange avec la dose faible de métaux ETMx1 (4.7%), est similaire à la minéralisation du SMX dans les solutions de $\text{CaCl}_2 \pm \text{HCl}$. Les métaux à dose faible ont donc le même effet que le CaCl_2 sur la minéralisation du SMX. Pour les raisons évoquées précédemment, l'effet pH est écarté. La diminution de la minéralisation du SMX par les ETMx1 pourrait aussi être attribuée à la force ionique. Or, la force ionique des solutions $\text{CaCl}_2 \pm \text{HCl}$ est supérieure à la force ionique des solutions ETMx1, car elle correspond à la force ionique des solutions ETMx5. La force ionique n'est donc pas le seul facteur explicatif de la diminution de la minéralisation par les ETMx1. On peut donc faire l'hypothèse d'un effet ETMx1 sur la minéralisation du SMX.

Lorsque les métaux sont apportés à forte dose (ETMx5), la minéralisation du SMX est fortement affectée et devient négligeable (<2%). Pour expliquer ce résultat, l'effet pH est de nouveau écarté. La force ionique des ETMx5 étant la même que la force ionique des solutions CaCl_2 , l'effet force ionique est aussi écarté. On peut donc en conclure que le cuivre Cu^{2+} et le zinc Zn^{2+} apportés à forte dose inhibent la minéralisation du SMX.

Un apport de CIP en présence ou en absence d'ETM n'a pas d'impact sur la minéralisation du SMX.

Ainsi, il n'y a ni effet CIP, ni effet pH sur la minéralisation du SMX. En revanche, on observe un effet métaux, entraînant la diminution de la minéralisation, jusqu'à son inhibition en fonction de la dose appliquée.

La hiérarchie des traitements est similaire pour SMX et N-ac-SMX, même si la minéralisation finale est dans tous les cas supérieure avec le N-ac-SMX (ce qui est cohérent avec les résultats du chapitre 3).

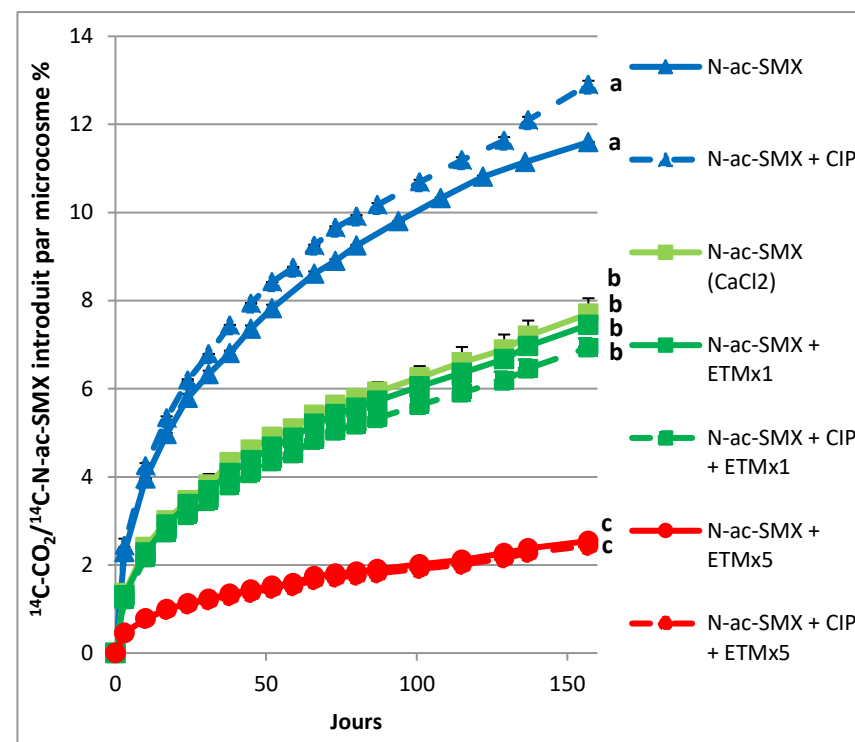
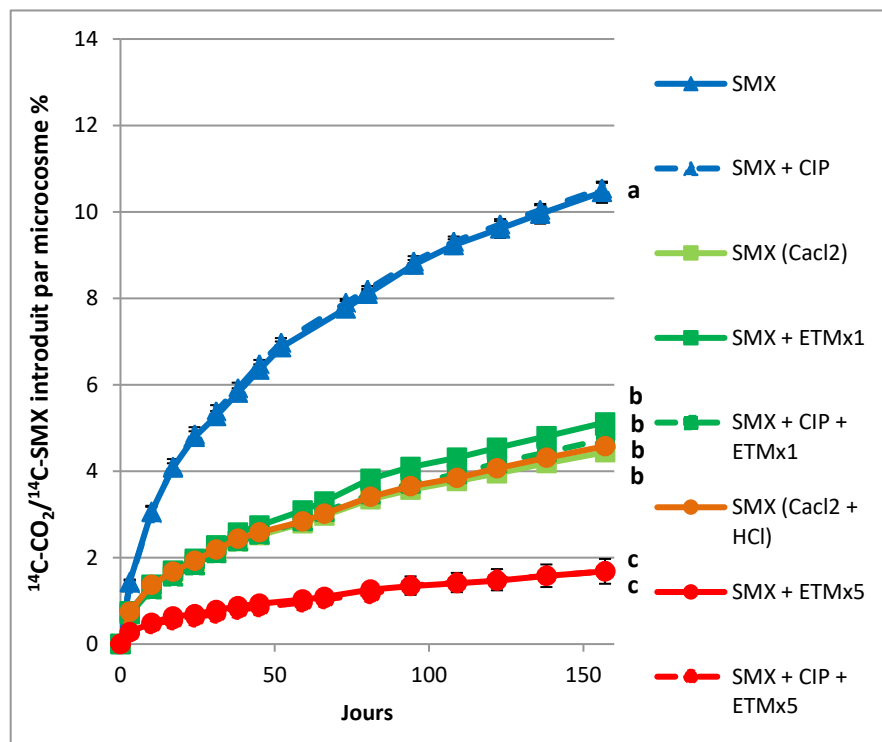


Figure 26 : Minéralisation jusqu'à 156 jours d'incubation, du ^{14}C -SMX (à gauche) et du ^{14}C -N-ac-SMX (à droite) dans le sol traité aux antibiotiques apportés dans de l'eau, ATB (eau) (modalités ^{14}C -SMX ou ^{14}C -N-ac-SMX \pm ^{12}C -CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl_2 , ATB (CaCl_2) (modalités ^{14}C -SMX (CaCl_2) ou ^{14}C -N-ac-SMX (CaCl_2)) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 (modalités ^{14}C -SMX ou ^{14}C -N-ac-SMX, + ETMx1 \pm ^{12}C -CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl_2 acidifiée au HCl, ATB (CaCl_2 + HCl) (modalités ^{14}C -SMX (CaCl_2 + HCl) uniquement) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 (modalités ^{14}C -SMX ou ^{14}C -N-ac-SMX, + ETMx5 \pm ^{12}C -CIP). Traitement statistique à J156.

6.4 Distribution de la radioactivité provenant du SMX et N-ac-SMX à J3

A 3 jours d'incubation, les bilans ^{14}C provenant des fractions minéralisées, facilement extractibles, difficilement extractibles et non extractibles varient de 84.3% à 96.4% du ^{14}C apporté pour le SMX, et 81.0% à 89.1% pour le ^{14}C N-ac-SMX. Pour faciliter les comparaisons, les résultats ont été exprimés en pourcentage du ^{14}C mesuré. Ainsi la somme de toutes les fractions est de 100% (Figure 27).

6.4.1 Influence des caractéristiques des solutions d'apport des sulfonamides

Pour SMX, la fraction facilement extractible HPCD représente entre 12.5 et 22.5% du ^{14}C mesuré selon les caractéristiques des solutions initiales. Les valeurs sont maximales lorsque la molécule est apportée dans l'eau (SMX seul ou avec CIP), minimales en présence d'une forte concentration en ETM (SMX + ETMx5 ± CIP), et intermédiaires pour les autres traitements (SMX apporté dans $\text{CaCl}_2 \pm \text{HCl}$ et avec ETMx1 ± CIP).

Pour N-ac-SMX, la fraction HPCD représente entre 19.6 et 25.6% du ^{14}C mesuré. La fraction HPCD est plus faible en présence d'ETM à forte dose (N-ac-SMX + ETMx5 ± CIP) mais est équivalente pour les autres traitements.

On observe donc avec la fraction HPCD que la disponibilité du SMX et du N-ac-SMX diminue lorsqu'ils sont apportés en cocktail avec les métaux à dose x5. Les autres traitements (ATB + CaCl_2 ou +ETMx1) n'ont pas d'effet ou des effets intermédiaires sur cette fraction.

La fraction MeCN varie entre 24.3 et 32.8% pour SMX et 32.0 et 36.9% pour N-ac-SMX. Aucune tendance claire ne se dégage entre les traitements.

Dès J3, la radioactivité est majoritairement concentrée dans la fraction non extractible (50.6-56.4% pour SMX et 36.9-42.3% pour N-ac-SMX). Les résidus non extractibles sont de manière générale les plus faibles lorsque les ATB sont apportés dans l'eau et les plus élevés en présence de métaux à forte dose. La production des résidus non extractibles en présence de métaux à forte dose est stimulée aux dépens des fractions minéralisées et extractible HPCD.

L'impact de CIP sur les distributions du ^{14}C n'est pas significatif.

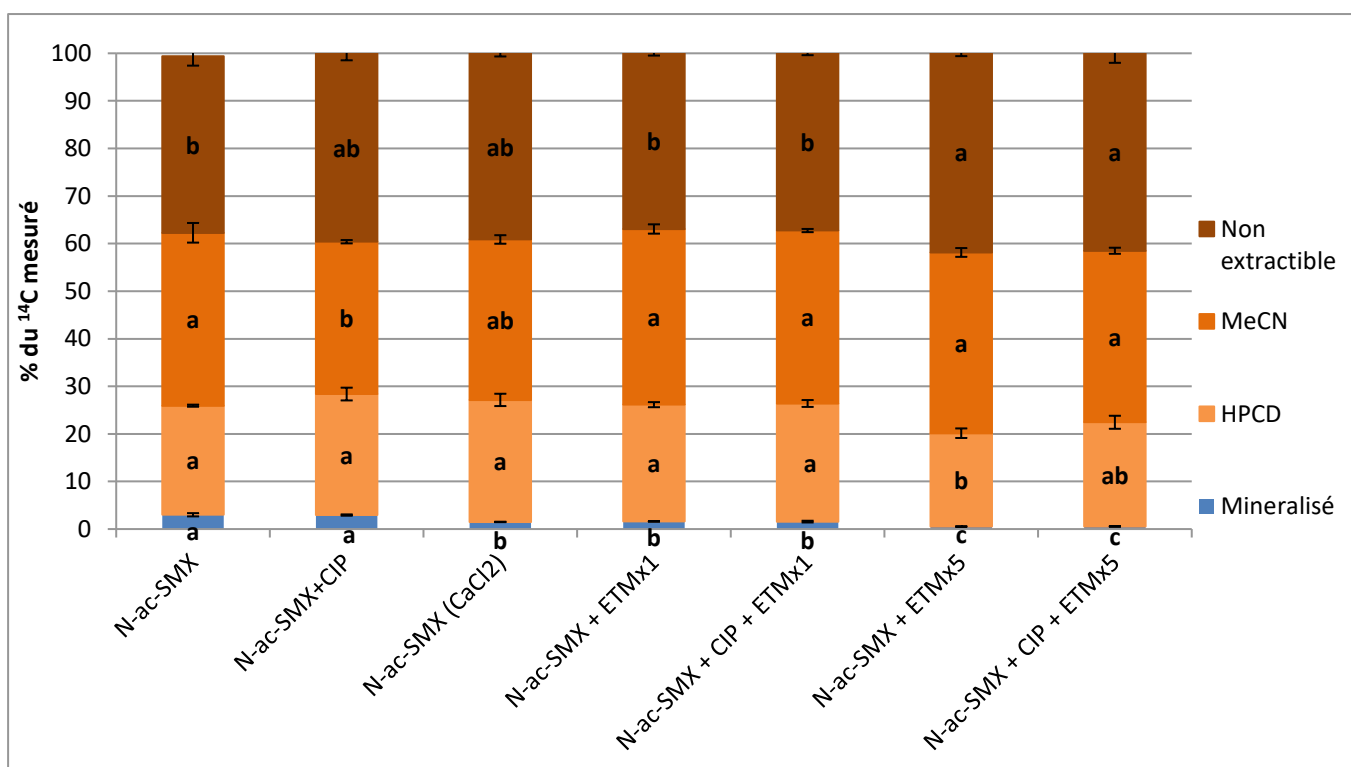
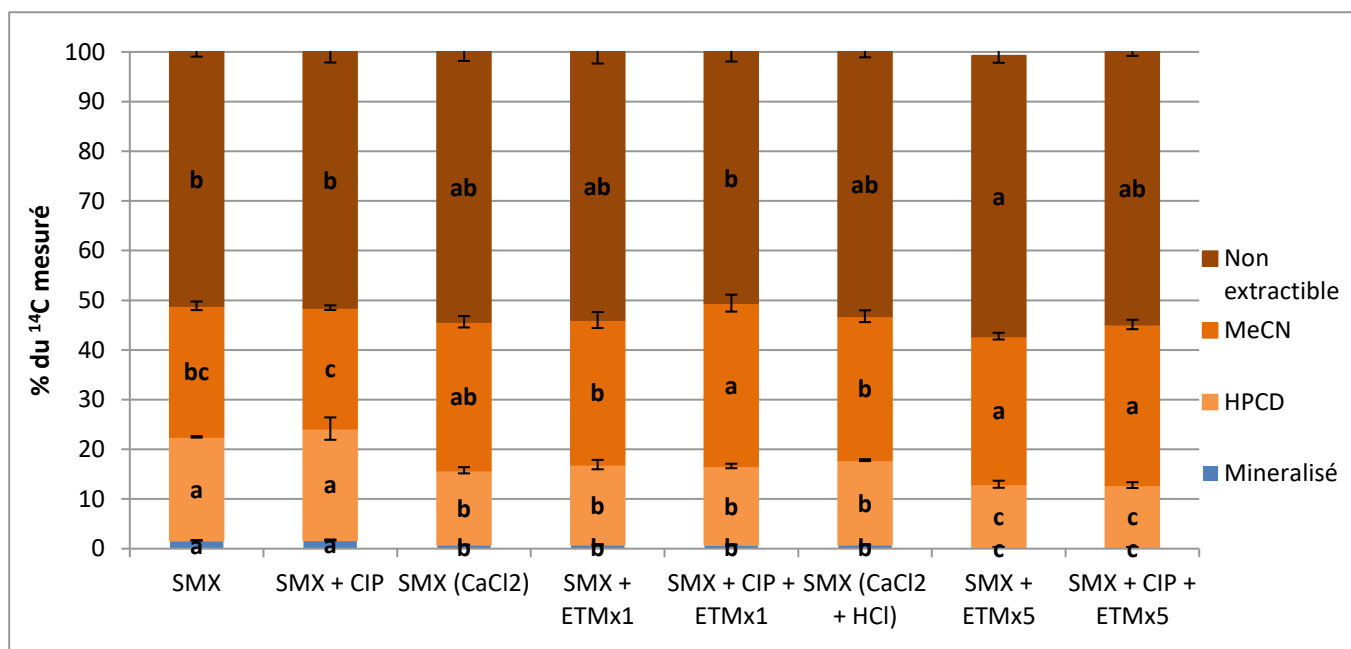


Figure 27 : Distribution du ¹⁴C à J3 dans les fractions minéralisées, facilement extractibles (HPCD), difficilement extractibles (MeCN), et non extractibles du ¹⁴C-SMX et du ¹⁴C-N-ac-SMX dans le sol traité aux antibiotiques apportés dans de l'eau, ATB (eau) (modalités ¹⁴C-SMX ou ¹⁴C-N-ac-SMX ± ¹²C-CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl₂, ATB (CaCl₂) (modalités ¹⁴C-SMX (CaCl₂) ou ¹⁴C-N-ac-SMX (CaCl₂)) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 (modalités ¹⁴C-SMX ou ¹⁴C-N-ac-SMX, + ETMx1 ± ¹²C-CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl₂ + HCl) (modalités ¹⁴C-SMX (CaCl₂ + HCl) uniquement) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 (modalités ¹⁴C-SMX ou ¹⁴C-N-ac-SMX, + ETMx5 ± ¹²C-CIP). Traitement statistique par type de fraction.

6.4.2 Comparaison entre le SMX et le N-ac-SMX

Si on compare SMX et N-ac-SMX, la fraction HPCD du SMX est significativement inférieure à celle de N-ac-SMX pour toutes les modalités (Tableau 24) sauf pour la modalité « ATB + CIP » où la différence n'est pas significative, mais avec un rapport SMX/N-ac-SMX inférieur à 1 (0.9). On observe donc que la molécule N-ac-SMX est globalement plus disponible que le SMX, particulièrement lorsqu'elle est apportée dans une solution de CaCl₂ (rapport des fractions HPCD SMX/N-ac-SMX = 0.6), ou en cocktail avec des métaux, quelle que soit la dose ($0.6 < \text{SMX/N-ac-SMX} < 0.7$).

La fraction MeCN de SMX est significativement inférieure à celle de N-ac-SMX ($0.7 < \text{SMX/N-ac-SMX} < 0.9$), quelle que soit la modalité.

Enfin, SMX produit plus de résidus non extractibles que N-ac-SMX, quelle que soit la modalité ($1.3 < \text{SMX/N-ac-SMX} < 1.4$).

Tableau 24 : Rapport des quantités de résidus ¹⁴C SMX / N-ac-SMX dans les fractions minéralisées, HPCD, MeCN et non extractibles à J3.

* différence significative entre SMX et N-ac-SMX.

| SMX / N-ac-SMX J3 | Fraction minéralisée | Fraction extractible HPCD | Fraction extractible MeCN | Fraction non extractible |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| ATB (eau) | 0,6* | 0,9* | 0,7* | 1,4* |
| ATB +CIP | 0,6* | 0,9 | 0,8* | 1,3* |
| ATB (CaCl ₂) | 0,5* | 0,6* | 0,9* | 1,4* |
| ATB +ETMx1 | 0,5* | 0,7* | 0,8* | 1,5* |
| ATB +ETMx1 + CIP | 0,5* | 0,6* | 0,9* | 1,4* |
| ATB +ETMx5 | 0,6* | 0,6* | 0,8* | 1,3* |
| ATB + ETMx5 + CIP | 0,5* | 0,6* | 0,9* | 1,3* |

6.5 Distribution de la radioactivité provenant du SMX et N-ac-SMX à J156

6.5.1 Influence des caractéristiques des solutions d'apport des sulfonamides

A 156 jours d'incubation, la radioactivité mesurée dans les fractions minéralisées, facilement extractibles, difficilement extractibles et non extractibles représente 87.3% à 98.5% du ¹⁴C apporté pour le SMX, et 84.4% à 90.0% pour le ¹⁴C N-ac-SMX. Les résultats ont été exprimés en pourcentage du ¹⁴C mesuré. Ainsi la somme de toutes les fractions est de 100% (Figure 28).

Entre J3 et J156, pour SMX et quel que soit le traitement, la fraction HPCD diminue et les fractions minéralisées et MeCN augmentent. La fraction non extractible n'évolue pas (comme observé dans le chapitre 3).

Pour N-ac-SMX, les fractions HPCD et MeCN diminuent et en parallèle, les fractions minéralisées et non extractibles augmentent.

Les apports de SMX et de N-ac-SMX dans l'eau et en présence d'ETM à forte dose présentent de manière générale les valeurs extrêmes pour les différentes fractions, mettant en évidence un effet traitement. Les fortes doses d'ETM semblent stimuler la fraction MeCN et diminuer la minéralisation. Les apports d'ATB dans $\text{CaCl}_2 \pm \text{HCl}$ et $\text{ETMx1} \pm \text{CIP}$ présentent des valeurs intermédiaires.

La minéralisation (Figure 26) et la distribution de la radioactivité dans les fractions à J156 (Figure 28) ne sont pas significativement différentes entre les modalités $^{14}\text{C-SMX}$ (CaCl_2) et $^{14}\text{C-SMX}$ ($\text{CaCl}_2 + \text{HCl}$), il n'y a pas d'effet pH.

Avec l'ajout de CIP, la distribution de la radioactivité dans les fractions à J156 est significativement différente uniquement entre les modalités $^{14}\text{C-N-ac-SMX}$ et $^{14}\text{C-N-ac-SMX} + ^{12}\text{C-CIP}$ (Figure 28). On considère donc qu'il n'y a pas d'effet cocktail avec la CIP. Les impacts des conditions d'apport des sulfonamides sur leur devenir les plus significatifs et les plus systématiques n'ont lieu qu'avec le traitement ETMx5.

6.5.2 Comparaison entre le SMX et le N-ac-SMX

A J156, la fraction HPCD de SMX est significativement supérieure à celle de N-ac-SMX pour toutes les modalités, sauf les modalités « ATB (eau) » et « ATB + ETMx5 + CIP » (Tableau 25). De même, la fraction MeCN de SMX est significativement supérieure à celle de N-ac-SMX pour toutes les modalités, sauf la modalité « ATB (eau) » où la différence n'est pas significative.

A l'inverse, la fraction non extractible de SMX est significativement inférieure à celle de N-ac-SMX pour toutes les modalités, sauf la modalité « ATB + CIP » où la différence n'est pas significative, et la modalité « ATB (eau) » qui est significativement supérieure. Cependant les différences significatives de la fraction non extractible portent sur un rapport SMX/N-ac-SMX proche de 1 (0.9 et 1.1). On peut donc considérer que les fractions non extractibles de SMX et N-ac-SMX sont proches pour tous les traitements.

Contrairement aux résultats du chapitre 4 sur le devenir des molécules apportées seules, les distributions de SMX et N-ac-SMX dans les différentes fractions extractibles ne tendent pas à se rejoindre à J156, pour la majorité des traitements (Tableau 20 chapitre 4 et Tableau 25 chapitre 6). Comparé au N-ac-SMX, à J156, la fraction biodisponible (HPCD) du SMX est plus élevée, de même que la fraction fortement adsorbée (MeCN). In fine la minéralisation reste inférieure pour le SMX, car elle est surtout déterminée par le début des incubations où on observait pratiquement l'inverse : les fractions extractibles de SMX inférieures à celles de N-ac-SMX et la fraction non-extractible nettement supérieures pour SMX.

Tableau 25 : Rapport des quantités de résidus ¹⁴C SMX / N-ac-SMX dans les fractions minéralisées, HPCD, MeCN et non extractibles à J156.

* indique des différences significatives entre SMX et N-ac-SMX.

| SMX / N-ac-SMX J156 | Fraction minéralisée | Fraction extractible HPCD | Fraction extractible MeCN | Fraction non extractible |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| ATB (eau) | 0,9* | 0,9 | 0,9 | 1,1* |
| ATB + CIP | 0,8* | 1,2* | 1,2* | 0,9 |
| ATB (CaCl ₂) | 0,6* | 1,5* | 1,3* | 0,9* |
| ATB + ETMx1 | 0,6* | 1,4* | 1,2* | 0,9* |
| ATB + ETM x1 + CIP | 0,6* | 1,3* | 1,3* | 0,9* |
| ATB + ETMx5 | 0,6* | 1,2* | 1,2* | 0,9* |
| ATB + ETM x5 + CIP | 0,6* | 1,0 | 1,2* | 0,9* |

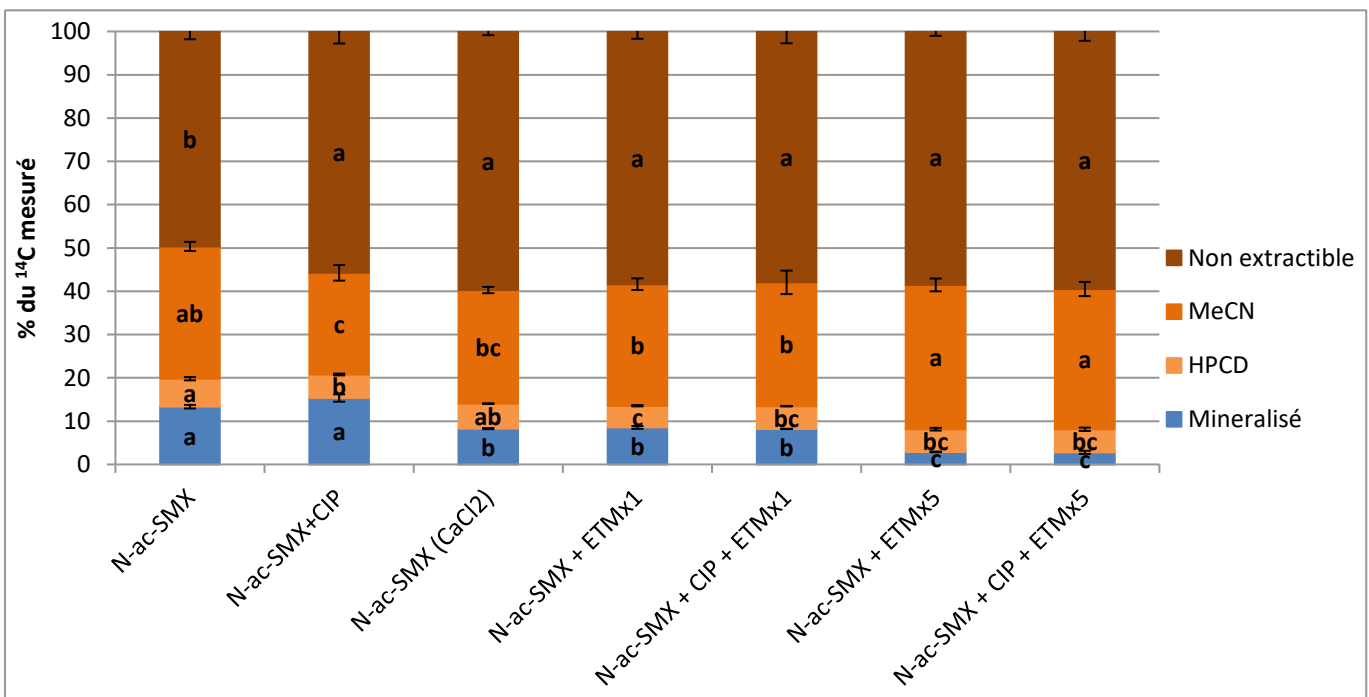
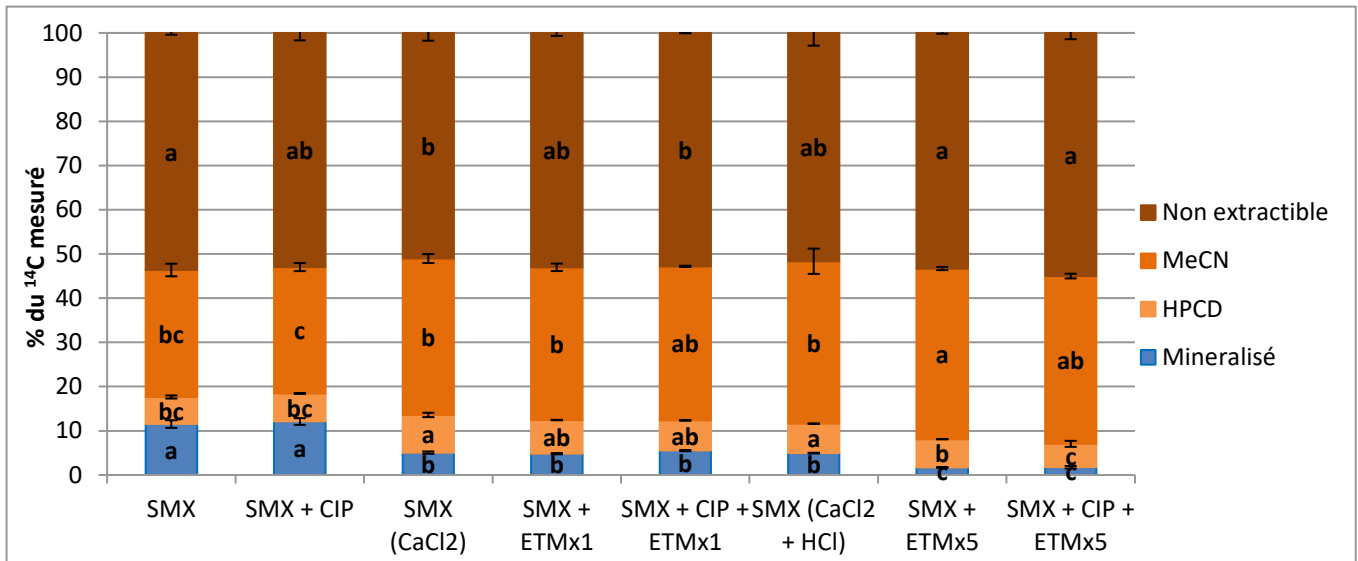


Figure 28 : Distribution du ¹⁴C à J156 dans les fractions minéralisées, facilement extractibles (HPCD), difficilement extractibles (MeCN), et non extractibles, du ¹⁴C-SMX et du ¹⁴C-N-ac-SMX dans le sol traité aux antibiotiques apportés dans de l'eau, ATB (eau) (modalités ¹⁴C-SMX ou ¹⁴C-N-ac-SMX ± ¹²C-CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl₂, ATB (CaCl₂) (modalités ¹⁴C-SMX (CaCl₂) ou ¹⁴C-N-ac-SMX (CaCl₂)) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 (modalités ¹⁴C-SMX ou ¹⁴C-N-ac-SMX, + ETMx1 ± ¹²C-CIP) ; traité aux antibiotiques dans une solution de CaCl₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl₂ + HCl) (modalités ¹⁴C-SMX (CaCl₂ + HCl) uniquement) ; traité aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 (modalités ¹⁴C-SMX ou ¹⁴C-N-ac-SMX, + ETMx5 ± ¹²C-CIP). Traitement statistique par type de fraction.

6.6 Discussion

6.6.1 Impact du mélange d'antibiotiques sur le devenir des sulfonamides

L'apport de la CIP n'a pas influé sur le devenir du SMX ou du N-ac-SMX, en mélange ou non avec les métaux. Les effets cocktails d'ATB sur le devenir des ATB sont contrastés dans la littérature et peuvent varier notamment suivant le type de familles d'ATB mélangées. Dans l'étude de Chait et al. (2007), l'apport combiné de doxycycline et d'érythromycine a un effet synergique sur la concentration minimum d'inhibition (CMI) des microorganismes, alors qu'aux mêmes concentrations, l'effet sur la CMI est suppressif en combinant la doxycycline et la ciprofloxacine. Dans l'étude de Ma et al. (2014), l'application combinée de sulfamonométhoxine (SMM), ciprofloxacine (CIP) et tétracycline (TC) ($100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour chaque molécule) favorise grandement la dissipation de chaque antibiotique par rapport à des apports de molécules seules. Après 7 jours d'incubation, la concentration résiduelle des 3 antibiotiques apportés en mélange (TC+SMM+CIP) (extraction avec une solution EDTA pour TC et CIP et avec un tampon phosphate pour SMM) était 37% plus faible que dans les sols traités avec le sulfonamide seul. Cette étude ne permet pas de distinguer si l'augmentation de la dissipation est due à une augmentation de la minéralisation des antibiotiques, de leur adsorption réversible ou de la quantité de résidus non extractibles. L'augmentation de la dissipation des antibiotiques a été accompagnée d'un développement des populations bactériennes résistantes au SMM et à la CIP. Les antibiotiques exercent donc une pression sur les communautés microbiennes plus forte en mélange que seuls. Fang et al. (2014) trouvent au contraire que les traitements combinés avec de la sulfadiazine et de la chlorotétracycline (0, 0.1, 1, 10, 100 et $500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les deux molécules) ne modifient pas significativement le devenir des deux molécules. En utilisant des ATB différents et une dose 5 fois plus élevée de cocktail d'antibiotiques, Fang et al. (2014) n'observent pas le même comportement des antibiotiques que Ma et al. (2014).

Les interactions entre ATB peuvent également être contrôlées par les caractéristiques du sol. L'adsorption des ATB augmentent avec la teneur en argile, limitant les possibilités d'interaction entre molécules d'ATB dans la solution du sol. Or la teneur en argile du sol de Ma et al. (2014) (20%), est plus élevée à celle de Fang et al. (2014) (7%). Les caractéristiques du sol n'expliquent donc pas l'augmentation de la dissipation des ATB dans le sol de Ma et al. (2014). Dans notre étude, le sol contient une teneur en argile intermédiaire de 14%, susceptible de privilégier les interactions des ATB avec le sol plutôt qu'entre les molécules. L'adsorption rapide du SMX et de la CIP sur les constituants du sol au détriment d'interactions des molécules entre elles dans la solution du sol pourrait expliquer l'absence d'effet cocktail observé.

Comme les quelques études observant des effets cocktails ATB + ATB utilisent des concentrations bien supérieures aux nôtres, l'hypothèse la plus probable est que les concentrations d'ATB engagées sont trop faibles pour observer un effet cocktail de la CIP sur les sulfonamides.

6.6.2 Impact du mélange ATB + ETM sur le devenir des sulfonamides

L'apport de métaux à faible (ETMx1) ou forte (ETMx5) dose, a modifié le devenir des deux sulfonamides, en comparaison avec le devenir des antibiotiques apportés seuls dans le sol. Au bout de 156 jours, la minéralisation a diminué en présence d'ETMx1, et a été complètement inhibée avec les ETMx5. De plus, en présence d'ETMx5, la fraction MeCN de résidus fortement adsorbés est supérieure à celle des autres traitements.

Les différences entre les traitements ne s'expliquent pas par des différences de pH qui restent malgré tout faibles et qui n'affectent pas la spéciation des ATB. En effet, à J0 quels que soit les traitements, les pH ont des valeurs comprises entre 6.0 et 6.7 et sont donc dans tous les cas supérieurs au pK_a des sulfonamides qui sont donc sous forme anionique et neutre. La comparaison des résultats de minéralisation des sulfonamides apportés dans des solutions de $CaCl_2$ et des solutions qui contiennent des métaux à forte dose, de force ionique similaire, a permis de montrer que les différences de minéralisation des sulfonamides n'étaient pas dues à la force ionique. Ces conclusions ont été confirmées en comparant les résultats obtenus avec des apports de sulfonamides dans une solution de $CaCl_2$ et d'ETMx1 puisque des minéralisations similaires ont été observées pour des forces ioniques différentes. On peut donc conclure que les ETM Cu et Zn ont bien un impact négatif sur la minéralisation et le devenir des deux sulfonamides.

Partant des hypothèses précédentes, la diminution de la minéralisation des sulfonamides lorsqu'ils sont apportés dans une solution de $CaCl_2$ par rapport à de l'eau ne peut s'expliquer ni par des différences de pH ni par des différences de force ionique. La force ionique de la solution en $CaCl_2$ est égale à 0.042 mol.L^{-1} . Or Morel et al. (2014) ont montré que lorsque la force ionique variait entre 0.1 et 0.01 mol.L^{-1} , la concentration de SMX adsorbé restait similaire. La diminution de la minéralisation après apport de sulfonamides dans une solution de $CaCl_2$ proviendrait plutôt des cations Ca^{2+} libérés par dissolution du sel. D'après Morel et al. (2014), deux classes de cations peuvent affecter le devenir du SMX (autour du pH6) : les cations fortement adsorbants, qui favorisent l'adsorption de SMX, et les cations faiblement adsorbants, qui favorisent ou non l'adsorption du SMX, par la formation de complexes SMX-Cation-Surface. Ca^{2+} appartiendrait à la seconde catégorie. Manceau et Matynia (2010) ont montré à travers une constante de complexation $\log K$ sur les groupes fonctionnels des acides humiques, que les agents complexants les plus forts sont le cuivre Cu ($\log K=5.8$) et le zinc Zn ($\log K=3.8$), et les plus faibles le magnésium Mg ($\log K=2.9$) et le calcium Ca ($\log K=2.5$). Même si la capacité de complexation du calcium fait partie des plus faibles, elle n'est pas nulle, et pourrait expliquer la diminution de la minéralisation.

La formation de complexes ternaires Sulfonamide-(Cu ou Zn)-Surface pourrait expliquer la diminution de la minéralisation aux deux doses de métaux, et l'augmentation de la quantité de résidus fortement adsorbés (fraction MeCN) à la dose ETMx5. En effet, le zinc, et surtout le cuivre, forment avec les ligands organiques des complexes nettement plus forts que le Ca (Manceau et Matynia, 2010). Apportés en mélange, les antibiotiques et les métaux entrent en compétition sur les sites d'adsorption, en faveur des métaux, notamment du cuivre. Morel et al. (2014) montrent que le SMX est un plus faible sorbant que le cuivre. A des concentrations similaires à celles utilisées dans cette étude mais en milieu aqueux, on observe que le Cu s'adsorbe 100 à 300 fois plus que le SMX. Cependant, Morel et al. (2014) ont également observé que le SMX s'adsorbait 10 fois plus sur le sol en présence de cuivre.

L'augmentation de l'adsorption du SMX en présence de cuivre est due au cuivre adsorbé agissant comme un agent de complexation avec SMX. Le cuivre immobilise le SMX par la formation de complexes ternaires avec la surface SMX–Cu–Surface. Wu et al. (2012) ont aussi mis en évidence la co-adsorption du cuivre et du SMX sur des nanotubes de carbone (NTC) par la formation de complexes ternaires SMX-Cu-NTC, où le Cu joue le rôle de pont pour la fixation de l'antibiotique, à des pH > 6.5. Dans les études de Pan et al. (2012) et de Pei et al. (2014), l'augmentation de l'adsorption du sulfathiazole (STZ) apporté au sol en mélange avec du cuivre, est attribuée à la formation de complexes Cu-STZ avec la surface, lorsque le pH est supérieur à 5.0.

Par ailleurs, Pei et al. (2014) montrent que la part de sulfathiazole (STZ) adsorbée sur de la tourbe par le complexe Cu-STZ est plus difficile à désorber que le STZ seul. Le cuivre renforce l'adsorption des sulfonamides sur les constituants du sol.

Ainsi, la complexation avec le cuivre peut diminuer les possibilités de biodégradation du SMX, par une augmentation et un renforcement de son adsorption, ce qui est cohérent dans notre étude avec la diminution de la minéralisation des sulfonamides aux deux doses de métaux appliquées.

De plus, dans l'étude de Wu et al. (2012) plus la dose de métaux augmente, plus la quantité de SMX adsorbée augmente. Ce phénomène est aussi observé avec le sulfathiazole (STZ), dont l'adsorption augmente, ainsi que son coefficient d'adsorption (de 7 à 16 L.kg⁻¹) en augmentant les concentrations en cuivre de 0 à 1.0 mM (Pei et al., 2014). Dans notre étude, cet effet dose est aussi observé, avec à J156 la fraction MeCN des résidus fortement adsorbés plus importante en présence d' ETMx5.

Outre leur rôle sur la complexation des ATB diminuant ainsi leur biodisponibilité, les métaux peuvent également exercer des effets toxiques sur les microorganismes du sol et notamment les microorganismes dégradants, qui pourraient également expliquer la diminution de la minéralisation des sulfonamides. L'effet toxique du Cu et du Zn est largement relaté dans la littérature. Par exemple, dans l'étude de Moffet et al. (2003), la biodiversité taxonomique a diminué de 25% dans des sols contaminés avec 400 mg.kg⁻¹ de zinc, par rapport à un sol contenant des teneurs naturelles en zinc (57 mg.kg⁻¹). Wyszowska et al. (2008) ont démontré que le cuivre et le zinc, ajoutés à un sol sablo-limoneux respectivement entre 150 et 450 mg.kg⁻¹ et entre 300 à 900 mg.kg⁻¹), inhibaient le développement de certaines bactéries (ammonificatrices, immobilisatrices d'azote, cellulolytiques), et que les effets étaient généralement similaires lorsque les métaux étaient apportés seuls ou en mélange. Dans notre étude, la dose ETMx1 correspond à des teneurs en cuivre et zinc respectivement de 20 mg.kg⁻¹ et 30 mg.kg⁻¹, qui sont en dessous par exemple des valeurs réglementaires relatives à l'épandage de boues de STEP sur les sols, et inférieures aux PNEC que l'on peut estimer en rentrant les caractéristiques du sol T dans l'outil Metal_PNECsoil_calculator basé sur la méthodologie REACH de l'UE (Archeconsulting ; Smolders et al, 2009). La dose ETMx5 correspond à des teneurs en cuivre et zinc respectivement de 100 mg.kg⁻¹ et 150 mg.kg⁻¹, proches des valeurs limites de la réglementation et supérieures aux PNEC estimées par le PNEC-calculator. L'inhibition de la minéralisation à la dose ETMx5 peut donc être expliquée par un effet toxique de cette dose sur les microorganismes dégradant les sulfonamides.

6.6.3 Comparaison des devenir du SMX et du N-ac-SMX

Le devenir du SMX et du N-ac-SMX semble varier en fonction des conditions d'apport. Lorsqu'ils sont apportés dans des solutions de CaCl_2 ou en présence de métaux, les deux fractions extractibles (HPCD et MeCN) du SMX sont supérieures à celles du N-ac-SMX, ce qui est contraire à ce qui a pu être observé lorsqu'ils sont apportés dans l'eau (chapitre 3). En revanche, la minéralisation du SMX reste inférieure à celle du N-ac-SMX quelles que soient les conditions d'apport, avec un rapport $\text{SMX}_{\text{minéralisé}}/\text{N-ac-SMX}_{\text{minéralisé}} = 0.6$ (CaCl_2 et métaux) contre 0.9 lorsque les molécules sont apportées dans l'eau.

Ainsi les solutions de CaCl_2 et ETM semblent davantage favoriser la rétention du SMX que du N-ac-SMX, dans la fraction HPCD par une adsorption faible, et dans la fraction MeCN par une adsorption forte. Tout se passe comme si le Cu, le Zn, mais aussi le Ca, génèrent de plus fortes liaisons avec SMX qu'avec N-ac-SMX. Pourtant, les deux molécules présentent les mêmes sites de complexation correspondant aux 3 groupes amines ^4N , ^1N , et celui de l'hétérocycle aromatique ^hN . Au niveau de ces groupes amines, les cations Cu^{2+} (Torre et al., 2003 ; Kremer et al., 2006 ; Morel et al., 2014), Zn^{2+} et Ca^{2+} majoritaires en solution après dissolution des sels, se complexent. La complexation peut également avoir lieu au niveau du groupe fonctionnel $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ même si les forces sont plus faibles (Wu et al., 2012). Au pH 6.5, la charge négative des groupes $-\text{NH}-$ peut renforcer les liaisons de complexation par l'attraction électrostatique. Les interactions type cation-Pi au niveau de l'hétérocycle aromatique ^hN ne sont en revanche pas stables, car le cycle a tendance à perdre les électrons sur lesquels les cations auraient pu se fixer (Qu et al., 2008). Les sites de complexation étant les mêmes entre les deux molécules, ils n'expliquent pas la différence de comportement observée.

Les résultats observés pourraient en revanche s'expliquer par le fait que les métabolites produits après apport de SMX ou N-ac-SMX à J3 sont différents (cf chapitre 3) et pourraient réagir différemment avec les différents cations.

6.7 Conclusion sur le devenir de SMX et N-ac-SMX apportés en mélange de contaminants

L'apport de CIP n'a pas influé sur le devenir du SMX ou du N-ac-SMX, en mélange ou non avec les métaux, certainement du fait des faibles concentrations en antibiotiques apportées. Il n'y a pas d'effet cocktail ATB + ATB sur le devenir des antibiotiques, ni de la complexification des mélanges.

Il y a un effet ETM, d'autant plus fort que la dose augmente. La dose réaliste $\text{ETM} \times 1$ diminue d'un facteur 2 la minéralisation des ATB, très probablement en augmentant leur adsorption par complexation. La dose forte $\text{ETM} \times 5$ inhibe la minéralisation, et augmente en parallèle la fraction difficilement extractible des ATB, suggérant que les ATB ne sont plus biodisponibles pour les microorganismes pour leur dégradation du fait de l'augmentation de leur adsorption par complexation avec la dose forte d'ETM.

Un effet type de cation sur la complexation des antibiotiques a été noté, avec une hiérarchie des effets dans l'ordre suivant : $\text{Cu}^{2+} \gg \text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$. L'élément cuivre serait l'élément principal responsable de la complexation des ATB devant le zinc, du fait de son

affinité plus forte avec les constituants du sol, alors que le zinc est plus mobile et plus présent dans la solution du sol.

Par ailleurs, les cations apportés en mélange avec le SMX et le N-ac-SMX ont modifié les écarts de comportements entre les deux molécules. Alors qu'apportées seules, la distribution des deux molécules différait à J3 mais tendait à se rejoindre à J156 du fait de la transformation du N-ac-SMX en SMX, en présence de cations, les fractions difficilement et facilement extractibles de SMX à J156 sont plus importantes que celles de N-ac-SMX. La minéralisation du SMX reste inférieure à celle du N-ac-SMX, mais l'écart entre les deux molécules est plus important qu'en absence de cations. Ces résultats pourraient être dus au rôle des cations dans la rétention des métabolites qui pourrait être plus importante pour le SMX que pour le N-ac-SMX.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence un type d'effet cocktail ATB + ETM (synergique, additif, antagoniste). Pour cela le devenir des ETM seuls devrait aussi être mesuré et être comparé à leur devenir en cocktail ATB + ETM.

**VII : EFFET
DES MELANGES
ATB + ATB ET ATB + ETM
SUR LES MICROORGANISMES
ET LEURS ACTIVITES DE
DEGRADATION**

7 EFFETS DES MELANGES ATB + ATB et ATB + ETM SUR LES MICROORGANISMES ET LEURS ACTIVITES DE DEGRADATION

7.1 Introduction

Ce chapitre porte sur l'impact des antibiotiques en cocktail de contaminants (ATB + ATB et ATB + ETM) sur les microorganismes du sol (biomasse microbienne totale et biomasse fongique) et leurs activités de dégradation (minéralisation de C et N).

Les quelques études sur les cocktails ATB + ATB montrent que des effets toxiques synergiques ou additifs peuvent avoir lieu sur l'abondance microbienne (Christensen et al., 2006). L'apport d'ATB en cocktail peut aussi augmenter le nombre de bactéries résistantes, stimuler la nitrification et inhiber la dénitrification (Ma et al., 2014). De plus le stress causé par la présence des ATB en mélange peut augmenter la respiration du sol (Fang et al., 2014). Cependant ces effets sont observés à des concentrations bien supérieures à celles utilisées dans nos travaux.

Les mélanges ATB + ETM peuvent aussi perturber les populations microbiennes et leurs activités. Des effets toxiques sur l'abondance microbienne antagonistes (Xu et al., 2016), synergiques (Lu et al., 2013), ou similaires à ceux observés avec l'ATB apporté seul (Aiju et al., 2014) ont été observés. Des mélanges d'ATB et de métaux peuvent également plus fortement impacter la structure des communautés microbiennes que les apports de contaminants seuls (Xu et al., 2016). Les mélanges ATB + ETM peuvent aussi diminuer des activités spécifiques comme la fluorescéine diacétate, la déshydrogénase et la respiration basale avec des effets antagonistes les premiers jours, puis additifs ou synergiques (Xu et al., 2016) ; diminuer la diversité des communautés microbienne avec des effets synergiques (Kong et al., 2006) ; ou encore inhiber la nitrification avec des effets antagonistes (Aiju et al., 2014).

Ainsi, ces quelques études montrent que les antibiotiques peuvent exercer des effets différents lorsqu'ils sont apportés en mélange de contaminants ou lorsqu'ils sont apportés seuls. Toutefois la concentration des contaminants, leur nature, leurs propriétés physico-chimiques ainsi que celles du milieu, sont autant de facteurs pouvant générer des résultats différents.

Les antibiotiques utilisés sont la molécule bactériostatique SMX et la molécule bactéricide CIP. L'effet cocktail ATB + ATB est testé en mélangeant les molécules SMX et CIP. L'effet métaux ainsi qu'un effet dose de métaux ont été testés en mélangeant respectivement les molécules SMX ou CIP avec une solution de cuivre et zinc, suivant deux doses, une dose réaliste ETMx1 et une dose 5 fois plus concentrée en ETMx5. Ces deux ETM peuvent perturber la diversité et les activités de la microflore tellurique (Chander et Brookes, 1993 ; Lock et Jansen, 2005). En effet, dans l'environnement, les cations métalliques peuvent être essentiels au fonctionnement normal des cellules bactériennes à faible concentration, mais ils deviennent toxiques à des niveaux élevés (Lemire et al., 2013). La faible dose de métaux ETMx1 est inférieure à la PNEC (Predicted No Effect Concentration), tandis que la dose 5 fois plus forte ETMx5 est très probablement supérieure à la PNEC. On s'attend donc à un effet toxique de la dose ETMx5 sur la biomasse microbienne. Par ailleurs, les bactéries dans le sol sont plus rapidement affectées par

l'augmentation du Zn que par celle de Cu, sans doute du fait du caractère plus mobile du Zn dans la solution du sol sous forme de cations libres, tandis que le Cu se fixe rapidement aux constituants du sol (Chaudri et al., 2000).

Ce chapitre a pour objectifs de répondre aux questions suivantes :

- i) Est-ce que l'apport d'ATB en mélange avec d'autres contaminants induit des effets sur les microorganismes différents de ceux observés lorsque l'antibiotique est apporté seul ?
- ii) L'impact des métaux Cu et Zn sur les microorganismes est-il direct (toxicité) ou indirect via des réactions physicochimiques ?
- iii) Y a-t-il un effet dose de métaux sur les microorganismes du sol et leurs activités ?
- iv) Y-at-il un effet molécule des cocktails ATB + ETM ?

Les hypothèses à tester sont que :

- i) Pour le cocktail SMX + CIP, une synergie entre ATB pourrait induire un effet non observé avec chaque ATB pris isolément ;
- ii) pour les cocktails ATB + ETM :
 - la présence des métaux entraîne des modifications physico-chimiques du sol (comme la diminution du pH), pouvant affecter les microorganismes.
 - La présence des métaux limite l'impact des antibiotiques sur les microorganismes. En effet, comme démontré dans le chapitre précédent, les métaux augmentent l'adsorption des molécules d'antibiotiques, ce qui limite leur disponibilité aux microorganismes, et donc leur impact sur les populations microbienne et leurs activités.
 - L'effet toxique des métaux augmente avec la dose.
 - Les effets observés sont différents pour SMX et CIP.

7.2 Matériels et méthodes

Les ATB et sols étudiés ainsi que les mesures réalisées dans ce chapitre sont résumés sur la Figure 29.

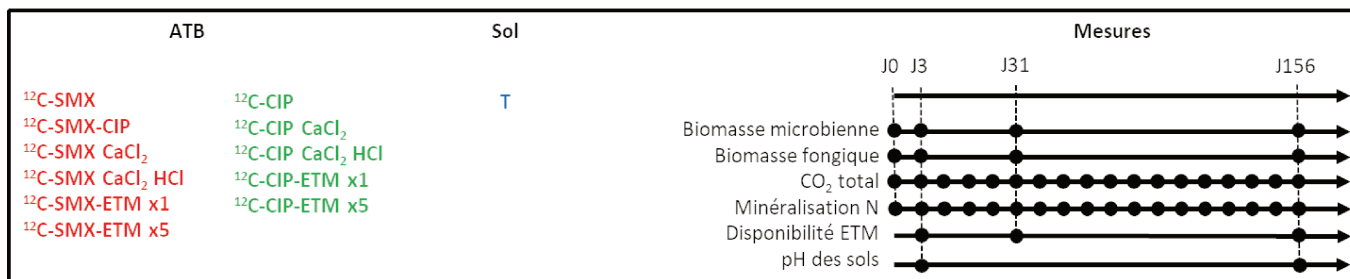


Figure 29 : Schéma récapitulatif des expérimentations du chapitre 7.

Les solutions d'apports des molécules dans les trois types de cocktails sont les suivantes :

- pour le cocktail d'antibiotiques SMX + CIP, les molécules sont apportées dans l'eau.
- les cocktails antibiotique ATB + ETM sont apportés via des solutions de chlorure de sels ($\text{CuCl}_2 + \text{ZnCl}_2$) aux deux doses ETMx1 et ETMx5.

Les concentrations testées sont rappelées dans le Tableau 26.

Tableau 26 : Concentrations utilisées des antibiotiques $^{12}\text{C-SMX}$ et $^{12}\text{C-CIP}$, ainsi que des éléments traces métalliques Cu et Zn ($\mu\text{g.g}^{-1}$ sol).

| $^{12}\text{C-SMX}$ | $^{12}\text{C-CIP}$ | ETMx1 | | ETMx5 | |
|---------------------|---------------------|-------|----|-------|-----|
| | | Cu | Zn | Cu | Zn |
| 0.02 | 0.15 | 20 | 30 | 100 | 150 |

Comme dans le chapitre précédent, pour différencier les effets toxiques des métaux des effets pH et force ionique, les ATB ont été apportés dans l'eau ou dans une solution de CaCl_2 acidifiée ou non à l'acide chlorhydrique HCl, telles que la force ionique des solutions $\text{CaCl}_2 \pm \text{HCl}$ corresponde à celle des solutions ETMx5. Les traitements $^{12}\text{C-ATB}$ (CaCl_2) et $^{12}\text{C-ATB} + \text{ETMx1}$ présentaient un pH similaire, ainsi que les traitements $^{12}\text{C-ATB}$ ($\text{CaCl}_2 + \text{HCl}$) et $^{12}\text{C-ATB} + \text{ETMx5}$.

7.3 Résultats

7.3.1 Impact du mélange ATB + ATB

7.3.1.1 Biomasse microbienne totale

L'apport d'ATB (SMX+CIP) en mélange par comparaison au sol non traité aux antibiotiques \emptyset , n'a pas d'effet sur la biomasse microbienne totale à J3 et J31 (respectivement à J3 : 130 et 121 mg C.kg⁻¹ ; et à J31 : 109 et 109 mg C.kg⁻¹). A J156, la biomasse microbienne dans le sol traité est supérieure (72 et 91 mg C.kg⁻¹) de manière inattendue (Figure 30).

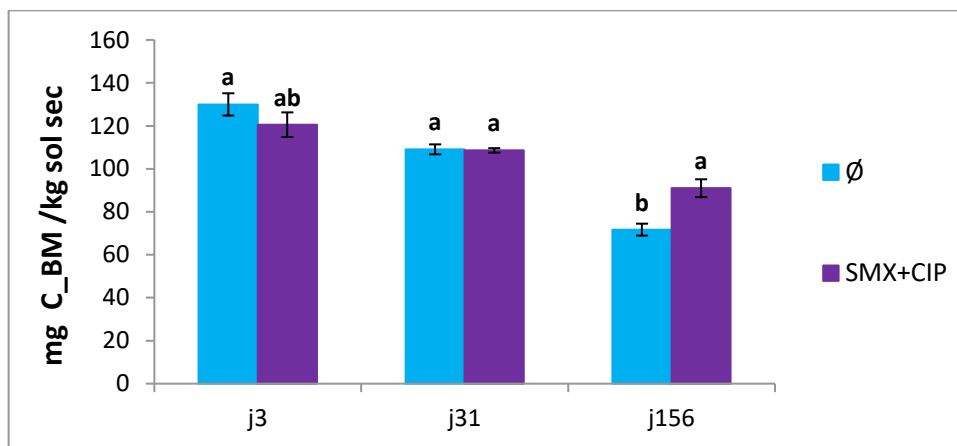


Figure 30 : Biomasse microbienne (BM) dans le sol témoin de Qualiagro non traité aux antibiotiques (\emptyset), et traité avec le cocktail d'antibiotiques (SMX + CIP), à J3, J31 et J156. Traitements statistiques par date.

7.3.1.2 Biomasse microbienne fongique

La biomasse fongique est similaire dans le sol non traité \emptyset et le sol traité avec le cocktail SMX + CIP, quelle que soit la date de mesure (à J3 : 0.55 mg ergostérol.kg⁻¹ ; à J31 : 0.52 mg ergostérol.kg⁻¹ ; à j156 : 0.36 mg ergostérol.kg⁻¹). Les ATB apportés en mélange n'ont eu aucun effet sur la biomasse microbienne fongique de ce sol (Figure 31).

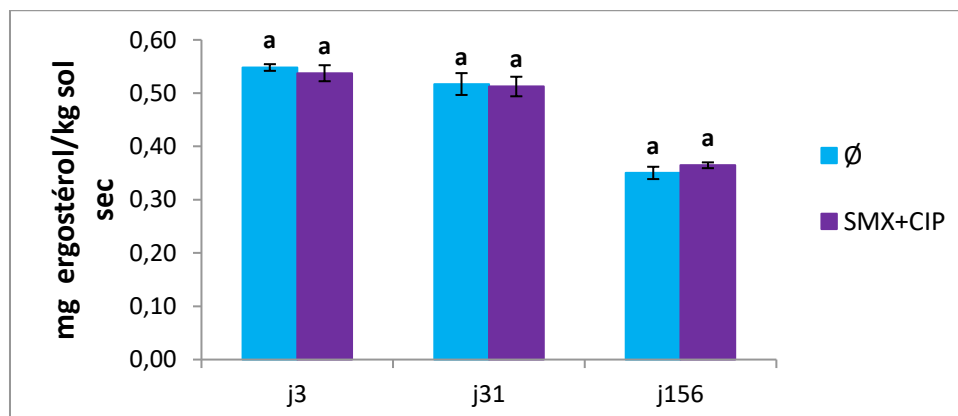


Figure 31 : Biomasse fongique dans le sol témoin de Qualiagro non traité aux antibiotiques (\emptyset), et traité au cocktail d'antibiotiques (SMX + CIP), à J3, J31 et J156. Traitements statistiques par date.

7.3.1.3 Respiration totale

A J156, la respiration carbonée totale, exprimée par rapport à la teneur en C initiale du sol (Figure 32), est supérieure dans le sol traité avec le mélange SMX + CIP comparée au sol non traité mais les différences restent faibles (respectivement 5 et 6%). La respiration supérieure à J156 avec le traitement SMX+CIP est toutefois cohérente avec l'augmentation de la biomasse microbienne à cette même date.

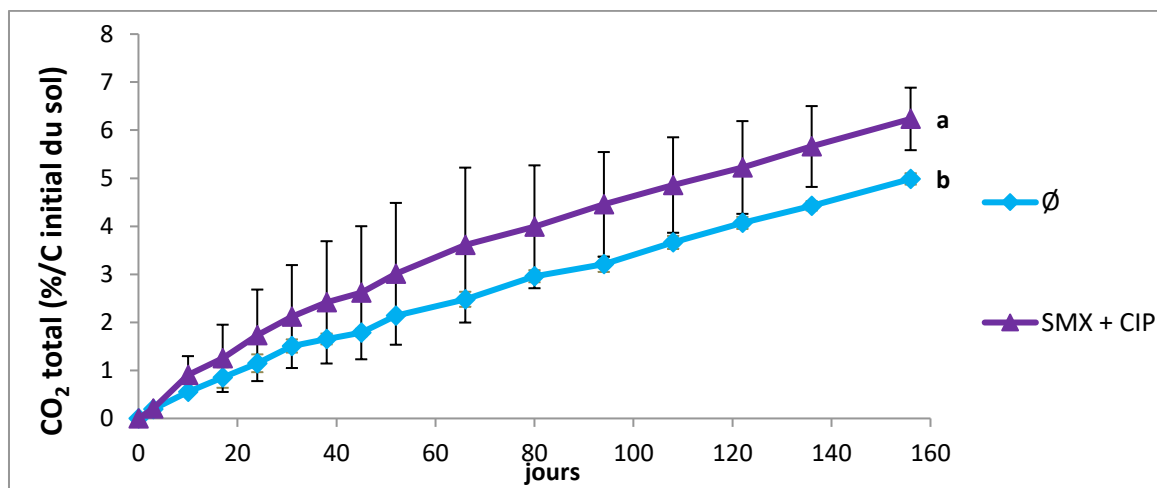


Figure 32 : Cinétiques de respiration carbonée totale dans le sol témoin QualiAgro non traité aux antibiotiques (Ø), et traité au cocktail d'antibiotiques (SMX + CIP). Traitement statistique à J156.

7.3.1.4 Minéralisation de N

Les cinétiques de minéralisation de l'azote N exprimée par rapport à l'azote total du sol (Figure 33) sont globalement similaires dans le sol non traité Ø et le sol traité avec SMX + CIP (4.2%). Il n'y a pas d'effet cocktail d'antibiotiques sur l'activité microbienne de minéralisation de N dans ce sol.

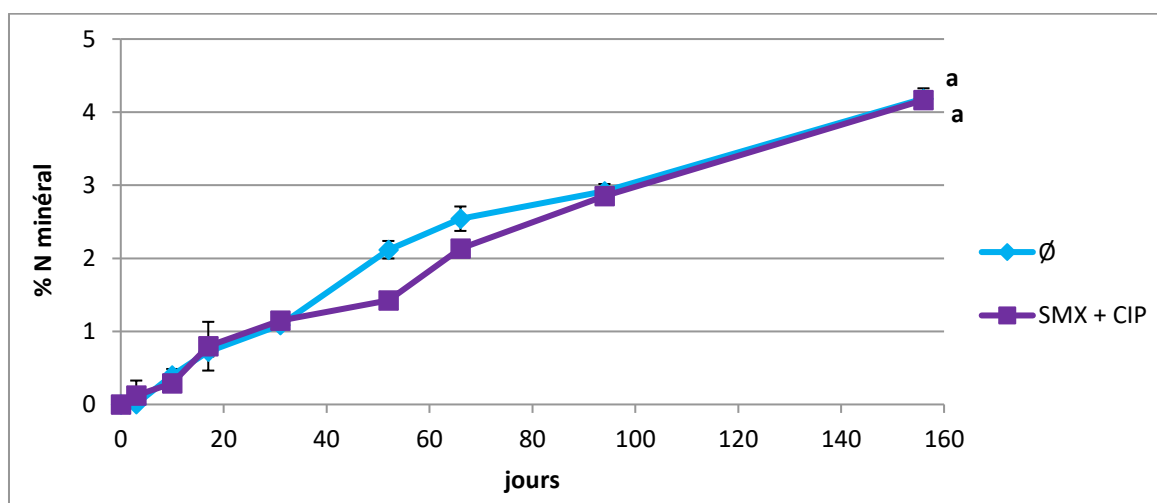


Figure 33 : Cinétiques de minéralisation de N dans le sol témoin de QualiAgro non traité aux antibiotiques (Ø) et traité au cocktail d'antibiotiques (SMX + CIP). Traitement statistique à J156.

7.3.2 Impact du mélange ATB + ETM

7.3.2.1 Mesure du pH des sols dans les extraits CaCl₂

A J3, les microcosmes non traités ou ayant reçu les ATB en solution CaCl₂ donnent des pH CaCl₂ voisins (~5.7) légèrement supérieurs à ceux qui ont reçu les ETM à dose x1. Les microcosmes ayant reçu les ATB dans du CaCl₂ acidifié ou associés à la dose forte ETMx5 donnent les pH les plus acides (~5.5) avec entre eux des différences pas toujours significatives (Figure 34).

On observe les mêmes classements à J31 et J149. Mais globalement les pH évoluent peu (de 0.1 à 0.2 unité) tout au long de l'incubation (entre 5.41 et 5.74).

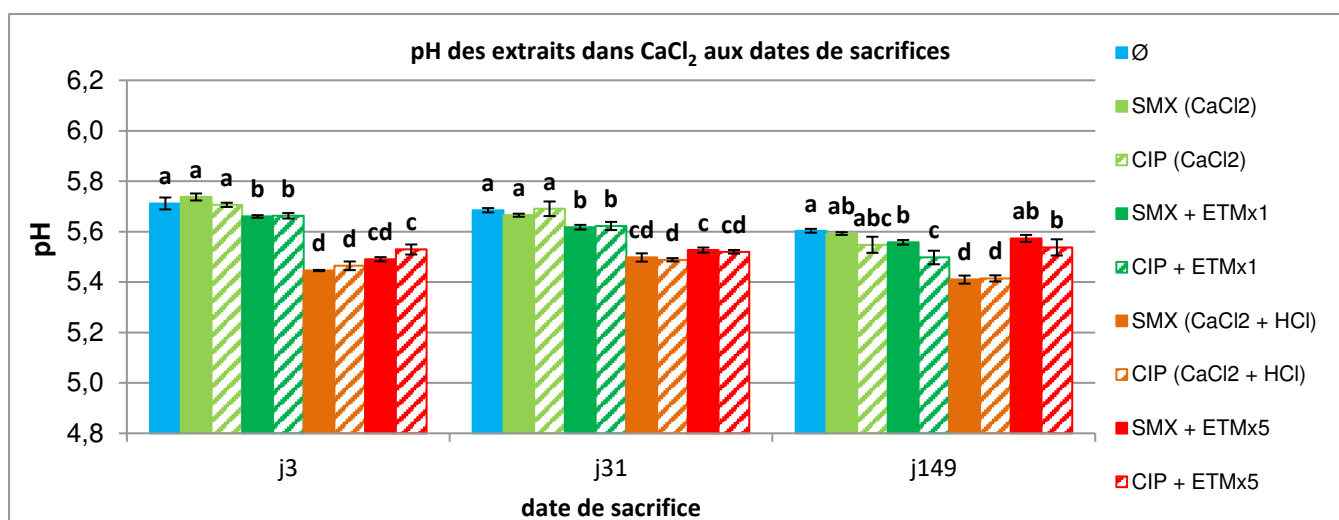


Figure 34 : pH du sol non traité Ø et traité aux antibiotiques ATB (SMX ou CIP) apportés dans une solution de CaCl₂, (ATB + CaCl₂) ; en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; dans une solution de CaCl₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl₂ + HCl) ; en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 ; à J3, J31 et J149. Traitements statistiques par date.

7.3.2.2 Disponibilité du Cu et Zn

Les teneurs en cuivre et zinc disponibles sont similaires dans les sols traités au SMX ou à la CIP (Tableau 27). Il n'y a pas d'effet de la nature de l'ATB sur la disponibilité des métaux.

Quelle que soit la dose d'ETM apportée, la disponibilité du Cu, en % du Cu apporté, devient rapidement (dès 3 jours) très faible avec des valeurs < 1.2% (Figure 35, A). Les % de Cu disponibles pour la dose ETMx1 sont inférieurs à ceux pour ETMx5 et restent constants tout au long de l'incubation. Lorsque les ETM sont apportés à plus forte dose, les % de Cu disponibles sont plus élevés (mais de manière non proportionnelle à la dose) et ont tendance à diminuer au cours du temps.

Le zinc reste davantage disponible que le cuivre pendant toute la durée de l'incubation (entre 5 et 36%) (Figure 35, B). Les % de Zn disponible sont également supérieurs dans les sols traités aux ETMx5 par rapport aux sols traités aux ETMx1 (respectivement 34 contre 18.5% à J3 ; 28 contre 12% à J31, et 20.5 contre 5% à J149). Le zinc disponible a tendance à diminuer au cours du temps.

Il y a donc un effet dose de métaux sur la disponibilité du cuivre et du zinc dans le sol.

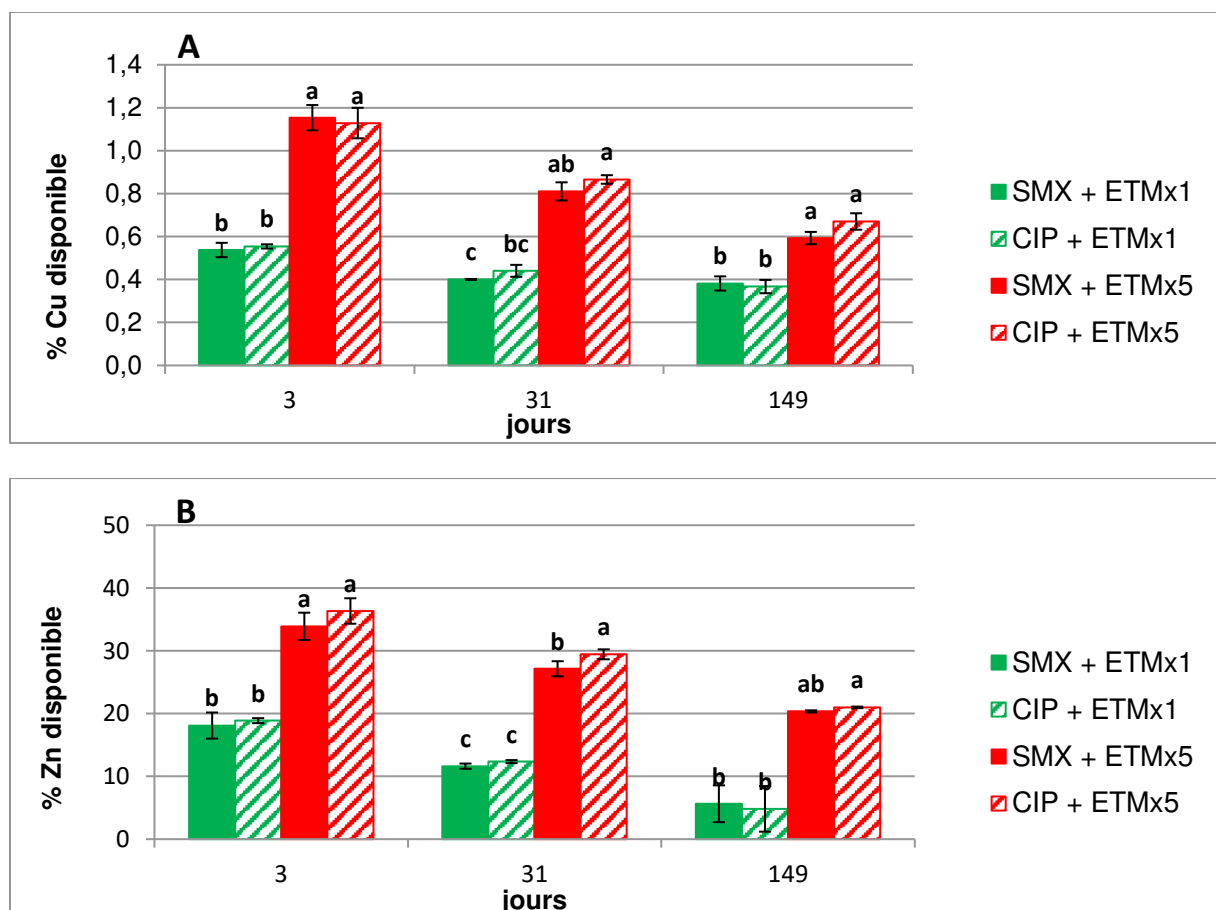


Figure 35 : % de Cuivre (A) Zinc (B) disponible dans les sols traités aux antibiotiques ATB (SMX ou CIP) apportés en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1; et apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB+ ETMx5 ; à J3, J31 et J149. Traitements statistiques par date.

Tableau 27 : Teneurs en cuivre et en zinc disponibles (mg.kg^{-1}), dans les sols traités aux antibiotiques ATB (SMX ou CIP) apportés en mélange avec les métaux à faible dose ATB + ETMx1 ; traités aux antibiotiques apportés en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5, à J3, J31 et J149. Les lettres représentent les différences statistiques entre les trois dates.

| mg.kg ⁻¹ | SMX + ETMx1 | | CIP + ETMx1 | | SMX + ETMx5 | | CIP + ETMx5 | |
|---------------------|-------------|------|-------------|------|-------------|-------|-------------|-------|
| | Cu | Zn | Cu | Zn | Cu | Zn | Cu | Zn |
| j3 | 0.11 | 5.43 | 0.11 | 5.66 | 1.15 | 50.85 | 1.13 | 54.51 |
| j31 | 0.08 | 3.49 | 0.09 | 3.70 | 0.8 | 40.70 | 0.87 | 44.16 |
| j149 | 0.08 | 1.69 | 0.05 | 0.97 | 0.59 | 30.52 | 0.67 | 31.49 |

7.3.2.3 Biomasse microbienne totale

L'apport de SMX dans une solution de CaCl_2 ou en présence de métaux à faible dose n'a pas d'impact sur la biomasse microbienne totale. Lorsque le SMX est apporté dans une solution acidifiée, on observe une légère diminution de la biomasse microbienne totale. Des fortes doses de métaux diminuent également la biomasse microbienne, ce traitement étant le plus drastique. Ces effets persistent tout au long de l'incubation même si globalement la biomasse microbienne diminue au cours du temps. Les effets sont similaires pour SMX et CIP (Figure 36 A et B).

Il y a donc un effet acidité et un effet métaux à haute dose sur la biomasse microbienne totale.

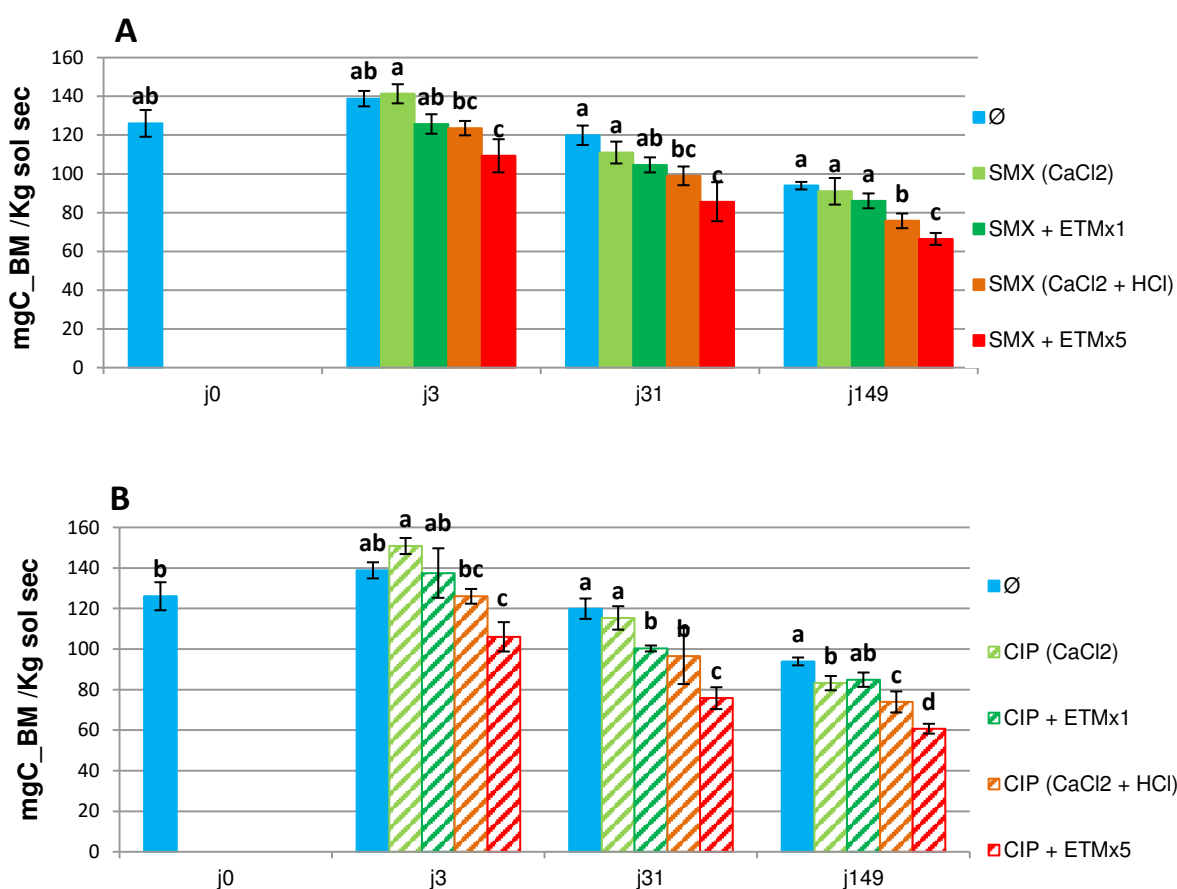


Figure 36 : Biomasse microbienne totale (BM) dans le sol témoin de Qualiagro non traité, Ø, traité aux antibiotiques ATB, (A) SMX ou (B) CIP, apportés dans une solution de CaCl_2 , ATB (CaCl_2) ; en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; dans une solution de CaCl_2 acidifiée au HCl, ATB (CaCl_2 + HCl) ; et en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 ; à J0 pour le sol non traité, et à J3, J31 et J149. Les lettres a b c résument les résultats de tests statistiques, qui comparent l'ensemble obtenu à J0 et J3, puis les résultats obtenus à J31, puis les résultats à J149.

Par ailleurs, les effets pour SMX et CIP ne sont pas significativement différents (résultats statistiques non présentés) ; il n'y a pas d'effet de la molécule sur la biomasse microbienne totale.

7.3.2.4 Biomasse microbienne fongique

Les différents modes d'apports des ATB n'ont pas d'effet sur la biomasse fongique. Il n'y a pas d'effet molécule, pas d'effet ETM, pas d'effet pH sur les biomasses fongiques de ces sols (Figure 37 A et B).

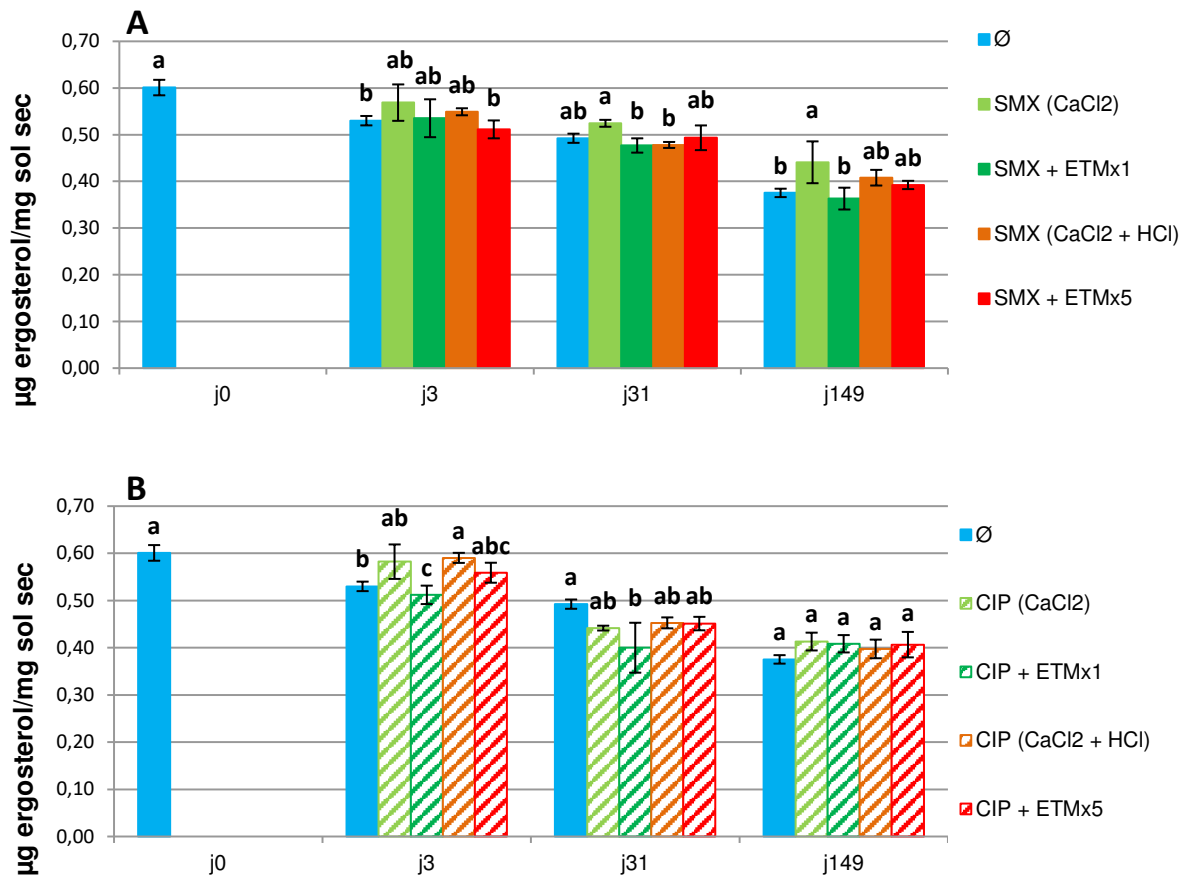


Figure 37 : Biomasse fongique (BF) dans le sol témoin de Qualiagro non traité, Ø, dans les sols traités aux antibiotiques ATB, (A) SMX ou (B) CIP, dans une solution de CaCl₂, ATB (CaCl₂) ; en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; dans une solution de CaCl₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl₂ + HCl) ; et en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5 ; à J0 pour le sol non traité, et à J3, J31 et J149. Les lettres a b c résument les résultats de tests statistiques, qui comparent l'ensemble obtenu à J0 et J3, puis les résultats obtenus à J31, puis les résultats à J149.

7.3.2.5 Respiration totale

Les courbes de la Figure 38 A et B montrent des dégagements de CO₂ compris entre 2.74 et 3.75% du C initial après 149 jours d'incubation. Par rapport aux microcosmes non exposés aux contaminants, la minéralisation est un peu plus faible lorsque les ATB sont apportés dans une solution acidifiée (courbes A et B) ou en présence d'une forte concentration en métaux (courbe B uniquement), ce qui est cohérent avec les résultats de biomasse microbienne totale.

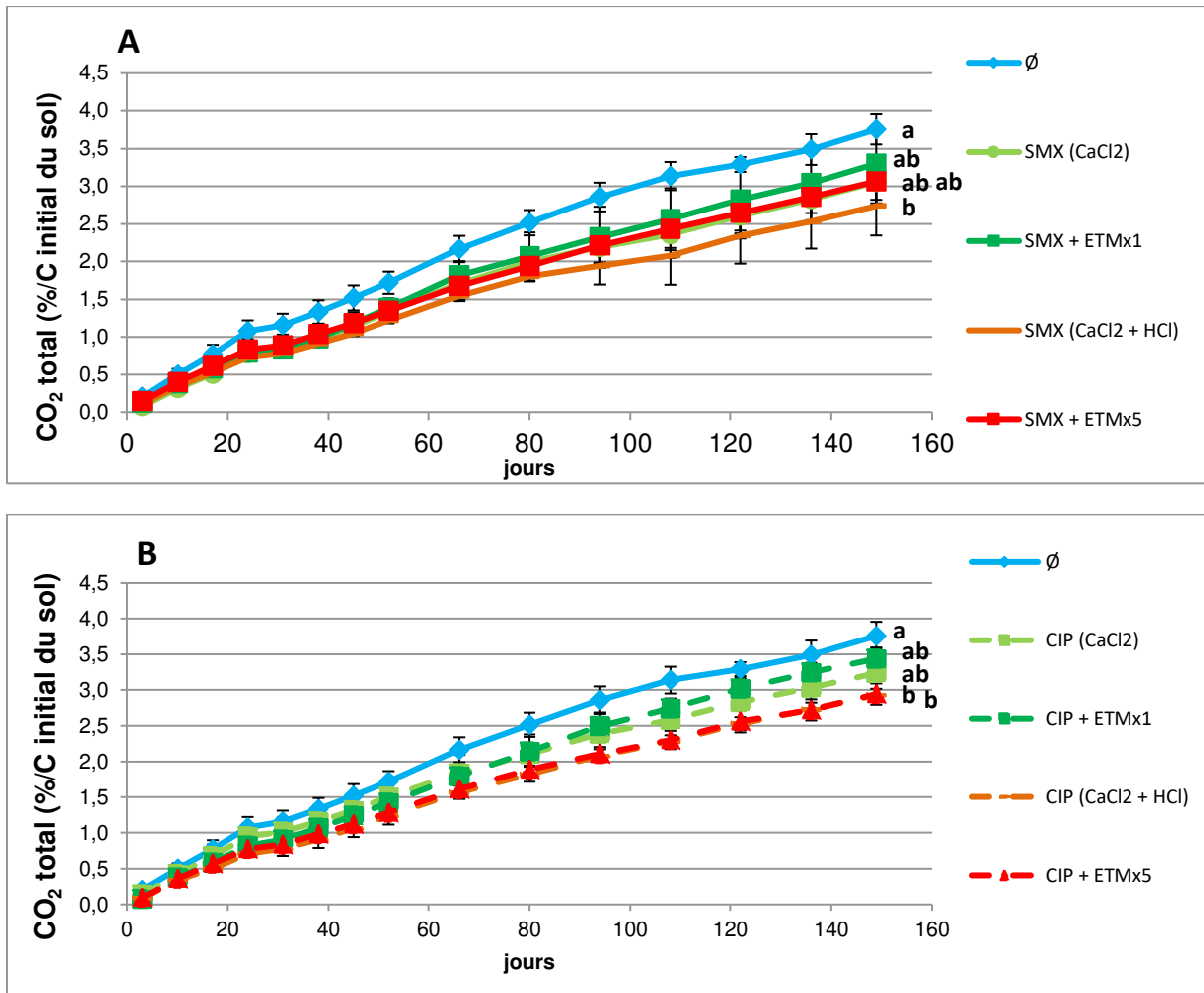


Figure 38 : Cinétiques de respiration carbonée totale dans le sol témoin QualiAgro non traité, Ø, dans les sols traités aux antibiotiques ATB, (A) SMX ou (B) CIP, apportés dans une solution de CaCl₂, ATB (CaCl₂) ; en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; dans une solution de CaCl₂ acidifiée au HCl, ATB (CaCl₂ + HCl) ; et en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5. Traitement statistique à J149.

Par ailleurs, la respiration des sols traités avec SMX ou CIP n'est pas significativement différente (résultats statistiques non présentés) ; il n'y a pas d'effet de la molécule sur la respiration totale.

7.3.2.6 Minéralisation de N

La minéralisation de l'azote varie entre 3.1 et 4% après 149 jours. Globalement, les cinétiques de minéralisation de l'azote sont similaires quelle que soit la nature de l'ATB (SMX vs CIP) et quel que soit le mode d'apport des ATB (solution acidifiée, en présence de métaux). Seuls les traitements CIP ($\text{CaCl}_2 + \text{HCl}$) et CIP + ETMx5 sont significativement différents mais avec des valeurs très proches des autres traitements (Figure 39).

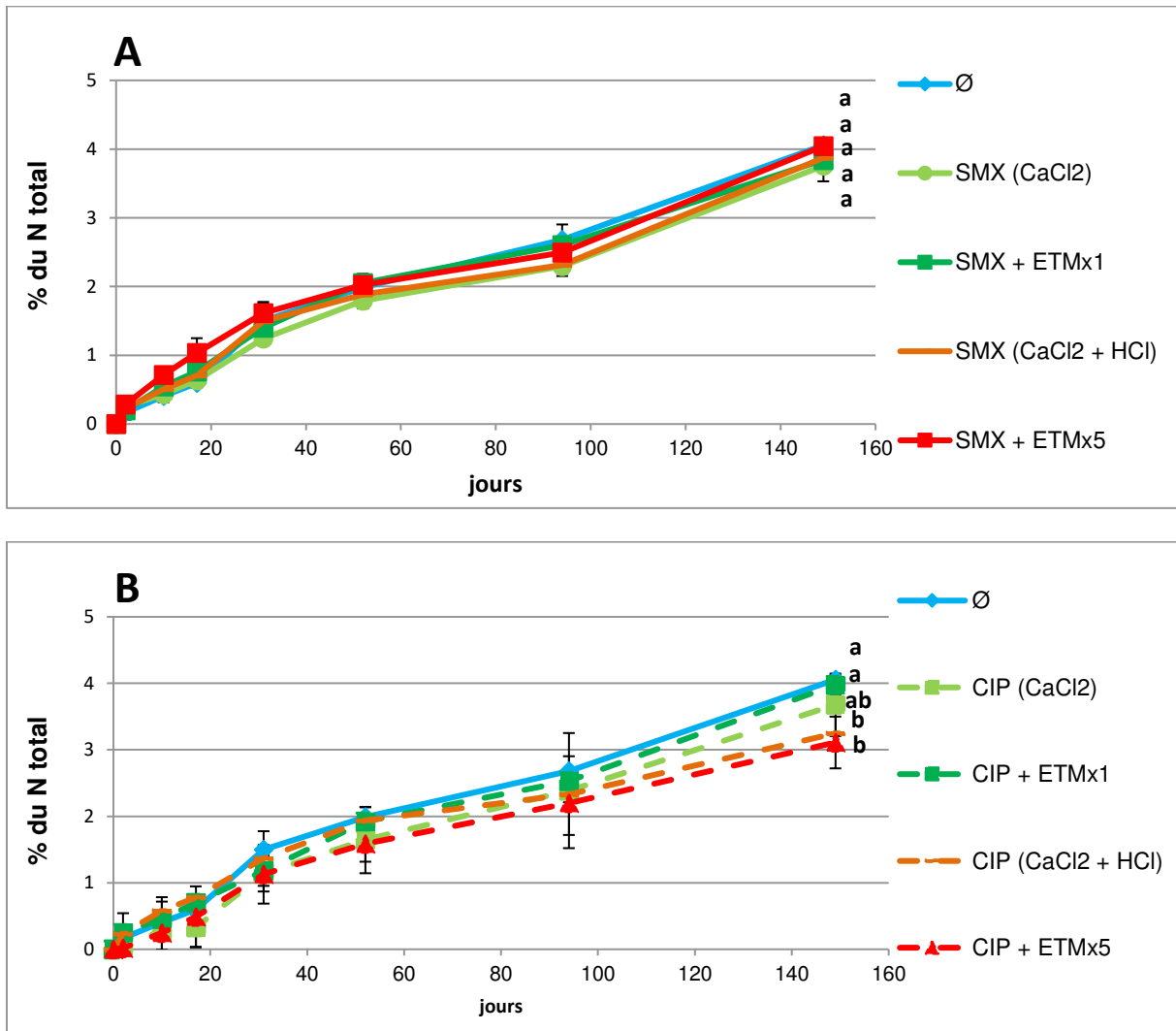


Figure 39 : Cinétiques de minéralisation de N dans le sol témoin de QualiAgro non traité, Ø, dans les sols traités aux antibiotiques ATB, (A) SMX ou (B) CIP, apportés dans une solution de CaCl_2 , ATB (CaCl_2) ; en mélange avec les métaux à faible dose, ATB + ETMx1 ; dans une solution de CaCl_2 acidifiée au HCl, ATB ($\text{CaCl}_2 + \text{HCl}$) ; et en mélange avec les métaux à forte dose, ATB + ETMx5. Traitement statistique à J149.

7.4 Discussion

L'objet de cette discussion est de déterminer si, les antibiotiques, apportés seuls, en cocktails d'antibiotiques SMX + CIP, ou en mélange avec des éléments traces métalliques ATB + ETM, ont des effets différents sur les microorganismes du sol et leurs activités. Pour rappel, dans le chapitre 5, nous n'avions quasiment pas observé d'effet des ATB apportés seuls.

7.4.1 Effet cocktail ATB + ATB

La bibliographie montre que généralement, les effets cocktails d'antibiotiques sur la microflore du sol apparaissent dès les premiers jours, voire les premiers mois (Kotzerke et al., 2008 ; Girardi et al., 2011 ; Reichel et al., 2013 ; Cui et al., 2014 ; Molaei et al., 2017). Or, dans notre étude, nous avons observé une stimulation de la biomasse microbienne totale et de la respiration carbonée sous l'effet du cocktail après 5 mois d'incubation. Néanmoins ce résultat reste à nuancer car les différences avec le sol non traité sont faibles. De plus, dans le chapitre 3, nous avons montré qu'après 5 mois, les ATB et leurs métabolites ont quasiment disparu de la solution du sol et sont majoritairement fortement adsorbés ou non-extractibles (Chapitre 3).

Néanmoins certains auteurs ont déjà mis en évidence une stimulation de la respiration totale en réponse à un apport combiné d'antibiotiques, mais à des concentrations d'antibiotiques bien plus fortes que celles utilisées dans cette étude (Ma et al., 2014 ; Fang et al., 2014). Ma et al. (2014) ont par exemple montré qu'après un apport en cocktail de tétracycline, sulfamonométhoxine et de ciprofloxacine (100 mg.kg^{-1}), la respiration totale était supérieure à celle des sols traités aux antibiotiques apportés seuls au bout de 20 jours. Ma et al. (2014) ont attribué cette augmentation à une réaction de stress des microorganismes sous la pression du cocktail de tétracycline, sulfamonométhoxine et de ciprofloxacine (100 mg.kg^{-1}). Fang et al. (2014) qui ont appliqué 5 fois de suite un mélange de sulfadiazine et de chlortétracycline, à des concentrations allant de 0.1 à 20.0 mg.kg^{-1} et avec 60 jours entre deux applications, ont observé qu'au bout de 2 applications, la respiration du sol était inhibée. Mais à mesure des applications, la respiration a augmenté pour dépasser de près de 2 fois la respiration obtenue avec des ATB apportés seuls. L'augmentation de la respiration totale s'expliquait par la prolifération de populations microbiennes résistantes.

Ces hypothèses semblent peu probables dans notre cas, les concentrations d'ATB étant très faibles et les sols n'ayant reçu qu'un seul apport d'ATB.

7.4.2 Effet cocktail ATB + ETM

Les effets des interactions ATB +ETM sur la microflore du sol peuvent être divers. En effet, en se complexant avec les antibiotiques, les métaux peuvent diminuer, voir inhiber les impacts des antibiotiques, soit en les inactivant, soit en réduisant leur activité, soit en limitant leur biodisponibilité aux microorganismes. Mais ce complexe peut aussi favoriser l'expression de la toxicité du métal, si l'antibiotique est utilisé comme vecteur intracellulaire. Ainsi une fois dans la cellule, le métal peut exercer son activité toxique, soit sous forme complexée, soit après s'être dissocié de l'antibiotique. De même, la complexation avec les métaux peut aussi permettre aux antibiotiques de franchir les membranes de bactéries résistantes aux antibiotiques, comme observé pour les fluoroquinolones (Uivarosi, 2013).

Enfin, les interactions ATB +ETM peuvent se produire une fois les deux éléments dans la cellule microbienne, (Poole, 2017).

Dans notre étude, même si nous n'avons pas observé d'effet du SMX et de la CIP sur la biomasse microbienne et ses activités lorsque les ATB étaient apportés seuls (Chapitre 4), nous pouvions faire l'hypothèse d'un potentiel effet cocktail après complexation avec le cuivre ou le zinc, comme cela se produit entre les sulfonamides et Cu (Morel et al., 2014 ; Wu et al., 2012 ; Pei et al., 2010) ou entre les fluoroquinolones et Cu ou Zn (Graouer-Bacart et al., 2013 ; Graouer-Bacart et al., 2015).

Cependant, des apports de métaux pouvant également affecter les microorganismes du sol de manière indirecte via une baisse de pH ou une modification de la force ionique, nous avons également testé ces 2 hypothèses.

Globalement, nous avons montré que lorsque les métaux sont apportés à faible dose, les mélanges ATB + ETM n'ont pas eu d'effet sur la biomasse microbienne totale, la biomasse fongique et les activités de minéralisation du C et de N.

En revanche, des apports d'ETM à forte dose en mélange avec des ATB affectent la biomasse microbienne et en particulier la biomasse bactérienne et la respiration globale. Nous avons pu mettre en évidence à la fois un effet pH et un effet direct des métaux (ou des ATB). L'effet sur la biomasse bactérienne de la combinaison ATB + ETMx5 est plus important que l'effet du même ATB en milieu acide ($\text{CaCl}_2 + \text{HCl}$). L'effet pH semble s'exprimer sur une faible gamme de variation, de l'ordre de 0.2 unité. Différents travaux ont mis en évidence l'effet du pH sur les microorganismes du sol et leurs activités sur de faibles gammes de variations mais qui sont en général plutôt de l'ordre d'une unité (e.g. Martensson et Witter, 1990 ; Martensson, 1993). Dahling et al. (1997) et Smolders et al. (2009) s'accordent sur le fait que la diminution de pH après apport de métaux n'explique pas entièrement, voire pas du tout les effets toxiques.

Quelle est la part des effets toxiques directs entre métaux et ATB ? D'après le chapitre 5, l'adsorption du SMX sur le sol est plus forte en présence de métaux à forte dose que lorsque le SMX est apporté seul au sol, principalement par complexation avec le cuivre, plutôt qu'avec le zinc. En effet, le cuivre est un agent complexant plus fort que le zinc, et apporté en combinaison, les deux métaux entrent en compétition sur les sites d'adsorption du sol négativement chargés, en faveur des ions Cu^{2+} , (Kim et al., 2008 ; Yang et al., 2015). Nos résultats d'extraction au CaCl_2 confirment ce fait : à J3, 99% du cuivre apporté à dose forte n'est plus disponible, contre 35% pour le zinc.

La majorité du SMX est donc adsorbée au sol par complexation avec le cuivre, limitant le contact entre microorganismes et SMX. Les effets directs du SMX semblent donc mineurs par rapport à ceux des métaux et en particulier du Zn qui reste disponible en grande proportion dans la solution du sol.

En effet, la toxicité des métaux est principalement causée par les ions libres métalliques présents en excès et disponibles en solution (e.g. Checkai et al., 1987 ; Wolt, 1994 ; Smolders et al., 2009).

Pour la CIP, apportée en mélange avec la forte dose de métaux, la molécule ne se trouve plus sous une forme zwitterionique comme c'était le cas lors de son apport seul au sol (pH=6.7) (chapitre 3), mais sous une forme majoritairement cationique car le pH du sol (5.5-5.6) est cette fois-ci inférieur au $\text{pK}_a = 6.2$ de la CIP. Cette forme cationique devrait favoriser son adsorption mais elle entre en compétition avec les cations Cu^{2+} et Zn^{2+} sur les sites d'adsorption négativement chargés. Le cuivre peut dans certains cas empêcher l'adsorption

des antibiotiques (Pei et al., 2014). Mais l'apport de 100 mg Cu.kg⁻¹ sol ne représente qu'environ 3,15 mmol+ par kg alors que la CEC est de 76 mmol+ par kg (Tableau 10 chapitre 3). Il est donc improbable que le cuivre et le zinc aient saturé tous les sites de fixation du sol. A J3, il ne reste qu'1% de cuivre disponible et 35% de zinc disponible. La disponibilité du Cu reste ensuite faible et stable alors que celle du Zn diminue lentement. On peut donc faire l'hypothèse que la CIP est en très grande majeure partie adsorbée, par échange cationique sur des sites d'abord occupés par Ca²⁺, ou comme le SMX, par complexation avec le cuivre et le zinc fixés au sol. En effet, la complexation est possible au niveau du groupement carboxyle de la CIP (Tableau 12 chapitre 3), où le proton H⁺ est éjecté en faveur de liaisons ioniques plus fortes avec les cations métalliques. Comme le SMX, la CIP ne serait alors plus accessible aux microorganismes. Si la CIP était dans la solution du sol avec le zinc disponible, un effet cocktail CIP-ETM sur les microorganismes pourrait apparaître. Mais, la diminution de la biomasse microbienne totale sous l'effet du traitement CIP + ETMx5 serait alors plus accentuée que celle induite par le traitement SMX + ETMx5. Or il n'y a pas de différence significative des effets de ces deux traitements sur la microflore du sol. L'hypothèse d'un effet cocktail CIP-Zn est donc rejetée.

Il n'y a donc pas d'effet cocktail ATB + ETM sur les microorganismes du sol, seulement un effet du zinc à forte dose.

7.5 Conclusion sur les effets de SMX et CIP apportés en mélange de contaminants

L'hypothèse sous-jacente à l'apport combiné de SMX et de CIP était que des interactions entre les ATB pouvaient induire un effet différent de celui observé avec chaque ATB pris isolément. Or ni la biomasse microbienne, ni les activités n'ont été affectées. Il n'y a pas d'effet cocktail SMX+ CIP, sans doute du fait des faibles concentrations utilisées.

En combinant les ATB avec les ETM, les résultats sur la biomasse microbienne (biomasse microbienne totale et biomasse fongique) et sur les activités de dégradation (minéralisation de C et N), sont similaires avec SMX ou CIP. Il n'y a pas d'effet molécules d'ATB.

Lorsque les métaux sont apportés à faible dose, les mélanges ATB + ETM n'ont pas eu d'effet sur la biomasse microbienne totale, la biomasse fongique et les activités de minéralisation du C et de N. En revanche, de faibles diminutions de pH suffisent à avoir un effet toxique sur la biomasse microbienne totale, mais moins important que celui des ETMx5 aux pH équivalents voire plus acides (CaCl₂ + HCl). Il y a donc également un effet ETM.

Il y a aussi un effet dose d'ETM. La forte dose ETMx5 diminue la biomasse microbienne totale, et de manière cohérente, la respiration totale. L'effet toxique s'est probablement porté sur une partie de la biomasse bactérienne, la biomasse fongique n'ayant pas été affectée. Cet effet toxique peut s'expliquer par une concentration utilisée supérieure à la PNEC. L'effet de la dose ETMx5 est attribué aux cations Zn²⁺ en quantité importante en solution, plutôt qu'aux cations Cu²⁺, indisponibles dès les premiers jours d'incubation.

Enfin, si les ETMx5 ont eu un impact sur la biomasse bactérienne et la respiration totale, les résultats ne permettent pas de postuler dans le sens d'une contribution des ATB aux effets observés. Au contraire, les ATB ont plus probablement été complexés au cuivre, limitant leurs effets. De plus leur concentration n'était sans doute pas suffisante pour exercer un quelconque effet. S'il y a un effet de la dose ETMx5, aucun effet cocktail ATB + ETMx5 sur les microorganismes du sol et leurs activités n'a été mis en évidence.

VIII : CONCLUSION

8 Conclusion

Cette étude s'est intéressée aux antibiotiques (ATB), polluants émergents non réglementés à ce jour, apportés dans les sols agricoles du fait de la valorisation agronomique des produits résiduels organiques (PRO). La toxicité d'un antibiotique sur le fonctionnement du sol est conditionnée par sa biodisponibilité, et pourrait être modulée de par ses interactions avec les contaminants concomitants dans les sols, tels que d'autres antibiotiques, et/ou les éléments traces métalliques (ETM). Contrairement aux antibiotiques, les apports d'ETM via les PRO sont réglementés. De plus, le devenir des contaminants dans les sols agricoles varie en fonction de leurs caractéristiques. En effet, les ETM sont des éléments inorganiques non dégradables. Ils sont par conséquent susceptibles de s'accumuler dans l'environnement davantage que les antibiotiques, qui sont des composés organiques potentiellement dégradables. Les ETM sont présents à des teneurs de l'ordre du mg.kg^{-1} dans les sols agricoles, contre des $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les antibiotiques. Les principales voies de dissipation des ETM dans les sols sont la lixiviation ou le transport colloïdal vers d'autres compartiments de l'environnement, tandis que pour les antibiotiques, s'ajoute la dégradation. Les différents processus contrôlant le devenir des contaminants dans les sols peuvent ainsi influencer sur l'occurrence et l'ampleur de leurs effets sur les communautés microbiennes (abondance, diversité, activités), et donc sur le fonctionnement global du sol.

La plupart des travaux de la littérature se sont concentrés sur l'étude du devenir des antibiotiques et de leurs effets sur les microorganismes lorsqu'ils sont apportés seuls dans les sols. Peu d'études ont abordé des apports en mélange, conditions plus proches du terrain. Tout en restant peu étudiées, les interactions entre ATB et ETM sont un peu mieux connues que les interactions entre antibiotiques. Certains travaux ont montré que les métaux peuvent augmenter la rétention des antibiotiques par complexation, influant alors directement sur leur devenir. Dans le cas des mélanges ATB + ATB, il semble que le devenir des ATB soit plutôt impacté de manière indirecte via le développement de bactéries résistantes capables de dégrader l'ATB et favorisant ainsi leur dissipation. Par ailleurs, certaines études existantes reportent pour les deux types de mélange ATB + ATB et ATB + ETM des effets synergiques, antagonistes ou additifs sur la diversité et les activités microbiennes. Cependant, les études sont à ce jour peu nombreuses et les résultats restent contrastés du fait de la grande variabilité des paramètres testés (nature des antibiotiques, nature des ETM, concentration des contaminants, type de sol, conditions expérimentales...). Par ailleurs, de manière générale, les concentrations en antibiotiques testées dans les mélanges ATB + ATB ou ATB + ETM sont 100 à 1000 fois supérieures aux doses environnementales et ne sont donc pas représentatives des conditions observées dans l'environnement.

A partir de ce constat, l'objectif de cette étude était de mieux comprendre le devenir et les impacts des antibiotiques sur les microorganismes du sol et leurs activités de dégradation, lorsqu'ils sont apportés seuls ou en mélange avec d'autres ATB ou des ETM (ATB + ATB ou ATB + ETM) à des concentrations environnementales.

Afin de rendre possible la comparaison du devenir et des effets d'ATB apportés seuls ou en mélanges (ATB + ATB et ATB + ETM), la démarche expérimentale a consisté d'abord à mettre en place des systèmes similaires et reproductibles, à savoir des microcosmes de sols en conditions contrôlées. Le devenir d'antibiotiques marqués au ^{14}C a été déterminé quantitativement par mesure de la radioactivité dans les fractions minéralisées, facilement extractibles, difficilement extractibles et non extractibles (Chapitre 4 et 6), ainsi que qualitativement par analyse de la nature des molécules marquées extractibles (ATB ou métabolites) (Chapitre 4). Les effets sur la microflore du sol ont été appréhendés par des mesures de biomasse microbienne totale et fongique et d'activités non spécifiques et par le suivi de la minéralisation de l'azote et du carbone (Chapitre 5 et 7).

Les microcosmes sont des systèmes simplifiés, qui peuvent être complexifiés afin de comprendre l'influence des facteurs testés seuls ou en interaction. C'est pourquoi, les premières étapes ont consisté à apporter les antibiotiques seuls dans les sols pour l'étude de leur devenir (chapitre 4) et de leurs effets potentiels (chapitre 5), avant leur étude en mélange (chapitres 6 et 7).

L'étude du devenir des antibiotiques apportés seuls a également permis de tester un facteur peu étudié à ce jour : l'historique d'amendement des sols (Chapitre 4). En effet, les sols recevant des amendements répétés de PRO et donc potentiellement des apports multiples d'ATB, ont des propriétés physico-chimiques et biologiques qui évoluent, ce qui peut influencer sur le devenir des antibiotiques. Ainsi, les antibiotiques ont été apportés seuls, d'une part sur un sol non amendé, et d'autre part dans deux sols qui ont reçu depuis 1998 des apports tous les 2 ans de composts de déchets verts et de boues de station d'épuration ou du fumier (ce qui représente neuf apports au moment des prélèvements).

Comme il est rarement considéré que les antibiotiques peuvent arriver dans les sols sous une forme dégradée plus ou moins toxique que le composé parent, le devenir d'un métabolite seul (chapitre 4) ou en mélange (chapitre 6) a également été considéré.

Enfin, les antibiotiques ainsi que les métaux ont été apportés à des concentrations réalistes dans les sols. Toutefois, comme l'accumulation des ETM non biodégradables dans les sols est plus plausible que celle des antibiotiques, un effet dose de métaux a aussi été testé selon un rapport 1:5.

Plus précisément, les facteurs testés dans cette étude ont été :

- i) deux antibiotiques aux comportements contrastés dans le sol, et couramment retrouvés dans les sols amendés par les PRO : le sulfaméthoxazole (SMX) de la famille des sulfonamides, et la ciprofloxacine (CIP) de la famille des fluoroquinolones, ainsi que le métabolite principal du SMX, le N-acétyl-sulfaméthoxazole (N-ac-SMX) ;
- ii) deux ETM en mélange, les plus couramment retrouvés dans les sols agricoles amendés par des PRO, le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) ;
- iii) trois types de sol : un sol témoin jamais amendé (T), et deux sols amendés tous les deux ans entre 1998 et 2013 par respectivement du fumier (FUM), et un compost de déchets verts et boues de station d'épuration (DVB).

Selon les chapitres, les questions spécifiques ont donc porté sur : l'effet molécule, l'effet métabolite, l'effet historique d'amendement, l'effet type de PRO, l'effet ATB + ATB, l'effet ATB + ETM, et l'effet dose d'ETM. Les hypothèses principales à vérifier étaient que :

- (1) Les épandages réguliers de PRO peuvent impacter le devenir des ATB dans les sols en favorisant leur adsorption du fait d'un apport de matière organique ou en stimulant leur dégradation. En effet, les amendements de PRO apportent des ATB et des métaux en quantités faibles mais susceptibles à long terme d'affecter la microflore du sol et de faire apparaître des microorganismes capables de dégrader les ATB (Topp et al., 2013). Les apports de MO pourraient également favoriser la dégradation des ATB par co-métabolisme. Enfin, les PRO pourraient apporter dans les sols des microorganismes dégradants.
- (2) Le devenir des antibiotiques et de leurs métabolites dans les sols est dépendant de leurs propriétés physicochimiques.
- (3) Le devenir et les effets des ATB sont impactés par la présence d'autres contaminants lorsqu'ils sont apportés en mélange par rapport à des apports seuls.

La Figure 40 suivante présente une réponse brève à chaque question posée par chapitre. Ces réponses sont développées dans la suite suivant une démarche intégrative du devenir et des effets des antibiotiques, respectivement pour les ATB seuls, les antibiotiques en mélange ATB + ATB, et les antibiotiques en mélange ATB + ETM, avant une discussion générale incluant les perspectives.

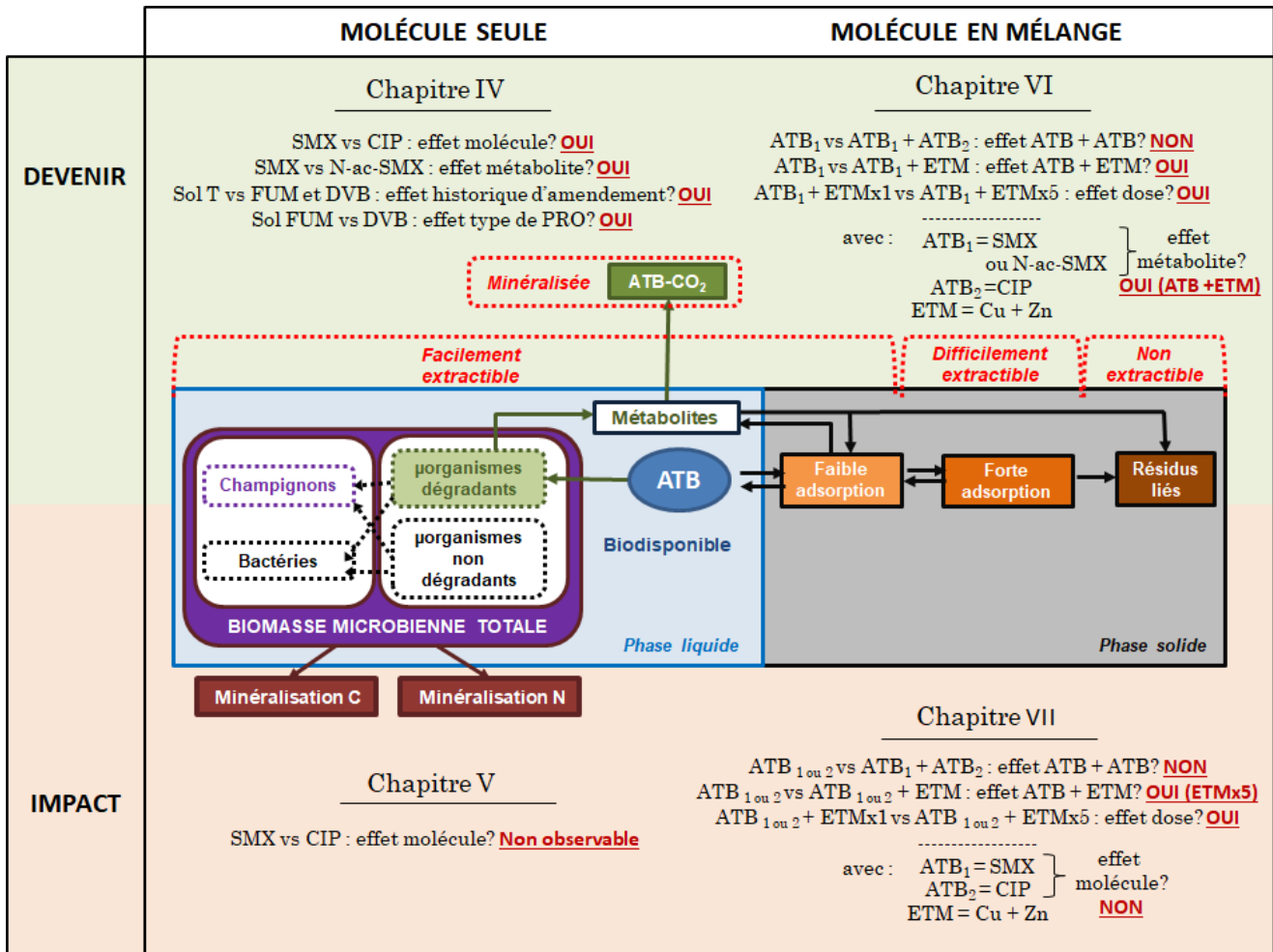


Figure 40 : Réponse brève apportée à chaque question posée par chapitre, en lien avec le devenir des antibiotiques dans les différentes fractions (minéralisées, facilement, difficilement et non extractibles), et leurs effets sur les microorganismes du sol (biomasse microbienne totale et fongique) et leurs activités (minéralisation de C et N), lorsque les antibiotiques sont apportés seuls ou en mélange de contaminants (ATB + ATB et ATB + ETM).

8.1 Synthèse

8.1.1 ATB apportés seuls au sol

Dans les conditions expérimentales choisies, les ATB, lorsqu'ils sont apportés seuls dans les sols, peuvent être partiellement ou complètement dégradés, s'adsorber réversiblement sur les constituants du sol et former des résidus non extractibles (Exemple du SMX : Figure 41).

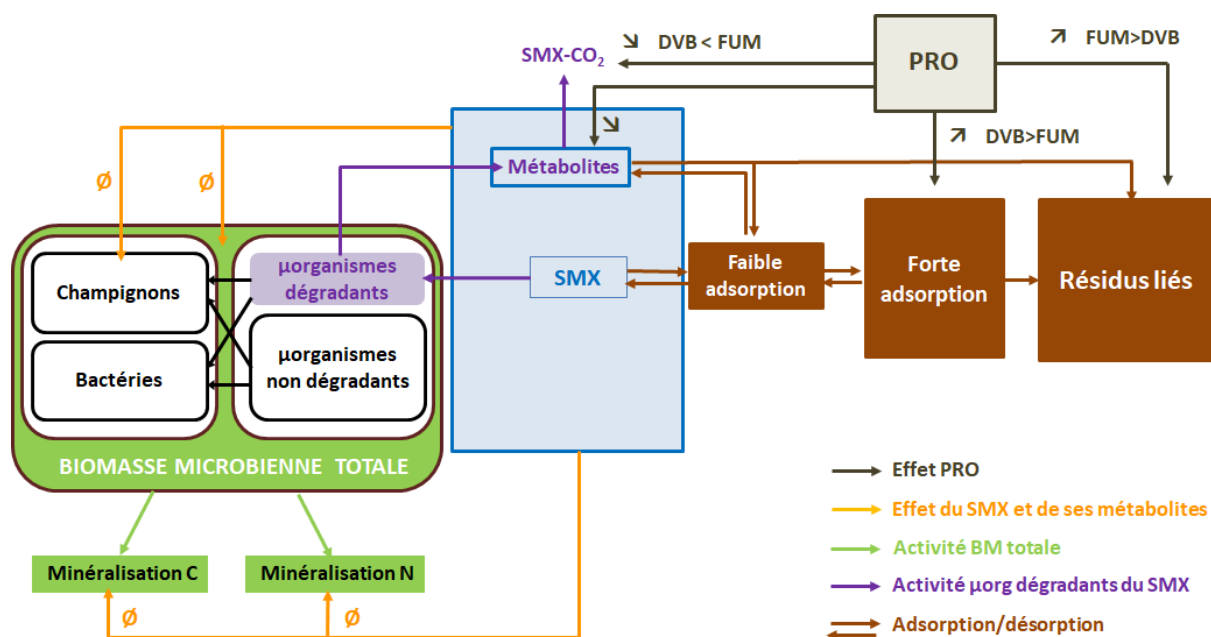


Figure 41 : Devenir et impact du SMX apporté seul au sol.

Quels que soient les ATB testés, les résidus non extractibles deviennent très rapidement majoritaires. Contrairement à la CIP, SMX et N-ac-SMX sont minéralisés, mais leur fraction biodisponible diminue rapidement, moins du fait de leur minéralisation que de leur rapide adsorption. **Ainsi quel que soit la famille des antibiotiques testés, la voie de dissipation majoritaire est la rétention.** Le comportement très similaire du SMX et du N-ac-SMX s'explique par la transformation du N-ac-SMX en SMX observée lors de l'analyse qualitative des résidus extractibles. Mais la minéralisation finale du N-ac-SMX est légèrement plus forte que celle du SMX du fait d'une adsorption plus faible du N-ac-SMX (et peut être de ses métabolites) en début d'incubation. Les différences restent beaucoup plus marquées entre les sulfonamides SMX/N-ac-SMX et la fluoroquinolone CIP qu'entre la molécule mère SMX et son métabolite principal N-ac-SMX. **L'effet ATB est donc plus marqué que l'effet métabolite dans le cas présent.**

En reprenant les hypothèses de départ, ces expériences valident le fait que **le devenir des ATB dans les sols est gouverné par leurs caractéristiques intrinsèques.** Des amendements répétés de PRO dans les sols modifient à long terme les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols (pH, teneur en MO, biomasse microbienne...)

qui peuvent impacter le devenir des ATB en favorisant leur adsorption ou en stimulant leur biodégradation. Dans ce travail, **l'apport répété de PRO favorise l'adsorption des ATB dans les sols et diminue leur minéralisation, comparé avec un sol jamais amendé.** Par ailleurs, le nombre de métabolites est globalement plus faible dans les sols amendés. De plus, la nature de certains métabolites diffère dans les sols amendés comparés au sol non amendé. **Ces différences de résultats pourraient s'expliquer par la présence d'une microflore dégradante différente dans les sols amendés et les sols non amendés ou la stimulation de la dégradation des ATB par co-métabolisme dans les sols amendés.**

L'impact des apports de PRO sur le devenir des ATB dépend également de la nature des PRO. Le sol amendé par un compost de déchets verts et boues de station d'épuration favorise la production de résidus difficilement extractibles, tandis que le sol amendé par du fumier favorise la minéralisation des ATB (par rapport au compost DVB) et la formation de résidus non extractibles (Figure 41). **Ces résultats peuvent directement être mis en relation avec le degré de stabilité des PRO.** En effet, le compost de déchets verts et boues de station d'épuration apporte une matière organique plus stable que le fumier. Par conséquent, la matière organique issue du fumier est plus facilement dégradable, ce qui peut favoriser la minéralisation des antibiotiques par co-métabolisme, et la formation de résidus liés.

Enfin, aux concentrations environnementales testées et considérant des activités de minéralisation du carbone et de l'azote mises en œuvre par une grande diversité de microorganismes, **aucun effet toxique des ATB n'a été observé.** Cette absence d'effet peut s'expliquer par la diminution rapide de la fraction biodisponible induite par la rétention des antibiotiques, mais aussi par la faible concentration initiale introduite (Figure 41).

8.1.2 ATB apportés en mélange (SMX + CIP)

La présence de CIP n'impacte ni le devenir de SMX ou de N-ac-SMX dans le sol étudié ni les effets des sulfonamides sur les microorganismes du sol et leurs activités de minéralisation de C et N.

Ces résultats peuvent être expliqués par 2 hypothèses principales : i) une concentration en CIP ($0.15 \mu\text{g.g}^{-1}$) trop faible même si elle est 7.5 fois plus forte que celle des sulfonamides et/ou ii) une adsorption très rapide de la CIP qui limite les interactions avec les sulfonamides. On peut également conclure qu'aux concentrations en SMX, N-ac-SMX et CIP testées, **les ATB n'entrent pas en compétition pour les sites d'adsorption.**

8.1.3 ATB apportés en mélange avec des métaux (SMX + Cu + Zn)

Dans ce travail, **nous avons mis en évidence des effets de Cu+Zn sur le devenir du SMX et N-ac-SMX et sur la microflore du sol qui sont dépendants de la dose d'ETM apportée.** Les effets des ETM incluent des effets directs et indirects. Les effets sont directs sur i) le devenir des ATB, en augmentant leur adsorption, ce qui diminue leur biodisponibilité

et donc leur minéralisation ; et sur ii) les microorganismes du sol et leurs activités (effets toxiques). Ils sont indirects via la modification du pH ou de la force ionique.

Lorsque les ETM sont apportés à une dose environnementale ($20 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour Cu et $30 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour Zn), la minéralisation du SMX et du N-ac-SMX est divisée par 2. Même si nous n'avons pas étudié directement les effets des mélanges SMX + Cu + Zn sur la microflore dégradante du SMX qui ne représente que quelques pourcents de la microflore totale, les effets généralement non significatifs sur la biomasse microbienne totale, la biomasse fongique et les activités de minéralisation de C et N laissent penser que **des effets toxiques des ETM à la dose réaliste ne sont pas les principaux facteurs explicatifs**. Ces résultats sont également cohérents avec les faibles pourcentages des ETM qui persistent dans la solution du sol. De même, les effets indirects des ETM à faible dose sur le pH et la force ionique étaient négligeables. **En revanche, les ETM et en particulier le Cu pourraient diminuer la disponibilité des ATB par la formation de complexes ternaires ATB-ETM-Sol**. Les effets des mélanges SMX + ETMx1 sont synthétisés sur la Figure 42.

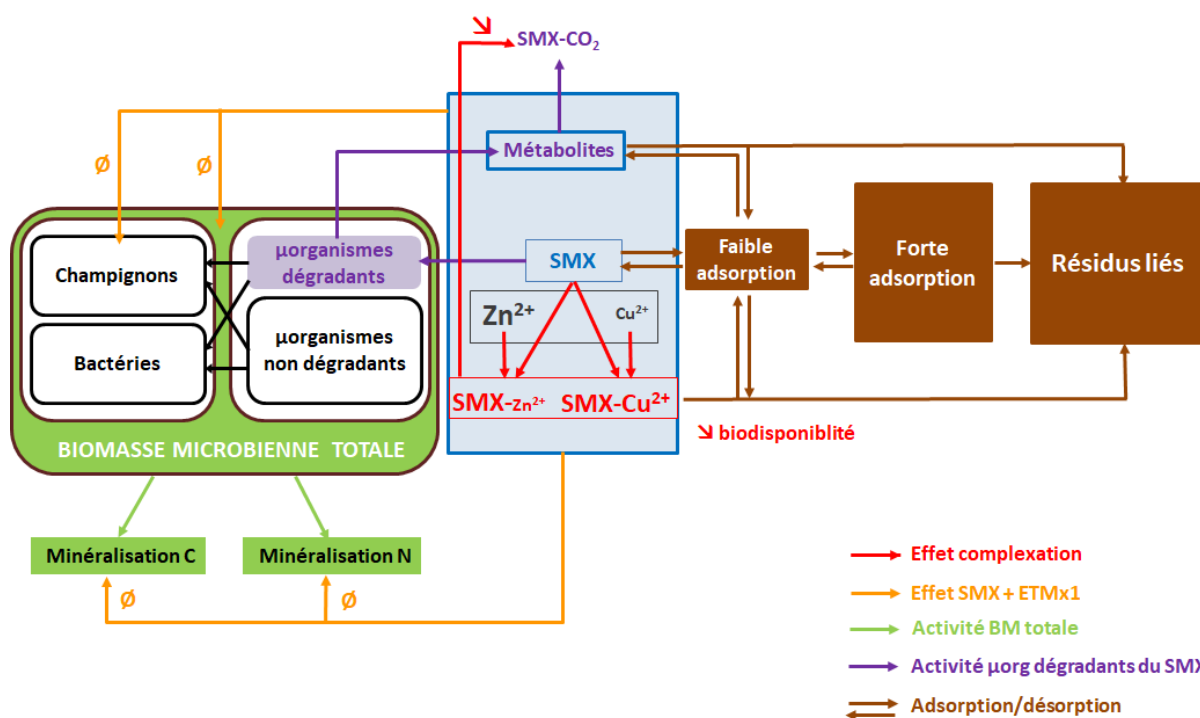


Figure 42 : Devenir et impact du SMX apporté en mélange avec ETMx1.

A une dose 5 fois supérieure ($100 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour Cu et $150 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour Zn), la minéralisation du SMX et du N-ac-SMX est complètement inhibée. Comme à la dose ETMx1, les ETMx5 favorisent la formation de complexes ternaires ATB-ETM-Sol et diminuent la biodisponibilité du SMX et N-ac-SMX pour les microorganismes dégradants. **Mais contrairement à la dose ETMx1, l'augmentation de l'adsorption du SMX ne semble pas être une hypothèse suffisante pour expliquer l'inhibition de la minéralisation du SMX**. En effet, la biomasse totale et probablement la biomasse bactérienne ainsi que la respiration totale ont également été affectées par la forte dose en ETM. Or les résultats ont également

montré qu'il n'y avait ni effet pH ni effet force ionique. **On peut donc faire l'hypothèse que des effets toxiques et en particulier du Zn ciblent à la fois les microorganismes dégradants et non dégradants.** Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une forte proportion de Zn reste en solution jusqu'à la fin de l'incubation. Les différents processus impliqués après apport d'un mélange SMX + ETMx5 sont résumés sur la Figure 43.

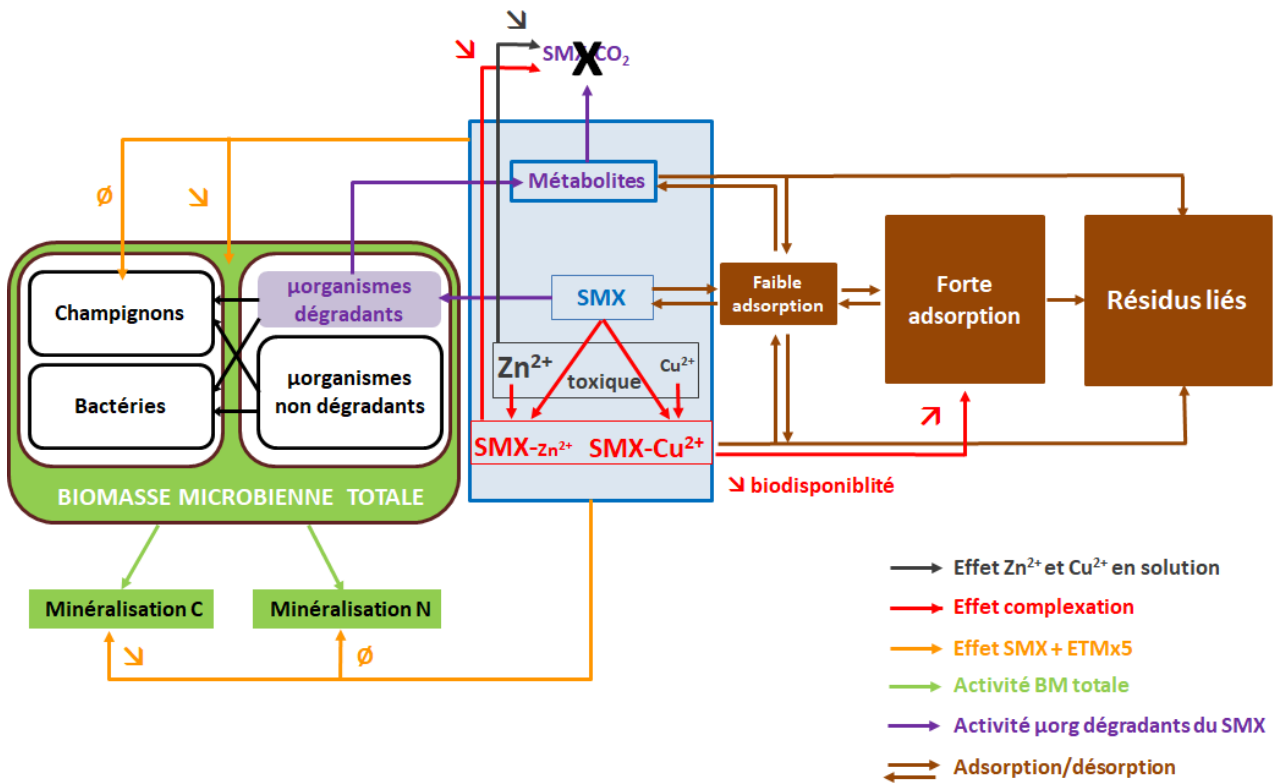


Figure 43 : Devenir et impact du SMX apporté en mélange avec ETMx5.

Ainsi, les effets et les types d'effets des ETM sur le devenir des ATB varient avec la dose de métaux appliquée. **La dose ETMx1 a un "effet physico-chimique" sur les ATB tandis que la dose ETMx5 couple des effets physico-chimiques et biologiques de toxicité.** A dose réaliste, la présence de métaux contribue au "stockage" des ATB et de leurs métabolites dans les sols et diminue donc les effets environnementaux et sanitaires, du moins à court terme.

De plus, **la nature des interactions entre ATB et métaux varierait suivant la nature des espèces métalliques en mélange.** Dans cette étude, le Cu favoriserait l'adsorption des ATB alors que le Zn qui persiste en solution, serait plutôt à l'origine des effets toxiques.

De plus, **les ETM semblent accentuer les différences du devenir entre le SMX et son métabolite le N-ac-SMX.** En effet, lorsque SMX et N-ac-SMX sont apportés seuls au sol, leur devenir devient globalement similaire après des étapes de transformation du N-ac-

SMX en SMX même si la minéralisation du N-ac-SMX reste légèrement supérieure à celle du SMX. En présence de métaux, les fractions facilement et difficilement extractibles du SMX sont supérieures à celles du N-ac-SMX, tandis que la minéralisation du SMX reste inférieure à celle du N-ac-SMX, mais l'écart entre les minéralisations a augmenté. Ces résultats pourraient être dus soit à une complexation plus importante des métabolites du SMX, diminuant leur disponibilité à la biodégradation comparés à ceux du N-ac-SMX, soit à une microflore dégradante du SMX et N-ac-SMX qui pourrait être différente avec des impacts des ETM plus importants sur la microflore dégradante du SMX.

Par ailleurs, que la molécule d'antibiotique testée soit SMX ou CIP, l'impact des mélanges ATB + ETM sur les microorganismes du sol et leurs activités sont similaires. **Il n'y a pas d'effet type d'ATB sur l'impact des mélanges ATB + ETM.**

Finalement, pour répondre à l'hypothèse selon laquelle le devenir et les effets des ATB sont impactés par la présence d'autres contaminants, nous pouvons conclure que cela dépend de la nature et de la dose du contaminant apporté en mélange avec les antibiotiques. En effet, le devenir et les effets des ATB ne sont pas influencés par le mélange d'antibiotiques, tandis qu'ils le sont par la présence d'ETM avec des impacts sur le devenir et les effets qui augmentent avec la dose. En comparant les résultats du devenir et des effets des ATB apportés seuls ou en mélange, nous pouvons également conclure que **les effets des ATB semblent négligeables par rapport à ceux des ETM.**

8.2 Discussion et perspectives

L'objectif de ce travail était de comparer le devenir et les effets des ATB apportés seuls, en mélange avec d'autres ATB et/ou en mélange avec des ETM (Cu+Zn) en considérant des ATB de différentes familles (sulfonamides et fluoroquinolones), une molécule mère et un métabolite (SMX et N-ac-SMX), et des sols ayant reçu ou non 9 amendements de PRO de différentes natures (co-compost de déchets verts et de boues de station d'épuration ou fumier).

Nous avons donc montré que le devenir des ATB dans les sols dépendait notamment de leurs propriétés avec des différences davantage marquées entre les molécules de familles différentes SMX/N-ac-SMX et CIP, qu'entre la molécule mère et son métabolite SMX et N-ac-SMX. Les sols amendés en PRO et enrichis en MO favorisent la rétention des ATB au détriment de leur minéralisation, les impacts étant plus importants avec les PRO les plus stabilisés.

Le devenir des ATB, lorsqu'ils sont apportés en mélange, varie avec la nature et la concentration des autres contaminants. Si la présence de CIP n'a aucun impact sur le devenir du SMX et N-ac-SMX, les ETM et en particulier le Cu, favorisent l'adsorption des ATB et diminuent leur minéralisation.

Peu d'effets sur la biomasse microbienne totale et fongique ainsi que sur les activités de minéralisation du carbone et de l'azote ont été observés que les ATB soient apportés seuls ou en mélange. Néanmoins, à forte dose, les ETM et notamment le Zn peuvent

exercer des effets toxiques sur les microorganismes totaux et dégradants ainsi que sur leur respiration.

Les antibiotiques ont été qualifiés de « polluants émergents » pour leur présence imprévisible dans les sols agricoles du fait de la valorisation agronomique des déchets. Pourtant, les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence des risques environnementaux assez limités, en tout cas à court terme, liés à la présence d'ATB seuls ou en mélange avec d'autres contaminants dans les sols aux concentrations usuellement retrouvées en Europe. Toutefois, les effets à moyen et long terme des antibiotiques restent mal connus puisque les résultats ont mis en évidence une accumulation des ATB ou de leurs métabolites et des ETM dans les sols dans les fractions extractibles et non extractibles. Ainsi, si les conditions dans le sol changent, la désorption progressive des antibiotiques et métabolites accumulés pourrait exposer la biomasse du sol à des teneurs bien supérieures aux doses apportées à chaque épandage, avec de potentiels effets toxiques. Ces conclusions restent néanmoins à nuancer puisque cette étude présente certaines limites.

En premier lieu, certaines conclusions de cette étude demandent à être vérifiées par des expérimentations complémentaires.

Ainsi, pour pouvoir dissocier les effets des ATB des effets ETM dans les cocktails ATB + ETM sur les microorganismes du sol, il serait nécessaire de mettre en place des expérimentations similaires à celles que nous avons réalisées, mais uniquement avec des ETM, et comparer les résultats ATB + ETM et ETM.

De même, l'augmentation de l'adsorption par complexation et les effets toxiques ont été attribués respectivement au cuivre et au zinc, à partir des mesures de leur biodisponibilité. Ces rôles respectifs pourraient être vérifiés en mélangeant les ATB avec les éléments métalliques séparément, cuivre d'une part et zinc d'autre part, et en comparant les résultats à ceux du mélange ATB + Cu + Zn.

Enfin, le processus de dégradation, s'il a été abordé principalement d'un point de vue quantitatif dans les études de devenir des ATB apportés en mélange avec d'autres contaminants, pourrait être approfondi d'un point de vue qualitatif (tel que cela a été réalisé lors des études du devenir des ATB apportés seuls) avec l'analyse par HPLC des produits de dégradation. En effet, si un changement des voies métabolites des antibiotiques en mélange venait à être observé comparé à leur apport seul, cela mettrait en évidence un effet cocktail ATB + ATB sur le devenir des ATB non observable sur les bilans, et/ou apporterait des éléments d'explication sur l'effet métabolite observé lorsque le SMX et le N-ac-SMX sont respectivement apportés en mélange ATB + ETM.

Si on considère les différentes questions posées dans notre étude, toutes n'ont pas été explorées systématiquement dans chaque chapitre.

C'est le cas de l'effet molécule sur le devenir des antibiotiques en mélange ATB + ETM (chapitre 6), où la molécule CIP n'a pas été testée avec les métaux. Tester cette modalité ne semblait pas prioritaire au vu du devenir de la CIP apportée seule. En effet la forte et rapide adsorption de la CIP aux constituants du sol suggérerait que peu d'évolutions seraient observées en mélange de contaminants. Toutefois, dans nos conditions

expérimentales, la CIP porte une charge cationique, qui aurait pu entrer en compétition sur les sites d'adsorption avec les éléments cationiques Cu^{2+} et Zn^{2+} , avec pour conséquence la diminution de sa rétention et l'augmentation de sa biodisponibilité.

Aussi, l'effet métabolite n'a pas été testé sur l'impact des antibiotiques sur les microorganismes, en utilisant la molécule N-ac-SMX seule ou en mélange (ATB+ ATB et ATB + ETM), alors que plusieurs études reportent que les métabolites peuvent avoir des effets plus ou moins toxiques que le composé parent, même à de faibles concentrations. Comme la molécule de N-ac-SMX se transforme en SMX, le métabolite apporté seul ou dans le mélange ATB + ATB avec la CIP aurait probablement engendré les mêmes résultats que la molécule parent, à savoir aucun effet sur les microorganismes. Alors qu'en mélange avec les métaux, l'analyse du devenir du N-ac-SMX et du SMX a montré qu'il y avait un effet métabolite sur le devenir des molécules, ce qui suggère une modification des voies de métabolisation des molécules par la présence des métaux, avec des conséquences incertaines sur l'impact du mélange métabolite-ETM sur les microorganismes. Cependant, le métabolite n'aurait probablement pas influencé les résultats, étant donné qu'il n'y a pas d'effet molécule entre SMX et CIP sur les impacts des mélanges ATB + ETM, alors que, comme conclu dans le chapitre 4, l'effet molécule est censé être plus marqué que l'effet métabolite.

Tester ces modalités permettrait de vérifier toutes ces hypothèses et de compléter les connaissances sur les effets molécules et métabolites en mélanges de contaminants.

Les limites résident aussi dans certains aspects de la démarche expérimentale choisie.

D'abord, l'utilisation de microcosmes fermés a eu certes pour avantage de contrôler les conditions du milieu et l'incrémentement de la complexité du système, mais ne permet pas de prendre en compte l'une des voies de dissipation des composés, à savoir le lessivage ou la lixiviation. Or cette voie de dissipation peut être importante notamment pour les sulfonamides, connus pour leur mobilité et leur transfert vers les eaux de surface ou souterraines via la solution du sol. En revanche, un transfert dans les eaux de surface ou souterraines diminuerait encore plus rapidement les concentrations biodisponibles et potentiellement les effets toxiques des ATB. L'impact des transferts des ATB par lessivage ou lixiviation sur le devenir et les effets des ATB pourrait être testé par des expérimentations en colonne.

Par ailleurs, les ATB étudiés ne sont marqués au ^{14}C que sur l'un des cycles aromatiques des antibiotiques. Ce type de marquage ne permet donc de suivre que partiellement le devenir de la molécule mère.

Enfin, la détermination des effets des antibiotiques sur les microorganismes du sol s'est restreinte à des mesures de biomasse microbienne totale, biomasse fongique, minéralisation du carbone et de l'azote, qui relèvent de mesure d'abondance et d'activités globales. Or la résilience des sols (développement de populations tolérantes ou résistantes) ainsi que la redondance fonctionnelle peuvent maintenir la taille des communautés et activités non spécifiques, même si la structure des communautés est affectée. Ainsi des résultats différents auraient pu être obtenus si on s'était intéressé à des activités plus

spécifiques comme la nitrification ou la réduction du fer essentiels au bon fonctionnement du sol.

Après avoir vérifié certaines conclusions de cette étude, exploré les questions en suspens, et complété la démarche expérimentale, le système pourrait être complexifié afin de se rapprocher de conditions réelles.

En effet, les ATB et ETM ont été apportés ensemble et à des concentrations réalistes, mais dans des solutions simples, et non dans une matrice complexe comme les PRO. Cette démarche a permis d'optimiser la compréhension des effets cocktail sur la minéralisation et la rétention des ATB. Or, dans les sols agricoles, les ATB, en mélange avec d'autres contaminants, sont très souvent apportés via les PRO, dans des sols régulièrement amendés. Ainsi la prochaine étape consisterait à étudier les effets cocktail dans des sols amendés, ce qui permettrait de considérer d'une part les effets à court terme juste après un apport de PRO (en prenant en compte également éventuellement les impacts du prétraitement des PRO et du stockage sur l'évolution de la MO, des ATB et de leurs interactions avant apport au sol), et d'autre part à plus long terme avec des apports répétés.

Par ailleurs, les sols n'ont reçu qu'un seul apport de mélanges de contaminants, ce qui ne rend pas compte de leurs effets cumulatifs à mesure des épandages. Pour tester cet effet, les antibiotiques pourraient être apportés à des concentrations environnementales et à différents intervalles de temps réguliers.

Enfin, cette étude vise in fine à contribuer à la mise en œuvre de politiques publiques vers la valorisation des déchets organiques, avec de nouvelles réglementations sur ces molécules pharmaceutiques dites « polluants émergents ». La mise en place des réglementations nécessite la détermination du seuil de toxicité des antibiotiques.

Cette étude apporte des réponses mais n'est pas suffisante et notamment parce qu'elle n'a été menée que sur deux familles d'antibiotiques, ce qui ne semble pas suffisant pour conclure sur l'innocuité de l'ensemble des pharmaceutiques à des doses environnementales.

Cependant, même si les antibiotiques ne perturbent pas directement le fonctionnement du sol, leur présence peut générer des effets indirects susceptibles de poser des problèmes majeurs en termes de sécurité sanitaire. En effet, même aux concentrations environnementales, la présence des antibiotiques entraîne le développement d'antibiorésistances, lesquelles peuvent s'amplifier par la présence de multiples contaminants comme les métaux. Or la dissémination des antibiorésistances s'effectue facilement depuis le sol vers de multiples compartiments de l'environnement, pouvant aller jusqu'à atteindre les réseaux d'eau potable et d'alimentation.

Bibliographie

Bibliographie

A

Académie Nationale de Pharmacie, (2008). Médicaments et Environnement, 105p.

Accinelli, C., Koskinen, W.C., Becker, J.M., & Sadowsky, M.J. (2007). Environmental Fate of Two Sulfonamide Antimicrobial Agents in Soil. *Chemosphere*, 55, 2677–2682. <http://doi.org/10.1021/jf063709j>.

Adedigba, B.M., Semple, K.T. (2015). Bioavailability of persistent organic pollutants in soils: Concept, Analytical tools, and application in the risk assessment. *Compr. Anal. Chem.* 67, 493-512.

ADEME, SOGREAH (2007). Bilan des flux de contaminants entrant sur les sols agricoles de France métropolitaine. Rapport final, Mai 2007, ADEME (Angers).

AFNOR. (2005). Amendements organiques et supports de culture. Pr NF U 44-051 - "Dénominations, spécifications et marquage", AFNOR. Paris, pp. 18.

AFNOR (2002). Norme NFU 44 095. Amendements organiques - Composts contenant des matières d'intérêt agronomique, issues du traitement des eaux. Association Française de Normalisation. Paris, France, pp. 22.

AFSSAPS (2011). Dix ans d'évolution des consommations d'antibiotiques en France. Rapport d'expertise juin 2011.

Aiju, L., Menghong, L., Honghai, W. (2014). The co-effect of Sulfamoxone and Zinc on the common soil. Vol. 8, no. 12, pp. 49–52.

Al-Ahmad, A., Daschner, F.D., Kümmerer, K. (1999). Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 158–163. <http://doi.org/10.1007/s002449900501>.

Allaire, S.E., Del Castillo J., Juneau, V. (2006). Sorption kinetics of chlortetracycline and tylosin on sandy loam and heavy clay soils. *Journal of Environmental Quality*, 35:969–972.

Alloway, B.J. (1995). Heavy metals in soils. Chapman & Hall, London. p. 368.

Amiard, J.C. (2011). Les risques chimiques environnementaux: Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Lavoisier.

Andreux, F. (1997). La matière organique des sols: interactions avec les polluants. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 83, pp. 111-123.

Andriamalala, A., Vieublé-Gonod, L., Dumeny, V., Cambier, P. (2018). Fate of Sulfamethoxazole, Its Main Metabolite N-Ac-Sulfamethoxazole and Ciprofloxacin in Agricultural Soils Amended or Not by Organic Waste Products. *Chemosphere*, 191: 607–15. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.093>.

ANSES (2010). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2009. 28p.

ANSES (2015). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2014. Moulin, G., Chevance, A. (coords). Rapport annuel, ANSES, France, 40 p.

ANSM (2014). L'évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2013. Cavalié, P., Djeraba, A. (coords). ANSM, France, 36 p.

Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Gril, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., Voltz, M. (2005). Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Expertise scientifique collective INRA et Cemagref - rapport complet.

Aust, M.O., Godlinski, F., Travis, G.R., Hao, X., McAllister, T.A., Leiweber, P., Thiele-Bruhn, S. (2008). Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environ. Pollut.* 156, 1243-1251.

B

Bazole. <https://basol.developpement-durable.gouv.fr/tableaux/home.htm#nature%20polluants>

Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V. (2006). Co-Selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiology*, 14: 176–182.

Bailey, V.L., Smith, J.L., Bolton, H., (2003). Novel antibiotics as inhibitors for the selective respiratory inhibition method of measuring fungal: bacterial ratios in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 38, 154–160.

Baize, D., Courbe, C., Suc, O., Schwartz, C., Tercé, M., Bispo, A., Sterckman, T., Ciesielski, H. (2006). Epanrages de boues d'épuration urbaines sur des terres agricoles : impacts sur la composition en éléments en traces des sols et des grains de blé tendre. *Courrier de l'environnement de l'INRA*, 53, 35-61.

Barles, S. (2005). L'invention des déchets urbains France, Seyssel, Champ vallon, Coll. milieux.

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.

- Baudrillard, J. (1986). *La société de consommation ses mythes, ses structures*, Paris, Gallimard, Coll. Folio 35.
- Blanchard, C. (2000). *Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués*. Thèse : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon.
- Beausse, J. (2004). Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23, 753–761.
- Belon, E., Boisson, M., Deportes, I.Z., Eglin, T.K., Feix, I., Bispo, A.O., Galsomies, L., Leblond, S., Guellier, C.R. (2012). An inventory of trace elements inputs to French agricultural soils. *Sci Total Environ*, 439, 87-95.
- Berg J., Thorsen M.K., Holm P.E., Jensen J., Nybroe O., Brandt K.K. (2010). Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community tolerance assay. *Environmental Science and Technology*, 44, 8724-8728.
- 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.
- Binh, C.T.T., Heuer, H., Gomes, N.C.M., Kotzerke, A., Fulle, M., Wilke, B.M., Schloter, M., Smalla, K. (2007). Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 62: 290–302.
- Bjorklund, H.V., Rabergh, C.M.I., & Bylund, G. (1991). Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*, 97: 85–96.
- Brandt, K.K., Amézquita, A., Backhaus, T., Boxall, A., Coors, A., Heberer, T., Lawrence, J.R., Lazorchak, J., Schönfeld, J., Snape, J.R., Zhu, Y.-G., Topp, E. (2015). Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. *Environ. Int.* 85, 189-205.
- Brandt, K.K., Sjöholm, O.R., Krogh, K.A., Halling-Sørensen, B., & Nybroe, O. (2009). Increased pollution-induced bacterial community tolerance to sulfadiazine in soil hotspots amended with artificial root exudates. *Environmental Science and Technology*, 43: 2963–2968.
- Briceno, G., Palma, G., Duran, N. (2007). Influence of organic amendment on the biodegradation and movement of pesticides. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37 (3): 233-271.
- Bordeau, B., Bouquery, J.M., Renault, C., Aviat, D., Daudin, D., Bailly-Boucher, I., Foucard, J.C., Coppin, Y. (2005). *Les débouchés des composts en France – Situation nationale – Etudes de cas sectorielles et regionales*. Données et références.

Boxall, A.B.A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P., and Tolls, J. (2002). The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicol. Lett.* 131, 19–28.

Boxall, A.B.A., Rudd, M. A., Brooks, B. W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., & Beazley, K.F. (2012). Review Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment : What Are the Big Questions ?, *Environmental Health Perspectives*, 120(9), 1221–1229.

Burkhardt, M., Stamm, C. (2007). Depth distribution of sulfonamide antibiotics in pore water of an undisturbed loamy grassland soil. *Journal of Environmental Quality*, 36(2): 588–96.

C

Calvet, R., Barriuso, E., Benoit, P., Charnay, M.P., Coquet, Y. (2005). *Les pesticides dans le sol. Conséquences Agronomiques et environnementales.* Editions France Agricole. 637 p. ISBN 2-85557-119-7.

Cambier, P., Michaud, A., Paradelo, R., Germain, M., Mercier, V., Guérin-Lebourg, A., Revallier, A., Houot, S. (2018). Trace metal availability in soil horizons amended with various urban waste composts during 17 years – Monitoring and modelling. *Science of the Total Environment* ; 651, 2961-2974. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.013>.

Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C. Ruedel, H. (2003). Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 1, 45-51.

Cercle national du recyclage, (2000) : *Le traitement biologique des déchets organiques.* Dossier.

Cetecioglu, Z., Ince, B., Azman, S., Gokcek, N., Coskun, N., Ince, O. (2013). Determination of Anaerobic and Anoxic Biodegradation Capacity of Sulfamethoxazole and the Effects on Mixed Microbial Culture, in: Chamy, R. (Ed.), *Biodegradation - Engineering and Technology.* InTech.

Chabauty, F., Pot, V., Bourdat-Deschamps, M., Bernet, N., Labat, C., Benoit, P. (2016). Transport of organic contaminants in subsoil horizons and effects of dissolved organic matter related to organic waste recycling practices. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 6907-6918.

Chait, R., Craney, A., Kishony, R. (2007). Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature*, 446(7136), 668–671. <http://doi.org/10.1038/nature05685>.

Chander, K., et Brookes, P.C. (1993) Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. *Soil Biology & Biochemistry* 25, 1231-1239.

Chander, Y., Kumar, K., Goyal, S.M., Gupta, S. C. (2005). Antibacterial Activity of Soil-Bound Antibiotics. *Journal of Environment Quality*, 34(6), 1952. <http://doi.org/10.2134/jeq2005.0017>.

Chang, A.C., Granato, T.C., Page, A.L. (1992). A methodology for establishing phyto-toxicity criteria for Cr, Cu, Ni, and Zn in agricultural land application of municipal sewage sludges. *J.*

Environ. Qual., 21, 521–536.

Charlatchka, R. et Cambier., P. (1999). Influence of reducing conditions on solubility of trace metals in contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution* 118: 143–167, 2000.

Chaudri, A.M., Lawlor, K., Preston, S., Paton, G.I., Killham, K., McGrath, S.P. (2010). Response of a Rhizobium-based luminescence biosensor to Zn and Cu in soil solutions from sewage sludge treated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 383-388.

Checkai, R.T., Corey, R.B., Helmke, P.A. (1987). Effects of ionic and complexed metal concentrations on plant uptake of cadmium and micronutrient metals from solution. *Plant and Soil* 99, 335-345.

Chen, H., Gao, B., Li, H., Ma, L. Q. (2011). Effects of pH and ionic strength on sulfamethoxazole and ciprofloxacin transport in saturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology*, 126(1–2), 29–36. <http://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2011.06.002>.

Chèvre, N., Rossi, L. (2007). Micropolluants organiques dans les eaux de surface. Etat de la recherche.

Christensen, A.M., Ingerslev, F., Baun, A. (2006). Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 2208–2215.

Christian, T., Schneider, R.J., Farber, H.A., Skutlarek, D., Meyer, M.T., Goldbach, H.E. (2003). Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 31: 36–44.

Córdova-Kreylos, A.L., et Scow, K.M. (2007). Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. *ISME Journal*, 1: 585–595.

Cripps, R.W., Winfree, S.K., Reagan, J.L. (1992). Effects of sewage sludge application method on corn production. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 23, 1705–1715.

Cui, H., Wang, S., Fu, J., Zhou, Z. (2014). Influence of ciprofloxacin on microbial community structure and function in soils, *Biology and Fertility of Soils*, 50, 939–947. <http://doi.org/10.1007/s00374-014-0914-y>.

D

Dahlin, S., Witter, E., Martensson, A., Turner, A., Baath, E. (1997). Wheres the Limit - Changes in the Microbiological Properties of Agricultural Soils at Low-Levels of Metal Contamination. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol 29, Is(9), 1405–1415.

Dantas, G., Sommer, M.O.A, Oluwasegun, R.D., Church, G.M. (2008). Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*, 320: 100–103.

Davies, J. et Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433.

Davis, R., Markham, A., Balfour, J.A. (1996). Ciprofloxacin. An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs*, 51: 1019–1074.

De Liguoro, M., Cibir, V., Capolongo, F., Halling-Sørensen, B., Montesissa, C. (2003). Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere* 52, 203–212.

Demoling, L. A., Bååth, E., Greve, G., Wouterse, M., Schmitt, H. (2009). Effects of sulfamethoxazole on soil microbial communities after adding substrate. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 840–848. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.02.001>.

Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C. (2003). Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces: influence des micro-organismes du sol. Tec & Doc. - Lavoisier, Paris.

DeVries, S.L., Zhang, P. (2016). Antibiotics and the terrestrial nitrogen cycle: A review. *Curr. Pollution Rep.* 2, 51-67.

Ding, C. et He, J. (2010). Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 925–941. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2649-5>.

Doi, A.M. et Stoskopf, M.K. (2000). The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate, and organic matter. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12: 246–253.

Dorival-garcía, N., Zafra-gómez, A., Navalón, A., González, J., Vílchez, J. L. (2013). Removal of quinolone antibiotics from wastewaters by sorption and biological degradation in laboratory-scale membrane bioreactors. *Science of the Total Environment*, 442, 317–328. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.026>.

E

Ehlers, G.A.C., Loibner, A.P. (2006). Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: A review of geosorbent characterization and (bio)availability prediction. *Environ. Pollut.* 141, 494-512.

Esiobu, N., Arments, L., Ike, J. (2002). Antibiotic resistance in soil and water environments used for various activities. *International Journal of Environmental Health Research*, 12, 133–144.

Evans, L.J. (1989). Chemistry of metal retention by soils. *Environmental Science and Technology*, 23, 1046-1056.

F

Fajardo, A. et Martinez, J. L. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 161–167. (doi:10.1016/j.mib.2008.02.006).

Fang, H., Han, Y., Yin, Y., Pan, X., Yu, Y. (2014). Variations in dissipation rate, microbial function and antibiotic resistance due to repeated introductions of manure containing sulfadiazine and chlortetracycline to soil. *Chemosphere*, 96, 51–56. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.016>.

Faugier, A. (2010). Diversité bactérienne des sols: accès aux populations à effectifs minoritaires "the rare biosphere". Thèse. Ecole Centrale de Lyon.

Ferhi, S., Goulas, A., Haudin, C.S., Bourdat-Deschamps, M., Benoit, P. (2016). A new extraction method to assess the environmental availability of ciprofloxacin in agricultural soils amended with exogenous organic matter, *Chemosphere* 165, 460–469. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.040>.

Figuroa-Diva, R.A., Vasudevan, D., MacKay, A.A. (2010). Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosphere*, 79(8), 786–793. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.017>.

Flieûbach, A., Martens, R., Reber H.H. (1994). Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, 26,1201-1205.

Francou C., Poitrenaud M., Houot S. (2005). Stabilization of organic matter during composting : influence of the process and feedstocks. *Compost Science & Utilization*, 13: 72-83.

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.

Fulthorpe, R.R, Roesch, L.F.W, Riva, A., Triplett, E.W. (2008). Distantly sampled soils carry few species in common. *ISME J* 2:901–10.

G

Gao, J. et Pedersen, J.A. (2005). Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environmental Science and Technology*, 39, 9509–9516.

Gao, J., et Pedersen, J. A. (2010). Sorption of Sulfonamide Antimicrobial Agents to Humic Acid – Clay Complexes. *Journal of Environmental Quality*, 228–235. <http://doi.org/10.2134/jeq2008.0274>.

Gao, H., Ma, J., Xu, L., Jia, L. (2014). Hydroxypropyl- β -cyclodextrin extractability and bioavailability of phenanthrene in humin and humic acid fractions from different soils and sediments. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 8620–8630. <http://doi.org/10.1007/s11356-014-2701-6>.

- Gao, M., Song, W., Zhou, Q., Ma, X., Chen., X. (2013). Interactive effect of oxytetracycline and lead on soil enzymatic activity and microbial biomass. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 667-674.
- Gaskins, H.R., Collier, C.T., Anderson, D.B. (2002). Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal Biotechnology*, 13, 29–42.
- Gavalchin, J., et Katz, S.E. (1994). The persistence of fecal-borne antibiotics in soil. *Journal of AOAC International*, 177, 481–485.
- Geng, C., Haudin, C.S., Zhang, Y., Lashermes, G., Houot, S., Garnier, P. (2015). Modeling the release of organic contaminants during compost decomposition in soil. *Chemosphere*, 119, 423–431. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.090>.
- Ghasemi, F., et Jalal, R. (2016). Antimicrobial action of zinc oxide nanoparticles in combination with ciprofloxacin and ceftazidime against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 6, 118–122.
- 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.
- Gilbertson, T.J., Hornish, R.E., Jaglan, P.S., Koshy, K.T., Nappier, J.L., Stahl, G.L., Cazars, A. R., Nappier, J.M., Kubicek, M.F., Hoffman, G.A., Hamlow, P.J. (1990). Environmental fate of ceftiofur sodium, a cephalosporin antibiotic – role of animal excreta in its decomposition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 890-894.
- Giller, K., Witter, E., McGrath, S.P. (1998). Toxicity Of Heavy Metals To Microorganisms And Microbial Processes In Agricultural Soils: A Review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10), 1389 —1414.
- Girardi, C., Greve, J., Lamshöft, M., Fetzer, I., Miltner, A., Schäffer, A., Kästner, M. (2011). Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. *Journal of Hazardous Materials*, 198, 22–30. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.004>.
- Göbel, A., Thomsen, A., McArdell, C.S., Joss, A., Giger, W. (2005). Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environmental Science and Technology*, 39, 3981–3989. <http://doi.org/10.1021/es048550a>.
- 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 and *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 125–132.
- Goulas, A., Haudin, C.S., Bergheaud, V., Dumény V., Ferhi, S., Néliu, S., Bourdat-Deschamps, M., Benoit, P., (2016). A new extraction method to assess the environmental availability of ciprofloxacin in agricultural soils amended with exogenous organic matter. *Chemosphere*, 165, 460-469. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.040> 0045-6535.

Golet, E. M., Strehler, A., Alder, A.C., Giger, W. (2002). Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry*, 74(21), 5455–5462.

Golet, E., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A., Giger, W. (2003). Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environmental Science and Technology*, 37, 3243–3249.

Gove, L., Cooke, C.M., Nicholson, F.A., Beck, A.J. (2001). Movement of water and heavy metals (Zn, Cu, Pb and Ni) through sand and sandy loam amended with biosolids under steady-state hydrological conditions. *Bioresource Technol.*, 78, 2, 171-179.

Graouer-Bacart, M., Sayen, S., Guillon, E. (2013). Macroscopic and molecular approaches of enrofloxacin retention in soils in presence of Cu (II). *Journal of Colloid and Interface Science*, 408, 191–199. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.07.035>.

Graouer-Bacart, M., Sayen, S., Guillon, E. (2015). Adsorption of enrofloxacin in presence of Zn (II) on a calcareous soil, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 470–476. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.019>.

Gruber, V. F., Halley, B. A., Hwang, S.C., Ku, C.C. (1990). Mobility of avermectin B1a in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 886-890.

Gruiz, K., Klebercz, O. (2014). Environment risk of waste and its management. in: *Environment deterioration and contamination. Problems and their management*, (Eds.) K. Gruiz, T. Meggyes, E. Fenyves, CRC Press, Taylor & Francis Group. London, UK, pp. 135 - 166.

Gu, C., Karthikeyan, K.G., Sibley, S.D., Pedersen, J.A. (2007). Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. *Chemosphere*, 66, 1494e1501.

Gutiérrez, I. R., Watanabe, N., Harter, T., Glaser, B., Radke, M. (2010). Effect of sulfonamide antibiotics on microbial diversity and activity in a Californian Mollic Haploxeralf, *Journal of Soils and Sediments*, 10, 537–544. <http://doi.org/10.1007/s11368-009-0168-8>.

H

Haller, M.Y., Müller, S.R., McArdell, C.S., Alder, A. C., Suter, M. J. F. (2002). Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 952, 111–120. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00083-3](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00083-3).

Halling-Sørensen, B., Nielsen, N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten-Lützhöft, C., Jörgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment: a review. *Chemosphere*, 36, 357-393.

- Halling-Sørensen, B. (2001). Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40, 451–460.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Tjørnelund, J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 7–16.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Ingerslev, F., Jensen, L.B. (2003). Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, and olaquinox due to environmental processes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 7–16. <http://doi.org/10.1007/s00244-002-1234-z>.
- Hammesfahr, U., Heuer, H., Manzke, B., Smalla, K., Thiele-Bruhn, S. (2008). Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1583–1591. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.010>.
- Hammesfahr, U., Bierl, R., Thiele-Bruhn, S. (2011). Combined effects of the antibiotic sulfadiazine and liquid manure on the soil microbial-community structure and functions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(2008), 614–623. <http://doi.org/10.1002/jpln.201000322>.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nay, H. (2002). Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 1509-1518.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Höper, H., Nau, H., (2005). Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 861-868.
- Harmsen, J. (2007). Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. *J. Environ. Qual.* 36, 1420-1428.
- Harris, S., Morris, C., Morris, D., Cormican, M., Cummins, E. (2013). Simulation model to predict the fate of ciprofloxacin in the environment after wastewater treatment. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 48(November 2014), 675–685. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.744568>.
- Hasman, H., Aarestrup, F.M., (2005). Relationship between Copper, Glycopeptide, and Macrolide Resistance among *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Pigs in Denmark between 1997 and 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 1454-456.
- Hatira, A., Gallali, T., Rouiller, J. Guillet, B. (1990). Stabilité et solubilité des complexes formés entre le cuivre, le plomb, le zinc et les acides fulviques. *Science du Sol*, 28, 123-135.

He, Z., et Zhang, H. (2014). Applied Manure and Nutrient Chemistry for Sustainable Agriculture and Environment. DOI 10.1007/978-94-017-8807-6_2.

Heuer, H., et Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology*, 9, 657–666. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x>.

Heuer, H., Solehati, Q., Zimmerling, U., Kleineidam, K., Schloter, M., Müller, T., Focks, A., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K. (2011b). Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 2527–2530.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L. (1999). Occurrence of Antibiotics in the Aquatic Environment. *Science of The Total Environment* 225.1-2: 109-18. Web.

Höltge, S., et Kreuzig, R. (2007). Laboratory testing of sulfamethoxazole and its metabolite acetyl-sulfamethoxazole in soil. *Clean - Soil, Air, Water*, 35(1), 104–110. <http://doi.org/10.1002/clen.200600019>.

Hölzel, C.S., Müller, C., Harms, K.S., Mikolajewski, S., Schäfer, S., Schwaiger, K., Bauer, J. (2012). Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environ. Res.* 113, 21-27.

Hoorweg, D., Bhada-Tata P. (2012). « What a Waste. A Global Review of Solid Waste Management », Urban Development Series, n°15, World Bank.

Houot, S., Cambier, P., Benoit, P., Deschamps, M., Jaulin, A., Lhoutellier, C., Barriuso, E. (2009b). Effet d'apports de composts sur la disponibilité de micropolluants métalliques et organiques dans un sol cultivé. *Etude et Gestion des Sols*, 16, 255–274.

Houot, S., Cambier, P., Deschamps, M., Benoit, P., Bodineau, G., Nicolardot, B., Morel, C., Linères, M., Le Bissonais, Y., Steinberg, C., Leyval, C., Beguiristain, T., Capowiez, Y., Poitrenaud, M., Lhoutellier, C., Francou, C., Brochier, V., Annabi, M., Lebeau, T. (2009a). Compostage et valorisation par l'agriculture des déchets urbains. *Innovations Agronomiques*, 5, 69-81.

Houot, S., Muller, H., Chenu, C., Linères, M., Nicolardot, B., Parnaudeau, V., Arrouays, D., Balesdent, J., Leclerc, B., Mellet, J., Kallassy, M., Poitrenaud, M., Pierre, N. (2004). Bilans environnementaux de la gestion biologique des déchets : Effet sur le sol et le stockage du carbone des apports de matières organiques issues de déchets. Rapport final du marché ADEME n° 0375C0062.

Houot, S., Pons, M.N., Pradel, M. (2014). Valorisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire sur les sols à usage agricole ou forestier. Impacts agronomiques, environnementaux, socio-économiques. Expertise scientifique collective INRA-CNRS-Irstea. Rapport final de l'ESCO "Matières fertilisantes d'origine résiduaire" – octobre 2014.

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, X.J., et Lee, L.S. (2001). Effects of dissolved organic matter from animal waste effluent on chlorpyrifos sorption by soils. *Journal of Environmental Quality*, 30 (4): 1258-1265.

Hund-Rinke, K., Simon, M., Lukow, T. (2004). Effects of tetracycline on the soil microflora: function, diversity, resistance. *Journal of Soils and Sediments*, 4:11–16.

Huysman, F., Verstraete. W., Brookes, P.C. (1994). Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial populations. *Soil Biology & Biochemistry*, 26, 103-110.

I

Ingerslev, F., et Halling-Sørensen, B., (2000). Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2467–2473.

Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B. (2001). Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manure slurries. *Ecotox. Environ. Saf.* 48, 311-320.

Ingham, E.R., et Coleman, D.C. (1984): Effects of streptomycin, cycloheximide, fungizone, captan, carbofuran, cygon, and PCNB on soil microorganisms. *Microbial Ecology*, 10, 345-358.

J

Jacobsen, A.M., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, Hansen, S.H. (2004). Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1038, 157-170.

Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, 22(9), 536–545. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>.

Jones, K.C.; Symon, C.J.; Johnston, A.E. (1987). Retrospective analysis of an archived soil collection. II. Cadmium. *Science of the Total Environment*, 67 (1): 75-89.

K

Khalis, M., Sekkaki, A., Irigaray, J.L., Revel, C.F.G. (1997). Etude de l'influence du milieu environnant sur la composition minérale d'une rivière marocaine en utilisant l'activation

neutronique et l'ICP/MS: Environmental control of Boufekrane river water basins by neutron activation analysis and ICP/MS. *Water Research*, 31, 11, 2930-2934.

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.

Kästner, M., Nowak, K.M., Miltner, A., Trapp, S., Schaffer, A. (2014). Classification and Modelling of Non extractable Residue (NER) Formation of Xenobiotics in Soil – A Synthesis. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(19), 2107-2171.

Kay, P., Blackwell, P.a., Boxall, A.B.a. (2005). Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. *Chemosphere*, 60, 497–507. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.028>.

Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* 8, 1–13.

Kim, S.C., Carlson, K. (2007). Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1301-1315.

Kim, B., McBride, M.B., Hay, A.G. (2008). Urease activity in aged copper and zinc-spiked soils: relationship to CaCl₂-extractable metals and Cu²⁺ activity. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 27(12), 2469–2475. <http://doi.org/10.1897/08-023.1>.

Kim, S.C., Yang, J.E., Ok, Y.S., Carlson, K. (2010). Dissolved and colloidal fraction transport of antibiotics in soil under biotic and abiotic conditions. *Water Qual. Res. J. Can.* 45, 275–285.

Kinney, C.a, Furlong, E.T., Werner, S.L., Cahill, J.D. (2006). Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 25(2), 317–326. <http://doi.org/10.1897/05-187R.1>.

Kirchmann H., Bernal M.P. (1997). Organic waste treatment and C stabilization efficiency. *Soil. Biol. Biochem.* 29:1747-1753.

Koba, O., Golovko, O., Kodešová, R., Fér, M., Grabic, R. (2017). Antibiotics degradation in soil: A case of clindamycin, trimethoprim, sulfamethoxazole and their transformation products. *Environmental Pollution*, 220, 1251-1263.

Kodešová, R., Kočárek, M., Klement, A., Golovko, O., Koba, O., Fér, M., Nikodem, A., Vondráčková, L., Jakšík, O., Grabic, R. (2016). An analysis of the dissipation of pharmaceuticals under thirteen different soil conditions. *Sci. Total Environ.* 544, 369-381.

Kong, W.D., Zhu, Y.G., Fu, B.J., Marschner, P., He, J. Z. (2006). The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community. *Environmental Pollution*, 143, 129–137. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.11.003>.

Kotzerke, A., Sharma, S., Schauss, K., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Berndt Wilke, M., Schloter, M. (2008). "Alterations in Soil Microbial Activity and N-Transformation Processes Due to Sulfadiazine Loads in Pig-Manure." *Environmental Pollution*, 153: 315–22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.020>.

Kotzerke, A., Fulle, M., Sharma, S., Kleineidam, K., Welzl, G., Lamshöft, M., Schloter, M., Wilke, B.-M. (2011a). Alterations in total microbial activity and nitrification rates in soil due to amoxicillin-spiked pig manure. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174, 56-64.

Kotzerke, A., Hammesfahr, U., Kleineidam, K., Lamshöft, M. (2011b). Influence of difloxacin-contaminated manure on microbial community structure and function in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 47:177–186.

Kremer, E., Facchin, G., Estévez, E., Alborés, P., Baran, E. J., Ellena, J., Torre, M.H. (2006). Copper complexes with heterocyclic sulfonamides: Synthesis, spectroscopic characterization, microbiological and SOD-like activities: Crystal structure of [Cu(sulfisoxazole)₂(H₂O)₄] · 2H₂O. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(7), 1167–1175. <http://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.042>.

Kumar, S., Tamura, K. Nei, M. (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150–163.

Kumar, K., Gupta, S.C., Chander, Y., Singh, A.K. (2005). Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy*, 87:1–54.

Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V. (2000). Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, 40, 701–710. [http://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00439-7](http://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00439-7).

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

Kümmerer, K. (2009a). Antibiotics in the aquatic environment: a review—part I. *Chemosphere*, 75:417–434.

Kümmerer, K. (2009b). Antibiotics in the aquatic environment: a review—part II. *Chemosphere*, 75:435–441.

L

Langhammer, J.P. (1989). Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Aezneistoffe als in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. PhD dissertation, Universität Bonn, Germany, p. 138.

Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N. (2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotox. Envir. Safe.* 57, 39-47.

- Lashermes, G., Nicolardot, B., Parnaudeau, V., Thuries, L., Chaussod, R., Guillotin, M.L., Lin_eres, M., Mary, B., Metzger, L., Morvan, T., Tricaud, A., Vilette, C., Houot, S. (2009). Indicator of potential residual carbon in soils after exogenous organic matter application. *Eur. J. Soil Sci.* 60 (2), 297e310.
- 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(8), 979–985. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.018>.
- Lega, R., Ladwig, G., Meresz, O, Clement, R.E., Crawford, G., Salemi, R., Jones, Y. (1997). Quantitative determination of organic priority pollutants in sewage sludge by GC/MS. *Chemosphere*, 34, 1705-1712.
- Lemire, J.A., Harrison, J.J., Turner R.J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 371–384.
- Li, Q., Guo, X.Y., Xu, X.H., Zuo, Y.B., Wei, D.P., Ma, Y.B. (2012). Phytoavailability of Copper, Zinc and Cadmium in Sewage Sludge-Amended Calcareous Soils. *Pedosphere*, 22(2), 254-262.
- Li, J., Ye, Q., Gan, J. (2015). Influence of organic amendment on fate of acetaminophen and sulfamethoxazole in soil. *Environmental Pollution*, 206, 543–550. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.019>.
- Li, X.L., Zheng, W., Machesky, M.L., Yates, S.R., Katterhenry, M. (2011). Degradation kinetics and mechanism of antibiotic ceftiofur in recycled water derived from a beef farm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 10176–10181.
- Liao, X., Li, B., Zou, R., Dai, Y., Xie, S., Yuan, B. (2016). Biodegradation of antibiotic ciprofloxacin: pathways , influential factors , and bacterial community structure. *Environmental Science and Pollution Research*, 7911–7918. <http://doi.org/10.1007/s11356-016-6054-1>.
- Lin, K., et Gan, J. (2011). Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere*, 83(3), 240–246. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.083>.
- Lindberg, R. H., Wennberg, P., Johansson, M. I., Tysklind, M., Andersson, B. a V. (2005). Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental Science and Technology*, 39, 3421–3429. <http://doi.org/10.1021/es048143z>.
- Liu, F., Ying, G.G., Tao, R., Zhao, J.L., Yang, J.F., Zhao, L.F. (2009). Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987), 157(5), 1636–1642. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.021>.

Lock, K., et Janssen, C.R. (2005). Influence of soil zinc concentrations on zinc sensitivity and functional diversity of microbial communities. *Environmental Pollution*, 136(2), 275–281. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.12.038>.

Lu, M., Xu, K., Chen, J. (2013). Effect of pyrene and cadmium on microbial activity and community structure in soil. *Chemosphere*, 91,491–497.

Lucida, H., Parkin, J.E., Sunderland, V.B. (2000). Kinetic study of the reaction of sulfamethoxazole and glucose under acidic conditions—I. Effect of pH and temperature. *International Journal of Pharmaceutics*, 202 (1–2), 47–61.

M

Ma, J., Lin, H., Sun, W., Wang, Q., Yu, Q., Zhao, Y., Fu, J. (2014). Soil microbial systems respond differentially to tetracycline, sulfamonomethoxine, and ciprofloxacin entering soil under pot experimental conditions alone and in combination. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 7436–7448. <http://doi.org/10.1007/s11356-014-2685-2>.

Ma, Y., Li, M., Wu, M., Li, Z., Liu, X. (2015). Occurrences and regional distributions of 20 antibiotics in water bodies during groundwater recharge. *Sci. Total Environ.* 518-519, 498-506.

MacKay, A.A. et Canterbury, B. (2005). Oxytetracycline sorption to organic matter by metal-bridging. *Journal of Environmental Quality*, 34:1964–1971.

Majone, M., Petrangeli Papini, M., Rolle, E. (1996). Modeling Lead adsorption on clays by models with and without electrostatic terms, *The Journal of Colloid and Interface Science*, 179, pp. 412-425.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. (2009) *Brock biology of microorganisms*. 12th international ed., Pearson, San Francisco.

Mamindy-Pajany, Y., Sayen, S., Mosselmans, J.F., Guillon, E. (2014). Copper, nickel and zinc speciation in a biosolid-amended soil: pH adsorption edge, micro-XRF and micro-XANES investigations. *Environ Sci Technol*, 48(13), 7237-7244.

Manceau, A., et Matynia, A. (2010). The nature of Cu bonding to natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74: 2556–80.

Mantovi, P., Baldoni, G., Toderi, G. (2005). Reuse of liquid, dewatered, and composted sewage sludge on agricultural land: effects of long-term application on soil and crop. *Water Res*, 39(2-3), 289-96.

Marengo, J.R., Kok, R.A., Burrows, L.A. (2001). Biodegradation of ¹⁴C-sarafloxacin hydrochloride, a fluoroquinolone antimicrobial by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Sci. Ind. Res.* 60, 121-130.

- Marengo, J.R., Kok, R.A., Obrien, K., Velagaleti, R.R., Stamm, J.M., (1997). Aerobic biodegradation of (¹⁴C)-sarafloxacin hydrochloride in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 462–471.
- Martensson, A.M. et Witter, E. (1990). Influence of various soil amendments on nitrogen-fixing soil microorganisms in a long-term field experiment, with special reference to sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, 22, 977-982.
- Martensson, A.M. (1993). Use of heterotrophic and cyanobacterial nitrogen fixation to study the impact of anthropogenic substances on soil biological processes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* SO, 466473.
- Martinez, J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157, 2893–2902.
- Martinez, C.E., McBride, M.B. (1998) Solubility of Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺ in aged coprecipitates with amorphous iron hydroxides. *Environmental Science & Technology*, 32, pp.743 748.
- 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. *Environmental Pollution*, 148, 570–579. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.11.035>.
- Mason, A., Jenkins, K., Tessier, A. Turner, D. (1995). Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. *Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems*, 479-583.
- MATE. (2002a). Evaluation des quantités actuelles et futures de déchets épandus sur les sols agricoles et provenant des activités industrielles hors agroalimentaire - Rapport final.
- MATE. (2002b). Evaluation des quantités actuelles et futures de sous-produits épandus sur les sols agricoles provenant des industries agroalimentaires - Rapport final.
- Mazoyer, M., Roudart, L. (2002). Histoire des agricultures du monde du néolithique à la crise contemporaine, Paris, Seuil.
- McBride, M.B. (1994). *Environmental chemistry of soils*. Oxford University Press, Inc., New York.
- McBride, M.B. (2003). Toxic metals in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks? *Advances in Environmental Research*, 8(1), 5-19.
- McCarty, L.S., Mackay, D. (1993). Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1719-1728.
- MEDD. (2002). Evaluation des quantités actuelles et futures des déchets épandus sur les sols agricoles et provenant de certaines activités - Lot 3: effluents d'élevage - Rapport final.

Miao, X.S., Bishay, F., Chen, M., et Metcalfe, C.D. (2004). Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environmental Science and Technology*, 38, 3533–3541.

Moenne-Loccoz, Y., Tichy, H.V., O'Donnell, A., Simon, R., O'Gara, F. (2001). Impact of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 on intraspecific diversity of resident culturable fluorescent pseudomonads associated with the roots of field-grown sugar beet seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:3418–3425.

Moffet, B.F., Nicholson, F.A., Uwakwe, N.C., Chambers, B.J., Harris, J.A., Hill, T.C.J. (2003). Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 43:13-19.

Mohamed, M.A.N., Ranjard, L., Catroux, C., Catroux, G., Hartmann, A. (2005). Effect of natamycin on the enumeration, genetic structure and composition of bacterial community isolated from soils and soybean rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, 60: 31–40.

Mojica, E.R., et Aga, D., (2011). *Antibiotics Pollution in Soil and Water: Potential Ecological and Human Health Issues*. Elsevier.

Molaei, A., Lakzian, A., Haghnia, G., Astaraei, A., Rasouli-sadaghiani, M., Ceccherini, M.T., Datta, R. (2017). Assessment of some cultural experimental methods to study the effects of antibiotics on microbial activities in a soil : An incubation study. *PLoS ONE*, 12(7). 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0180663>.

Montgomery, H.J., Monreal, C.M., Young, J.C., Seifert, K.A. (2000). Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1207-1217.

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. *Science of the Total Environment*, 481, 266–273. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.040>.

Moreno, J.L., García, C., Hernández, T. Pascual, J.A. (1996). Transference of heavy metals from a calcareous soil amended with sewage-sludge compost to barley plant. *Bioresource Technol.*, 55, 3, 251-258.

Müller, A.K., Westergaard, K., Christensen, S., Sørensen, S.J. (2002). The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology*, 44: 49–58.

Murray, B.E. (1997). Antibiotic resistance. *Journal of Advances in Internal Medicine*, 42: 339–367.

N

Naslund, J., Hedman, J.E., Agestrand, C. (2008). Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquatic Toxicology*, 90: 223–227.

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.

Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J. (2003). An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of The Total Environment*, 311(1-3), 205-219.

Nocker A, Burr M, Camper A.K. (2007). Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb Ecol* 54:276–289.

Novak, J., Watts, D., Stone, K.C. (2004). Copper and zinc accumulation, profile distribution, and crop removal in coastal plain soils receiving long-term, intensive applications of swine manure. *Transaction of the ASAE*, 47(5), 1513-1522.

Nowara, A., Burhenne, J., Spiteller, M. (1997). Binding of Fluoroquinolone Carboxylic Acid Derivatives to Clay Minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1459–1463. <http://doi.org/10.1021/jf960215l>.

Nwosu, V.C., (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Res Microbiol* 152, 421–430.

O

Ollivier, J., Schacht, D., Kindler, R., Groeneweg, J., Engel, M., Wilke, B. M., Kleineidam, K., Schlöter, M. (2013). Effects of repeated application of sulfadiazine-contaminated pig manure on the abundance and diversity of ammonia and nitrite oxidizers in the root-rhizosphere complex of pasture plants under field conditions. *Frontiers in Microbiology*, 4(February), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00022>.

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:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.064>.

P

Pan, M., Chu, L.M. (2016). Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soils. *Sci. Total Environ.* 545-546, 48-56.

Pan, B., Qiu, M., Wu, M., Zhang, D., Peng, H., Wu, D., Xing, B. (2012). The opposite impacts of Cu and Mg cations on dissolved organic matter-ofloxacin interaction. *Environmental Pollution*, 161, 76–82. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.040>.

Patten, D.K., Wolf, D.C., Kunkle, W.E., Douglas, L.W. (1980). Effect of antibiotics in beef cattle feces on nitrogen and carbon mineralisation in soil and on plant growth and composition. *Journal of Environmental Quality*, 9, 167–172.

Pedersen, J.A., Gao, J., Bialk, H.M. (2003). Sorption of sulfonamide antimicrobial agents to soil constituents. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 226, pp. U493–U494.

Pei, Z.G., Shan, X.Q., Kong, J.J., Wen, B., Owens, G. (2010). Coadsorption of ciprofloxacin and Cu(II) on montmorillonite and Kaolinite as affected by solution pH. *Environmental Science and Technology*, 44, 915-920.

Pei, Z., Yang, S., Li, L., Li, C., Zhang, S., Shan, X.Q., Wen, B., Guo, B. (2014). Effects of copper and aluminum on the adsorption of sulfathiazole and tylosin on peat and soil. *Environmental Pollution*, 184, 579–585. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.038>.

Pelletier, E., Campbell, P., Denizeau, F. (2004). *Ecotoxicologie moléculaire: principes fondamentaux et perspectives de développement*. P. G. C. Campbell, Francine Denizeau, 462p.

Pérez, S., Farré, M., Garcia, M.J., Barceló, D. (2001). Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge and their contribution to its toxicity in the ToxAlert @100 bioassay. *Chemosphere*, 45, 705-712.

Picó, Y., et Andreu, V. (2007). Fluoroquinolones in soil-risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1287–1299. <http://doi.org/10.1007/s00216-006-0843-1>.

Pinck, L.A., Holton, W.F., Allison, F.E. (1961a). Antibiotics in soils: 1. Physico-chemical studies of antibiotic-clay complexes. *Soil Science*, 91, 22–28.

Pinck, L.A., Holton, W.F., Allison, F.E. (1961b). Antibiotics in soil: 1. Extent and mechanism of release. *Soil Science*, 91, 94–99.

Poole, K. (2017). At the Nexus of Antibiotics and Metals: The Impact of Cu and Zn on Antibiotic Activity and Resistance. *Trends in Microbiology*, 25(10), 820–832. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2017.04.010>.

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.

Q

Qu, X.L., Liu, P., et Zhu, D.Q. (2008). Enhanced sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to tetra-alkyl ammonium modified smectites via cation– π interactions. *Environmental Science & Technology*, 42:1109–16.

Quevauviller P, Rauret, R, Rubio, G, Lopez-sanchez, J.F., Ure, A.M., Bacon, J.R., Muntau, H. (1997). Certified reference materials for the quality control of EDTA- and acetic acid extractable contents of trace elements in sewage sludge amended soils (CRMs 483 and 484). *Fresenius J Anal Chem* 357:611–618.

R

Rabølle, M., Spliid, N.H. (2000). Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* 40, 715-722.

Reichel, R., Rosendahl, I., Peeters, E.T.H.M., Focks, A., Groeneweg, J., Bierl, R., Schlichting, A., Amelung, W., Thiele-Bruhn, S. (2013). Effects of slurry from sul- fadiazine-(sdz) (and difloxacin-(dif) medicated pigs on the structural diversity of microorganisms in bulk and rhizosphere soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 62, 82–91.

Richter, A., Löscher, W., Witte, W. (1996). Leistungsförderer mit antibakterieller Wirkung: Probleme aus pharmakologisch-toxikologischer und mikrobiologischer Sicht. *Prakt; Tierarzt* 7, 603-624.

Ricken, B., Corvini, P.F.X., Cichocka, D., Parisi, M., Lenz, M., Wyss, D., Martínez-Lavanchy, P. M., Müller J.A., Shahgaldian, P., Tulli L. G., Kohler H.P.E., Kolvenbacha, B.A. (2013). Ipso-hydroxylation and subsequent fragmentation: A novel microbial strategy to eliminate sulfonamide antibiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5550–5558. <http://doi.org/10.1128/AEM.00911-13>.

Riding, M.J., Doick, K.J., Martin, F.L., Jones, K.C., Semple, K.T. (2013). Chemical measures of bioavailability/bioaccessibility of PAHs in soil: Fundamentals to application. *J. Hazard. Mater.* 261, 687-700.

Roesch, L.F.W, Fulthorpe, R.R, Riva, A, Casella, G, Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A., Farmerie, W.G. Triplett, E.W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* 1:283–290.

Roger, P., et Jacq, V. (2000). Introduction à la bio-remédiation des sols, des eaux et de l'air. PhD. Université de Provence Aix-Marseille 1 E.S.G.B.M.A – E.S.I.L. Luminy. Laboratoire de microbiologie IRD. Institut de Recherche pour le Développement IRD.

Rosendahl, I., Siemens, J., Kindler, R., Groeneweg, J., Zimmermann, J., Czerwinski, S., Lamshöft, M., Laabs, V., Wilke, B.M., Vereecken, H., Amelung, W. (2012). Persistence of the Fluoroquinolone Antibiotic Difloxacin in Soil and Lacking Effects on Nitrogen Turnover. *Journal of Environment Quality*, 41, 1275. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0459>.

Rousk, J., Demoling, L.A., Bahr, A., Bååth, E. (2008). Examining the fungal and bacterial niche overlap using selective inhibitors in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 63, 350–358.

S

- 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. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>.
- Schauss, K., Focks, A., Heuer, H., Kotzerke, A., Schmitt, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B.W., Matthies, M., Amelung, W., Klasmeier, J., Schloter, M. (2009a). Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. *Trend. Anal. Chem.* 28, 612-618.
- Schauss, K., Focks, A., Leininger, S., Kotzerke, A., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Sharma, S., Wilke, B.M., Matthies, M., Smalla, K., Munch, J.C., Amelung, W., Kaupenjohann, M., Schloter, M., Schleper, C. (2009b). Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. *Environmental Microbiology*, 11, 446–456. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01783.x>.
- Schmitt, H., van Beelen, P., Tolls, J., van Leeuwen, C.L. (2004). Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine. *Environmental Science and Technology*, 38, 1148–1153. <http://doi.org/doi:10.1021/es034685p>.
- Schmitt, H., Haapakangas, H., Van Beelen, P. (2005). Effects of antibiotics on soil microorganisms: Time and nutrients influence pollution-induced community tolerance. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1882–1892. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.022>.
- Schnabel, E.L., et Jones, A.L. (1999). Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4898–4907.
- Sekhar, K.C., Chary, N.S., Kamala, C.T., Raj, D.S.S., Rao, A.S. (2004). Fractionation studies and bioaccumulation of sediment-bound heavy metals in Kolleru lake by edible fish. *Environment International*. 29, 7, 1001-1008.
- 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.
- Serpaud, B., Al-Shukry, R., Casteignau, M. et Matejka, G. (1994). Adsorption des métaux lourds (Cu, Zn, Cd et Pb) par les sédiments superficiels d'un cours d'eau: rôle du pH, de la température et de la composition du sédiment. *Revue des Sciences de l'eau*, 7, 343-365.
- Sibley, S.D., et Pedersen, J.A. (2008). Interaction of the macrolide antimicrobial clarithromycin with dissolved humic acid. *Environmental Science and Technology*, 42:422–428.
- Smolders, E.; Oorts, K.; Lombi, E.; Schoeters, I.; Ma, Y.B.; Zrna, S.; McLaughlin, M.J. (2012). The Availability of Copper in Soils Historically Amended with Sewage Sludge, Manure, and Compost. *Journal of Environmental Quality*, 41 (2): 506-514.

Smolders, E., Oorts, K., Van Sprang, P., Schoeters, I., Janssen, C.R., McGrath, S.P., McLaughlin, M. J. (2009). Toxicity of trace metals in soil as affected by soil type and aging after contamination: using calibrated bioavailability models to set ecological soil standards. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 28(8), 1633–1642. <http://doi.org/10.1897/08-592.1>.

Sollicec, M., Roy-Lachapelle, A., Gasser, M.O., Côté, 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.

Sommer, C., et Bibby, B. M. (2002). The influence of veterinary medicines on the decomposition of dung organic matter in soil. *European Journal of Soil Biology*, 38, 155–159.

Song, W., Guo, M. (2014). Residual veterinary pharmaceuticals in animal manures and their environmental behaviors in soils. In: He, Z., Zhang, H. (Eds.), *Applied Manure and Nutrient Chemistry for Sustainable Agriculture and Environment*, 2014, Springer, pp 23-52.

Sposito, G. (1989). *The chemistry of soils*. Edition Oxford University Press, pp. 277.

Stenström, J., Svensson, K., Johansson, M. (2001) Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 93–104.

Stoob, K., Singer, H.P., Stettler, S., Hartmann, N., Mueller, S.R., et Stamm, C.H. (2006). Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1128(1–2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.048>.

Strauss, C., Harter T., Radke M. (2011). Effects of pH and Manure on Transport of Sulfonamide Antibiotics in Soil. *L. Environ. Qual.* 40, 1652-1600. doi:10.2134/jeq2010.0535.

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 Science*. 2012, 1-10.

Swift, R., McLaren, R. (1991). Micronutrient adsorption by soils and soil colloids. In Bolt, G.H.; Boodt, M.F.; Hayes, M.H.B.; McBride, M.B. (Ed.) *Interactions at the soil colloid-soil solution interface*. Dordrecht: Kluwer Academic Publications. 257-292.

T

Tamtam, F., van Oort, F., Le Bot, B., Dinh, T., Mompelat, S., Chevreuil, M., Lamy, I., et Thiry, M. (2011). Assessing the fate of antibiotic contaminants in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation. *Science of the Total Environment*, 409(3), 540–547. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.033>.

Tang, C.M., Huang, Q.X., Yu, Y.Y., et Peng, X.Z. (2009). Multiresidue determination of sulfonamides, macrolides, trimethprim, and chloramphenicol in sewage sludge and sediment

using ultrasonic extraction coupled with solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37: 1119–1124.

Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245–3260.

Thauvin., P. (2005). Quel devenir pour les installations de compostage sur ordures résiduelles? ADEME.

Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166, 145–167. <http://doi.org/10.1002/jpln.200390023>.

Thiele-Bruhn, S. (2005). Microbial inhibition by pharmaceutical antibiotics in different soils – dose-response relations determined with the iron (III) reduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 869–876.

Thiele-Bruhn, S., et Beck, I.C. (2005). Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere*, 59, 457–465. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.023>.

Thurman, E.M., Lindsey, M.E. (2000). Transport of antibiotics in soil and their potential for groundwater contamination. Poster presented at the 3rd SETAC World Congress, Brighton, UK, 22–25 May 2000.

Tolls, J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environmental Science and Technology*, 35(17), 3397–3406. <http://doi.org/10.1021/es0003021>.

Topp, E., Monteiro, S.C., Beck, A., Coelho, B.B., Boxall, A.B.A, Duenk, P.W., Kleywegt, S. Lapen, D.R., Payne, M. Sabourin, L., Li, H., Metcalfe, C.D. (2008). Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field. *Science of the Total Environment*, 396, 52–59. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.011>.

Topp, E., Chapman, R., Devers-Lamrani, M., Hartmann, A., Marti, R., Martin-Laurent, F., Sabourin, L., Scott, A., Sumarah, M. (2013). Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading sp. *Journal of Environmental Quality*, 42(1), 173–8. <http://doi.org/10.2134/jeq2012.0162>.

Torre, H., Facchin, G., Kremer, E., Castellano, E.E., Piro, O. E., Baran, E.J. (2003). Short communication Characterization of a Cu (II) complex of sulfadimethoxine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94, 200–204.

Toth, J.D., Feng, Y., Dou, Z. (2011). Veterinary antibiotics at environmentally relevant concentrations inhibit soil iron reduction and nitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(12), 2470–2472. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.09.004>.

U

Uivarosi, V. (2013). Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: An update. *Molecules*, 18(9), 11153–11197. <https://doi.org/10.3390/molecules180911153>.

UNIFA, (2004-2005). Les livraisons de fertilisants minéraux en France – Exercice 2004 - 2005.

Ure, A.M., Davidson, C.M. (2001). *Chemical speciation in the environment*. Wiley, pp. 480.

V

Vaclavik, E., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F. (2004). Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil. *Chemosphere*, 56, 667–676. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.02.018>.

Vasudevan, D., Bruland, G.L., Torrance, B.S., Upchurch, V.G., MacKay, A. (2009). pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma*, 151, 68–76. <http://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.03.007>.

Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (18), 5649–5654. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1503141112>.

Vazquez, J.L., Berlanga, M., Merino, S., Domènech, O., Viñas, M., Montero, M.T., Hernández-Borrell, J. (2001). Determination by fluorimetric titration of the ionization constants of ciprofloxacin in solution and in the presence of liposomes. *Photochemistry and Photobiology*, 73 (1), 14–19.

Verlicchi, P., et Zambello, E. (2015). Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil - A critical review. *Science of the Total Environment*. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.108>.

Vieublé-Gonod, L., Benoit, P., Cohen, N., Houot, S. (2009). Spatial and temporal heterogeneity of soil microorganisms and isoproturon degrading activity in a tilled soil amended with urban waste composts. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(12), 2558–2567. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.09.017>.

Vieno, N.M., Härkki, H., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2007). Occurrence of pharmaceuticals in river water and their elimination in a pilot-scale drinking water treatment plant. *Environmental Science and Technology*, 41, 5077e5084.

W

Wales, A.D., et Davies, R.H. (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics (Basel)*, 4, 567–604.

- Wang, Q., Guo, M., Yates, S.R. (2006). Degradation kinetics of manure-derived sulfadimethoxine in amended soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 157–163.
- Wang, Y.J., Jia, D.A., Sun, R.J., Zhu, H.W., Zhou, D. M. (2008). Adsorption and cosorption of tetracycline and copper(II) on montmorillonite as affected by solution pH. *Environmental Science and Technology*, 42(9), 3254–3259. <http://doi.org/10.1021/es702641a>.
- Wang, H., Dong, Y., Yang, Y., Toor, G.S., Zhang, X. (2013). Changes in heavy metal contents in animal feeds and manures in an intensive animal production region of China. *Journal of Environmental Sciences*, 25(12), 2435-2442.
- Wang, C., Hu, X., Chen, M.L., Wu, Y.H. (2005). Total concentrations and fractions of Cd, Cr, Pb, Cu, Ni and Zn in sewage sludge from municipal and industrial wastewater treatment plants. *J Hazard Mater*, 119(1-3), 245-9.
- Watanabe, N., Bergamaschi, B.A., Loftin, K.A., Meyer, M.T., Harter, T. (2010). Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manured forage fields. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6591-6600.
- Watkinson, A.J., Murby, E.J., Kolpin, D.W., Costanzo, S.D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*, 407: 2711–2723.
- Wegst-Uhrich, S.R., Navarro, D.A.G., Zimmerman, L., Aga, D.S. (2014). Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides. *Chem. Cent. J.* 8:5.
- Wei, Y., Liu, Y. (2005). Effects of sewage sludge compost application on crops and cropland in a 3-year field study. *Chemosphere*, 59(9), 1257-1265.
- Westergaard, K., Müller, A.K., Christensen, S., Bloem, J., Sørensen, S.J. (2001). Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 2061–2071.
- Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2002) 49, 585–586. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00337-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4)
- Wolt, J. (1994). *Soil solution chemistry: applications to environmental science and agriculture*. John Wiley, New York, 0471585548.
- Wolf Environnement, SGS, SAS. Contrat ADEME 0075011. (2002). Bilan entre micropolluants organiques, éléments traces métalliques, paramètres agronomiques, pH et matière sèche des boues de station d'épuration d'effluents urbains (données de janvier 1998 à avril 2000).
- Wong, J.W.C. Wan, C.K., Fang M., China, P.R. (2002). Pig Manure as a Co-Composting Material for Biodegradation of PAH-Contaminated Soil. 23, 1, *Environ. Technol.* 23, 15-26.

Wu, D., Pan, B., Wu, M., Peng, H., Zhang, D., Xing, B. (2012). Coadsorption of Cu and sulfamethoxazole on hydroxylized and graphitized carbon nanotubes. *Science of the Total Environment*, 427–428, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.039>.

Wyszkowska, J., Kucharski, J., Borowik, A. (2008). Response of Bacteria to Soil Contamination With Heavy Metals. *Chair of Microbiology*, 13(3), 443–453.

X

Xing, Y., Chen, X., Zhuang, J., Chen, X. (2015). What happens when pharmaceuticals meet colloids. *Ecotoxicology* 24, 2100-2114.

Xu, Y., Yu, W., Ma, Q., Wang, J., Zhou, H., & Jiang, C. (2016). The combined effect of sulfadiazine and copper on soil microbial activity and community structure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.041>.

Xu, Y., Yu, W., Ma, Q., Zhou, H., 2015. Interactive effects of sulfadiazine and Cu(II) on their sorption and desorption on two soils with different characteristics. *Chemosphere* 138, 701-707.

Xue, H., Nhat, P.H., Gächter, R., Hooda, P.S. (2003). The transport of Cu and Zn from agricultural soils to surface water in a small catchment. *Advances in Environmental Research*, 8(1), 69-76.

Xue, H., Nhat, P.H., Sigg, L. (2005). Effects of Soil Composition on Zn Speciation in Drainage Waters from Agricultural Soils. *Aquatic Geochemistry*, 11(3), 303-318.

Y

Yang, J.F., Ying, G.G., Yang, L.H., Zhao, J.L., Liu, F., Tao, R., Yu Z.Q., Peng, P. (2009). Degradation behavior of sulfadiazine in soils under different conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 44: 241–8.

Yang, J.F., Ying, G.G., Zhao, J.L., Tao, R., Su, H.C., Chen, F. (2010). Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl River using RRLC-MS/MS. *Science of the Total Environment*, 408, 3424–3432.

Yang, J.F., Ying, G.G., Liu, S., Zhou, L.J., Zhao, J.L., Tao, R., Peng, P.A. (2012). Biological degradation and microbial function effect of norfloxacin in a soil under different conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47: 288–295.

Yang, J., Wei, W., Pi, S., Ma, F., Li, A., Wu, D., Xing, J. (2015). Competitive adsorption of heavy metals by extracellular polymeric substances extracted from *Klebsiella* sp. J1. *Bioresource Technology*, 196, 533–539. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.011>.

Yang, Y.D., Chen, D.H., Huang, M.H. (2010a). The source of antibiotics in the environment and progress of its ecological impact research. *Journal of Environmental Science and Management*, 35(1): 140–143.

Yu, X., Zipp, G.L., Davidson III, G.W.R. (1994). The effect of temperature and pH on the solubility of quinolone compounds: Estimation of heat of fusion. *Pharm. Res.* 11, 522-527.

Z

Zhang, Y., Hu, S., Zhang, H., Shen, G., Yuan, Z., Zhang, W. (2017). Degradation kinetics and mechanism of sulfadiazine and sulfamethoxazole in an agricultural soil system with manure application. *Science of the Total Environment*, 607–608, 1348–1356. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.083>.

Zielezny, Y., Groeneweg, J., Vereecken, H., Tappe, W. (2006). Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2372–2380. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.031>.

Zilles, J., Shimada, T., Jindal, A., Robert, M., Raskin, L. (2005). Presence of macrolide–lincosamide–streptogramin B and tetracycline antimicrobials in swine waste treatment processes and amended soil. *Water Environment Research*, 77:57–62.



Titre : Antibiotiques apportés seuls ou en mélange (antibiotique+antibiotique et antibiotique+métaux) dans des sols agricoles – Devenir et impacts sur les microorganismes du sol et leurs activités

Mots clés : sol, antibiotiques, éléments traces métalliques, mélange de contaminants, produits résiduels organiques, activités microbiennes

Résumé : Les antibiotiques (ATB) consommés en médecine humaine et vétérinaire sont en grande partie excrétés et peuvent entrer dans les sols agricoles via l'épandage des produits résiduels organiques (PRO), avec des risques encore mal connus sur la santé humaine et l'environnement. De plus, ces ATB sont le plus souvent apportés en mélange avec d'autres contaminants organiques et/ou minéraux. Or très peu d'études ont abordé le devenir et les effets des ATB en interaction avec d'autres contaminants dans les sols.

L'objectif de la thèse était donc de mieux comprendre le devenir des ATB, apportés seuls, ou en mélange et leurs impacts sur les microorganismes du sol et leurs activités.

Les antibiotiques sélectionnés ont été le sulfaméthoxazole (SMX) et la ciprofloxacine (CIP), pour leur comportement dans le sol et leur mode d'action contrastés, ainsi que le N-ac-SMX, métabolite principal du SMX. Les métaux choisis ont été le cuivre et le zinc car leur accumulation dans le sol est connue pour être favorisée via certains PRO. Ils ont été apportés en mélange, à une dose environnementale, et à une dose 5 fois plus élevée. Les sols sont un sol témoin qui n'a jamais reçu de PRO et deux sols amendés depuis 1998, par du fumier ou un compost de déchets verts et boues de station d'épuration, afin de tester l'impact d'apports répétés de PRO et la nature du PRO.

Des microcosmes ont été incubés en conditions contrôlées pendant 156 jours. Pour l'étude du devenir des ATB, les sols ont été traités avec des ATB marqués au ¹⁴C et la distribution du ¹⁴C a été suivie dans les fractions minéralisées, facilement et difficilement extractibles et non extractibles. L'étude de l'impact des ATB seuls ou en mélange sur les microorganismes et leurs activités a été réalisée à partir d'ATB non marqués.

Le devenir des ATB est contrôlé par :

i) La nature et les propriétés des ATB : la CIP s'adsorbe rapidement et fortement dans les sols et n'est pas minéralisée. Les sulfonamides sont rapidement dégradés et minéralisés jusqu'à 10% après 156 jours.

Les devenirs du SMX et du N-ac-SMX, sont quasiment similaires lorsqu'ils sont apportés seuls, le N-ac-SMX étant transformé en SMX. Quelles que soient les molécules, les résidus non extractibles sont majoritaires en fin d'incubation (> 50%).

ii) L'apport répété de PRO qui favorise l'adsorption des ATB et diminuent leur minéralisation.

iii) La nature des PRO suivant leur stabilité : le compost, plus stable, favorise la production de résidus difficilement extractibles, le fumier, plus dégradé, stimule la minéralisation des sulfonamides et la production de résidus non extractibles.

iv) La présence d'autres contaminants, leur nature et leur concentration : si l'apport de CIP à dose environnementale n'a pas impacté le devenir du SMX et du N-ac-SMX dans les sols, les métaux ont exercé des effets d'autant plus importants que leur dose était élevée. A dose faible, les métaux diminuent la minéralisation du SMX et du N-ac-SMX d'un facteur 2 en favorisant l'adsorption des ATB par complexation en particulier avec le cuivre. A forte dose, les métaux inhibent la minéralisation des sulfonamides avec des effets d'origine physico-chimique (augmentation de l'adsorption des ATB via le cuivre) et certainement biologique (effets toxiques en particulier du zinc).

Les sulfonamides n'ont pas eu d'effet sur les microorganismes du sol et la minéralisation du carbone et de l'azote lorsqu'ils sont apportés seuls ou en mélange avec de la ciprofloxacine ou avec des métaux à dose environnementale. En revanche, les mélanges avec la forte dose de métaux exercent des effets toxiques sur la biomasse microbienne et sur la minéralisation du carbone. Ces effets toxiques semblent essentiellement dus aux métaux et non au pH ou à la force ionique.

Dans ces conditions expérimentales, les risques environnementaux liés aux ATB semblent donc limités à court terme. Mais il serait nécessaire d'étudier les effets à plus long terme, et les effets d'apports cumulatifs.

Title : Antibiotics alone or in combination (antibiotic+antibiotic and antibiotic+metals) in agricultural soils - Fate and impacts on soil microorganisms and their activities

Keywords : soil, antibiotics, trace metals, mixture of contaminants, organic waste products, microbial activities

Abstract : The antibiotics (ATB) used in human and veterinary medicine are largely excreted and can enter agricultural soils through the spreading of organic waste products (OWP), with unassessed risks on human health and the environment. In addition, these ATBs are most often combined with other organic and / or mineral contaminants. However, very few studies have addressed the fate and effects of ATBs interacting with other contaminants in soils.

The objective of the thesis was to better understand the fate of ATB applied to soils alone or in combination with other contaminants, and their impacts on soil microorganisms and their activities.

The antibiotics selected were sulfamethoxazole (SMX) and ciprofloxacin (CIP), for their contrasting mode of action and behavior, and N-ac-SMX, the main metabolite of SMX. The chosen metals were copper and zinc, which are known to increase in soils with regular applications of certain OWPs. They were brought together, at an environmental dose, and at a dose 5 times higher. The soils are a control soil that has never received OWP and two soils amended since 1998, by manure or compost green waste and sewage sludge, to test the impact of repeated applications of OWP and of the nature of OWP.

Microcosms were incubated under controlled conditions for 156 days. For the study of ATB fate, the soils were treated with ¹⁴C-labeled ATBs and the ¹⁴C distribution was followed in the mineralized, easily and hardly extractable and non-extractable fractions. The impact of ATBs alone or in combinations on microorganisms and their activities was studied using unlabelled ATBs.

The fate of ATBs is controlled by :

i) The nature and properties of ATBs: CIP is rapidly and strongly adsorbed in soils and is not mineralized. Sulfonamides are rapidly degraded and mineralized up to 10% after 156 days.

The fates of the SMX and N-ac-SMX are almost similar when they are brought alone, the N-ac-SMX being transformed into SMX. Whatever the molecules, the non-extractable residues are major at the end of incubation (> 50%).

ii) Previous repeated applications of OWP that enhance adsorption of ATBs and reduce their mineralization.

iii) The nature of the OWP : the more stable compost promotes the production of hardly extractable residues, the manure, more degradable, stimulates the mineralization of the sulfonamides and the production of non-extractable residues.

iv) The presence of other contaminants, their nature and concentration : although the CIP at environmental doses did not affect the fate of SMX and N-ac-SMX in soils, the influence of metals was measurable and increased with their dose. At low doses, metals decrease the mineralization of SMX and N-ac-SMX by a factor of 2, by promoting the adsorption of ATBs through complexation, in particular with copper. At high doses, metals inhibit the mineralization of sulfonamides, through physicochemical reactions (increased adsorption of ATBs via copper) and certainly biological effects (toxic effects especially of zinc).

The sulfonamides had no effect on soil microorganisms and mineralization of carbon and nitrogen when applied alone or as a mixture with ciprofloxacin or metals at environmental doses. But mixtures with the high dose of metals induce toxic effects on microbial biomass and mineralization of carbon. These toxic effects seem mainly due to metals and not to pH or ionic strength indirect effects.

Therefore under these experimental conditions, the environmental risks associated with ATBs seem limited in the short term. But it would be necessary to study the effects in the longer term and of cumulative applications.

