

Effets des antibiotiques sur le procédé d'épuration par boues activées. : étude du cas de l'érythromycine, du floc bactérien au réacteur biologique

Jean-Noël Louvet

▶ **To cite this version:**

Jean-Noël Louvet. Effets des antibiotiques sur le procédé d'épuration par boues activées. : étude du cas de l'érythromycine, du floc bactérien au réacteur biologique. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2010. Français. NNT : 2010INPL066N . tel-01748806

HAL Id: tel-01748806

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748806

Submitted on 29 Mar 2018

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 09/11/2010
pour l'obtention du grade de Docteur de l'INPL
(Spécialité Génie des Procédés et des Produits)

par

Jean-Noël LOUVET

Effets des antibiotiques sur le procédé d'épuration par boues activées. Etude du cas de l'érythromycine, du floc bactérien au réacteur biologique

Composition du jury :

Rapporteurs : Christophe DAGOT, ENSIL, Limoges
Eberhard MORGENROTH, ETH, Zürich (Suisse)

Examinateurs : Yolaine BESSIERE, INSA, Toulouse
Marie-Noëlle PONS, CNRS, LRGP, Nancy (directeur de thèse)
Olivier POTIER, ENSGSI, Nancy (co-directeur de thèse)
Ganesh SOCKALINGUM, Université de Reims Champagne-Ardenne

Membre Invité : Dominique DUMAS, Faculté de Médecine, Nancy Université

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (UPR 3349 CNRS)

Contact : jn.louvet@gmail.com

« Il y a sur terre deux choses précieuses. La Première c'est l'amour, la seconde, bien loin derrière, c'est l'intelligence. Amour et intelligence ne se séparent d'ailleurs pas à qui en entend bien le sens. »

Gaston Berger

Remerciements

Je remercie Michel SARDIN directeur du LSGC et Gabriel WILD directeur du LRGP de m'avoir acceuilli au sein de leur laboratoire et permis d'y développer ce travail de thèse dans le cadre du projet ANR-Antibi-eau.

Je remercie tout particulièrement mes directeurs de thèse Marie-Noëlle PONS et Olivier POTIER pour leur gentillesse, le temps qu'ils m'ont accordé et les conseils qu'ils m'ont donnés.

Marie-Noëlle PONS avait imaginé un projet de recherche original et ambitieux qui a été le fil directeur de ce travail de thèse. Marie-Noëlle a toujours veillé à ce que mon travail s'effectue dans les meilleures conditions et a toujours apporté réponse à mes questions. Je la remercie également de m'avoir permis de défendre mon travail lors de congrès internationaux.

Olivier POTIER s'est également beaucoup investi pour la réussite de mon travail de thèse. Il m'a transmis son enthousiasme pour la recherche et a apporté une vision originale sur les résultats. De plus il a été l'exemple que j'ai essayé de suivre lors des enseignements à l'ENSGSI.

Je remercie Dominique DUMAS pour m'avoir enseigné la microscopie confocale et fait confiance quant à l'utilisation des microscopes. Une grande partie des résultats est liée aux compétences et à l'implication de Dominique dans le projet de recherche.

Je remercie également les autres membres du jury qui ont accepté de juger mon travail ;
Le Professeur Christophe DAGOT que j'ai rencontré à de nombreuses reprises et toujours avec grand plaisir. Yolaine BESSIERE et Eberhard MORGENROTH qui m'ont également fait l'honneur de juger mon travail et de participer à mon jury de thèse. Ganesh SOCKALINGUM était membre du jury et membre du projet de recherche et a permis l'utilisation de la microspectroscopie infrarouge et Raman.

Je remercie Tatiana GÖRNER et Catalina AVELLA pour le travail effectué au LEM concernant la caractérisation des exopolymères bactériens dans le cadre du projet ANR Antibi-eau.

Je remercie Jean-Pierre LECLERC et François LAPICQUE pour leur aide concernant les articles sur l'électrocoagulation. Je remercie Christophe MERLIN pour ses conseils.

Je remercie Steve PONTVIANNE pour son rôle clé dans le laboratoire d'analyse des eaux et en particulier pour son aide avec la chromatographie ionique.

Je remercie l'ensemble des doctorants que j'ai cotoyés, en particuliers ceux qui ont travaillé sur le traitement de l'eau. Nous étions une très belle promotion ! Salim ZODI, ou dois-je dire Professeur ZODI, a grandement contribué à la réussite de mon travail, il m'a donné de précieux conseils tant sur le plan scientifique que sportif ! Muatasem ALNNASOURI, souris à la vie, toujours de bon conseils. Clémence MICHON, dis nous où se cache l'arsenic ! Rania ATTIK, post-doctorante membre du projet ANR Antibi-eau, avec qui j'ai eu le bonheur

d’effectuer de très belles images. Yann LE MOULLEC, merci pour tout ce que tu m’as appris et ton classeur excel magique !

Je remercie l’ensemble des stagières qui m’ont aidé dans mon travail en particulier Cinzia GIAMMARINO et Yannick HELUIN.

Je remercie mes parents qui ont toujours été exemplaires et m’ont permis d’effectuer des longues études.

Je remercie Déborah, le rayon de soleil qui illumine ma vie.

Résumé

Effets des antibiotiques sur le procédé d'épuration par boues activées. Etude du cas de l'érythromycine, du floc bactérien au réacteur biologique

L'objectif de ce travail est de caractériser l'effet de l'érythromycine sur l'activité bactérienne et l'inhibition de l'épuration dans les réacteurs de traitement des eaux usées urbaines. L'étude a montré l'importance du temps d'exposition à l'érythromycine. L'inhibition de la nitrification et de l'épuration de la DCO a été mesurée sur une période de 4 h pour des concentrations supérieures à 1 mg/L d'érythromycine alors que l'inhibition de l'épuration pour une concentration d'érythromycine de 4 µg/L a été mesurée suite à 20 h d'exposition. L'origine de la liqueur mixte est également déterminante : l'érythromycine a inhibé la nitrification avec les boues de Nancy mais n'a pas inhibé la nitrification avec les boues et d'Epinal. Par contre, l'inhibition de l'épuration de la DCO a été mesurée pour les deux boues. Des analyses microscopiques ont montré qu'en présence d'érythromycine les flocs bactériens se fractionnaient suite aux lyses bactériennes. La microscopie en épifluorescence et la microscopie confocale combinées à des marqueurs de viabilité fluorescents ont permis de déterminer les vitesses de mortalité bactérienne. Ces études ont mis en évidence un temps de latence qui précède la mortalité des bactéries. Ce temps de latence pourrait être lié aux mécanismes d'adsorption de l'antibiotique et de diffusion dans les flocs, ainsi qu'à la vitesse biologique de mortalité. Enfin, un marquage simultané Gram et viabilité (microscopie confocale 3D au cours du temps) a montré que l'érythromycine pourrait modifier la composition bactérienne des boues en sélectionnant les bactéries les moins sensibles.

Mots clés : boues activées, antibiotiques, microscopie, viabilité, inhibition nitrification

Abstract

Effects of antibiotics on activated sludge process. The Erythromycine case, from activated sludge flocs to the biological reactor.

This study examines the effect of erythromycin on activated sludge bacteria and the inhibition of the pollution removal in batch reactors treating urban wastewater. Results showed the importance of exposure time to erythromycin. Inhibition of nitrification and COD removal was measured during a 4 h period for erythromytcin concentrations higher than 1 mg/L. A 4 µg/L erythromycin concentration inhibited COD removal during a 20 h exposure time. The effect of erythromycin on nitrification was variable depending on the sludge origin. Erythromycin inhibited the specific nitrification rate with sludge from Nancy WWTP, but increased the nitrification rate at the other facility (Epinal WWTP). The cell lysis resulted in destruction of activated sludge flocs. Microscopic techniques (epifluorescence and confocal laser scanning microscopy (CLSM)), combined with a fluorescent viability indicator, allowed us to study erythromycin time-kill activity.Viability staining results showed a latency time before the lower antibiotic concentrations began to kill bacteria. This latency time could be related to antibiotic adsorption and diffusion into activated sludge flocs as well as the rate of bateria death. The effect of erythromycin according to the bacterial Gram type was investigated with 3-dimensional Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) time-lapse imaging combined with a Gram and Viability staining. $Gram^+$ bacteria had a higher mortality rate than the $Gram^-$ bacteria. This result suggests that antibiotic in wastewater could change the activated sludge bacteria composition according to their Gram type by selecting bacteria the less sensitive to the antibiotics.

Key words : activated sludge, antibiotics, microscopy, viability staining, inhibition nitrification

Table des matières

Introduction Générale 9

1 Etude bibliographique 23

1.1 Antibiotiques dans l'environnement et résistances 23
1.1.1 Le mode de développement de résistances 23
1.1.2 Les actions possibles pour limiter le développement 23
1.1.3 Le rôle des concentrations subinhibitrices 25
1.1.4 Le rôle des stations d'épuration 26
1.1.5 Les concentrations d'antibiotiques dans les eaux 26

1.2 Les antibiotiques de la famille des macrolides 27
1.2.1 Definition 27
1.2.2 L'érythromycine 28
1.2.3 Sels et esters dérivés de l'érythromycine 29
1.2.4 Mode d'action des antibiotiques macrolides 29

1.3 L'action des macrolides sur le quorum sensing 30
1.3.1 Le quorum sensing, généralités. 30
1.3.2 L'inhibition du quorum sensing par les macrolides 32

1.4 Les stations d'épuration à boues activées 34
1.4.1 Principe de fonctionnement 34
1.4.2 Le floc bactérien de boues activées 36

1.5 Les stations d'épuration face aux antibiotiques 38
1.5.1 L'élimination des antibiotiques dans les stations d'épuration. 38
1.5.2 Inhibition des bactéries autotrophes et des bactéries nitrifiantes 41
1.5.3 Modélisation d'un effet toxique 43
1.5.4 L'inhibition des procédés par les antibiotiques 44

1.6 L'imagerie confocale de cellules vivantes 46
1.6.1 Les limites des mesures globales 46
1.6.2 L'apport de l'imagerie confocale 47
1.6.3 Principe de la microscopie confocale 47
1.6.4 Vue d'ensemble des différentes techniques en microscopie de confocale 48
1.6.5 L'étude de la viabilité 50
1.6.6 L'étude de la diffusion 51
1.6.7 Aspects techniques de l'imagerie confocale de cellules vivantes 52

1.7 Conclusion de l'étude bibliographique 53

2 Materiels et méthodes 61

2.1 Présentation des sites de prélèvement 61
2.1.1 Station d'Epuration Nancy-Maxéville 61
2.1.2 Station d'épuration d'Epinal 63

2.2 Réacteurs et chambres pour microscopie 64
2.2.1 Réacteurs batch 3L 64
2.2.2 Réacteurs batch 500 mL 64
2.2.3 Chambres pour microscopie 65

2.3 Analyses pour le suivi des réacteurs batch 66
2.3.1 Matières sèches (MS) et matières en suspension (MES) 66
2.3.2 Spectrophotométrie d'absorbance UV-Visible 67
2.3.3 Spectrophotométrie de fluorescence synchrone 67
2.3.4 Spectro-photocolorimétrie (DCO et ammonium) 68
2.3.5 Chromatographie ionique : Nitrites et Nitrates 69

2.4 Préparations microscopiques et analyse d'image 70
2.4.1 Préparation état sec 70
2.4.2 Analyse d'image (« état sec ») 71
2.4.3 Coloration de Gram 73
2.4.4 Le marquage de viabilité BacLight™ 74
2.4.5 Analyse des images marquage BacLight™ 75
2.4.6 Marquage combiné Gram et viabilité (ViaGram Red+ Bacterial Gram Stain and Viability Kit) 76
2.4.7 Analyse des images ViaGram™ 77

2.5 Microscopes confocaux 78
2.5.1 Le microscope SP2 Leica 78
2.5.2 Le microscope Olympus FV10i Fluoview 78
2.5.3 Macroscope Leica TCS LSI 79

3 Conséquences négatives de l'érythromycine sur l'épuration et la structure des flocs de boues activées 81

3.1 Introduction 82

3.2 Materials and methods 84
3.2.1 Reactor preparation 84
3.2.2 Sample and wastewater measurements 84
3.2.3 Removal rate and inhibition calculations 85
3.2.4 Activated sludge morphology assessment 85

3.3 Results and Discussion 86
3.3.1 Removal rates and inhibition 86
3.3.2 Biomass destruction by erythromycin 89

3.4 Conclusions 90

4 Effet toxique de l'érythromycine sur les boues activées : Expériences en réacteurs batch et utilisation de techniques microscopiques (épifluorescence, et microscopie confocale).....94

4.1 Introduction 96

4.2 Materials and methods 97
4.2.1 Sludge and wastewater origin..... 97
4.2.2 Batch experiments 97
4.2.3 Reactor preparation for 30-hour-long experiments 97
4.2.4 Reactor preparation for five-day-long experiments..... 98
4.2.5 Analyses 98
4.2.6 Activated sludge morphology assessment via bright-field imaging..... 99
4.2.7 Viability assessment via Live/Dead® *BacLight*™ 99

4.3 Results 101
4.3.1 Batch experiments 101
4.3.2 Toxicity assessment via Live/Dead® *BacLight*™ 105

4.4 Discussion 110
4.4.1 Batch experiments 110
4.4.2 Toxicity assessment via Live/Dead ® *BacLight*™ 111

5 Marquage simultané Gram et viabilité sur des boues activées exposées à l'érythromycine. Désintégration des bactéries observée par imagerie confocale 3D au cours du temps. 115

5.1 Introduction 117

5.2 Materials and Methods 118
5.2.1 Sludge and wastewater 118
5.2.2 Classical Gram Staining 119
5.2.3 ViaGram™ Staining..... 119
5.2.4 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) 121
5.2.5 Image analysis 122

5.3 Results and discussion 122
5.3.1 Validation of the staining with high resolution observations 122
5.3.2 Time lapse observations 125

5.4 Conclusion 132

Conclusion Générale..... **131**

6 Annexes.....138

Table des illustrations

Liste des figures

FIGURE 1-1: A) CONSOMMATION D'ANTIBIOTIQUES MACROLIDES, LINCOSAMIDES, ET STREPTOGRAMINES DANS LES SOINS AMBULATOIRES EN 2005 A L'ECHELLE EUROPEENNE. B) POURCENTAGE DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* RESISTANT A L'ERYTHROMYCINE (2004-2005) (D'APRES RIEDEL ET AL. 2007). 24

FIGURE 1-2 : EVOLUTION DE LA MULTIPLICATION CELLULAIRE ET DE LA TRANSCRIPTION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'ANTIBIOTIQUES (DAVIES 2006). 25

FIGURE 1-3 : LES QUATRE REACTEURS DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES MONTRANT LE MELANGE ENTRE LES BACTERIES ENVIRONNEMENTALES (ROND BLANC) ET LES BACTERIES ASSOCIEES AUX HUMAINS ET AUX ANIMAUX (ROND NOIR) (BAQUERO ET AL. 2008). 25

FIGURE 1-4: STRUCTURE CHIMIQUE DE L'ERYTHROMYCINE 29

FIGURE 1-5 : A) STRUCTURE DE LA PAROI DES BACTERIES A GRAM NEGATIF, B) STRUCTURE DES BACTERIES A GRAM POSITIF (SITE INTERNET BIOTECHNOLOGIES DE L'ACADEMIE DE BOURGOGNE) 30

FIGURE 1-6 : (A) STRUCTURES MOLECULAIRES DES DEUX MOLECULES CONNUES SERVANT DE SIGNAL PRODUITES PAR P. AERUGINOSA, BHL ([N-BUTYRYL]-L-HOMOSERINE LACTONE), ET (B) ODDHL N-[3-OXO-DODECANOYL]-L-HOMOSERINE LACTONE) (D'APRES RASMUSSEN ET GIVSKOV 2006) 32

FIGURE 1-7 : GRAPHIQUE DE SURVIE REALISE A PARTIR DE DONNEES CLINIQUES POUR 94 PATIENTS ATTEINTS A UN NIVEAU CRITIQUE PAR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*. LA PRESCRIPTION D'UN MACROLIDE EN SUPPLEMENT A UN AUTRE ANTIBIOTIQUE AUGMENTE SENSIBLEMENT LA PROBABILITE DE SURVIE (BADDOUR ET AL. 2004). 33

FIGURE 1-8 : SENSIBILITE DU BIOFILM DE *P. AERUGINOSA* A L'ANTIBIOTIQUE TOBRAMYCINE EN L'ABSENCE ET EN PRESENCE DE FURANONE, UN INHIBITEUR DE QUORUM SENSING. IMAGES OBTENUES PAR MICROSCOPIE CONFOCALE EN UTILISANT LE KIT LIVE/DEAD BACLIGHT VIABILITY KIT. LES CELLULES QUI APPARAISSENT EN ROUGE SONT CONSIDEREES COMME MOURANTES (HENTZER ET AL. 2003). 33

FIGURE 1-9 : REPRESENTATION SIMPLIFIEE D'UN SYSTEME DE TRAITEMENT DES EAUX USEES 35

FIGURE 1-10 : SCHEMA CONCEPTUEL DU MODELE ASM1 (D'APRES CHACHUAT ET AL., 2001) 36

FIGURE 1-11 : CONSTANTE DE VITESSE DE DEGRADATION K_{BIO} POUR 35 PRODUITS PHARMACEUTIQUES, HORMONES OU PRODUITS A USAGE PERSONNEL. LA VALEUR INDIQUEE EST UNE VALEUR MOYENNE ENTRE DES MESURES REALISEES DANS UNE STATION D'EPURATION URBAINE A BOUES ACTIVEES ET DES EXPERIENCES AVEC UN REACTEUR PILOTE A MEMBRANE. LES LIGNES K_{BIO} = 0,1 ET K_{BIO} =10 $LG_{SS}^{-1}D^{-1}$ INDIQUENT LES LIMITES ATTENDUES DE MOINS DE 20% ET PLUS DE 90% D'ELIMINATION DANS UNE STATION D'EPURATION A BOUES ACTIVEES URBAINE. LES COLONNES EN GRISE INDIQUENT LES VALEURS POUR LESQUELLES LA PRECISION DES DONNEES EXPERIMENTALES PERMETTENT SEULEMENT DE CALCULER LA LIMITE SUPERIEURE DE K_{BIO}. (JOSS ET AL. 2006, MCARDELL ET AL., 2005, UMWELTBUNDESAMT, 2003, TERNES 2000, JOSS ET AL., 2004) 40

FIGURE 1-12 : COMPARAISON ENTRE LA CONCENTRATION EFFICACE 50 (EC_{50}) DES BACTERIES HETEROTROPHES ET CELLES DU GENRE *NITROSOMONAS* (NITRIFIANTES). CHAQUE POINT CORRESPOND A UNE MOLECULE TOXIQUE ECKENFELDER (1992). 42

FIGURE 1-13 : VITESSE SPECIFIQUE DE DISPARITION DE L'AMMONIUM EN REACTEUR BATCH EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'ERYTHROMYCINE (BOUES NANCY) (ALIGHARDASHI (2009)). 45
FIGURE 1-14 : EVOLUTION DE LA SURFACE DE LA BIOMASSE OBSERVEE AU MICROSCOPE A CHAMP CLAIR EN FONCTION DU TEMPS DANS UN REACTEUR BATCH TEMOIN (○) ET UN REACTEUR CONTENANT 20 MG/L D'ERYTHROMYCINE (♦) (ALIGHARDASHI (2009)). 45
FIGURE 1-15 : PERFORMANCE D'UN REACTEUR CONTINU ANAEROBIE TRAITANT UN EFFLUENT SYNTHETIQUE ENTRE LES JOURS 104 ET 167. (●) DCO SOLUBLE DANS L'EFFLUENT, (□) PRODUCTION DE BIOGAZ. LA CONCENTRATION D'ERYTHROMYCINE DANS L'INFLUENT EST INDIQUEE SUR LE HAUT DU GRAPHIQUE (D'APRES AMIN ET AL. 2006). 46
FIGURE 1-16 : TRAJET OPTIQUE POUR UN MICROSCOPE CONFOCAL SIMPLE. LA LENTILLE C CONDENSE LA LUMIERE QUI EST PASSEE A TRAVERS LE « PINHOLE » A ET LA FOCALISE SUR UN POINT D DU SPECIMEN A OBSERVER. LA LENTILLE DE L'OBJECTIF,O, FORME UNE IMAGE DE D SUR LE DEUXIEME « PINHOLE » (« PINHOLE DE SORTIE ») QUI EST CONFOCAL AVEC D ET A. UN AUTRE POINT DU SPECIMEN, LE POINT E PAR EXEMPLE NE SERAIT PAS DANS LE FOCUS DE A, AINSI SON ILLUMINATION SERAIT MOINDRE. DE PLUS, LA PLUPART DE LA LUMIERE (G, H) QUE RENVOIE E NE PASSERA PAS LE PINHOLE DE SORTIE B. LA LUMIERE PROVENANT DE E QUI REJOINT LE PHOTOTUBE, P, EST DONC FAIBLE EN COMPARAISON DE CELLE EN PROVENANCE DU POINT CONFOCAL D. DE CETTE MANIERE LA RESOLUTION DU MICROSCOPE EST AMELIOREE. PENDANT QUE LE SPECIMEN EST SCANNE LE PHOTOTUBE REÇOIT LA LUMIERE PROVENANT DES POINTS D_1, D_2, D_3, ETC. (NON MONTRES SUR LA FIGURE). LES POINTS D_1, D_2, D_3, ETC., PEUVENT SE SITUER SUR LE MEME PLAN FOCAL COMME EN MICROSCOPIE CONVENTIONNELLE, OU PERPENDICULAIREMENT, CE QUI PERMET D'OBTENIR DES SERIES D'IMAGES DANS LE PLAN XY A DIFFERENTES PROFONDEURS Z (MOUVEMENT DE LA SURPLATINE, FLECHES DE LA FIGURE) (D'APRES MINSKY 1957). 47
FIGURE 2-1 : LA STEP DE NANCY NANCY-MAXEVILLE (1, CLARIFICATEURS ; 2, FLOTTATEURS ; 3, TRAITEMENT PHYSIQUE (DECANTATEUR LAMELLAIRE) ; 4, ANOXIE ; 5, CLARIFICATEURS ; 6, DEGAZEUR DESSABLEUR ; 7, CHAUFFERIE ; 8, DIGESTEURS ; 9 BIOLIFT® (D'APRES UNE IMAGE SATELLITE GOOGLE MAP) 61
FIGURE 2-2 : LA STATION D'EPURATION D'EPINAL DONT LES REJETS S'EFFECTUENT DANS LA MOSELLE. LES DEUX LIGNES DE TRAITEMENTS SONT VISIBLES (2 CHENAUX D'OXYDATION ET 2 CLARIFICATEURS). (D'APRES UNE IMAGE SATELLITE GOOGLE MAP) 63
FIGURE 2-3 : PHOTOGRAPHIE DES QUATRE REACTEURS BATCH 3L PRISE 24H APRES LE DEBUT D'UNE EXPERIENCE AVEC LA BOUE ET L'EAU USEE D'EPINAL. DE GAUCHE A DROITE : REACTEUR TEMOIN, 1 MG/L D'ERYTHROMYCINE, 10 MG/L D'ERYTHROMYCINE, 20 MG/L D'ERYTHROMYCINE. 64
FIGURE 2-4 : SYSTEME DE MINI-REACTEURS UTILISES DANS LE TEST DE BIODEGRADABILITE. 65
FIGURE 2-5 : A) CHAMBRES IBIDI UTILISEES POUR LES EXPERIENCES AVEC LE MICROSCOPE A EPIFLUORESCENCE, B) CHAMBRES LAB-TEK® UTILISEES EN MICROSCOPIE CONFOCALE. 66
FIGURE 2-6 : LOCALISATION DES PICS DE FLUORESCENCE DE QUELQUES COMPOSES BIOLOGIQUES DANS LA MATRICE EXCITATION EMISSION (PONS ET AL. 2004) 67
FIGURE 2-7 : EXEMPLE D'EVOLUTION DU SPECTRE DE FLUORESCENCE SYNCHRONE (DELTA = 50 NM) AU COURS DE L'EPURATION EN REACTEUR BATCH D'UNE EAU USEE URBAINE 68
FIGURE 2-8 : EXEMPLE DE CHROMATOGRAPHE (CONDUCTIVITE EN FONCTION DU TEMPS D'ELUTION) POUR UN ECHANTILLON D'EAU USEE URBAINE ANALYSE AVEC LA COLONNE AS18 70
FIGURE 2-9 : LES ETAPES DU PROGRAMME « FLOCS_SEC » 72

FIGURE 2-10 : SPECTRES D'EXCITATION ET D'EMISSION POUR L'IODURE DE PROPIDIUM ET LE SYTO9® (EN POURCENTAGE PAR RAPPORT A LA VALEUR MAXIMALE)..... 74
FIGURE 2-11 : EVOLUTION DU MARQUAGE DE VIABILITE BACLIGHT ™ LORS D'UNE HEURE D'OBSERVATION DE BOUES ACTIVEES EN PRESENCE D'ERYTHROMYCINE (5 MG/L). A) IMAGES COMBINEES LUMIERE TRANSMISE, EPIFLUORESCENCE CANAL ROUGE, EPIFLUORESCENCE CANAL VERT T=15 MINUTES, B) PROFIL D'INTENSITE DE FLUORESCENCE SUR LE SEGMENT BLANC TRACE AU CENTRE DE L'IMAGE A, C) IMAGES COMBINEES LUMIERE TRANSMISE, EPIFLUORESCENCE CANAL ROUGE, EPIFLUORESCENCE CANAL VERT T= 1 HEURE, D) PROFIL D'INTENSITE DE FLUORESCENCE SUR LE SEGMENT BLANC TRACE AU CENTRE DE L'IMAGE C. 76
FIGURE 2-12 : FLUORESCENCE DU SYTOX® GREEN COMPAREE A CELLE DE L'IODURE DE PROPIDIUM POUR DIFFERENTS ETATS PHYSIOLOGIQUES DE LA BACTERIE *E. COLI*. D'APRES ROTH (1997) 77
FIGURE 2-13 : L'INTERFACE DU LOGICIEL DE COMMANDE DU MICROSCOPE OLYMPUS FLUOVIEW FV10I. 1) SELECTION DU TYPE D'OBSERVATION (TIME-LAPSE, Z-STACK, Z-STACK-TIME-LAPSE, MULTI-AERA-TIME-LAPSE, MULTI-AERA-Z-STACK-TIME-LAPSE, 2) ECRAN DE CONTROLE (REGLAGE DU ZOOM, FOCUS, PUISSANCE LASER, SENSIBILITE DES PHOTOMULTIPLICATEURS, CONDITIONS DES TIME-LAPSE), 3)CARTOGRAPHIE (UNE CROIX ROUGE INDIQUE LA POSITION ACTUELLE, 5) IMAGE EN TEMPS REEL (DIFFERENTS CANAUX ET SUPERPOSITION). 79
FIGURE 2-14 : CHAMP DE VISION EN FONCTION DU ZOOM ET DE L'OBJECTIF POUR LE MACROSCOPE TCS LSI (SOURCE LEICA MICROSYTEM)..... 80
FIGURE 2-15 LE MACROSCOPE LEICA TCS LSI ; 1) DFC CAMERA, 2) TETE CONFOCALE, 3) ZOOM (MOTORISE), 4) MOTEUR (FOCUS), 5) CHAMBRE DE PROTECTION CONTRE LES RAYONS LASER, 6) ECHANGEUR DE CHALEUR (SOURCE LEICA MICROSYTEMS) 80
FIGURE 3-1 SPECIFIC COD EVOLUTION RATE AS A FUNCTION OF THE INITIAL COD IN CONTROL REACTORS AND REACTORS CONTAINING WASTEWATER SPIKED WITH 10 MG/L. 86
FIGURE 3-2: SPECIFIC N-NH_4^+ EVOLUTION RATE AS A FUNCTION OF THE INITIAL N-NH_4^+ CONCENTRATION IN CONTROL REACTORS AND REACTORS CONTAINING WASTEWATER SPIKED WITH 10 MG/L ERYTHROMYCIN. 86
FIGURE 3-3 : INHIBITION OF THE SPECIFIC COD EVOLUTION RATE (A); SPECIFIC N-NH_4^+ EVOLUTION RATE (B); AND SPECIFIC NITRIFICATION RATE (C), ALL AS A FUNCTION OF ERYTHROMYCIN CONCENTRATION. 87
FIGURE 3-4: EXAMPLE OF COD EVOLUTION VERSUS TIME IN A CONTROL REACTOR AND A REACTOR CONTAINING WASTEWATER SPIKED WITH 10 MG/L ERYTHROMYCIN..... 87
FIGURE 3-5: EXAMPLE OF EVOLUTION OF TRYPTOPHAN LIKE FLUORESCENCE VERSUS TIME AS A FUNCTION OF ERYTHROMYCIN CONCENTRATION (CONTROL, 1 MG/L, 10 MG/L AND 20 MG/L)..... 87
FIGURE 3-6 : EXAMPLE OF N-NH_4^+, N-NO_2^- AND N-NO_3^- CONCENTRATION OVER TIME AS A FUNCTION OF ERYTHROMYCIN CONCENTRATION (CONTROL, 10 MG/L) FOR THE NANCY WWTP SLUDGE. 88
FIGURE 3-7 : EXAMPLE OF N-NH_4^+, N-NO_2^- AND N-NO_3^- CONCENTRATION OVER TIME AS A FUNCTION OF ERYTHROMYCIN CONCENTRATION (CONTROL, 1 MG/L, 10 MG/L AND 20 MG/L) FOR THE EPINAL WWTP SLUDGE..... 88
FIGURE 3-8 : EXAMPLE OF ACTIVATED SLUDGE FLOC IMAGES (FROM EPINAL SLUDGE) AT THE BEGINNING OF THE EXPERIMENT (A) AND AFTER 1 HR 40 MIN (B) IN A REACTOR CONTAINING WASTEWATER SPIKED WITH 10 MG/L ERYTHROMYCIN. THE IMAGE ANALYSIS PROCEDURE ENABLED MEASUREMENT OF THE EVOLUTION OF THE MEAN SURFACE OF FLOCS OVER TIME AS A FUNCTION OF ERYTHROMYCIN CONCENTRATION (CONTROL, 1 MG/L AND 10 MG/L) (C). 90

FIGURE 4-1 : N-NH_4^+ (A), N-NO_2^- (B) AND N-NO_3^- (B) CONCENTRATION EVOLUTION VERSUS TIME AS A FUNCTION OF THE ERYTHROMYCIN CONCENTRATION (CONTROL, 0.1 MG/L, 1 MG/L AND 10 MG/L). 102
FIGURE 4-2 : EVOLUTION OF SOLUBLE COD MEASURED VIA UV-VISIBLE ABSORBANCE VERSUS TIME AS A FUNCTION OF ERYTHROMYCIN CONCENTRATION (CONTROL, 0.1 MG/L, 1 MG/L AND 10 MG/L)..... 102
FIGURE 4-3 : N-NH_4^+ (A), N-NO_3^- (B) AND 254 NM ABSORBANCE (C) EVOLUTION VERSUS TIME AS A FUNCTION OF THE ERYTHROMYCIN CONCENTRATION (CONTROL, 0.004 MG/L, 0.5 MG/L AND 5 MG/L). A AND B SERIES ARE REPLICATES OF A SAME ERYTHROMYCIN CONCENTRATION IN THE SAME DATE OF EXPERIMENT. 103
FIGURE 4-4 : TYPICAL BRIGHTFIELD IMAGES SHOWING FLOC MORPHOLOGY EVOLUTION VERSUS TIME IN A REACTOR WITH 10 MG/L ERYTHROMYCIN CONCENTRATION AFTER 10 MINUTES (A), 2 H 40 (B) AND 29 H (C). 104
FIGURE 4-5 : FLOC DIAMETER EVOLUTION VERSUS TIME IN REACTOR WITH 10 MG/L ERYTHROMYCIN CONCENTRATION AFTER 10 MINUTES (A), 2 H 40 (B) AND 29 H. THE IMAGE ANALYSIS WAS BASED ON BRIGHTFIELD IMAGES. 104
FIGURE 4-6 : PERCENT LIVE BACTERIA EVOLUTION VERSUS TIME IN MICROSCOPIC SLIDE WELLS IN FUNCTION OF ERYTHROMYCIN CONCENTRATION (CONTROL, 0.1 MG/L AND 1 MG/L) CALCULATED FROM EPIFLUORESCENCE TIME-LAPSE MICROSCOPY IMAGES. BACTERIAL VIABILITY WAS ASSAYED BY STAINING USING THE LIVE/DEAD ® *BACLIGHT*™ VIABILITY KIT. ERROR BARS REPRESENT STANDARD DEVIATION CALCULATED ON THREE REPLICATES..... 105
FIGURE 4-7 : CONFOCAL LASER SCANNING MACROSCOPY IMAGES OF A FLOC COMING FROM A CONTROL REACTOR (A) AND FROM A 10 MG/L ERYTHROMYCIN-SPIKED REACTOR (B) AFTER SIX HOURS OF EXPOSURE. GREEN AREAS ARE LIVE BACTERIA AND RED AREAS ARE DAMAGED BACTERIA. BACTERIAL VIABILITY WAS ASSAYED BY STAINING USING THE LIVE/DEAD ® *BACLIGHT*™ VIABILITY KIT. 106
FIGURE 4-8 : TOP AND SIDE PROJECTIONS OF CONFOCAL LASER SCANNING MACROSCOPY IMAGES OF A FLOC EXPOSED TO 10 MG/L ERYTHROMYCIN AFTER 15 MINUTES (A) AND TWO HOURS (B). GREEN AREAS ARE LIVE BACTERIA AND RED AREAS ARE DAMAGED BACTERIA. BACTERIAL VIABILITY WAS ASSAYED BY STAINING USING THE LIVE/DEAD ® *BACLIGHT*™ VIABILITY KIT. THE WHITE BAR INDICATES THE LOCATION OF LINE PROFILE PRESENTED FIGURE 4-9. 107
FIGURE 4-9 : LINE PROFILE FOR THE ACTIVATED SLUDGE FLOC OBSERVED IN TIME-LAPSE MICROSCOPY WITHIN THE WHITE BAR SHOWN IN FIGURE 4-8A AND FIGURE 4-8B. THE FLOC WAS EXPOSED TO 10 MG/L ERYTHROMYCIN AND BACTERIAL VIABILITY WAS ASSAYED BY STAINING USING THE LIVE/DEAD ® *BACLIGHT*™ VIABILITY KIT. A) T= 15 MIN, B) T= 2H. 107
FIGURE 4-10 : PERCENT LIVE BACTERIA EVOLUTION VERSUS TIME DURING A TWO HOURS EXPOSURE TO 10 MG/L ERYTHROMYCIN FOR THE FLOC PRESENTED FIGURE 4-8. BACTERIAL VIABILITY WAS ASSAYED BY STAINING USING THE LIVE/DEAD ® *BACLIGHT*™ VIABILITY KIT. 108
FIGURE 4-11 : SYTO®9 AND PROPIDIUM IODIDE FLUORESCENCE INTEGRATED SPECTRA FOR CONTROL AND 100 MG/L ERYTHROMYCIN CONCENTRATION OBTAINED VIA CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY SPECTRAL IMAGING. BACTERIAL VIABILITY WAS ASSAYED BY STAINING USING THE LIVE/DEAD ® *BACLIGHT*™ VIABILITY KIT. 109
FIGURE 4-12 : CLSM IMAGING OF ACTIVATED SLUDGE AFTER FOUR HOURS OF EXPOSURE TO A 100 MG/L ERYTHROMYCIN CONCENTRATION AT THE SCALE OF FLOC (A) AND AT THE SCALE OF BACTERIA (B). GREEN AREAS ARE LIVE BACTERIA AND RED AREAS ARE DAMAGED BACTERIA. BACTERIAL VIABILITY WAS ASSAYED BY STAINING USING THE LIVE/DEAD ® *BACLIGHT*™ VIABILITY KIT. 109
FIGURE 5-1 : FLUORESCENCE AND EXCITATION AND EMISSION SPECTRA OF THE THREE DYES USED IN THE STAINING. 121

FIGURE 5-2 : HIGH RESOLUTION 3D MAXIMAL PROJECTION CLSM IMAGE OF AN ACTIVATED SLUDGE FLOC IN A CONTROL MICRO-REACTOR (NANCY WWTP). VIABILITY AND GRAM TYPE WERE ASSAYED USING THE VIAGRAM™ RED + BACTERIAL GRAM STAIN AND VIABILITY KIT. BLUE : DAPI, ALL NUCLEIC ACIDS; GREEN : SYTOX GREEN, NUCLEIC ACIDS OF DYING BACTERIA; RED : TEXAS RED-XCWGA: GRAM+ BACTERIA SURFACE. 123
FIGURE 5-3 : CLASSICAL GRAM STAINING OF ACTIVATED SLUDGE FLOCS (NANCY WWTP) 123
FIGURE 5-4 : A: 3D MAXIMAL PROJECTION CLSM IMAGE OF ACTIVATED SLUDGE FLOCS EXPOSED TO ERYTHROMYCIN (30 MINUTE EXPOSURE TIME). B: ZOOM ON A ZONE WHERE THERE WERE NO MORE BACTERIA UNIQUELY STAINED BY DAPI. VIABILITY AND GRAM TYPE WERE ASSAYED USING THE VIAGRAM™ RED + BACTERIAL GRAM STAIN AND VIABILITY KIT. 124
FIGURE 5-5 : A) 3D MAXIMAL PROJECTION CLSM IMAGE IN THE CONTROL MICRO-REACTOR 15 MIN AFTER STAINING B) CONTROL REACTOR 9H30 AFTER STAINING (THE WHITE ARROW INDICATE A ZONE STAINED BY SYTOX GREEN WHERE THE FLUORESCENCE DECREASED WITH TIME) C) MICRO-REACTOR WITH 10 MG/L ERYTHROMYCIN 15 MIN AFTER STAINING. D) MICRO-REACTOR WITH 10 MG/L ERYTHROMYCIN 9H30 AFTER STAINING. VIABILITY AND GRAM TYPE WERE ASSAYED USING THE VIAGRAM™ RED + BACTERIAL GRAM STAIN AND VIABILITY KIT. 126
FIGURE 5-6 : BACKGROUND FLUORESCENCE LEVEL 15 MINUTE AFTER STAINING (FULL LINE) AND 30 MINUTES AFTER STAIN (INTERRUPTED LINE) IN THE MICRO-REACTOR THAT CONTAINED 10 MG/L ERYTHROMYCIN A) DAPI, B) SYTOX GREEN C) TEXAS RED-X_{CWGA} 127
FIGURE 5-7 : EVOLUTION OF TOTAL FLUORESCENCE OF FLOCS DURING CLSM 3D TIME-LAPSE IMAGING. ▲SYTOX GREEN, ● DAPI, ♦ TEXAS RED-XCWGA. A) CONTROL CHAMBER B) WITH 10 MG/L ERYTHROMYCIN CHAMBER. 128
FIGURE 5-8 : EVOLUTION OF SURFACE OF FLOCS DURING CLSM 3D TIME-LAPSE IMAGING. ▲SYTOX GREEN, ● DAPI, ♦ TEXAS RED-XCWGA. A) CONTROL MICRO-REACTOR B) MICRO-REACTOR WITH 10 MG/L ERYTHROMYCIN. 129
FIGURE 5-9 : EVOLUTION OF THE PERCENTAGE OF GRAM+ ALIVE (GRAM+ ALIVE/TOTAL ALIVE BACTERIA X100) BACTERIA. ○ CONTROL MICRO-REACTOR, ♦ REACTOR WITH 10 MG/L ERYTHROMYCIN. 131

Liste des tableaux

TABLEAU 1-1 : CLASSIFICATION DES MACROLIDES EN FONCTION DES ORGANISMES QUI LES PRODUISENT (SHIOMI K., ET ŌMURA S., (2002)) 29
TABLEAU 1-2 : PRESENTATION DES CONSTANTES DE VITESSE DE BIODEGRADATION KBIO ET D'ADSORPTION KD POUR DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES 39
TABLEAU 1-3: COMPARAISON DES VITESSES DE CROISSANCE ET DE MORTALITE DES BACTERIES NITRIFIANTES ET DES BACTERIES HETEROTHROPHES EN L'ABSENCE DE TOXIQUE 41
TABLEAU 1-4 : VITESSE MAXIMALE DE BIODEGRADATION ET VALEUR DE L'EC50 (CONCENTRATION A LAQUELLE LA RESPIRATION EST DIMINUEE DE MOITIE PAR RAPPORT A UN REACTEUR TEMOIN) POUR LE PHENOL, LE 4-CHLOROPHENOL ET LE 2-AMINOPHENOL (HENZE 1997) 42
TABLEAU 1-5 : CONSIDERATIONS PRATIQUES POUR L'IMAGERIE CONFOCALE DE CELLULES VIVANTES (D'APRES DAILEY ET AL. 2006) . 52
TABLEAU 2-1 : PARAMETRES MOYENS JOURNALIERS DE L'EAU USEE ARRIVANT A LA STATION D'EPURATION DE NANCY-MAXEVILLE .. 63
TABLEAU 3-1 : EXAMPLES OF ANTIBIOTIC CONCENTRATIONS. 83

Introduction Générale

Le génie des procédés au service de l'épuration de l'eau

Afin de préserver la santé humaine, les écosystèmes aquatiques et les usages sociaux et économiques de l'eau, il est nécessaire de collecter et d'épurer efficacement les eaux usées. L'épuration biologique des eaux englobe les différents processus qui conduisent à l'élimination totale ou partielle de la pollution grâce à l'intervention de micro-organismes (Brouzes 1973). Les procédés d'épuration des eaux reproduisent industriellement l'effet épurateur des rivières où s'effectue la dégradation des matières polluantes (Edeline 1993). Le génie des procédés dispose de nombreux outils pour relever les défis concernant l'épuration de l'eau. Il s'agit d'accroître les connaissances fondamentales par une approche mécanistique. Ceci peut être réalisé notamment grâce à l'analyse multi-échelle (de la molécule au procédé), l'analyse des interfaces, par l'étude des matrices biologiques et de leur réactivité, par l'utilisation d'outils de caractérisation et par la modélisation. Ces connaissances fondamentales vont permettre de concevoir des réacteurs plus performants (Baig 2010).

La problématique des micropolluants

La problématique des micropolluants fait partie des défis prioritaires à relever. En effet, l'activité humaine génère de nombreuses molécules qui peuvent avoir des effets néfastes pour la santé humaine et pour l'environnement en dépit d'une présence en faible concentration. Ces micropolluants peuvent être des toxiques, des agents cancérigènes, des perturbateurs du système endocrinien ou encore des éléments favorisant la résistance bactérienne aux antibiotiques (Richardson 2009).

Rejets d'antibiotiques et développement de résistances

Au delà de leur effet potentiellement toxique sur l'environnement, les rejets d'antibiotiques sont préoccupants car ils contribueraient au maintien et au développement de résistances

bactériennes. La résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique, notamment depuis la récente découverte des bactéries NDM-1 (New Delhi metallo-β-lactamase 1). Ces micro-organismes « super résistants » augmentent l'inquiétude des médecins qui redoutent l'apparition et le développement de gènes de résistance chez les bactéries pathogènes. Afin de limiter ce développement de résistance, la France s'est engagée depuis 2002 dans un programme ambitieux de réduction de la consommation d'antibiotique (Sabuncu et al. 2009). En addition de cette action au niveau de la source de pollution une amélioration de l'épuration des rejets est nécessaire. En effet, actuellement les rendements d'épuration des antibiotiques sont particulièrement faibles (Joss et al. 2005). Les stations d'épuration les plus répandues sont les stations d'épuration à boues activées. L'essentiel du traitement consiste en la dégradation de la pollution par voie biologique grâce à l'action des bactéries.

Rejets d'antibiotiques et perturbation des stations d'épuration

Outre le développement de résistance dans l'environnement qui pourrait s'effectuer dès le niveau des stations d'épuration, les antibiotiques (du grec *anti* : contre, et *bios* : la vie) pourraient inhiber l'activité biologique des bactéries des stations d'épuration. Le procédé d'épuration de l'eau pourrait donc être perturbé ce qui augmenterait les rejets de polluants dans l'environnement. Quelques études ont déjà relevé que la présence d'antibiotiques dans les eaux usées pourrait entrainer une inhibition de la nitrification et de l'épuration de la pollution carbonée (Halling-Sorensen 2001, Alighardashi et al. 2009). De plus, il est probable qu'il existe un lien entre rendement d'élimination, résistance et toxicité. Nous avons donc choisi de focaliser notre travail sur l'étude de la toxicité des antibiotiques sur les boues activées et la perturbation du procédé d'épuration que cette toxicité pourrait entrainer.

Expériences nécessaires et choix d'une focalisation sur l'étude d'un seul antibiotique

Pour connaître l'effet d'un composé sur le procédé d'épuration par boues activées il convient d'étudier l'effet du composé :

- pour différentes concentrations
- pour différents temps d'exposition

- en fonction de la variation de la composition des boues et de la composition des eaux usées
- sur plusieurs stations d'épuration pour savoir si les résultats sont propres à une station d'épuration ou sont généralisables ainsi que pour comparer les procédés.

Ceci nécessite d'effectuer un grand nombre d'expériences. De plus, le nombre de composés potentiellement néfastes pour le procédé d'épuration par boues activées étant pléthorique, il est impossible de les étudier un par un. Il est de ce fait nécessaire de comprendre les mécanismes d'action pour pouvoir généraliser les résultats obtenus. Enfin, la bonne connaissance de l'effet d'un composé permet de valider des techniques nouvelles pour mesurer cet effet. C'est pourquoi nous avons décidé de focaliser notre étude en grande partie sur un seul antibiotique.

Le choix de l'érythromycine

L'érythromycine est un antibiotique bactériostatique de la famille des macrolides qui est utilisé à la fois en médecine humaine et vétérinaire. Le choix de l'érythromycine est d'une part lié à son usage massif et à sa présence avérée dans les environnements aquatiques. A titre d'exemple, l'érythromycine a été l'antibiotique le plus fréquemment détecté parmi 21 antibiotiques mesurés dans les eaux de surface lors d'une vaste étude à l'échelle des Etats-Unis (Kolpin et al. 2002). D'autre part, l'érythromycine est un des antibiotiques ayant les plus mauvais rendements d'élimination en station d'épuration (Le-Minh et al. 2010). Enfin, l'érythromycine fait partie des antibiotiques les plus dangereux pour les écosystèmes aquatiques (Lee et al. 2008 et Isidori et al. 2005).

Objectifs et organisation de l'étude

Le but de notre travail est de savoir dans quelle mesure l'érythromycine peut perturber le procédé d'épuration par boues activées et de connaître son effet sur les bactéries des stations d'épuration. De plus, nous avons étudié la variation des communautés bactériennes liée à la présence d'érythromycine. L'effet de l'antibiotique a été étudié à trois échelles : celle de la bactérie, celle du floc bactérien et celle du réacteur.

- Le chapitre 1 est une étude bibliographique qui fait la synthèse des connaissances actuelles concernant la problématique des antibiotiques avec une attention particulière sur les antibiotiques de la famille des macrolides. De plus, nous avons consacré une partie de ce chapitre à la microscopie confocale, un outil fortement utilisé dans notre travail.
- Le chapitre 2 s'attache à décrire les matériels et méthodes utilisés dans notre étude.
- Le chapitre 3 présente les variations de l'effet de l'érythromycine en fonction de la date de prélèvement des boues et des eaux usées ainsi qu'en fonction de leur origine (deux stations d'épuration ont été étudiées, celle de Nancy et celle d'Epinal).
- Le chapitre 4 présente l'effet de l'érythromycine sur les boues activées en fonction du temps d'exposition et de sa concentration. De plus, l'effet de l'érythromycine a été étudié à l'échelle du floc bactérien par des techniques microscopiques.
- Le chapitre 5 présente la mortalité différenciée des bactéries en présence d'érythromycine en fonction de leur type Gram. Ces résultats ont été obtenus grâce à l'utilisation d'un nouveau marquage fluorescent et l'utilisation de la microscopie confocale.

Ce document se termine par une conclusion générale puis donne des perspectives pour de futures recherches.

Bibliographie

Alighardashi A., Pandolfi D., Potier O. and Pons M.N. (2009). Acute sensitivity of activated sludge bacteria to erythromycin. Journal of Hazardous Materials 172(2-3), 685-692.

Baig S. 2010. Le génie des procédés au service de l'environnement : enjeux et défis, X^{èmes} journée Cathala-Letort, 1 et 2 octobre 2008, INSA Toulouse. Procédique Bulletin de la SFGP Juin 2010 n°43

Brouzes P. 1973. Précis d'épuration biologique par boues activées. Lavoisier. 278 p.

Edeline 1993. L'épuration biologique des eaux, théorie et technologie des réacteurs 4èmeédition revue et complétée, coéditions Cebedoc Liège et Lavoisier TEC et DOC Paris, 303p.

Halling-Sorensen 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.

Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Pascarella L., et Parrella A., (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. Science of the Total Environment, 346, 87-98.

Joss A., Keller E., Alder A.C., Gobel A., McArdell, C.S., Ternes, T., Siegrist, H. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. Water Research 39, 3139-3152.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. Environmental Science and Technology 36:1202–11.

Lee Y.J., Lee S.E., Lee D.S., et Kim Y.H., (2008): Risk assessment of human antibiotics in Korean aquatic environment. Environmental Toxicology and Pharmacology, 26, 216-221.

Le-Minh, N., Khan, S.J., Drewes, J.E., Stuetz, R.M. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes Water Research 44 (15), 4295-4323

Richardson S. 2009.Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. Analytical Chemistry 81, 4645–4677.

Sabuncu E. David J. Bernède-Bauduin C., Pépin S., Leroy M., Boëlle P.Y., Watier L., Guillemot D. (2009) Significant Reduction of Antibiotic Use in the Community after a Nationwide Campaign in France, 2002 à 2007. PLoS Med 6, e1000084

Chapitre 1

1 Etude bibliographique

1.1 ANTIBIOTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT ET RESISTANCES

1.1.1 Le mode de développement de résistances

Chaque antibiotique agit seulement sur une fraction du monde des microorganismes. Pour un antibiotique donné, certaines espèces sont sensibles d'autres non. Les espèces de bactéries insensibles à un antibiotique donné sont dites « naturellement résistantes ». On dit des espèces qui furent sensibles mais ne le sont plus qu'elles ont acquis une résistance. A l'origine l'acquisition de résistance provient d'une mutation aléatoire dans les gènes existants ou de l'utilisation d'un gène déjà existant pour résister à l'antibiotique. L'exposition aux antibiotiques et à d'autres produits antimicrobiens, que ce soit dans le corps humain, le corps des animaux, ou dans l'environnement crée une sélection naturelle qui favorise le développement de résistances par le développement des souches naturellement résistantes et celui des souches qui ont acquis une résistance. Le transfert de gènes horizontal qui consiste à l'échange de matériel génétique entre microbes permet aux gènes porteurs de résistances de se propager parmi l'ensemble des populations bactériennes (bactéries environnementales, commensales, pathogènes). La résistance prolifère également par la réplication des microbes qui sont porteurs des gènes de résistances (American Academy of Microbiology 2009).

1.1.2 Les actions possibles pour limiter le développement

Parmi les solutions pour lutter contre le développement de résistances la détection rapide et la surveillance sont des outils utiles. Connaître rapidement quels sont les antibiotiques qui peuvent soigner une infection permettrait aux médecins de prendre la bonne décision quant au choix de l'antibiotique et ralentirait le développement de résistances tout en améliorant la guérison des malades. Des solutions concrètes peuvent aussi limiter le développement de résistances ; il s'agit par exemple de la bonne hygiène des mains et de l'épuration des eaux usées pour limiter la dispersion des pathogènes. De plus, l'usage responsable des antibiotiques

est recommandé afin de limiter les consommations inutiles (par exemple les infections virales et l'usage trop prolongé des antibiotiques). L'usage responsable couvre également le champ de la médecine vétérinaire (American Academy of Microbiology 2009). L'Europe s'est démarquée sur ce plan puisqu'elle a interdit l'usage des antibiotiques en tant que promoteurs de croissance. D'autres pays réfléchissent à une révision de leur législation.

Les pays en voie de développement sont particulièrement victimes du développement de résistances. En effet, les conditions d'hygiène insuffisantes et le manque de qualité de l'eau favorisent les maladies d'origine bactérienne. De plus, les antibiotiques de dernière génération, plus efficaces sont aussi plus chers (Pepin et Ricordeau 2006).

Même si la consommation et le rejet des antibiotiques ne sont pas les seuls facteurs influençant le développement et la stabilité des résistances aux antibiotiques, on observe un fort lien entre consommation d'antibiotiques et résistances. Au niveau européen, il existe une relation linéaire entre la consommation d'érythromycine, antibiotique chef de file de la famille des macrolides, et la présence de *Streptococcus pneumoniae* résistant (Riedel et al. 2007, Granizo et al. 2000). La France est le pays européen le plus sévèrement touché par la résistance à l'érythromycine (Figure 1-1), (Farrell 2008, Riedel 2007). Le transfert horizontal de plasmides conférant des résistances aux antibiotiques serait une des raisons pour lesquelles l'apparition de résistance bactérienne est si difficile à contrôler (Woo et al. (2003), Dröge et al. (2000)).

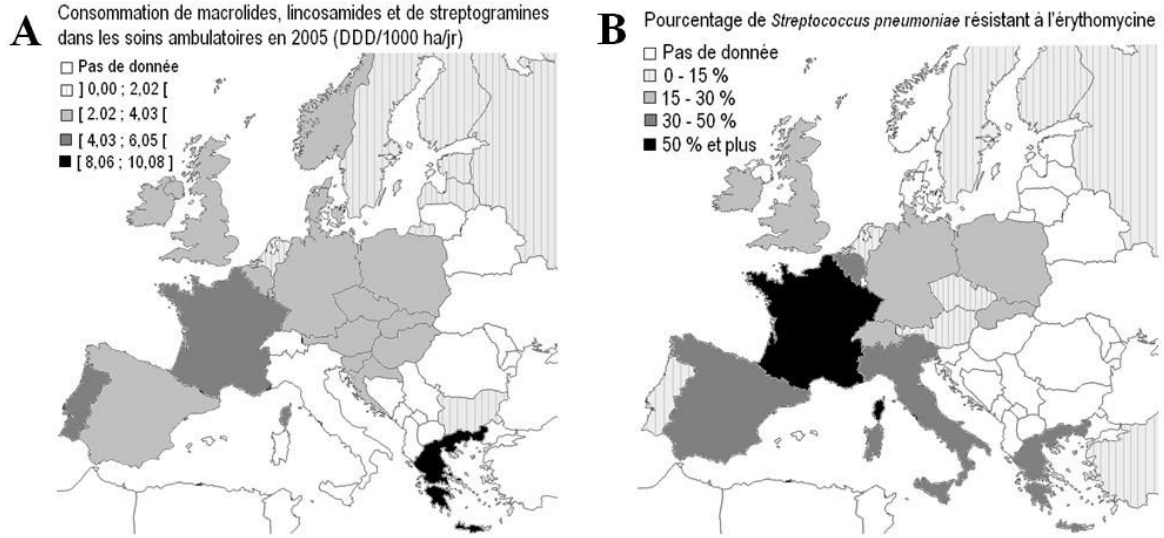


Figure 1-1: A) consommation d'antibiotiques macrolides, lincosamides, et streptogramines dans les soins ambulatoires en 2005 à l'échelle européenne. B) pourcentage de ***Streptococcus pneumoniae*** résistant à l'érythromycine (2004-2005) (d'après Riedel et al. 2007).

Depuis 2002, la France s'est engagée dans un plan national ambitieux pour la réduction de la consommation d'antibiotiques. En cinq ans la consommation d'antibiotiques par les enfants entre 6 et 15 ans a diminué de 35,8% (Sabuncu et al. 2009). Les effets sont d'ores et déjà visibles sur la réduction du pourcentage de germes résistant aux antibiotiques. A titre d'exemple, le pourcentage de *S. pneumoniae* résistant à l'érythromycine est passé de 50,1% en 2004 à 30,7% en 2008 (EARSS 2010).

1.1.3 Le rôle des concentrations subinhibitrices

Les concentrations subinhibitrices d'antibiotiques jouent plusieurs rôles. Elles contribueraient à enrichir les populations bactériennes en gènes de résistance tout en ayant peu d'effet sur la mortalité. De plus, la présence d'antibiotiques à des concentrations subinhibitrices augmente la fréquence des mutations. Les pathogènes peuvent commencer une réponse de survie lorsqu'ils sont exposés à de faibles concentrations d'antibiotiques comme les quinolones qui affectent la synthèse d'ADN (American Academy of Microbiology 2009). De cette façon, ils développeront plus rapidement une résistance dans le futur. La gamme des effets possibles des concentrations subinhibitrices est pléthorique. En effet, les antibiotiques sont des puissants régulateurs du métabolisme microbien (Figure 1-2, Davies 2006).

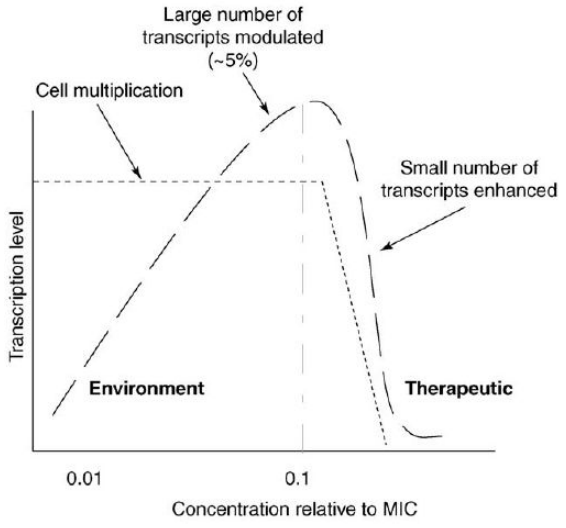


Figure 1-2 : évolution de la multiplication cellulaire et de la transcription en fonction de la concentration d'antibiotiques (Davies 2006).

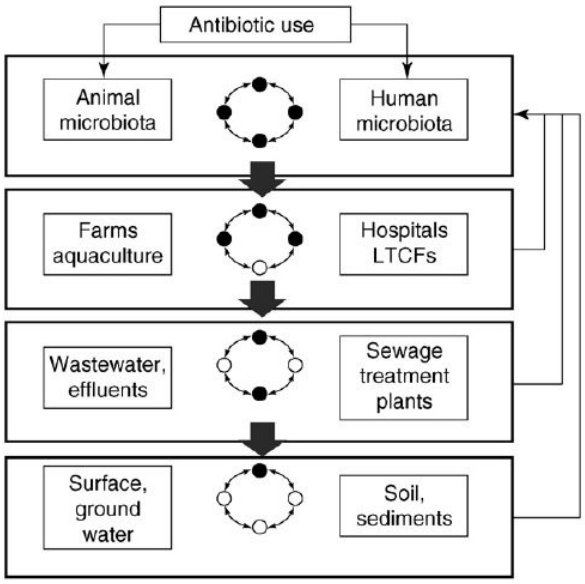


Figure 1-3 : les quatre réacteurs de la résistance aux antibiotiques montrant le mélange entre les bactéries environnementales (rond blanc) et les bactéries associées aux humains et aux animaux (rond noir) (Baquero et al. 2008).

1.1.4 Le rôle des stations d'épuration

On peut schématiser le développement de résistance en considérant que cette résistance se développe dans des réacteurs où se trouvent en particulier une forte connectivité entre bactéries et la présence d'une sélection spécifique. Tous ces éléments sont réunis au niveau des stations d'épuration. De plus, la présence simultanée de bactéries environnementales et de bactéries associées aux humains faciliterait le transfert de gènes à des germes pathogènes (Figure 1-3, Baquero et al. 2008). Szczepanowski et al. (2004) ont isolé dans une population de bactéries d'une station d'épuration à boues activées, 10 plasmides différents conférant un haut niveau de résistance à l'érythromycine dont un conférant une multi-résistance.

1.1.5 Les concentrations d'antibiotiques dans les eaux

Les concentrations d'antibiotiques dans les eaux usées urbaines sont fonction de la consommation d'antibiotiques par les populations, du taux d'excrétion après métabolisme (Lienert et al. 2007), et de la persistance des molécules. Il faut noter qu'en France la consommation d'antibiotiques double en hiver (Pepin et Ricordeau 2006). De plus, les antibiotiques et leur dérivés étant excrétés en même temps que les eaux brunes, des fluctuations journalières proches de celles de la DCO et de l'azote organique ont été mesurées pour la plupart des antibiotiques (Joss et al. 2005). On peut donc supposer également que les infiltrations dans les réseaux d'égouts et les eaux de ruissellement par temps de pluie diluent les concentrations d'antibiotiques de la même façon qu'elles diluent la pollution provenant des eaux brunes. Dans les stations d'épuration urbaines les concentrations minimales en antibiotiques de la famille des macrolides varient entre 0,07 et 0,45 µg/L en fonction des stations d'épuration. Les concentrations médianes varient entre 0,11 et 0,63 µg/L et les concentrations maximales varient entre 0,16 et 1,98 µg/L (Göbel et al. 2005, Karthikeyan et al. 2006, Gulkowska et al. 2008, Xu et al. 2007, Spongberg et al. 2008). Les effluents des industries pharmaceutiques sont beaucoup plus concentrés que les eaux usées urbaines. En effet, dans ces effluents les concentrations d'antibiotiques peuvent atteindre 30 mg/L (Larsson et al. 2007). Les effluents des hôpitaux, bien que moins concentrés que ceux des industries pharmaceutiques sont eux aussi plus concentrés que ceux des eaux usées urbaines. Les concentrations d'antibiotiques de la famille des fluoroquinolones peuvent atteindre les 87µg/L

dans les effluents hospitaliers (Hartmann 1998). Hartemann et al. (2005) indiquent des concentrations de macrolides de 3,2 µg/L dans les effluents de l'hôpital de Bonn. Dans la plupart des cas, les effluents liquides hospitaliers ne subissent pas de prétraitement spécifique et sont directement traités dans les stations d'épuration urbaines. Dans le futur, on risque de voir de plus en plus de collectivités imposer aux établissements de santé une épuration préalable. Ils seront conduits à réaliser par eux-mêmes l'épuration de leurs effluents lorsque les taxes qui leur seront appliquées à titre de redevance de dépollution, taxes basées sur le principe « pollueur-payeur », prendront en compte les dangers spécifiques liés aux effluents hospitaliers (Hartemann 2005). Koplin et al. (2002) ont détecté l'érythromycine plus fréquemment que 21 autres antibiotiques à usage humain et vétérinaire dans les eaux de surface lors d'une étude nationale aux Etats-Unis. La persistance des antibiotiques dans l'environnement et leur présence dans les réserves d'eau potable est avérée. Aux Etats-Unis l'érythromycine a été détectée dans 21 % des rivières et des antibiotiques ont été détectés dans 17 % des nappes souterraines (Focazio 2008). L'érythromycine fait partie des antibiotiques les plus dangereux pour les écosystèmes aquatiques (Lee 2008 et Isidori 2005).

1.2 LES ANTIBIOTIQUES DE LA FAMILLE DES MACROLIDES

1.2.1 Definition

Le terme de macrolide a été initialement proposé en 1957 pour les antibiotiques macrocycliques ayant une fonction lactone. La définition s'est élargie et les macrolides regroupent plus de 2000 molécules macrocycliques à noyau lactone. Les actinomycètes (eubactéries Gram-positives), produisent le plus grand nombre de macrolides (plus de 800) (Tableau 1-1). Les plantes produisent environ 700 macrolides ; la plupart étant des tannins ou des alcaloïdes (molécules organiques hétérocycliques azotées). Près de 200 composés, dont la plupart ont une cytotoxicité sont produits par les invertébrés hormis les insectes. La cytotoxicité est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique d'altérer des cellules, éventuellement jusqu'à les détruire. Les vertébrés produisent environ 30 macrolides dont la plupart ont été découverts dans les lipides à la surface de la peau des chevaux (Shiomi K., et Ōmura S., (2002)).

Les antibiotiques de la famille des macrolides les plus couramment utilisés en médecine sont constitués d'un noyau lactone contenant 14, 15, ou 16 atomes avec des sucres liés par des

liaisons glycosidiques. L'érythromycine, l'oléandomycine, la roxithromycine, la dirithromycine, la clarithromycine et la flurithromycine sont des macrolides avec un noyau lactone à 14 atomes alors que l'azithromycine contient un noyau à 15 atomes. Les macrolides qui contiennent 16 atomes sur leur noyau lactone sont la josamycine, la rosaramicine, la rokitamycine, la kitasamycine, la mirosamycine, la spiramycine et la tylosine. La spiramycine et la tylosine sont presque exclusivement utilisées en médecine vétérinaire.

A l'exception de la rosaramicine et de la mirosamycine qui sont isolées à partir de l'espèce *Micromonospora*, et des dérivés semi-synthétiques de l'érythromycine A (roxithromycine, dirithromycine, clarithromycine, flurithromycine, et azithromycine), les antibiotiques de la famille des macrolides sont produits par des micro-organismes du genre *Streptomyces*. Tous ces antibiotiques ont des propriétés antibactériennes proches et sont actifs contre les bactéries Gram-positives et quelques bactéries Gram-négatives. Ils sont utilisés dans le traitement des espèces *Mycoplasmas, Haemophilus influenzae*, *Chlamydia* et *Rickettsia*. Les antibiotiques macrolides constituent une alternative importante pour les patients allergiques ou sensibles à la pénicilline (Kanfer et al. 1998).

1.2.2 L'érythromycine

L'érythromycine est un antibiotique macrolide produit par l'actinomycète *Streptomyces erythreus*. La structure chimique de l'érythromycine A est présentée sur la Figure 1-4. L'érythromycine est un polyhydroxylactone qui contient deux sucres. La partie non glucidique de la molécule contient un noyau lactone. Un sucre aminé, D-desosamine, est attaché par une liaison β-glycosidique sur la position C-5 du noyau lactone. L'amine tertiaire de la desosamine confère à l'érythromycine son caractère basique (pK_a 8.8). A partir de ce groupe de nombreux sels acides de l'antibiotique ont été préparés. Un second sucre, L-cladinose, qui est unique à l'érythromycine est attaché par une liaison β-glycosidique en position C-3 du noyau lactone.

Tableau 1-1 : classification des macrolides en fonction des organismes qui les produisent (Shiomi K., et Ōmura S., (2002))

Organisme Producteur	Nombre*
Actinomycètes	826
Myxobactéries	125
autres bactéries	37
Champignons	218
Lichen	3
Algues	69
Plantes	683
Invertébrés	190
Insectes	51
Vertébrés	27
Total	2212

*16 macrolides sont produits par 2 ou 3 type d'organisme et sont comptabilités plusieurs fois

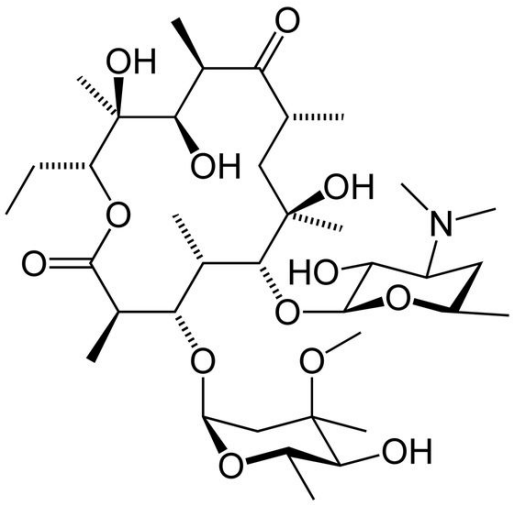


Figure 1-4: Structure chimique de l'érythromycine

1.2.3 Sels et esters dérivés de l'érythromycine

Plusieurs sels et esters de l'érythromycine ont été préparés pour un usage pharmaceutique. Parmi eux existent l'érythromycine stearate (ES), l'érythromycine éthylsuccinate (EESC), la propionly érythromycine (PE), l'érythromycine estolate (EES), l'érythromycine lactobioate (EL), l'érythromycine glucoheptonate (EG), l'eryhromycine ethyl carbonate (EEC) et l'érythromycine acistrate (EASC). Ces sels ont un pouvoir surfactant supérieur à celui de l'érythromycine A.

1.2.4 Mode d'action des antibiotiques macrolides

Les antibiotiques macrolides, en dépit de structures moléculaires différentes, inhibent tous la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 50S des ribosomes 70S des bactéries (le Svedberg, de symbole S, est une unité de mesure du taux de sédimentation).

Les macrolides, dont les molécules dérivées semi-synthétiques telles que la roxithromycine, la clarithromycine, l'azithromycine et la télithromycine exercent généralement une activité

puissante contre la majorité des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus* spp. et *Streptococcus* spp. Leur action est variable en ce qui concerne les bactéries à Gram négatif. En effet, les bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* qui causent des infections opportunistes sont généralement intrinsèquement résistants aux macrolides. Cependant, d'autres bactéries à Gram négatif telles *Hemophilus, Bordetella, Legionella*, *Campylobacter*, *Chlamydia* et *Treponema* spp. sont sensibles aux macrolides. Les antibiotiques tels que les β-lactames et les quinolones sont impuissants contre *Mycoplasmas* spp. alors que les macrolides comme l'érythromycine sont efficaces contre cette bactérie (Nakajima Y. 2002).

Le fait d'avoir une membrane externe en plus de leur membrane plasmique rend les bactéries à Gram négatif moins sensibles aux macrolides que les bactéries à Gram positif (Figure 1-5).

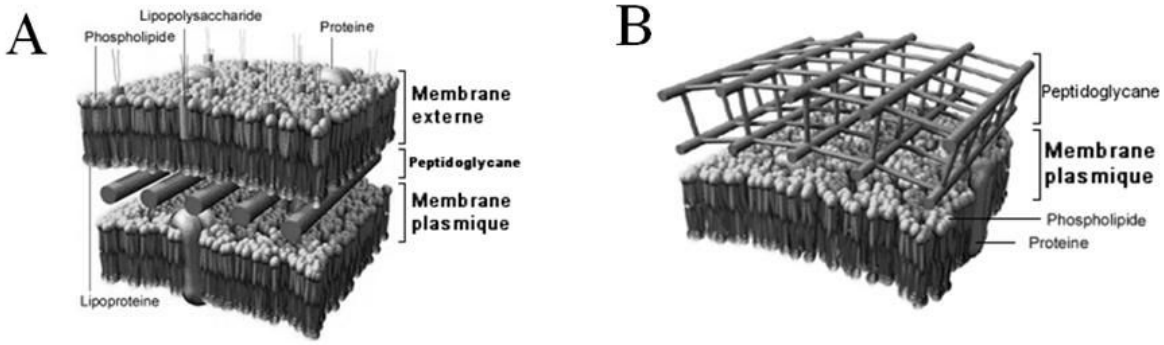


Figure 1-5 : A) structure de la paroi des bactéries à Gram négatif, B) structure des bactéries à Gram positif (Site internet Biotechnologies de l'académie de Bourgogne)

1.3 L'ACTION DES MACROLIDES SUR LE QUORUM SENSING

L'effet des macrolides sur le quorum sensing des boues activées est probable et pourrait expliquer une partie des effets observés par Alighardashi 2009.

1.3.1 Le quorum sensing, généralités.

1.3.1.1 DEFINITION :

Le quorum est le nombre minimum de membres qui doivent être représentés dans une assemblée pour que celle-ci puisse valablement délibérer et prendre une décision (dictionnaire français Hachette). En microbiologie, le quorum sensing est une forme de communication entre bactéries basée sur l'utilisation de molécules induisant un signal qui permet aux

bactéries de coordonner leur comportement. L'accumulation de molécules du signal dans l'environnement permet à une cellule unique de percevoir la densité cellulaire qui l'entoure.

1.3.1.2 ROLE DU QUORUM SENSING :

Les réponses comportementales comprennent l'adaptation à la disponibilité des nutriments, la défense contre d'autres microorganismes qui peuvent rentrer en compétition pour les mêmes nutriments, et l'évitement de composés toxiques potentiellement dangereux pour les bactéries. Le quorum sensing est très important pour des bactéries pathogènes pendant l'infection d'un hôte afin de coordonner leur virulence et d'échapper à sa réponse immunitaire pour établir une infection réussie (FAO et OMS 2004).

1.3.1.3 FONCTIONNEMENT BIOCHIMIQUE DU QUORUM SENSING :

Pour les bactéries à Gram-négatif, le signal se fait par les acylhomosérines lactones (AHLs). Pour les bactéries à Gram-positif, le signal passe principalement par de petits peptides (Miller et Bassler 2001).

1.3.1.4 LES REPONSES AU QUORUM SENSING:

- Le quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* :

P. aeruginosa est une espèce qui possède une résistance naturelle aux antibiotiques incluant les macrolides. Pour cette espèce, le quorum sensing avec l'acyl-homoserine lactone est nécessaire pour le développement normal du biofilm et de la virulence (Parsek M. R. et Greenber P. 2000). Les gènes régulés par le quorum sensing contribuent également au maintien du biofilm et à sa résistance face aux antibiotiques, aux détergents, et au système immunitaire de l'hôte (Hentzer et al. 2003, Rasmussen et Givskov 2006)

- Le quorum sensing chez *Vibrio cholerae*:

Selon Zhu and Mekalanos 2003, le quorum sensing permettrait à *Vibrio cholerae*, la bactérie responsable du choléra, de sortir du biofilm lors de son arrivée dans l'intestin en inhibant la synthèse de polysaccharide après le passage de la barrière acide que constitue l'estomac.

- Le quorum sensing dans les boues activées:

Dans le cas de boues activées urbaines, des souches appartenant aux genres *Aeromonas* et *Pseudomonas* produisant des auto-inducteurs semblables aux AHL ont été isolées par Morgan-Sagastume (2005). Les auteurs pensent que le quorum sensing est omniprésent dans

les boues activées. Ils suspectent les antibiotiques et hormones d'inhiber le quorum sensing dans les stations d'épuration des hôpitaux. Valle et al. (2004) ont montré que les N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) ont une action sur les dynamiques des communautés microbiennes dans les flocs de boues activées.

1.3.2 L'inhibition du quorum sensing par les macrolides

1.3.2.1 L'EFFET DES MACROLIDES SUR LE QUORUM SENSING DES BACTERIES PATHOGENES

Les macrolides ayant un noyau lactone contenant 14 atomes de carbone inhibent le quorum sensing chez plusieurs espèces bactériennes à Gram-négatif. Cela peut s'expliquer par la ressemblance des structures chimiques : les molécules du signal chez les bactéries Gram-négatif contiennent elles aussi un noyau lactone (Figure 1-6). Toutefois, les macrolides dont le noyau lactone contient 16 atomes n'auraient pas cette capacité d'inhibition (Yanagihara et al. 2002)).

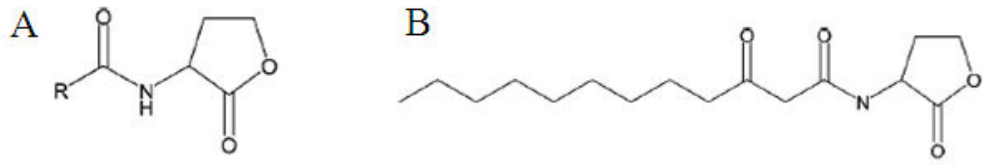


Figure 1-6 : (A) Structures moléculaires des deux molécules connues servant de signal produites par P. aeruginosa, BHL ([N-butyryl]-L-homoserine lactone), et (B) OdDHL N-[3-oxo-dodecanoyl]-L-homoserine lactone) (d'après Rasmussen et Givskov 2006)

Des études ont montré que grâce à l'inhibition du quorum sensing provoqué par les macrolides le développement de biofilm par des bactéries pathogènes est limité. De plus, le biofilm est moins résistant aux antibiotiques (Figure 1-7 et Figure 1-8).

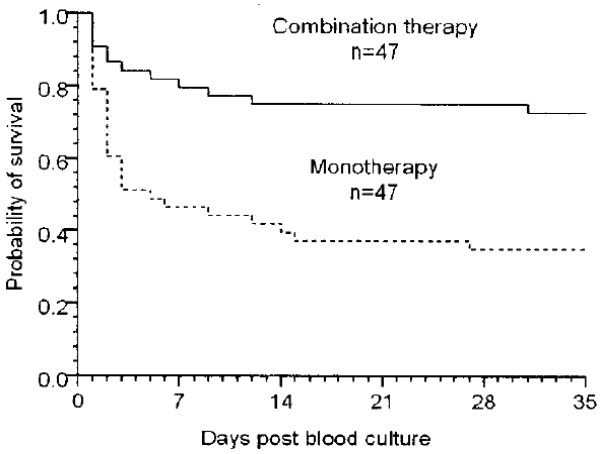


Figure 1-7 : graphique de survie réalisé à partir de données cliniques pour 94 patients atteints à un niveau critique par ***Streptococcus pneumoniae.*** La prescription d'un macrolide en supplément à un autre antibiotique augmente sensiblement la probabilité de survie (Baddour et al. 2004).

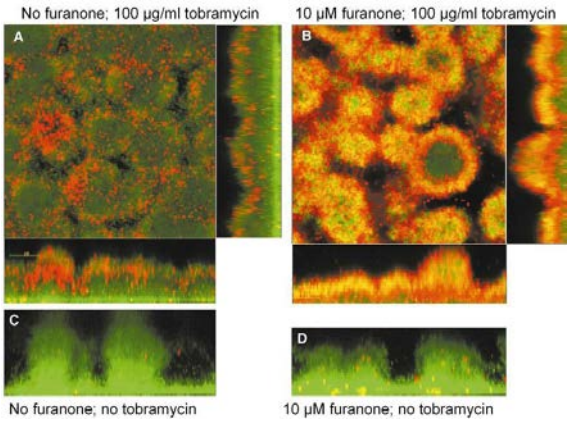


Figure 1-8 : sensibilité du biofilm de ***P. aeruginosa*** à l'antibiotique tobramycine en l'absence et en présence de furanone, un inhibiteur de quorum sensing. Images obtenues par microscopie confocale en utilisant le kit LIVE/DEAD BacLight Viability Kit. Les cellules qui apparaissent en rouge sont considérées comme mourantes (Hentzer et al. 2003).

Fabre-Bonté et al. (2003) ont montré que la 3-oxo-C12-HSL et la C4-HSL sont nécessaires pour la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* et qu'en présence d'azithromycine, leur sécrétion est inhibée ce qui a pour conséquence une production moindre de polysaccharides. Les auteurs suggèrent que l'azithromycine aurait également un rôle sur l'architecture du biofilm, le rendant plus perméable.

Outre leur rôle classique d'antibiotique et leur rôle sur le quorum sensing bactérien, les médecins peuvent prescrire les macrolides pour leur action immunorégulatrice (Giamarellos-Bourboulis E. J. 2008)

1.3.2.2 L'EFFET PROBABLE DE L'ERYTHROMYCINE SUR LE QUORUM SENSING DES BOUES ACTIVEES.

En extrapolant les effets connus du quorum sensing, on peut supposer que dans un floc bactérien de boues activées le quorum sensing a un effet sur :

- la floculation des bactéries et la sortie des bactéries du floc
- le métabolisme nutritionnel des bactéries

- la sécrétion d'exopolysaccharides et leur structure spatiale (porosité)
- des organismes externes en relation avec le floc

1.4 LES STATIONS D'EPURATION A BOUES ACTIVEES

1.4.1 Principe de fonctionnement

Les stations d'épuration urbaines sont situées en aval des villes de sorte que l'eau usée leur arrive par gravité. Au niveau de la station d'épuration, un relevage de l'eau usée est généralement effectué par une vis sans fin. Ainsi par la suite du procédé l'eau peut s'écouler grâce à la force de gravité. Le traitement primaire consiste en l'épuration de l'eau par des procédés physico-chimiques. Un dégrillage élimine les déchets solides de grandes dimensions. Le dégrillage est suivi par un dessablage qui élimine les sables par décantation. Ensuite vient un déshuilage qui élimine les corps gras par flottation (raclage de surface d'un bassin aéré). Les stations d'épuration récentes ne possèdent en général pas de décanteur primaire pour éviter la gestion de boues primaires. Le traitement secondaire, de nature biologique est réalisé grâce aux bactéries qui réalisent la dégradation des matières organiques, la nitrification et la dénitrification. En général, le carbone est le polluant présent en plus faible proportion comparé aux besoins des bactéries. Il convient donc de limiter sa consommation pour que les autres polluants soient eux aussi dégradés. C'est pour cela que le bassin anoxique où s'effectue la dénitrification est placé en amont du bassin aéré où s'effectue la nitrification. L'inconvénient de ce système est la nécessité de recirculer la liqueur mixte depuis le bassin aéré vers le bassin anoxique. Les boues sont séparées de l'eau épurée par décantation et recirculées en tête de station afin de poursuivre le traitement. L'eau épurée peut éventuellement subir des traitements complémentaires (traitements tertiaires) avant rejet dans les milieux aquatiques naturels (Figure 1-9).

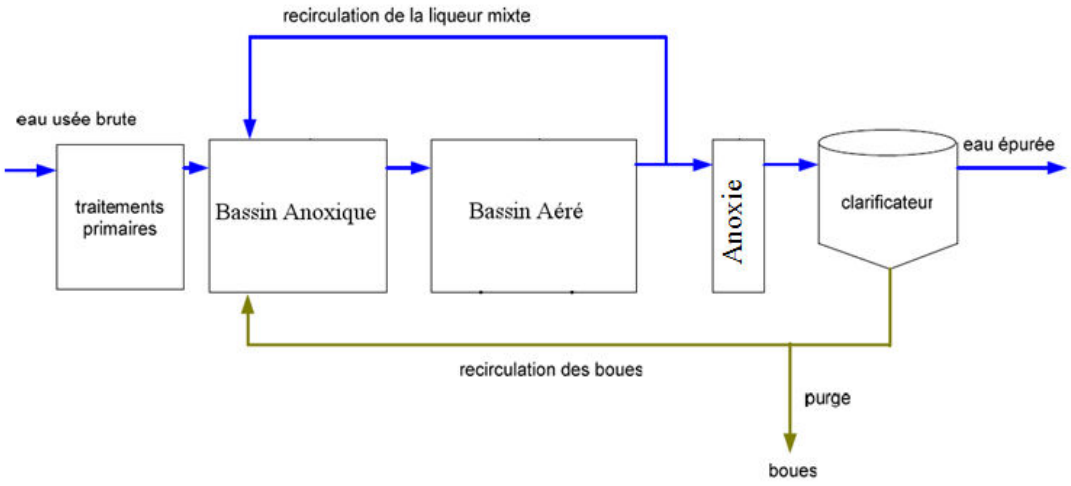


Figure 1-9 : représentation simplifiée d'un système de traitement des eaux usées

Il faut noter qu'il existe plusieurs possibilités de configuration des réacteurs. Certains réacteurs ont une hydrodynamique proche du réacteur parfaitement agité, d'autres sont plutôt de type piston et ont par conséquence de meilleures cinétiques d'abattement de la pollution. Enfin, dans certains réacteurs l'alimentation en eau usée est étagée pour mieux répartir les besoins en oxygène. On peut supposer que l'effet d'un toxique peut être très différent selon le type de réacteur. Par exemple, dans le cas d'une arrivée ponctuelle d'une forte concentration d'un toxique, on peut supposer que le réacteur parfaitement agité pourrait faire passer la concentration du toxique en dessous du seuil de toxicité.

Ce qui caractérise une station d'épuration par rapport à un autre procédé industriel est l'absence de contrôle possible des entrées. En effet, la station d'épuration va subir au cours d'une journée des variations de la charge hydraulique et de la charge polluante. Il faut distinguer ces deux types de variation car la dilution de la charge polluante varie au cours de la journée. Classiquement, les stations d'épuration des eaux résiduaires urbaines ont deux pics de pollution journaliers à épurer. L'un survient le matin en général vers 8 heures, l'autre vers 18 heures. Les pics peuvent être plus ou moins prononcés et décalés dans le temps en fonction de la longueur du réseau d'assainissement. En plus de ces variations au cours de la journée, se superposent les variations dues au climat et notamment aux précipitations.

Le modèle ASM1 (Activated Sludge Model n°1) est issu d'un groupe de travail de l'IWA (International Water Association). C'est un modèle qui décrit les cinétiques d'abattement de la pollution et l'évolution de la population bactérienne. La Figure 1-10 présente les processus

et les variables du modèle ASM1. Le modèle BSM1 (Benchmark Simulation Model n°1), dont les cinétiques des réactions sont basées sur le modèle ASM1 rend possible l'évaluation de la performance de différentes stratégies de commande grâce à des simulations à l'échelle de la station d'épuration.

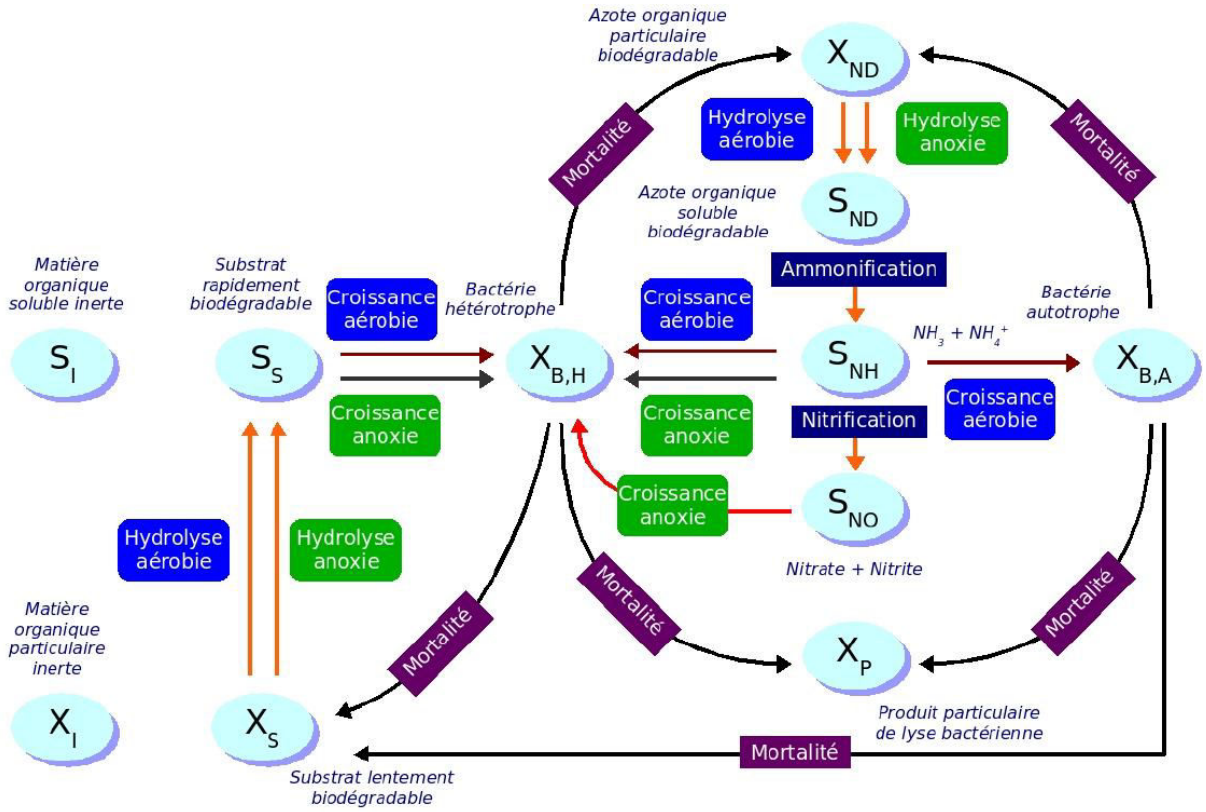


Figure 1-10 : Schéma conceptuel du modèle ASM1 (d'après Chachuat et al., 2001).

1.4.2 Le floc bactérien de boues activées

Dans les stations d'épuration à boues activées, les bactéries qui effectuent l'épuration sont majoritairement regroupées sous forme de flocs. Les bactéries filamenteuses jouent un rôle important dans la structure des flocs dont elles constituent le « squelette ». Les bactéries nitrifiantes, bien que présentes en minorités jouent un rôle essentiel puisqu'elles assurent l'oxydation de l'azote ammoniacal. Enfin, les exopolymères secrétés par les bactéries jouent aussi un rôle dans la structuration des flocs, et leurs propriétés physico-chimiques.

1.4.2.1 BACTERIES FILAMENTEUSES

Il existe environ 30 organismes filamenteux qui contribuent aux problèmes de décantation en raison de leur croissance rapide et non désirée. Parmi ces organismes filamenteux, 10

bactéries sont responsables de la plupart des épisodes de bulking. Bien que plus connues pour les problèmes opérationnels qu'elles causent, des bactéries filamenteuses contribuent à la dégradation de la Demande Biologique en Oxygène (DBO) soluble et à la formation et structuration des flocs. Les bactéries filamenteuses les plus fréquentes sont *Haliscomenobacter hydrossis*, *Microthrix parvicella*, Nocardioforms, *Sphaerotilus natans*, *Thiothrix*, type 0041, type 0092, type 0675, type 1701 et type 021N. Parmi les bactéries filamenteuses *Haliscomenobacter* et *hydrossis* sont des bactéries Gram-négatives qui sont entourées d'une gaine translucide. Cette gaine pourrait les protéger contre les antibiotiques. Lorsque les bactéries quittent leur gaine elles peuvent se déplacer grâce à leur flagelle et peuvent former ailleurs une autre chaîne filamenteuse (Gerardi 2006).

1.4.2.2 BACTERIES NITRIFIANTES

La nitrification, l'oxydation aérobie de l'ammonium en nitrite puis nitrate, est catalysée par deux groupes différents de bactéries autotrophes à croissance lente : les bactéries oxydant l'ammonium et les bactéries oxydant les nitrites. La nitrification est le « talon d'Achille » des stations d'épuration (Da Silva 2008). Bien que les livres classiques rapportent usuellement que *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter* sont les deux espèces nitrifiantes, des recherches plus récentes ont montré que de nombreuses espèces contribuent à la nitrification dont beaucoup ne sont pas cultivables (Wagner et Loy 2002).

1.4.2.3 LES EXOPOLYMERES (EPS)

Les EPS sont les sécrétions de haut poids moléculaire provenant des microorganismes auxquels s'ajoutent les résidus de lyse cellulaire et d'hydrolyse de macromolécule. De plus des matières organiques peuvent s'adsorber sur les EPS. Les hydrates de carbone et les protéines sont généralement les substances majoritaires dans les ESP. Les acides humiques peuvent aussi être des composants importants. De plus on retrouve également des lipides et des acides nucléiques dans les EPS (D'Abzac et al., 2010). La composition, le pourcentage en masse par rapport aux bactéries et la répartition spatiale des EPS est variable (Wingender et al., 1999).

1.4.2.4 STRUCTURE DES FLOCS

Le diamètre moyen des flocs varie de quelques micromètres jusqu'à 1 mm en fonction des conditions opératoires notamment des conditions de substrat et les forces de cisaillement. Lorsqu'une boue est alimentée par un substrat synthétique elle peut perdre complètement sa morphologie originelle. On peut notamment obtenir des granules qui font plusieurs

millimètres de diamètre (Li et al. 2006). Au contraire, les forces de cisaillement conduisent à casser les flocs de gros diamètre. En laboratoire, il est possible de diminuer la taille des flocs en mixant la liqueur mixte (Henriques et Love 2007). Dans une boue tous les flocs n'ont pas le même diamètre, on peut donc caractériser une boue par la distribution de ses flocs en fonction de leur diamètre. Par exemple Henriques et Love (2007) ont montré qu'il y a une relation entre cette distribution et sensibilité des boues à un toxique. Cependant, pour un même diamètre externe des objets peuvent avoir des propriétés très différentes en ce qui concerne la diffusion. Aussi l'analyse d'images permet de calculer des indices de concavité et de robustesse (Pons et al. 1999) qui peuvent être utiles pour caractériser la facilité qu'aura un toxique à atteindre le centre d'un floc. La microscopie confocale a permis de considérables progrès dans la compréhension de la structure des flocs bactériens de boues activées. Elle a permis de confirmer que les flocs ont une structure fractale avec différents niveaux de structuration (Chu et Lee 2004a). Les images de microscopie confocale peuvent servir de base pour le calcul des phénomènes des transferts de matière. Ces transferts s'effectuent par convection et par diffusion à l'intérieur des larges pores et par diffusion à travers les matrices biologiques des flocs (Chu et al. 2005, Chu et Lee 2004b).

1.5 LES STATIONS D'EPURATION FACE AUX ANTIBIOTIQUES

1.5.1 L'élimination des antibiotiques dans les stations d'épuration.

1.5.1.1 L'ELIMINATION PAR BIODEGRADATION

Du fait de l'imprécision des mesures, du coût

des analyses, de la difficulté de faire un bilan de matières sur une station d'épuration et de la variabilité des effluents et des boues, l'efficacité des stations d'épuration pour éliminer les antibiotiques est encore mal connue. De plus, les rendements et les voies d'élimination varient en fonction des molécules. En effet, même si la biodégradation semble être le phénomène majeur pour la plupart des antibiotiques (Le-Minh 2010) pour d'autres c'est l'adsorption sur les boues qui est la cause principale de la diminution de leur concentration dans l'eau (Joss et al. 2006). Des mesures en laboratoire ont montré qu'une réaction de pseudo ordre 1 décrit la biodégradation des antibiotiques :

$$dC/dt = kbio \times Xss \times S, \qquad (1)$$

avec C la concentration totale d'antibiotique, (µg/L), S la concentration d'antibiotique en solution (µg/L) (antibiotique non adsorbé), t le temps (jours), kbio la constante de vitesse de la réaction ($Lg_{ss}^{-1}J^{-1}$), et Xss la concentration en matière en suspension (g/L). La vitesse d'une réaction d'ordre 1 ne dépend que de la concentration du composé en question. On dit ici qu'il s'agit d'une réaction de « pseudo » ordre 1 car la concentration de boues activées Xss intervient.

1.5.1.2 ELIMINATION DE L'EAU PAR SORPTION SUR LES BOUES

On peut définir le coefficient de sorption kd dans un réacteur :

$$kd = \frac{X}{Xss \times S} \qquad (2)$$

Avec Kd le coefficient de sorption sur les boues activées (L/gss), X la concentration du composé adsorbé exprimée en unité de volume du réacteur (µg/L)

1.5.1.3 BILAN GLOBAL :

$$C = S + X = S(1 + kd \times Xss) \qquad (3)$$

On suppose que la vitesse de biodégradation est lente par rapport à la vitesse de sorption. On peut donc considérer qu'il y a un équilibre entre antibiotique adsorbé et antibiotique en solution. En substituant l'équation (2) et l'équation (3) dans l'équation (1), la décroissance de la concentration de l'antibiotique en solution peut être exprimée :

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-kbio}{1+kd \times Xss} \times Xss \times S \qquad (4)$$

Le Tableau 1-2 présente des valeurs du coefficient de sorption kd et de constante de vitesse K_{bio} pour différents antibiotiques.

Tableau 1-2 : présentation des constantes de vitesse de biodégradation Kbio et d'adsorption Kd pour différents antibiotiques.

Antibiotique	Famille	Kd (L/g_{ss})	Kbio($Lg_{ss}^{-1}d^{-1}$) Station Boues Activées (réelle)	Kbio (Lgss-1d-1) bio-réacteur à membrane (pilote de laboratoire)	source
Azithromycine	Macrolide	0,38 ± 0.09	≤ 0,13	≤ 1,5	Göbel et al. (2005)
Clarithromycin	Macrolide	0.26 ± 0.095	≤ 0,5	≤ 2	Göbel et al. (2005)
(Anhydro-) érythromycine	Macrolide	0.165	≤ 0,12	≤ 1,1	Jones et al. (2002)
Roxithromycine	Macrolide	n.a.	≤ 0,2	≤ 0,3	Joss et al. (2006)
N^4-acetyl-sulfamethoxazole	Sulfamide	n.a.	5,9-7,6	≤ 3,2-5,0	Göbel et al. (2005)

Il faut noter que les constantes de vitesse de biodégradation pour les antibiotiques sont très faibles comparées aux autres micropolluants organiques. La constante de vitesse pour la biodégradation des œstrogènes est environ 10000 fois supérieure à celle des antibiotiques (Figure 1-11). Un lien entre toxicité des molécules et biodégradabilité est une des hypothèses explicatives.

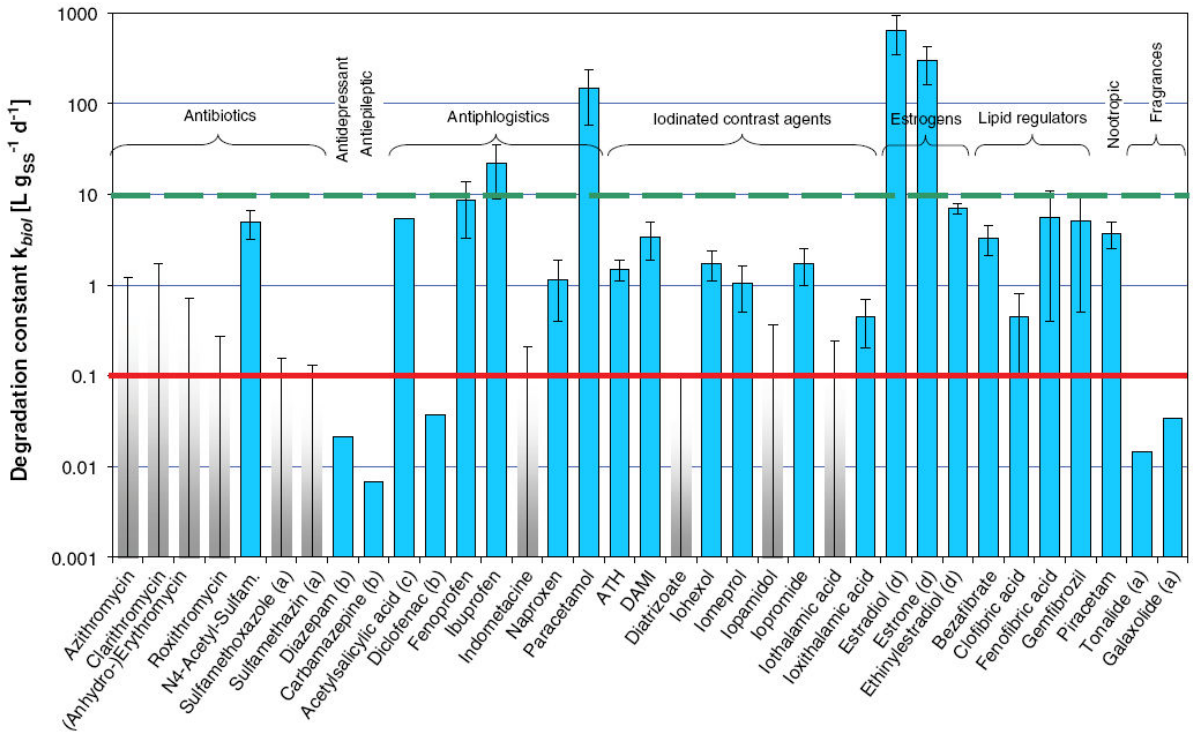


Figure 1-11 : constante de vitesse de dégradation k_{bio} pour 35 produits pharmaceutiques, hormones ou produits à usage personnel. La valeur indiquée est une valeur moyenne entre des mesures réalisées dans une station d'épuration urbaine à boues activées et des expériences avec un réacteur pilote à membrane. Les lignes k_{bio} = 0,1 et k_{bio} =10 $Lg_{ss}^{-1}d^{-1}$ indiquent les limites attendues de moins de 20% et plus de 90% d'élimination dans une station d'épuration à boues activées urbaine. Les colonnes en grisé indiquent les valeurs pour lesquelles la précision des données expérimentales permettent seulement de calculer la limite supérieure de k_{bio}. (Joss et al. 2006, McArdell et al., 2005, Umweltbundesamt, 2003, Ternes 2000, Joss et al., 2004)

Nous avons vu que la vitesse d'élimination dépend de la concentration des antibiotiques. Ceci est un paramètre qui joue en faveur d'un traitement des antibiotiques proche des sources ponctuelles où les concentrations d'antibiotiques sont élevées (industries, hôpitaux). Cela implique aussi que la configuration du réacteur a une importance, les réacteurs type piston seraient plus efficaces que les réacteurs type parfaitement agités.

Cependant les bactéries disposent de différentes voies métaboliques pour leur approvisionnement en nutriments. Ces voies sont régulées. Or, Drilla et al. (2005) ont montré

que la vitesse de dégradation du sulfaméthoxazole dépend du substrat disponible par les bactéries. En absence de source d'azote, la molécule de sulfaméthoxazole qui contient trois atomes d'azote est dégradée pratiquement aussi rapidement que l'acétate (source de carbone). En revanche, en présence d'une source d'azote (l'ammonium) le sulfaméthoxazole n'est plus dégradé. Cette étude montre que les vitesses de réactions dépendent de nombreux paramètres (et non uniquement de la concentration d'antibiotique) et donc l'importance de la compréhension des mécanismes avant de pouvoir modéliser la biodégradation des antibiotiques.

1.5.2 Inhibition des bactéries autotrophes et des bactéries nitrifiantes

D'après Da Silva (2008), le risque pour les stations d'épuration urbaines de dépassement des normes de rejet lié aux variations de la composition des effluents est plus grand en ce qui concerne les matières azotées que la DCO. La nitrification peut donc être considérée comme un point à particulièrement surveiller dans le procédé d'épuration à boues activées. La différence entre la vitesse de croissance et la vitesse de mortalité est plus faible pour les bactéries nitrifiantes que pour les bactéries hétérotrophes (Tableau 1-3). Ainsi, pour une même mortalité entre bactéries nitrifiantes et bactéries hétérotrophes causée par un toxique à un instant t, la nitrification serait affectée plus longtemps. Même un niveau d'inhibition limité durant plusieurs semaines peut causer l'arrêt total de la nitrification (Henze et al. 1997). Henze et al. (1997) affirment que la croyance selon laquelle les bactéries nitrifiantes sont plus sensibles que les bactéries hétérotrophes est erronée. Cependant, les données de bio-toxicité rapportées par Eckenfelder (1992) montrent que pour 55 des 61 molécules organiques toxiques testées, il faut une concentration supérieure pour inhiber 50% des bactéries hétérotrophes que la concentration nécessaire pour inhiber 50% des bactéries nitrifiantes (Figure 1-12).

Tableau 1-3: Comparaison des vitesses de croissance et de mortalité des bactéries nitrifiantes et des bactéries hétérothrophes en l'absence de toxique.

	Symbole	Unité	Valeur	μ_{max}-b
Taux de croissance maximal des hétérotrophes	μ_{max}	J^{-1}	4-8	3,8-7,9
Constante de mortalité des hétérothrophes	b	J^{-1}	0,1-0.2	
Taux de croissance maximal des autotrophes	μ_{maxa}	J^{-1}	0,6-0,8	0,54-0,77
Constante de mortalité des autotrophes	ba	J^{-1}	0,03-0,06	

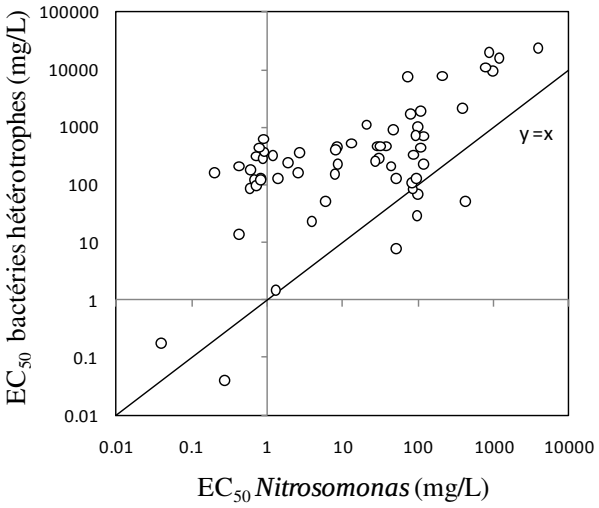


Figure 1-12 : Comparaison entre la concentration efficace 50 (EC_{50}) des bactéries hétérotrophes et celles du genre ***Nitrosomonas*** (nitrifiantes). Chaque point correspond à une molécule toxique Eckenfelder (1992).

Parmi les molécules organiques les plus toxiques pour les bactéries à faible concentration, on retrouve de nombreux composés à cycle aromatique benzénique. La présence de fonctions amine ou d'atomes de chlore augmente généralement la toxicité de ces molécules et diminue leur biodégradabilité (Tableau 1-4, Henze 1997).

Tableau 1-4 : vitesse maximale de biodégradation et valeur de l'EC50 (concentration à laquelle la respiration est diminuée de moitié par rapport à un réacteur témoin) pour le phénol, le 4-chlorophenol et le 2-aminophenol (Henze 1997)

Composé	Vitesse de Biodégradation (mg COD/gVSS-h)	EC_{50} (mg/L)	
		Nitrosomonas	Hétérothrophes
phénol	80	21	1100
4-chlorophenol	40	0.73	98
2-aminophenol	21	0.27	0.04

1.5.3 Modélisation d'un effet toxique

Les effets de la présence de micropolluants toxiques sont généralement modélisés en modifiant les vitesses de réactions catalysées par des enzymes. Ces mécanismes décrits par Michaelis-Menten peuvent être modifiés en ajoutant deux étapes décrivant l'effet de l'inhibiteur à l'état soluble (S_{inh}) (Pons 2009). L'équation générale du modèle ASM1

$r_X = \frac{\mu SX}{(K_S+S)}$ peut être remplacée par :

$$r_x = \frac{\mu SX}{\left(1+\frac{[S_{inh}]}{K_{I1}}\right)K_s+\left(1+\frac{[S_{inh}]}{K_{I2}}\right)S} \qquad (1)$$

On peut voir dans l'équation (1) que la vitesse est influencée par le ratio $\frac{[S_{inh}]}{K_I}$. Un autre effet du micropolluant toxique peut être une augmentation de la vitesse de mortalité ( ). Cette vitesse généralement exprimée comme suit : $r_d = -bX$ devient :

$$r_d = -bX(1 + \frac{[S_{inh}]}{K_{I1}})^{\alpha}(1 + \frac{[S_{inh}]}{K_{I1}})^{\beta} \qquad (2)$$

Les paramètres α et β permettent d'équilibrer l'effet de l'inhibiteur entre inhibition de la croissance et augmentation de la vitesse de mortalité.

Une limitation de ces équations est de ne pas prendre en compte les phénomènes de transfert. En effet, il est considéré ici que l'ensemble des bactéries sont exposées à la même concentration qui est celle de l'antibiotique soluble dans le réacteur. Or, la structure complexe des flocs bactériens génère des gradients de concentrations. Il conviendrait donc d'étudier la diffusion des antibiotiques à travers les flocs bactériens. De plus, on peut supposer que dans les boues activées certaines populations sont plus sensibles que d'autres à un antibiotique. Par exemple, les bactéries à Gram positif sont supposées être plus sensibles à l'érythromycine que les bactéries à Gram négatif et cela n'est pas pris en compte dans la modélisation présentée ci-avant. Il serait donc intéressant d'étudier la différence de mortalité entre les bactéries en fonction de leur position dans les flocs et en fonction de leur type Gram et voir si cette différence est suffisante pour nécessiter d'être prise en compte dans la modélisation.

1.5.4 L'inhibition des procédés par les antibiotiques

1.5.4.1 INHIBITION DU PROCEDE D'EPURATION A BOUES ACTIVEES

L'inhibition du procédé d'épuration à boues activées par les antibiotiques a été peu étudiée. De plus, dans la majorité des études, des eaux usées synthétiques ont été utilisées. On peut s'interroger sur la représentativité de ces études puisque seul 1 à 15% des bactéries présentes dans les boues activées sont cultivables (Wagner et al. 1993). Cependant, du fait de la non conservation de l'eau usée et des volumes nécessaires pour alimenter un réacteur continu, des études avec un substrat synthétique peuvent être justifiées. Campos et al. (2001) ont étudié l'effet du chloramphenicol et de l'oxytetracycline sur l'activité bactérienne dont la nitrification dans un réacteur mixte biofilm et bactéries en suspension. Le chloramphenicol (10-250 mg/L) n'a pas eu d'effet sur la nitrification et sur la stabilité du biofilm. L'oxytetracyline a causé des détachements dans le biofilm pour une concentration de 10 mg/L mais la nitrification n'a commencé à être inhibée que pour des concentrations supérieures à 100 mg/L. Une concentration de 250 mg/L a provoqué une inhibition de la nitrification de 50%. De plus, les mesures de carbone organique total ont montré que les antibiotiques n'ont été ni dégradés ni accumulés dans le réacteur. Pourtant, l'effluent ne contenait plus d'antibiotique actif, ce qui laisse supposer que les antibiotiques étaient seulement partiellement dégradés par la biomasse. Halling-Sørensen (2001) a montré que les antibiotiques pouvaient être toxiques pour les boues activées, notamment ceux à large spectre. Cependant, l'auteur rapporte que la tylosine, antibiotique de la classe des macrolides, a augmenté la vitesse de nitrification. Alighardashi (2009) a montré que l'érythromycine inhibe l'ammonification, la nitritation et la nitratation pour une concentration supérieure à 20 mg/L pour la station d'épuration de Nancy (Figure 1-13). De plus, son étude montre que l'érythromycine agit également sur les bactéries hétérotrophes dont les bactéries filamenteuses ce qui cause le morcellement des flocs et la diminution de leur surface ainsi que la rupture des filaments (Figure 1-14). Les résidus des bactéries ont causé l'augmentation de l'azote organique et de la DCO soluble.

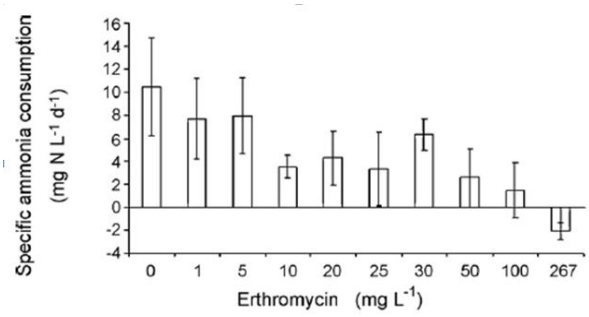


Figure 1-13 : vitesse spécifique de disparition de l'ammonium en réacteur batch en fonction de la concentration d'érythromycine (boues Nancy) (Alighardashi (2009)).

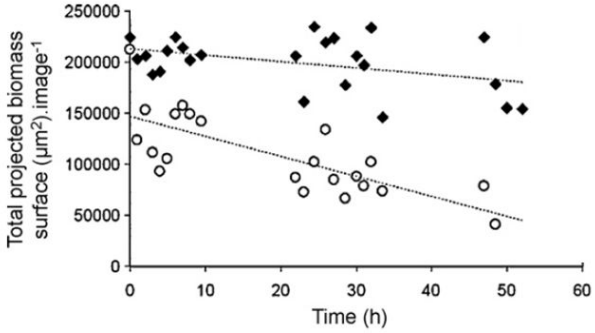


Figure 1-14 : évolution de la surface de la biomasse observée au microscope à champ clair en fonction du temps dans un réacteur batch témoin (♦) et un réacteur contenant 20 mg/L d'érythromycine (○) (Alighardashi (2009)).

1.5.4.2 INHIBITION D'AUTRES PROCEDES D'EPURATION

- Le procédé « anammox »

D'après Jetten et al. (2001), le procédé « anammox » est basé sur la réaction :

$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2\,H_2O$. Fernandez et al. (2009), ont montré que le chloramphenicol et la tétracycline pouvaient inhiber ce procédé. Les auteurs ont montré que les bactéries pouvaient reprendre leur activité suite à une exposition au chloramphenicol (20 mg/L) alors qu'une exposition à la tétracycline (50 mg/L) pouvait conduire à la nécessité de ré-inoculer le réacteur.

- Inhibition de la méthanogénèse

Amin et al. (2006) ont montré qu'une concentration d'1 mg/L d'érythromycine pouvait réduire de 5 % la production de biogaz. L'augmentation de la concentration à 200 mg/L d'érythromycine dans l'influent n'a pas augmenté le niveau d'inhibition de la production de biogaz. Des essais en réacteur batch avec de la biomasse prélevée dans le réacteur après 47 jours d'exposition à l'érythromycine ont montré que la conversion de l'acide butyrique était moins inhibée par l'érythromycine qu'elle ne l'était en début d'expérience. Ces résultats suggèrent que les populations bactériennes sont devenues plus résistantes à l'érythromycine en cours d'expérience. De plus, l'augmentation du niveau de DCO dans l'effluent a été

attribuée d'une part à la non dégradation de l'érythromycine (1 g d'érythromycine correspond à 2.03 g de DCO) et d'autre part à la sécrétion de produits microbiens solubles (Figure 1-15).

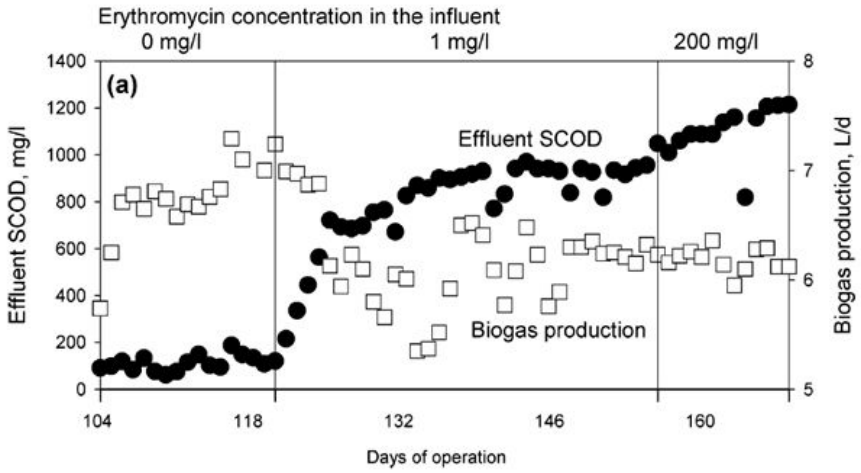


Figure 1-15 : performance d'un réacteur continu anaérobie traitant un effluent synthétique entre les jours 104 et 167. (●) DCO soluble dans l'effluent, (□) production de biogaz. La concentration d'érythromycine dans l'influent est indiquée sur le haut du graphique (d'après Amin et al. 2006).

Shimada et al. (2008), ont montré que la tylosine (1,67 mg/L) (antibiotique de la famille des macrolides) pouvait inhiber la méthanogénèse. Les auteurs indiquent que des études à long terme peuvent conduire à une sous-estimation de l'inhibition due à un antibiotique du fait de l'adaptation de la biomasse. Par contre, les études à court terme pourraient mener à une surestimation de l'inhibition. Ainsi les auteurs conseillent de combiner des études à long terme avec des études à court terme menées dans des réacteurs batch.

1.6 L'IMAGERIE CONFOCALE DE CELLULES VIVANTES

1.6.1 Les limites des mesures globales

Les premières études portant sur la dynamique des populations microbiennes ont été consacrées principalement à des observations de cinétiques globales. On peut par exemple suivre l'évolution de la biomasse par densité optique, par la mesure des matières sèches, en mesurant la consommation d'oxygène ou la dégradation du substrat. Cependant, ces études sont parfois insuffisantes pour prévoir l'évolution d'une population microbienne du fait de l'hétérogénéité au sein même des populations.

En revanche, la microscopie permet de caractériser des sous-populations qui sont importantes pour le fonctionnement des procédés. Par exemple, on peut mesurer l'abondance en bactéries filamenteuses qui peuvent perturber la décantation dans un procédé à boues activées.

1.6.2 L'apport de l'imagerie confocale

La microscopie confocale présente comme avantage par rapport à la microscopie classique de fluorescence de pouvoir imager des échantillons en trois dimensions. Il est dès lors possible de reconstruire leur volume à partir d'une série d'images (plan XY) obtenues à différentes profondeurs (axe Z). Ainsi, grâce à la microscopie confocale, il est possible d'étudier des mécanismes de diffusion et de réaction dans l'espace tridimensionnel et dans le temps.

1.6.3 Principe de la microscopie confocale

Le microscope confocal à balayage laser (CLSM) améliore le microscope à fluorescence classique grâce à l'optimisation du chemin optique en chaque point de l'image. L'image globale est obtenue par balayage de l'ensemble de l'échantillon observé. Les lasers effectuent des balayages dans le plan horizontal et l'échantillon est déplacé dans le sens vertical grâce à une surplatine motorisée pour que l'échantillon puisse être analysé dans l'ensemble de son volume. Le principe en microscopie confocale de fluorescence est d'augmenter au maximum la lumière reçue tout en minimisant l'excitation. Pour cela, des lasers sont utilisés pour l'excitation et des photomultiplicateurs (PMT) comme détecteurs. Les systèmes de microscopie confocale récents incorporent des spectrophotomètres. Il est donc possible d'acquérir des séquences d'images spectrales qui sont ensuite traitées pour séparer les émissions des différents chromophores (Kahn, 2007). La Figure 1-16 présente le trajet optique en microscopie confocale.

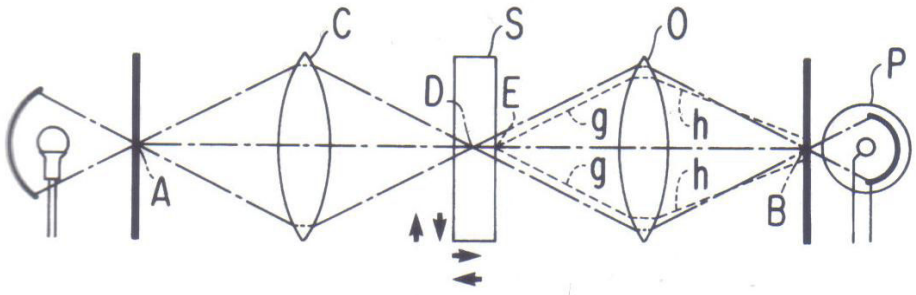


Figure 1-16 : trajet optique pour un microscope confocal simple. La lentille C condense la lumière qui est passée à travers le « pinhole » A et la focalise sur un point D du spécimen à observer. La lentille de l'objectif,O, forme une image de D sur le deuxième « pinhole » (« pinhole de sortie ») qui est confocal avec D et A. Un autre point du spécimen, le point E par exemple ne serait pas dans le focus de A, ainsi son illumination serait moindre. De plus, la plupart de la lumière (g, h) que renvoie E ne

passera pas le pinhole de sortie B. La lumière provenant de E qui rejoint le phototube, P, est donc faible en comparaison de celle en provenance du point confocal D. De cette manière la résolution du microscope est améliorée. Pendant que le spécimen est scanné le phototube reçoit la lumière provenant des points D_1, D_2, D_3, etc. (non montrés sur la figure). Les points D_1, D_2, D_3, etc., peuvent se situer sur le même plan focal comme en microscopie conventionnelle, ou perpendiculairement, ce qui permet d'obtenir des séries d'images dans le plan xy à différentes profondeurs z (mouvement de la surplatine, flèches de la figure) (d'après Minsky 1957).

1.6.4 Vue d'ensemble des différentes techniques en microscopie de confocale

D'après Pawel (2006)

- Imagerie à plusieurs canaux dans le temps (*Multi-channel time-Lapse Fluorescence Imaging*)

Il existe un grand nombre de sondes ayant des caractéristiques spectrales différentes et qui peuvent être utilisées simultanément pour visualiser la distribution relative de différents composants de cellules ou de tissus. Les progrès technologiques ont permis d'améliorer la mesure de plusieurs canaux de fluorescence (en mode simultané ou séquentiel) en maximisant la collecte du signal et en séparant les signaux qui se recouvrent partiellement. De plus, l'imagerie à plusieurs canaux peut être menée en utilisant une seule sonde dont les propriétés spectrales (absorption ou émission) changent en fonction des conditions ioniques et permettent de créer des images ratiométriques. C'est le cas de la sonde Indo-1 qui peut être utilisée comme indicateur physiologique de la concentration en Ca^{2+}.

- Imagerie spectrale et déconvolution spectrale (*linear unmixing*)

De plus en plus d'études portent sur l'incorporation de plusieurs sondes fluorescentes à l'intérieur de cellules ou de tissus pour définir la distribution spatiale de plusieurs structures marquées ou d'espèces moléculaires. De telles expériences en mode multi-couleurs ou multi-spectral requièrent une séparation précise de la fluorescence émise. Le principe de l'imagerie spectrale est de mettre en place des filtres passebande, pour encadrer les spectres d'émission de chacun des chromophores avant qu'ils soient détectés au niveau des PMT pour former les images correspondantes. Cela devient plus difficile lorsque les spectres d'émission se chevauchent. Cependant, en se basant sur le spectre de chaque sonde, des méthodes mathématiques permettent de séparer le signal et de localiser des fluorophores dont le spectre d'émission se chevauche en grande partie.

- Retour de fluorescence après photo-blanchiment (Fluorescence recovery after photobleaching (Frap))

Le retour de fluorescence après photo-blanchiment est une technique pour caractériser la diffusion de molécules marquées par des sondes fluorescentes. Typiquement, un point ou une ligne fortement éclairée sont utilisés pour blanchir une partie d'une cellule fluorescente et le retour du signal de fluorescence dans la zone blanchie est mesuré au cours du temps (généralement pendant quelques secondes ou quelques minutes). Cette technique peut donc donner des informations sur le coefficient de diffusion.

- Perte de fluorescence après blanchiment (Fluorescence loss in photobleaching)

Cette technique est l'utilisation répétée du photo-blanchiment dans le but de blanchir tous les fluorophores dans un compartiment cellulaire. Ainsi la perte de fluorescence peut être utilisée pour étudier la continuité d'une membrane ou pour définir les propriétés de la diffusion en surface et à l'intérieur du compartiment.

- Transfert d'énergie par résonance de la fluorescence (*Fluorescence resonance energy transfer (Fret))*

Le Transfert d'énergie par résonance de la fluorescence (FRET) est une technique utilisée pour définir les interactions entre deux espèces moléculaires marquées par différents fluorophores. Elle tire avantage du fait que l'énergie émise par un « donneur » fluorescent est absorbée par un fluorophore « accepteur » lorsque ces fluorophores sont proches l'un de l'autre (quelques nm).

- Temps de vie de fluorescence (Fluorescence lifetime imaging (FLIM))

Chaque sonde fluorescente a un « temps de vie » de fluorescence caractéristique dans son état excité (généralement compris entre 1 et 20 ns). La mesure de ce temps de vie peut être utilisée pour distinguer différentes sondes dans un échantillon marqué.

- Combinaison d'images de florescence avec des images acquise par d'autres modalités.

Il est parfois avantageux de combiner les images acquises par détection de la fluorescence avec des images acquises par d'autres modalités (lumière transmise, contraste de phase).

1.6.5 L'étude de la viabilité

La caractérisation de la viabilité bactérienne est cruciale dans un large spectre de disciplines dont la médecine, les biotechnologies, le contrôle sanitaire, les productions agroalimentaires et les études environnementales. Classiquement la viabilité bactérienne est déterminée par une série de dilutions de l'échantillon à tester suivie d'une mise en culture en boîtes de Petri et comptage du nombre de bactéries formées. Ceci implique un délai compris généralement entre 24h et 5 jours. Un tel délai peut être problématique notamment dans les secteurs liés à la santé. Un autre défaut de cette technique est de ne pas pouvoir donner d'information sur la distribution spatiale de la localisation des bactéries mortes et vivantes. Enfin, cette technique n'est utilisable que lorsque les bactéries étudiées sont cultivables en milieux de culture synthétique. Cela n'est pas le cas pour la grande majorité des bactéries environnementales des stations d'épuration à boues activées. En effet, seulement de 1 à 15% des bactéries des boues activées sont cultivables (Wagner et al. 1993). Cela a fait émerger la notion de « big plate count anomally » dans les années 1990 (Amann et al.1995).

Le kit fluorescent de viabilité BacLight^{TM} est largement utilisé par les scientifiques. Fabriqué par Molecular Probes (Eugene, OR, USA), il contient deux sondes, l'iodure de propidium et le SYTO®9. Ces sondes se lient aux acides nucléiques. L'iodure de propidium fluoresce dans le rouge, et les membranes des cellules saines ne laissent pas passer cette molécule. Le SYTO®9 qui est capable de traverser les membranes marque toutes les cellules qu'elles soient vivantes ou moribondes. Selon Molecular Probes lorsque les deux sondes sont présentes dans une cellule, le STYTO®9 est délié des acides nucléiques car l'iodure de propidium prend sa place. Stocks (2004) ont démontré que l'affinité de l'iodure de propidium pour les acides nucléiques est supérieure à l'affinité du SYTO®9 pour les acides nucléiques.

Soit $\mathrm{ADN} + \mathrm{Sonde} \leftrightarrow \mathrm{ADNSonde}$ $\mathrm{K} = \frac{[\mathrm{ADNSonde}]}{[\mathrm{DNA}][\mathrm{Sonde}]}$, les auteurs ont calculé une constante d'affinité K_{PI} égale à $3{,}5.10^5$ /M et une constante d'affinité $K_{syto9}=1{,}8.10^5$/M. Selon Stock, la méthode BacLight^{TM} est robuste. Il faut cependant bien veiller à ce que l'iodure de propidium soit en excès par rapport à l'ensemble des acides nucléiques présents, y compris dans le milieu extracellulaire. Un exemple d'usage de la microscopie confocale avec le kit de viabilité BacLight^{TM} est présenté Figure 1-8.

Une autre sonde, une cyanine asymétrique marquant les cellules dont les membranes sont endommagées a été développée (Roth et al. 1997). Son nom commercial est le SYTOX Green. Elle fluoresce dans le vert. Le SYTOX Green est utilisé dans le kit « ViaGram™ Red $^{+}$

Bacterial Gram Stain and Viability Kit » (Molecular Probes) combiné avec le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) qui fluoresce dans le bleu et qui marque l'ensemble des bactéries. Cette sonde présente l'avantage par rapport à l'iodure de propidium d'avoir un accroissement plus élevé de sa fluorescence lorsqu'elle est liée à des acides nucléiques. Cependant, ce qui fait la force du kit BacLight^{TM} est le déplacement du SYTO®9 par l'iodure de propidium.

1.6.6 L'étude de la diffusion

La microscopie confocale en mode réflexion permet de mesurer la vitesse de diffusion d'un traceur fluorescent dans une matrice biologique. Dans notre cas, ces études sont particulièrement intéressantes lorsque le traceur est un antibiotique. En effet, la plupart des études sur la diffusion dans les biofilms se focalisent sur la mort des bactéries en fonction de leur profondeur dans le biofilm mais ne donnent pas d'information sur la vitesse de transport de l'antibiotique. Pourtant cette vitesse de transport est très importante. En effet, les bactéries planctoniques sont plus sensibles aux antibiotiques car elles sont exposées rapidement à la dose totale d'antibiotique. Au contraire, dans un biofilm les bactéries sont exposées graduellement à une concentration croissante d'antibiotique. Ceci leur donne le temps de préparer une réponse défensive et de mettre en place un mécanisme de résistance. En appui de cette hypothèse, il a été montré que les bactéries peuvent augmenter en moins d'une heure la transcription de gènes associés à un stress. Par exemple les gènes servant à la synthèse de la paroi cellulaire peuvent être transcrits en moins d'une heure en présence de faibles concentrations d'antibiotiques actifs contre les parois (Utaida 2003). Jefferson et al. (2005) ont utilisé la microscopie confocale pour étudier la diffusion d'un dérivé fluorescent de la vancomycine (disponible dans le commerce) dans un biofilm de *Staphylococcus aureus*. Les auteurs ont montré que c'est l'arrivée moins brutale de l'antibiotique, plutôt que l'incapacité de l'antibiotique à atteindre les bactéries, qui cause la plus grande résistance des bactéries localisées dans le biofilm. De plus, les auteurs ont montré que la diffusion du SYTO®9 (un marqueur fluorescent très couramment utilisé) était proche de celle du traceur analogue à la vancomycine. Yawata et al. (2010) ont étudié avec la même technique (microscopie confocale en mode réflexion et marqueur fluorescent) la diffusion du SYTO®9 dans un floc de boues dénitrifiantes.

1.6.7 Aspects techniques de l'imagerie confocale de cellules vivantes

Des facteurs sont à prendre en compte dans l'imagerie confocale de cellules vivantes. Il s'agit (1) d'effectuer un marquage correct qui permet de visualiser clairement les objets d'intérêt, (2) de maintenir la préparation dans des conditions qui maintiennent les cellules vivantes, (3) acquérir les images avec une bonne résolution spatiale et temporelle tout en ne compromettant pas la santé des cellules. Le Tableau 1-5 rassemble les principaux paramètres à considérer ainsi que les solutions que l'on peut apporter aux problèmes expérimentaux lors d'expériences d'imagerie confocale de cellules vivantes.

Tableau 1-5 : Considérations pratiques pour l'imagerie confocale de cellules vivantes (d'après Dailey et al. 2006)

	Paramètre à Considérer	Problème	Solutions Potentielles
1	Température	De nombreux phénomènes biologiques sont dépendants de la température.	● Utilisation d'une chambre thermostatée
2	Oxygénation	Les plupart des organismes requièrent de l'O2. L'oxygène peut venir à manquer dans des microréacteurs fermés	● Utilisation d'une chambre avec perfusion ● Remplacer le substrat ancien par du substrat oxygéné ● Accroitre le volume de la chambre d'observation
3	pH	Le métabolisme cellulaire peut engendrer de forts changements de pH dans la chambre d'observation au cours du temps.	● Utiliser une solution HEPES ● Remplacer le substrat ● Utiliser un indicateur de pH (phénol rouge)
4	Humidité	l'évaporation qui se produit dans une chambre d'évaporation ouverte peut conduire à des changements dans la salinité et le pH	● Utiliser une chambre fermée ou une perfusion ● Placer la chambre dans un environnement humidifié
5	Force du signal de fluorescence	Des sondes faiblement fluorescentes ou une faible concentration des sondes peut mener à des images avec un faible ratio signal/bruit	● Augmenter le temps de passage sur chaque pixel ● Ouvrir le pinhole ● Maximiser la collecte de la fluorescence émise ● Utiliser le moyennage (ligne ou champs) pour améliorer le ratio signal/bruit
6	Mauvaise séparation des différents canaux	Lorsque les spécimen sont marqués avec plusieurs sondes, la fluorescence d'un canal peut être détectée dans les autres	● Imager en mode séquentiel (un canal puis l'autre) ● Utiliser des images spectrales et des algorithmes de séparation de spectres ● Utiliser des filtres modernes
7	Blanchiment par la lumière	La fluorescence des sondes décroit sous une illumination répétée	● Réduire l'illumination ● Utiliser des sondes résistantes ● Ouvrir le pinhole ● Maximiser la collecte de la fluorescence émise ● Réduire le temps de passage sur chaque pixel ● Réduire la fréquence des images ● Imager que lorsque l'information est importante ● Pour améliorer le Signal/Bruit, toujours utiliser une déconvolution
8	Résolution spatiale	Des observations nécessitent de grandes résolutions spatiales dans le plan x-y ou en Z	● Utiliser des objectifs avec un grandissement élevé ● Réduire la taille du pinhole ● Augmenter l'échantillonnage spatial (en s'aidant du théorème de Nyquist) ● Utiliser le zoom électronique ● Décroitre le pas en z entre chaque plan ● Utiliser des objectifs à immersion à eau pour réduire les aberrations sphériques ● Faire une déconvolution sur les images
9	Résolution temporelle	Certains phénomènes biologiques sont rapides comparés à la vitesse d'acquisition des images	● Réduire le champs d'acquisition (moins de lignes horizontales) ● Réduire le temps de passage sur chaque pixel ● Passer d'une matrice 1024x1023 à une matrice 512x512 pixels
10	Garder la focalisation sur le spécimen	Les échantillons biologiques peuvent bouger durant l'observation	● Imager sur une profondeur supérieure que celle qui est occupée par l'échantillon ● Des ajustements manuels peuvent être nécessaires

1.7 CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les résidus d'antibiotiques posent plusieurs problèmes majeurs. Leur présence dans l'environnement, même à de faibles concentrations, favoriserait le maintien et le développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques (American Academy of Microbiology 2009). Cette résistance est un problème majeur de santé publique. Le rôle positif ou négatif des stations d'épuration à ce niveau est actuellement à l'étude (Baquero 2008). Les stations d'épuration sont le point où se concentre la majorité des flux d'antibiotiques avant de se disperser dans l'environnement. Il serait souhaitable qu'elles éliminent ces antibiotiques. Cependant, les rendements d'élimination sont faibles en particulier pour la famille des macrolides (Le-Minh 2010). Si l'on compare les vitesses d'élimination des antibiotiques par rapport aux autres micropolluants, on se rend compte qu'ils sont significativement plus faibles (Joss et al. 2006). Les auteurs s'interrogent sur un lien entre toxicité des antibiotiques sur les bactéries et biodégradation. De plus, des études ont montré que cette toxicité pourrait générer des perturbations dans le fonctionnement des stations d'épuration (Alighardashi 2009, Halling-Sorensen et al. 2001). Enfin, par la sélection qu'elle entraîne, cette toxicité pourrait également faciliter le maintien des bactéries résistantes (intrinsèquement résistantes ou ayant acquis une résistance).

La mesure de l'effet toxique d'une molécule sur des boues activées est difficile. La difficulté provient pour l'essentiel de l'impossibilité de maintenir en vie la plupart des bactéries des boues activées sur un substrat synthétique (Wagner et al. 1993). Il est donc nécessaire d'utiliser de la « véritable » eau usée. Or la composition de l'eau usée en nutriments et en substances toxiques est variable. De plus, la composition et la structure des flocs de boues activées peuvent, elles aussi varier au cours du temps dans une station d'épuration. Cependant, des marqueurs de viabilité fluorescents existent et l'utilisation de ces marqueurs combinée à la microscopie de fluorescence, en particulier la microscopie confocale, est un outil de choix pour l'étude des cinétiques de mortalité (Lopez et al. 2005, Pawel J. B. 2006).

Bibliographie

Alighardashi A., Pandolfi D., Potier O. and Pons M.N. (2009). Acute sensitivity of activated sludge bacteria to erythromycin. Journal of Hazardous Materials 172(2-3), 685-692.

Alighardashi A. (2007). Composés pharmaceutiques et eaux usées urbaines. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine: 154p.

Amann R. I., Ludwig W., Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews 59, 143-169

American Academy of Microbiology (2009). Antibiotic Resistance : an ecological perspective on an old problem 32p. Rapport téléchargeable à l'adresse internet suivante : http://academy.asm.org/images/stories/documents/antibioticresistance.pdf

Amin M. M., Zilles, J. L., Greiner, J., Charbonneau S., Raskin L., Morgenroth, E. (2006) Environmental Science & Technology, 40, 3971.

Baddour L. M., Yu V. L., Klugman K. P., Feldman C., Ortqvist A., Rello J., Morris A. J., Luna C. M., Snydman D. R., Ko W. C., Chedid M. B., Hui D. S., Andremont A., C. C. C. C., and t. I. P. S. Group. (2004). Combination antibiotic therapy lowers mortality among severely ill patients with pneumococcal bacteremia. Am J Respir Crit Care Med 170:440-444.

Baquero F., Martinez J.L., et Canton R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current opinion in biotechnology 19, 260-265.

Benedetti L. (2006). Probabilistic design and upgrade of wastewater treatment plants in the EU Water Framework Directive context. PhD thesis, Ghent University, Belgium, pp. 304.

BioTechnologies de l'académie de Bourgogne, site internet consulté le 2 Septembre 2010 http://stl_bjb.ac-dijon.fr/microbio/mparoibacterienne.htm

Campos, J.L., Garrido, J.M., Meindez, R. and Lema, J.M. (2001) Effect of two broad-spectrum antibiotics on activity and stability of continuous nitrifying system. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology 95(1), 1-10.

Chachuat B., Roche N., Abderrazak M. (2001) Nouvelle approche pour la gestion optimale de l'aération des petites stations d'épuration par boues activées. L'Eau, L'Industrie, Les Nuisances, 240, p. 53-59.

Chu C. P., Lee D. J., Tay J. H. (2005) Floc model and intrafloc flow. Chemical Engineering Science 60, 565-575.

Chu C. P., et Lee, D. J. (2004a) Multiscale structures of biological flocs. Chemical Engineering Science 59, 1875-1883.

Chu C. P., et Lee, D. J. (2004b) Advective flow in a sludge floc. Journal of Colloid and Interface Science 277, 387-395.

Da Silva M.C.L. (2008). Effet de la variabilité du fractionnement de la pollution carbonnée sur le comportement des systèmes de traitement des eaux usées par boues activées. Thèse de doctorat soutenue le 03 juillet 2008, Institut National Polytechnique de Lorraine 182 p.

Dailey M.E., Manders E., Soll D. R., Terasaki M. Confocal microscopt of living cells. Chapitre 19 du livre Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3ème édition, éditeur, Pawley J.B, Springer, 985p. ISBN 10 : 0-387-25921-X

Davies J., Spiegelman G.B. and Yim G. (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. current opinion in microbiology 9, 445-453.

D'Abzac P, Bordas F, Joussein E, van Hullebusch E, Lens PNL, Guibaud G. (2010). Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludge. Environ Sci Technol 44, 412-8.

Drillia P., Dokianakis S.N., Fountoulakis M.S., Kornaros M., Stamatelatou K. Lyberatos G. (2005). On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole. Journal of Hazardous Materials 122(3), 259-265.

Dröge M., Pühler A., Selbitshka W., (2000). Phenotypic and molecular characterization of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge. *Molecular and General Genetics*, 263, 471-482

Edeline (1993). L'épuration biologique des eaux, théorie et technologie des réacteurs 4 ème édition revue et complétée, coéditions Cebedoc Liège et Lavoisier TEC et DOC Paris, 303p.

Eckenfelder W. et Grau P. (1992). Activated Sludge Process Design and control : theory and practice. Volume 1. Technomic 268p. ISBN No. 87762-889-0

EARSS : European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2010). Une base de données interactive est accessible sur le site internet : http://www.rivm.nl/earss/database/

FAO and OMS. (2004). Caractérisation des dangers liés à la présence de pathogènes dans les aliments et dans l'eau, directives.85p.

Farrell D. J., Couturier C., et Waleria H., 2008: Distribution and antibactrial susceptibility of macrolide resistance genotypes in *Streptococcus pneumoniae* : PROTEKT Year 5 (2003 - 2004). International Journal of Antimicrobial Agents, 31, 245-249.

Favre-Bonté S., Köhler T., Van Delden C. (2003). Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. Journal of antimicrobial chemotherapy 52:598-604.

Fernå ndez, I., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L. and Mandez, R. (2009) Operation of an Anammox SBR in the presence of two broad-spectrum antibiotics. Process Biochemistry 44(4), 494-498.

Focazio M. J., Kolpin D.W., Barnes K.K., Furlong E. T., Meyer M. T., Zaugg S. D., Barder L. B., Thurman M. E., (2008). A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment*, 402, 201-216.

Gerardi M. H. (2006) Wastewater Bacteria, Wastewater Microbiology Series, Wiley-Interscience. ISBN-10: 0-471-20691-1, 255 p.

Giamarellos-Bourboulis E. J. (2008). Macrolides beyond the conventional antimicrobials: a class of potent immunomodulators. antimicrobial agents 31:12-20.

Göbel, A., Thomsen, A., McArdell, C.S., Joss, A., Giger, W., (2005). Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides and trimethoprim in conventional activated sludge treatment. Env. Sci. Tech. 39, 3981–3989.

Granizo J.J, Aguilar L., Casal J., Garcia-Rey C., Dal-Ré R., et Baquero F., (2000) *Streptococcus pneumoniae* resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and B-lactam consumption in Spain (1979-1997). Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 46, 767-773

Gulkowska, A., Leung, H.W., So, M.K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Yeung, L.W.Y., Richardson, B.J., Lei, A.P., Giesy, J.P., Lam, P.K.S., (2008). Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. Water Research 42, 395–403.

Halling-Sorensen B. (2001). Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. Archives of Environmental Contamination and Toxicolgy 40, 451-460.

Hartemann P., Hautemaniere A., et J. M., (2005). La problématique des effluents liquides hospitaliers, revue générale. Hygiènes, 8

Hartmann A, Alder A.C., Koller T, Widmer R.M., (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 377–82.

Henriques, I. D. S., Love, N. G. (2007). The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. Water Research 41, 4177-4185.

Henze M., Harremoës P., Jansen J.C.J., Arvin E. (1997); "*Wastewater Treatment; biological and chemical processes"*, deuxième édition, Spriger, Berlin 382p.

Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Pascarella L., et Parrella A., (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. Science of the Total Environment 346, 87– 98.

Jefferson, K. K., Goldmann, D. A., Pier, G. B., (2005). Use of Confocal Microscopy To Analyze the Rate of Vancomycin Penetration through Staphylococcus aureus Biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 2467-2473.

Jetten M.S.M., Wagner M., Fuerst J., Van Loosdrecht, M. Kuenen G., Strous M. (2001). Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process. Current Opinion in Biotechnology 12, 283-288.

Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C. S., Ternes, T. A., Thomsen, A., and Siegrist, H. (2006) Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. Water Research 40, 1686-1696.

Joss, A., Keller, E., Ald bel, A., McArdell, C.S., Ternes, T., Siegrist, H. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. Water Research 39, 3139-3152.

Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P.R., Siegrist, H., (2004). Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimisation. Environ. Sci. Technol. 38, 3047–3055.

Kahn, E. (2007) Imagerie spectrale et analyse de séquences d'images en microscopie confocale à balayage laser. IRBM 28, 107-116.

Kanfer, I., Skinner, M. F., Walker, R. B., (1998). Analysis of macrolide antibiotics. Journal of Chromatography A 812, 255-286.

Karthikeyan KG, Meyer MT. (2006). Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. Science of the Total Environment 361, 196–207.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. Environmental Science and Technology 2002;36:1202–11

Larsson DGJ, de Pedro C, Paxeus N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. Journal of Hazardous Materials 148:751–5.

Lee Y.J., Lee S.E., Lee D.S., et Kim Y.H., (2008). Risk assessment of human antibiotics in Korean aquatic environment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26, 216-221.

Le-Minh, N., Khan, S.J., Drewes, J.E. and Stuetz, R.M. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. Water Research 44(15), 4295-4323.

Li, Z. H., Kuba, T., Kusuda, T. The influence of starvation phase on the properties and the development of aerobic granules. Enzyme and Microbial Technology 38, 670-674 (2006).

Lienert J., Güdel K., Escher B. I., (2007). Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. Environ. Sci. Technol. 41, 4471-4478.

Lopez, C., Pons, M.N. and Morgenroth, E. (2005) Evaluation of microscopic techniques (epifluorescence microscopy, CLSM, TPE-LSM) as a basis for the quantitative image analysis of activated sludge. Water Research 39(2-3), 456-468.

March J. C., and Bentley W. E. (2004). Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. Current opinion in biotechnology 15:495-502.

McArdell, C.S., Molnar, E., Suter, M.J.F. and Giger, W. (2003). Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. Environmental Science & Technology 37(24), 5479-5486.

McArdell, C.S., Joss, A., Alder, A.C., Felis, E., Giger, W., Göbel, A., Löffler, D., Siegrist, H., Zabczynski, S., Ternes, T.A., (2005). Sorption of pharmaceuticals and personal care products to activated sludge. SETAC Europe Meeting, Lille, France.

McLean R. J. C., Barnes M. B., Windham M. K., Merchant M., Forstner M. R. J., Fuqua C. (2005). Cell-cell influences on bacterial community development in aquatic biofilms. Microbiology 71:8987-8990.

Miller M. B., Bassler B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55:165-99.

Minsky, M., 1957, U.S. Patent #3013467, Microscopy apparatus

Morgan-Sagastume F., Boon N., Dobbelaere S., Defoirdt T., and Verstraete W. (2005). Production of acylated homoserine lactones by *Aeromonas* and *Pseudomonas* strains isolated from municipal activated sludge. Can. J. Microbiol 51:924-933.

Nakajima Y. (2002). Mode of Action and Resistance Mechanisms of Antimicrobial Macrolides. Chapitre 10 du livre Macrolide Antibiotics Chemistry, Biology, and Practice, deuxième édition. Satoshi Ōmura 637p.

Pepin S. et Ricordeau (CNAMTS). (2006). La consommation d'antibiotiques : situation en France au regard des autres pays européens.Points de repère n°6. Issn : 1777-7674

Pawel J. B. (2006) Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3ème érdition, Springer, 985p. ISBN 10 : 0-387-25921-X

Parsek M. R., and Greenber P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacterie: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Colloquium. PNAS 97:8793.

Pons, M. N., Vivier, H., Belaroui, K., Bernard-Michel, B., Cordier, F., Oulhana, D., and Dodds, J. A. (1999) Particle morphology: From visualisation to measurement. Powder Technology 103, 44-57.

Pons M. N., J. N. Louvet J.N, Potier O., (2009). Implementation of micropollutant fate in wastewater treatment plant benchmark simulation models. Proceedings, International Conference Xenowac 2009. 11-13 Mars 2009 Chypre

Rasmussen T. B., and M. Givskov. (2006). Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. Microbiology 152, 895-904.

Riedel S., Beekmann S. E., Heilmann K. P., Richter S.S., Garcia-de-Lomas J., Ferech M., Goosens H. and Doern G. V. (2007) Antimicrobial use in Europe and antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26, 485-490.

Roth, B.L., Poot, M., Yue, S.T. and Millard, P.J. (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. Appl. Environ. Microbiol. 63(6), 2421-2431.

Sabuncu, E. et al. (2009) Significant Reduction of Antibiotic Use in the Community after a Nationwide Campaign in France, 2002 à 2007. PLoS Med 6, e1000084.

Shimada, T., Zilles, J.L., Morgenroth, E. and Raskin, L. (2008) Inhibitory effects of the macrolide antimicrobial tylosin on anaerobic treatment. Biotechnology and Bioengineering 101(1), 73-82.

Shiomi K., Ōmura S., (2002). Discovery of new Macrolides. Chapitre 1 du livre Macrolide Antibiotics, chemistry, biology, and practice, édité par Ōmura S., Elsevier Science Academic Press, 637p ISBN 0-12-526451-8

Spongberg A.L, Witter J.D. (2008). Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. Science of the Total Environment. 397, 148–57.

Stocks S.M. (2004). Mechanism and Use of the Commercially Available Viability Stain, BacLight. Cytometry Part A 61A, 189–195

Szczepanowski R., K. I., Linke B. Goesmann A, Pühler A., Schlüter A., (2004). Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology*, 150, 3613-3630.

Ternes, T.A., (2000). Rückstände von Arzneimitteln, Diagnostika und Antiseptika in Abwasser, Flüssen und Grundwasser. Professorial dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz.

Utaida, S., Dunman, P.M., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Singh, V.K., Jayaswal, R.K., Wilkinson, B.J (2003). Genome-wide transcriptional profiling of the response of Staphylococcus aureus to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. Microbiology 149, 2719-2732.

Valle A., Bailey M., Whiteley A.S., Manefield M. (2004). N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community and function in activated sludge. Environmental microbiology 6:424-433.

Wagner, M., Loy, A. (2002). Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. Current Opinion in Biotechnology 13, 218-227.

Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K. H. (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1520-1525.

Wingender J, Neu TR, Flemming HC. What are bacterial extracellular polymeric substances? In: Wingender J, Neu TR, Flemming HC, editors. Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structures and function. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1999. p. 1-18.

Woo P. C. Y., To A. P. C., Lau S. K. P., et Yuen K. Y., (2003). Facilitation of horizontal transfer of antimicrobial resistance by transformation of antibiotic-induced cell-wall-deficient bacteria. *Medical Hypotheses*, 61, 503-508

Xu W, Zhang G, Li X, Zouc S, Lia P, Hua Z (2007). Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. Water Research 2007;41:4526–34.

Yawata Y, Uchiyama H, Nomura N. (2010) Visualizing the Effects of Biofilm Structures on the Influx of Fluorescent Material Using Combined Confocal Reflection and Fluorescent Microscopy Microbes and Environments. Vol. 25, No. 1, 49–52, 2010

Chapitre 2

2 Materiels et méthodes

2.1 PRESENTATION DES SITES DE PRELEVEMENT

Les prélèvements d'eau usée et de boues ont été effectués dans deux stations d'épuration : la STEP de Nancy-Maxéville de forte capacité et celle d'Epinal de taille moyenne. Dans les deux stations d'épuration, les eaux usées ont été prélevées après le dégrillage. Les boues ont été prélevées dans la boucle de recirculation.

2.1.1 Station d'Epuration Nancy-Maxéville

La station d'épuration de Nancy-Maxéville peut recueillir des eaux résiduaires correspondant à 350 000 EH (Equivalent-Habitants) et traite les eaux usées provenant des vingt communes de la communauté urbaine du Grand-Nancy. Le débit en entrée est d'environ 100 000 $m^3.j^{-1}$. L'installation assure également le traitement des effluents industriels produits par des brasseries situées à Champigneulles dans la banlieue de Nancy. Une image satellite de la station est présentée Figure 2-1.



Figure 2-1 : la STEP de Nancy Nancy-Maxéville (1, clarificateurs ; 2, flottateurs ; 3, traitement physique (décantateur lamellaire) ; 4, anoxie ; 5, clarificateurs ; 6, dégazeur dessableur ; 7, chaufferie ; 8, digesteurs ; 9 Biolift® (d'après une image satellite google map)

A partir de 1999, cette exploitation a subi d'importantes modifications dans ses installations en terme de traitement de l'azote et du phosphore. Ceci a été effectué pour se conformer à la Loi Nationale de l'Eau du 3 janvier 1992 (Loi n° 92-3 du 3 janvier 1992 sur l'eau) ainsi qu'à la Directive Européenne de 1991 (91/271/CEE – Traitement des Eaux Urbaines Résiduaires). En 2004, tous les travaux d'extension pour le traitement de l'azote (à l'aide d'un système hybride Biolift®) et du phosphore (par précipitation chimique en traitement tertiaire) se sont terminés. A leur arrivée, les eaux usées urbaines sont d'abord relevées par trois vis d'Archimède et traversent un dégrilleur pour éliminer les déchets les plus grossiers (chiffons, papiers et plastiques). Par la suite, elles sont conduites vers un système combiné de dessablage, déshuilage et décantation lamellaire pour enlever les sables, graisses et une partie des matières en suspension. Après cette étape, les eaux décantées sont envoyées vers la zone d'anoxie amont, et les boues provenant du décanteur primaire sont dirigées vers les digesteurs. La zone d'anoxie permet une prédénitrification et une biodégradation de la pollution carbonée (environ 35 % de l'effluent urbain décanté est envoyé vers la zone d'anoxie amont de la filière industrielle et 65 % vers la zone d'anoxie amont urbaine). Ensuite, l'effluent est introduit dans le Biolift® — réacteur biologique à culture fixée sur lit de microsable fluidisé. Ce système est composé de 14 cellules pour la filière industrielle et 18 cellules pour la filière urbaine. Le réacteur possède une grande surface spécifique de fixation des microorganismes (environ 900 à 1800 $m^2.m^{-3}$). L'aération est assurée à l'aide d'une injection d'air par des diffuseurs. L'effluent est ensuite conduit vers le système dégazeur/dessableur. Le premier permet la suppression des mousses formées dans le Biolift® avec un pont racleur et le second récupère les particules de sable pour les renvoyer vers le Biolift®. L'influent est dirigé vers les bassins d'anoxie aval, puis vers les clarificateurs où une partie des boues sera recyclée vers l'anoxie amont et l'excès sera envoyé vers les épaississeurs puis les digesteurs. A la sortie des clarificateurs, un traitement physico-chimique est réalisé pour éliminer les phosphates avant que l'effluent ne soit rejeté à la Meurthe. Le Tableau 2-1 donne la composition moyenne de l'eau usée arrivant à la station d'épuration de Nancy-Maxéville

Tableau 2-1 : paramètres moyens journaliers de l'eau usée arrivant à la station d'épuration de Nancy-Maxéville

Paramètres moyens journaliers	Débit : 100 000 $m^3.j^{-1}$
DCO	260 mg/L^{-1} – 26 $t.j^{-1}$
DBO5	220 mg/L^{-1} – 12 $t.j^{-1}$
MES	150 mg/L^{-1} – 15 $t.j^{-1}$
NTK	30 mg/L^{-1} – 3 $t.j^{-1}$
P total	10 mg/L^{-1} – 1 $t.j^{-1}$

2.1.2 Station d'épuration d'Epinal

La station d'épuration d'Epinal a une capacité de 60 000 équivalent-habitants. Le débit moyen journalier en entrée est d'environ 20 000 m^3. Le traitement primaire comprend un dégrillage, un dessablage et un déshuilage. Le traitement biologique s'effectue dans un chenal aéré par des diffuseurs qui fonctionnent de manière séquentielle, les périodes aérées permettant la nitrification, les phases anoxiques permettant la dénitrification. Le temps de séjour global est supérieur à 30 heures dont 24 heures dans le chenal d'oxidation (Figure 2-2). Les eaux usées à l'entrée sont caractérisées par une concentration moyenne en DCO de 450 mg/L, une concentration en DBO_5 de 230 mg/L, et une concentration en azote NTK de 35 mg/L.



Figure 2-2 : La station d'épuration d'Epinal dont les rejets s'effectuent dans la Moselle. Les deux lignes de traitements sont visibles (2 chenaux d'oxydation et 2 clarificateurs). (D'après une image satellite google map)

2.2 REACTEURS ET CHAMBRES POUR MICROSCOPIE

2.2.1 Réacteurs batch 3L

Plusieurs réacteurs aérés et parfaitement agités sont utilisés pour réaliser les expériences en laboratoire (Figure 2-3). Chaque réacteur est constitué d'un cône et d'un cylindre qui le surplombe. Le volume maximal du réacteur est de 4 litres. Les réacteurs ont été fabriqués par l'atelier du LRGP. L'ensemble des manipulations a été réalisé avec des volumes d'un litre de boues activées et deux litres d'eau usée. L'aération est réalisée à l'aide d'un disque poreux disposé au fond du cône. L'apport d'oxygène est assuré par l'air comprimé. Cette aération permet également d'assurer le brassage (le temps de mélange est de 7 secondes). Pour éviter les problèmes de retour de liquide vers le tuyau de l'air comprimé, tous les réacteurs sont équipés d'un clapet anti-retour. Des prélèvements réguliers ont été effectués dans les réacteurs. Après filtration des échantillons, ils sont conservés à 4 °C. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons filtrés.

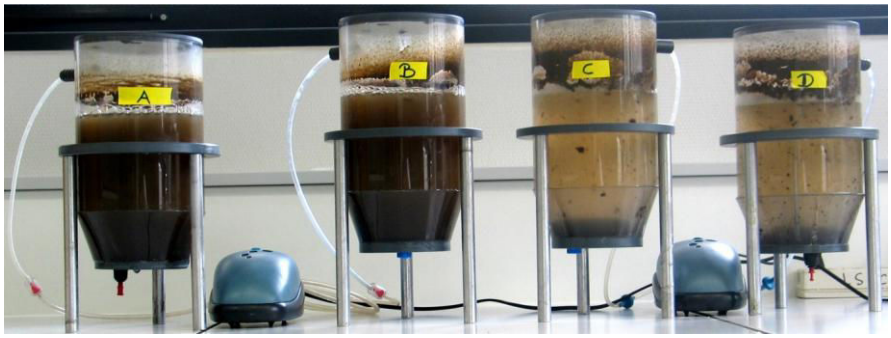


Figure 2-3 : photographie des quatre réacteurs batch 3L prise 24h après le début d'une expérience avec la boue et l'eau usée d'Epinal. De gauche à droite : réacteur témoin, 1 mg/L d'érythromycine, 10 mg/L d'érythromycine, 20 mg/L d'érythromycine.

2.2.2 Réacteurs batch 500 mL

Ces réacteurs ont été utilisés pour les expériences en réacteur batch sur un période de 5 jours effectuées avec une faible concentration de boues (450 mL d'eau usée et 50 mL de boues). Le système des mini-réacteurs est constitué d'une cuve rectangulaire, en plexiglas, conçue pour assurer la thermostatation de 12 réacteurs (diamètre interne = 65 mm, hauteur = 200 mm et volume total = 670 mm) (Figure 2-4). La cuve peut être remplie avec de l'eau maintenue à 20 °C (Cryothermostat Bioblock Scientifique modèle 18207, Walthman, MA, USA) dans laquelle les réacteurs restent immergés. Les réacteurs sont fixés par des vis sur un couvercle

en plexiglas. L'apport d'oxygène est assuré par l'alimentation en air comprimé qui se fait individuellement à l'aide d'un diffuseur d'air poreux disposé au fond de chaque réacteur. Pour éviter les problèmes liés à une évaporation excessive, l'air injecté est humidifié par un passage dans un bidon rempli d'eau déminéralisée. Le débit de l'air comprimé dans chaque réacteur est réglé par l'intermédiaire d'une petite vanne. Pour éviter les problèmes de retour de liquide vers le tuyau de l'air comprimé, tous les réacteurs sont équipés d'un clapet anti-retour. Les réacteurs ont été fabriqués par l'atelier du LRGP



Figure 2-4 : Système de mini-réacteurs utilisés pour les experiences d'une durée de 5 jours.

2.2.3 Chambres pour microscopie

Pour les expériences de microscopie en épifluorescence réalisée au LRGP nous avons utilisé des chambres « µ-Slide 18 well – flat » provenant du constructeur allemand Ibidi (http://www.ibidi.de) et distribuées par la société Biovalley (77 601 Marne La Vallée, France). Chaque lame de microscope contient 18 puits de 5 mm de diamètre et de 30 µL de volume (Figure 2-5). Ces lames sont fabriquées dans un matériau plastique qui ne présente pas d'auto-fluorescence. Elles sont distribuées par boîtes de 15. Ces lames sont destinées à un usage unique, elles se raient facilement et de la matière organique peut se déposer dans les puits. Cependant, il est possible de les réutiliser après lavage notamment pour les expériences de mise au point.

En ce qui concerne les expériences de microscopie confocale nous avons utilisé des chambres Lab-Tek® II. Chaque lame contient 8 compartiments (25 x 56 mm) fixés sur une lamelle en verre borosilicaté. Ces lames sont distribuées par Dutscher SAS par boite de 16 (Figure 2-5B).

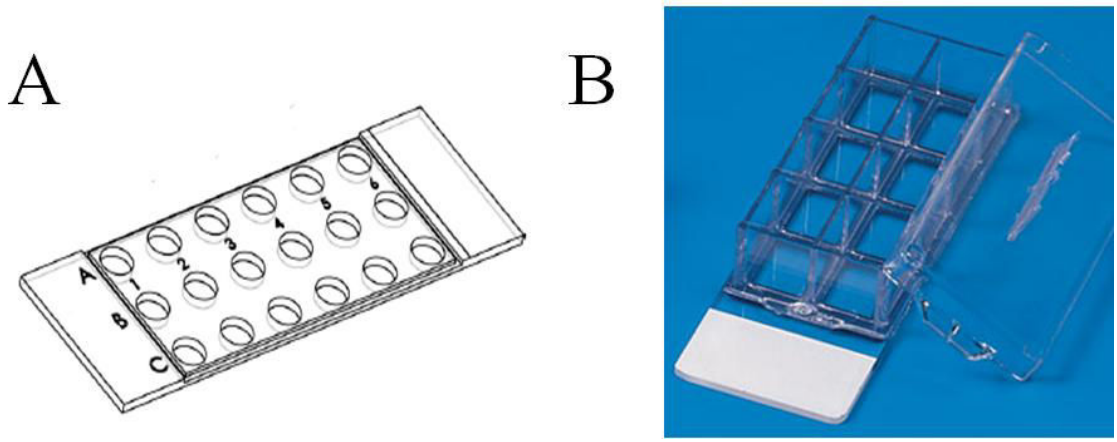


Figure 2-5 : A) chambres Ibidi utilisées pour les expériences avec le microscope à épifluorescence, B) chambres Lab-Tek® utilisées en microscopie confocale.

2.3 ANALYSES POUR LE SUIVI DES REACTEURS BATCH

Tous les échantillons prélevés dans les réacteurs ont été filtrés avant d'effectuer les analyses. La filtration des échantillons s'est faite à l'aide de filtres en cellulose (diamètre des pores environ 1,5 µm).

2.3.1 Matières sèches (MS) et matières en suspension (MES)

Pour obtenir la concentration en matière sèche, on place 25 mL d'échantillon dans une coupelle que l'on laisse sécher pendant 24 heures dans une étuve à 105 °C. Cette matière sèche correspond à l'ensemble des matières en suspension et matières solubles. On a fait cette analyse pour les boues des réacteurs batch en début et en fin d'expérience. La concentration, s'exprime par :

$$MS = \frac{P2 - P1}{0{,}025}$$

Avec P1 le poids de la coupelle propre (en g) et P2 le poids de la coupelle après séchage (en g) et MS les matières sèches en g/L. Pour la mesure des matières en suspension (MES) on filtre les échantillons avec un filtre à 0,45 µm. Le calcul s'effectue de la même manière. P2 correspond au poids de la coupelle du filtre et des matières en suspension après séchage. P1 correspond au poids du filtre et de la coupelle. Les filtres et les coupelles sont placés à l'étuve 24 h avant leur utilisation de sorte que le poids P1 corresponde bien au poids sec.

2.3.2 Spectrophotométrie d'absorbance UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible a été utilisée pour estimer la DCO soluble grâce à l'absorbance à 254 nm. Les spectres UV-visible donnent aussi une bonne estimation des concentrations de nitrites et nitrates par la méthode de la pente double (Ferre et Shannon 2001). Cependant il n'est pas possible de différencier les concentrations de nitrites et de nitrates. Les spectres ont été obtenus dans une gamme de 200 à 600 nm (pas de 1 nm) avec un spectrophotomètre SECOMAN Anthélie Light®. Une cellule en quartz de 10 mm a été utilisée. Ses parois ont été nettoyées avant chaque mesure. Deux sources de lumière sont utilisées : une lampe visible tungstène halogène et une lampe UV au deutérium. La vitesse de balayage a été fixée à 1200 nm/min. Le blanc a été réalisé avec de l'eau déminéralisée et avec la même cellule de mesure. Les spectres ont été obtenus sans dilution.

2.3.3 Spectrophotométrie de fluorescence synchrone

La présence de résidus protéiniques de type tryptophane est suivie par fluorescence synchrone. La détection a été effectuée avec un spectrophotomètre de fluorescence (F-2500; Digilab, Hitachi®), avec une lampe xénon (Xe), en utilisant le logiciel de « FL Solutions 2.0». La longueur d'onde de l'émission ($\lambda_{ém}$) varie de 280 nm à 650 nm et le décalage entre la longueur d'onde de l'émission et la longueur d'onde de l'excitation ($\lambda_{éx}$) était de 50 nm ($\lambda_{ém} - \lambda_{ex}$ = 50nm). Un décalage de 50 nm entre longueur d'onde d'excitation et longueur d'onde d'émission se justifie car la plupart des pics de fluorescence d'intérêt sont « alignés » sur une diagonale dans la matrice 3d excitation émission (Figure 2-6). La vitesse d'analyse utilisée était de 300 nm.min^{-1}.

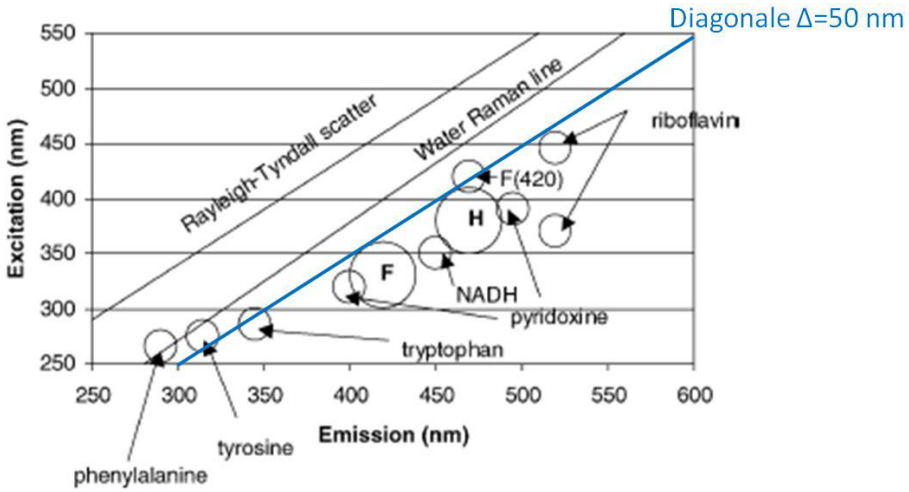


Figure 2-6 : localisation des pics de fluorescence de quelques composés biologiques dans la matrice excitation émission (Pons et al. 2004)

La

Figure 2-7A représente un exemple d'évolution du spectre de fluorescence d'une eau usée urbaine au cours de son épuration dans un réacteur batch. On peut noter une décroissance du pic à 285 nm (Δ=50) qui correspond à la fluorescence type tryptophane.

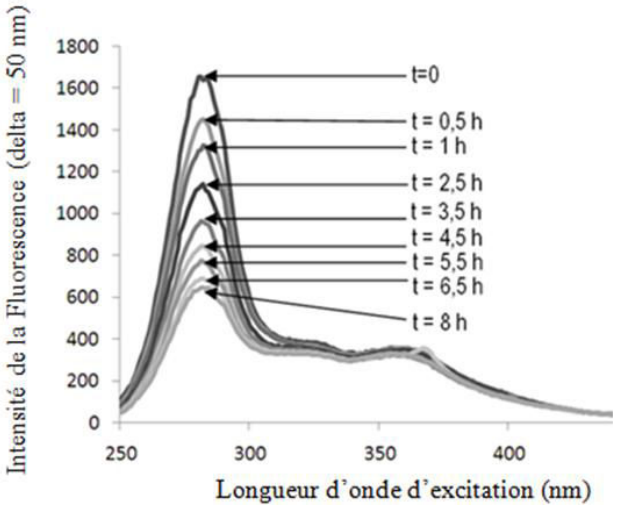


Figure 2-7 : exemple d'évolution du spectre de fluorescence synchrone (λ=285 nm, delta = 50 nm) au cours de l'épuration en réacteur batch d'une eau usée urbaine.

2.3.4 Spectro-photocolorimétrie (DCO et ammonium)

Nous avons mesuré la DCO et l'ammonium avec un spectro-photocolorimètre Hach® DR/2400. La gamme de longueur d'onde de cet appareil s'étend de 400 à 800 nm (±1 nm). La sélection de la longueur d'onde peut s'effectuer manuellement en mode signal unique ou être automatique en mode programme. La lecture des résultats peut s'effectuer en mode transmission, absorption ou concentration. Nous avons utilisé le mode absorption.

Mesure de la Demande Chimique en Oxygene (DCO)

La DCO est une mesure globale de la pollution oxydable chimiquement par un mélange sulfo-chromique. C'est la quantité d'oxygène équivalente à la quantité de dichromate consommée par la pollution lors de son oxydation à chaud. Après réaction, la valeur est mesurée par spectrophotométrie d'absorbance. Nous avons utilisé la gamme 0-750 mgO_2/L. Le protocole détaillé comporte quatre étapes :

1. 2 mL d'échantillon sont placés dans un tube Hach® et mélangés à une solution acide (3,5 mL). Cette solution de digestion est un mélange de dichromate de potassium

(oxydant fort) et de sulfate de mercure (pour éliminer les interférences avec les ions chlorure). La solution acide est composée d'acide sulfurique concentré (milieu acide) et de sulfate d'argent (catalyseur).

2. L'échantillon est chauffé à reflux pendant 2 heures à 147°C dans un four CSB/DCO Aqualytic Reactor AL31 puis on le laisse refroidir à l'air libre pendant 20 minutes
3. L'extérieur des tubes est nettoyé avec du papier imbibé d'éthanol afin d'éliminer toute trace qui pourrait perturber la mesure de l'absorbance. L'absorbance est mesurée à 620 nm. La moyenne de quatre mesures d'absorbance sur un même échantillon permet d'avoir une valeur plus précise. Un blanc est réalisé à chaque fois à partir d'un échantillon d'eau déminéralisée ayant été traité comme un échantillon à doser.
4. Une droite d'étalonnage donne la correspondance entre l'absorbance de l'échantillon et sa DCO.

AZOTE AMMONIACAL

La méthode Hach® n° 380 sur une gamme de 0 à 2,5 mg_N/L basée sur le réactif de Nessler a été adaptée pour des prises d'échantillon de 10 mL. Les échantillons (filtrés) ont été dilués au $20^{ème}$ à l'aide d'un diluteur automatique Hamilton® et avec de l'eau déminéralisée. Le réactif de Nessler (iodo-mercurate de potassium alcalin) est décomposé en présence d'ions ammonium avec formation d'iodure de dimercuriammonium produisant une couleur jaune. Sa concentration est mesurée par absorbance à 425 nm. L'erreur de dosage est évaluée à ± 0,5 mg $N\text{-}NH_4/L$.

2.3.5 Chromatographie ionique : Nitrites et Nitrates

L'analyse par chromatographie ionique est réalisée à l'aide d'un appareil DIONEX® en utilisant la colonne échangeuse d'ions IonPac AS18. Les ions ou composés polaires sont entraînés par la phase mobile et séparés par effet de leurs interactions avec les sites ioniques de la phase stationnaire. La couche échangeuse d'ion de la phase stationnaire de la colonne AS18 est constituée d'ammoniums quaternaires. L'éluant utilisé (phase mobile) est le KOH. Plus la densité de charge d'un anion est grande, plus il sera retenu par la phase stationnaire et plus sont temps de séjour dans la colonne sera important. Ainsi on peut différencier les ions par leur temps de séjour dans la colonne. La détection est basée sur la mesure de la conductivité de la phase mobile à la sortie de la colonne. La Figure 2-8, représente un

exemple de chromatographe obtenu lors de l'analyse d'un échantillon d'eau usée urbaine. On peut modifier la concentration et le débit de la phase mobile, le but étant de permettre une analyse rapide, qui sépare bien les pics de conductivité pour les anions que l'on souhaite mesurer et qui nettoie suffisamment la colonne pour qu'il n'y ait pas de résidu d'un échantillon qui vienne perturber les analyses suivantes.

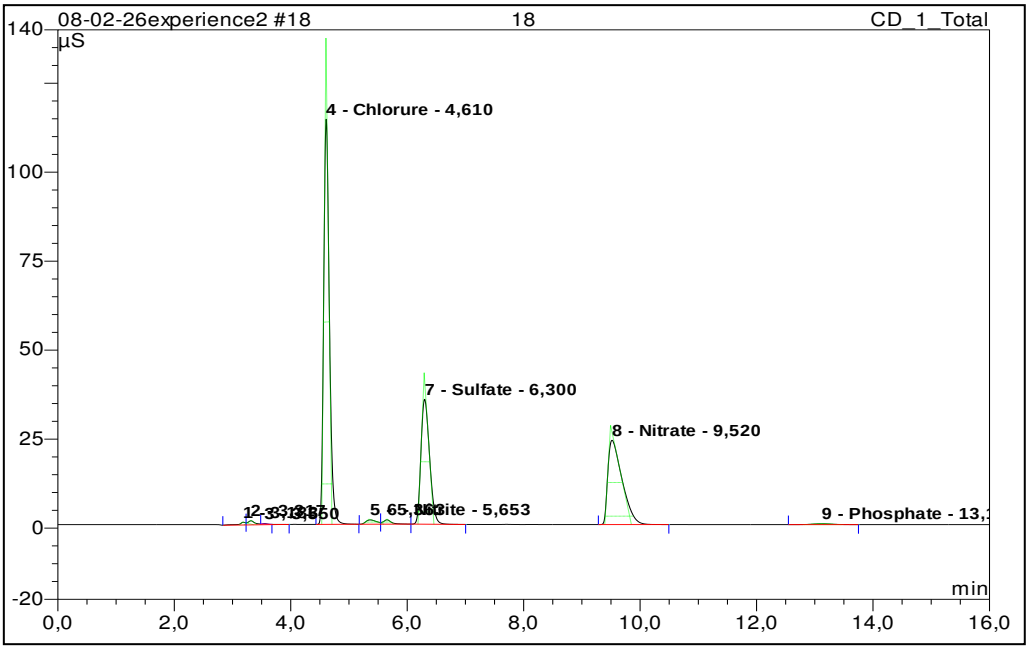


Figure 2-8 : exemple de chromatographe (conductivité en fonction du temps d'élution) pour un échantillon d'eau usée urbaine analysé avec la colonne AS18

2.4 PREPARATIONS MICROSCOPIQUES ET ANALYSE D'IMAGE

Nous avons effectué quatre types de préparations microscopiques pour observer les boues activées : étalement sur lame et observation à l'état sec, coloration de Gram, marquage fluorescent de viabilité BacLight™, et marquage fluorescent simultané Gram et viabilité

2.4.1 Préparation état sec

Cette préparation est effectuée pour étudier la morphologie des boues par analyse d'images après observation au microscope à lumière transmise. La préparation « état sec » permet une meilleure focalisation que les observations à l'état frais. En effet, lors de l'observation des boues à l'état frais l'épaisseur occupée par les boues est plus importante et dans certain cas ne permet pas d'avoir une bonne focalisation sur l'ensemble de l'image. De plus et surtout, les

lames à l'état sec peuvent être observées plusieurs heures après leur préparation ce qui facilite le déroulement des expériences notamment lors de prises d'échantillons rapprochées dans le temps. L'analyse d'image est utilisée pour déterminer différents paramètres morphologiques des bactéries filamenteuses et des flocs : la surface totale, la surface de flocs, le nombre de flocs, le nombre de filaments, la longueur de filaments et la longueur du squelette. On peut calculer la surface moyenne des flocs en utilisant la proportion « surface de flocs/nombre de flocs ».

Le protocole est le suivant : sur chaque lame, on étale 100 µL de boues et on laisse sécher à l'air. On observe à un agrandissement γ de 100 X (objectif 10 X, 1 pixel = 1,029 μm^2). La fixation à une chaleur douce permet de figer la situation. Elle tue les microorganismes en ne modifiant que légèrement leurs aspects morphologiques. Les images ont été prises sur un microscope axio imager A1 (Zeiss) associé avec une caméra AxioCam MRn (Zeiss, Oberkochen, Germany). 50 images (1384 36 pixels) sont prises sur chaque lame sans superposition de champs de vision. Les images ont été analysées avec le logiciel Visilog 5 (Noesis, Les Ulis, France).

2.4.2 Analyse d'image (« état sec »)

Les images ont été analysées à l'aide du logiciel Visilog 5.2 (Noesis, Les Ulis) à partir de routines écrites dans un langage semblable au langage C. Les résultats sont sauvegardés sous forme de fichiers texte qui peuvent être importés dans un tableur. On a utilisé le programme « Flocs_sec » pour l'analyse des échantillons « état sec ».

Le programme « Flocs_sec » a été adapté par M. N. Pons à partir du travail de Da Motta (2001) et Pandolfi (2006). Ce programme a été appliqué sur des séries de 50 images qui sont préparées par « état sec ». Les principales étapes de ce programme sont représentées sur la Figure 2-9. Il permet de nous renseigner sur la morphologie et la quantité des bactéries filamenteuses et des flocs.

L'image de départ est une image monochrome. Une égalisation globale de l'histogramme des niveaux de gris est réalisée afin d'augmenter le contraste de l'image (→**image I.2**). L'image résultante est ensuite automatiquement segmentée (seuillage par entropie) afin d'obtenir une image binaire (→image I.3), et de visualiser le fond (valeur des pixels = 0) et les objets (filaments, flocs) (valeur des pixels = 1). Sur l'image binaire I.3 on applique les opérations d'érosion, de soustraction pour éliminer les flocs de l'image (→**image I.4**). Une discrimination selon la taille est effectuée. Celle-ci permet de distinguer les flocs d'une part

(→**image I.5**), les petit débris et les filaments d'autre part (→**image I.6**). L'identification des filaments est basée sur la taille et le rayon de giration (r_g) de chaque élément.

$$r_g = \frac{\sqrt{M_{2X}+M_{2Y}}}{D_{eq}/2}$$

M_{2X} et M_{2Y} sont les moments d'ordre 2 de l'élément considéré. Le diamètre équivalent des flocs (diamètre d'un disque de surface égale à la surface du floc) est déterminé par la relation suivante :

$$D_{eq} = 2\sqrt{\frac{S}{\pi}},$$

où S est la surface projetée des flocs.

Les éléments dont la surface est supérieure à 20 pixels et dont le rayon de giration est supérieur à 1,1 sont considérés comme des filaments. Chaque filament est squelettisé, c'est-à-dire qu'il est réduit à un pixel d'épaisseur. Cette approche permet de calculer la longueur des filaments par le calcul du nombre de pixels des squelettes.

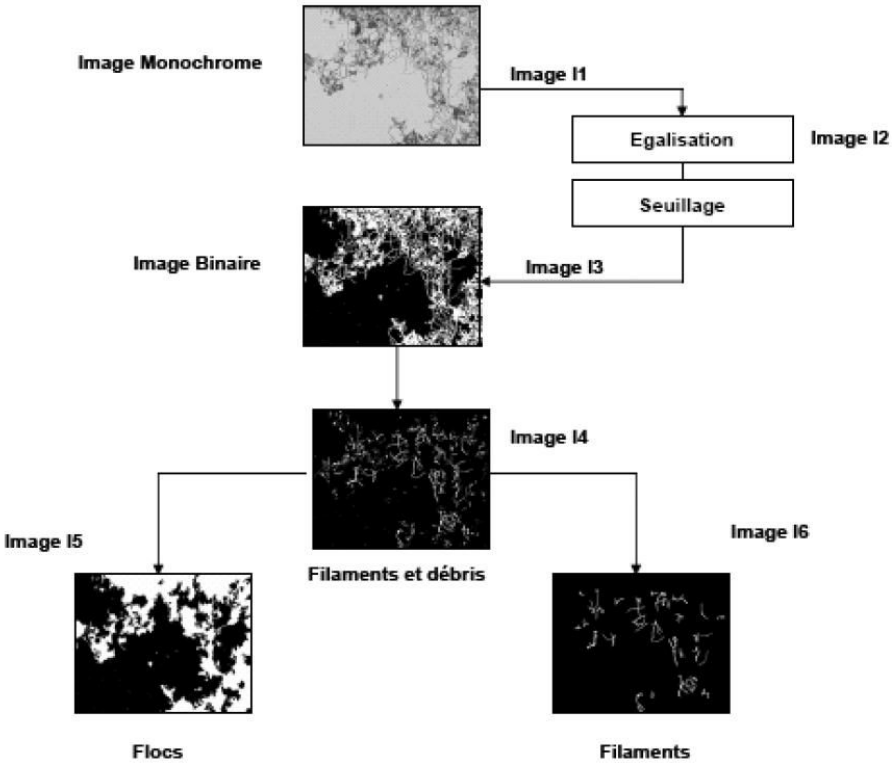


Figure 2-9 : Les étapes du programme « Flocs_sec »

2.4.3 Coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique qui aide à l'identification des espèces de bactéries. Les bactéries dites à Gram positif (G_+) possèdent une paroi cellulaire formée par une couche épaisse de peptoglycane, tandis que pour les bactéries à Gram négatif (G_-) cette couche est moins épaisse et recouverte d'une membrane externe. Le cristal violet traverse les parois de toutes les bactéries et colore en violet leur cytoplasme. Après mordançage par du Lugol, les bactéries sont décolorées plus rapidement pour les Gram négatives que pour les Gram positives. Après la deuxième coloration par la safranine les bactéries Gram négatives deviennent roses. L'utilisation de la coloration de Gram requiert une certaine pratique. Les réactifs doivent être frais (3 – 6 mois), et si possible, être testés avec des cultures pures de bactéries dont on connaît les caractéristiques Gram. Les gros flocs denses qui ne sont pas complètement décolorés sont ignorés dans le traitement des images. Les différentes manipulations avec la coloration de Gram ont été réalisées avec un KIT GRAM- HÜCKER RAL®. Ce kit contient les trois solutions suivantes :

Solution N° 1 :
- Violet de cristal 2g
- Ethanol à 95%, 10 mL
- Oxalate d'ammonium 0,8 g
- Eau déminéralisée 80 mL

Solution N° 2 :
- Iodure de potassium 2 g
- Iode 1 g
- Eau déminéralisée 300 mL

Solution N° 3 :
- Safranine O : (2,5 % dans éthanol à 95 %) 10 mL
- Eau déminéralisée 100 mL

La procédure que l'on utilise est la suivante :

- Fixer 100 µL de boue sur une lame à chaleur douce.

- Appliquer la solution N° 1 pendant une minute, rincer à l'eau distillée.

- Appliquer la solution N° 2 (30 secondes à une minute), rincer à l'eau distillée.

- Incliner légèrement la lame et décolorer partiellement avec de l'éthanol à 95% (goutte à goutte pendant 20 secondes environ).

- Appliquer la solution N° 3 (10 secondes à une minute), rincer et sécher.

L'observation est réalisée à un grandissement γ de 250 X avec de l'huile à immersion sur un microscope Dialux 20 (Leitz, Solms, Allemagne) équipé d'une caméra couleur Sony 3CCD Exwave™ HAD. CCD fait référence à Charge-Coupled Device, un capteur électronique photosensible servant à convertir un rayonnement électromagnétique (UV, visible ou IR) en

un signal électrique analogique. Ce signal est ensuite amplifié, puis numérisé par un convertisseur analogique-numérique et enfin traité pour obtenir une image numérique.

2.4.4 Le marquage de viabilité BacLight™

Le kit Live/Dead® BacLight™ a été utilisé en suivant la notice fournie par le constructeur (Molecular Probes (2004)). Le kit est basé sur l'intégrité membranaire et permet de différencier les bactéries vivantes des bactéries moribondes. 1,5 µL de la solution d'iodure de propidium sont mélangés à 1,5 µL de la solution de SYTO®9 dans un eppendorf® recouvert d'aluminium (pour protéger les fluorophores de la lumière), un 1 mL d'eau de ville est ajouté dans l'eppendorf®. Cela constitue la solution de travail pour les micro-réacteurs de contrôle qui peut être conservée quelques jours. Pour les micro-réacteurs contenant de l'érythromycine le même protocole est suivi mais à la place des 1 mL d'eau de ville on utilise une solution d'érythromycine (dont la concentration en érythromycine est 2 fois supérieure à la concentration finale du micro-réacteur). Dans le cas de l'utilisation d'une « µ-Slide » (ibidi), on introduit 10 µL de boues activées dans un puits puis 10 µL de la solution contenant les fluorophores (et l'érythromycine dans le cas des réacteurs avec érythromycine). Dans le cas de l'utilisation des chambres Lab-Tek® on utilise des volumes 10 fois supérieurs (100 µL de la solution contenant les fluorophores et 100 µL de boues activées). Les observations ont commencé 15 minutes après le marquage afin de laisser le temps aux fluorophores de marquer les cellules. La Figure 2-10 présente les spectres d'excitation et d'émission des deux fluorophores du kit bacLight™

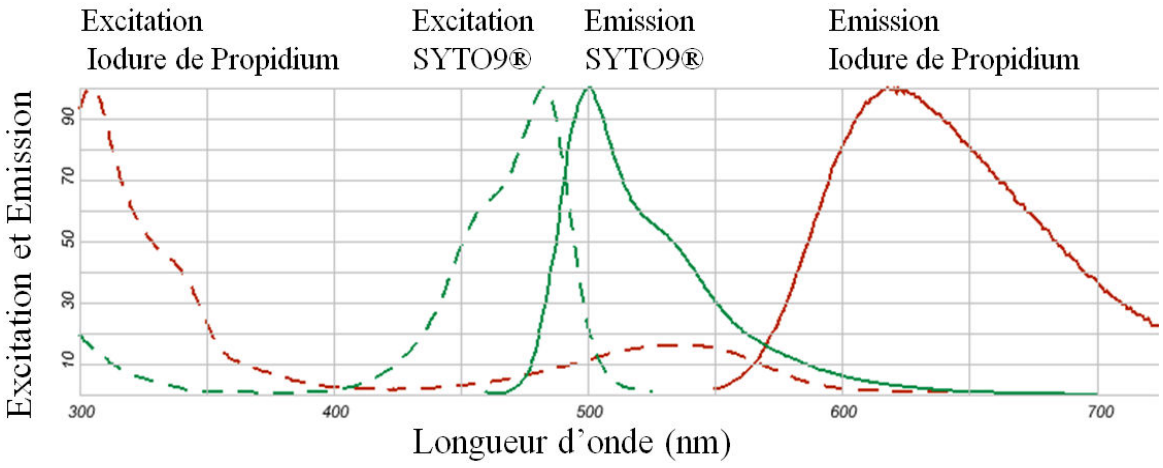


Figure 2-10 : spectres d'excitation et d'émission pour l'iodure de propidium et le SYTO9® (en pourcentage par rapport à la valeur maximale)

2.4.5 Analyse des images marquage BacLight™

La procédure d'analyse d'image développée par Lopez et al. (2005) a été utilisée. Le pourcentage de cellules viables et cellules endommagées a été calculé avec le pourcentage de pixels verts ou rouges contenus dans la zone définie par la silhouette de la biomasse. Un pixel est considéré comme coloré lorsque son niveau de vert (G) ou de rouge (R) est plus grand que ε où ε, caractérise le niveau de couleur du fond. Un pixel est considéré comme en vert lorsque $\varepsilon \leq R < G$ ou rouge quand $\varepsilon \leq G < R$. Cette procédure a été utilisée pour la microscopie à épifluorescence et la macroscopie confocale. Les images réalisées avec le microscope à épifluorescence ont été analysées uniquement associée à des images sur fond clair. Des images en lumière transmise ont été utilisées pour obtenir la silhouette de la biomasse par seuillage automatique. Cette procédure a été jugée comme plus précise pour obtenir la silhouette biomasse. En fait l'iodure de propidium marque les bactéries aux membranes endommagées, mais les cellules mortes éclatent complètement après un certain temps. Par conséquent, elles ne peuvent plus être observées avec l'iodure de propidium, en particulier avec la microscopie à épifluorescence, où le rapport signal/bruit est inférieur à celui obtenu avec la microscopie confocale. La Figure 2-11 présente l'évolution du marquage BacLight™ au cours du temps en présence d'érythromycine. Notez que le fond dans le canal rouge augmente (propidium iodide). Les images ont été stockées sous format TIFF et analysées à l'aide du logiciel Visilog 6,2 (Noesis, Les Ulis, France).

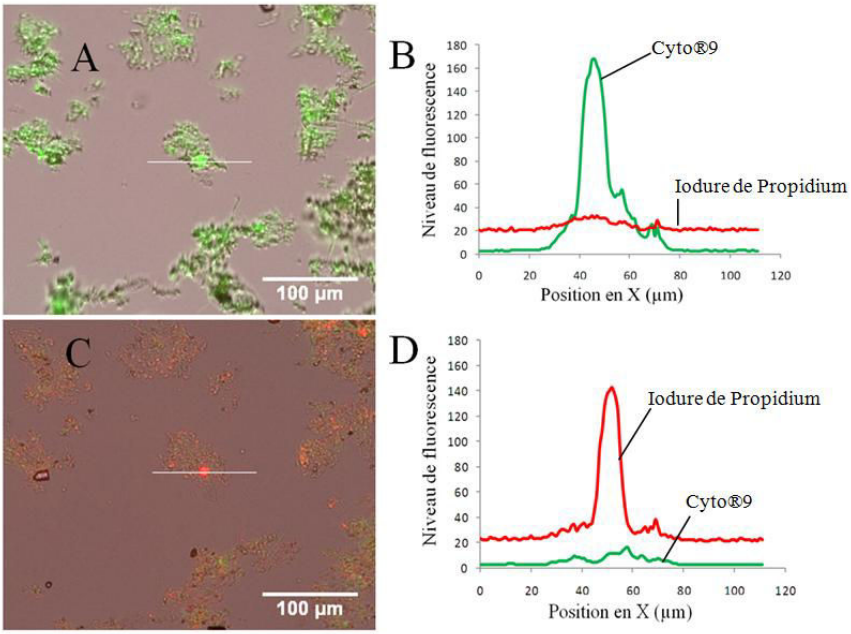


Figure 2-11 : Evolution du marquage de viabilité BacLight ™ lors d'une heure d'observation de boues activées en présence d'érythromycine (5 mg/L). A) images combinées lumière transmise, épifluorescence canal rouge, épifluorescence canal vert t=15 minutes, B) profil d'intensité de fluorescence sur le segment blanc tracé au centre de l'image A, C) images combinées lumière transmise, épifluorescence canal rouge, épifluorescence canal vert t= 1 heure, D) profil d'intensité de fluorescence sur le segment blanc tracé au centre de l'image C.

2.4.6 Marquage combiné Gram et viabilité (ViaGram Red$^+$ Bacterial Gram Stain and Viability Kit)

Le kit ViaGram ™ a été utilisé conformément aux instructions du fabricant (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Ce kit fournit un protocole de coloration fluorescente qui différencie de nombreuses espèces bactériennes en fonction de leur type Gram et en même temps permet de discriminer les cellules moribondes sur la base de l'intégrité de leur membrane plasmique. Le kit contient trois réactifs: deux sondes nucléiques pour la détermination de la viabilité et une agglutinine de germe de blé (Texas Red X_{CWGA}) pour la détermination du type Gram (fluorescence rouge pour les bactéries Gram$^+$). Les bactéries dont les membranes cellulaires sont intactes sont marquées par la sonde 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), alors que les bactéries ayant leurs membranes endommagées sont marquées à la fois par le DAPI (fluorescence dans le bleu) et le SYTOX ® Green (fluorescence dans le vert). S'il n'y a pas d'acides nucléiques dans l'eau du milieu, le fond des images reste non fluorescent. En effet, lorsque le DAPI est lié à des polynucléotides sa fluorescence s'accroit considérablement (Kaspuscinski et Wlodzimierz, 1979). C'est également le cas pour le SYTOX ® selon Roth (1997). 4 µL de la solution SYTOX ®Green

+ DAPI ont été mélangés avec 4 µL de Texas $RedX_{CWGA}$ et 1 mL d'eau de ville dans un eppendorf® recouvert d'aluminium (pour les micro-réacteurs avec de l'érythromycine, l'eau a été enrichie avec de l'érythromycine à une concentration égale à 20 mg / L). 100 µL de boues activées non diluées ont été mélangés avec 100 µL de la solution contenant les sondes dans une chambre pour microscopie lab-tek®. Les observations ont commencé 15 minutes après le marquage afin de laisser le temps aux fluorophores de se lier à leur cible. La Figure 2-12 compare la fluorescence du SYTOX® Green à celle de l'iodure de propidium (sonde présente dans le kit BacLight™) pour différents états physiologiques de la bactérie *E. coli*.

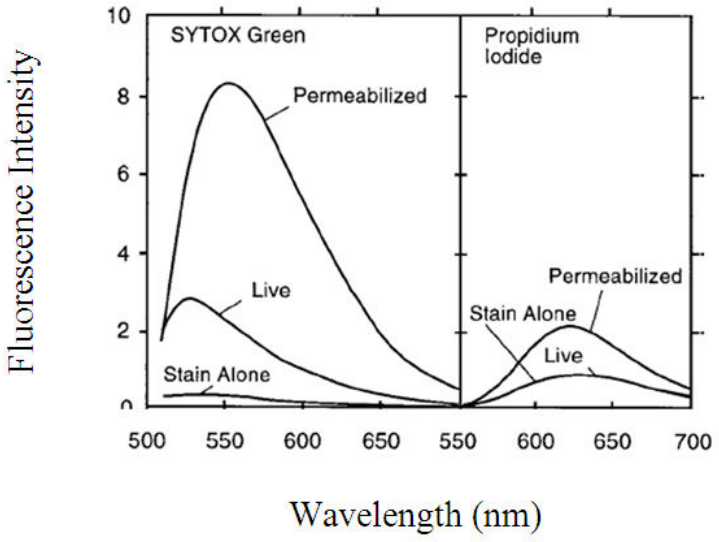


Figure 2-12 : fluorescence du SYTOX® Green comparée à celle de l'iodure de propidium pour différents états physiologiques de la bactérie ***E. coli***. D'après Roth (1997)

2.4.7 Analyse des images ViaGram™

Les images sont au départ sur 4096 niveaux de gris. Le traitement consiste, après avoir ramené les niveaux de gris entre 0 et 256 en divisant par 16, à déterminer le mode de l'histogramme (il correspond au niveau de gris du fond), à sélectionner le seuil ad hoc par analyse de l'histogramme entre le mode et 256 selon l'algorithme d'entropie (Russ, 1995) puis à compter le nombre de pixels supérieurs à ce seuil (ou à ces seuils quand on regarde les combinaisons de pixels simultanément significativement rouges et bleus, etc).

2.5 MICROSCOPES CONFOCAUX

2.5.1 Le microscope SP2 Leica

A la différence des microscopes confocaux proposés par d'autres fabricants, le microscope SP2 Leica est dépourvu de filtres dichroïques, d'excitation et d'émission afin d'améliorer le taux de transmission du signal d'émission de fluorescence. Cette amélioration passe d'une part par l'utilisation d'un cristal (AOBS) au niveau de l'excitation du laser et d'autre part, par l'utilisation d'un prisme permettant de décomposer et de sélectionner la longueur d'onde d'émission. Pour constituer l'image, un balayage point par point à l'aide d'une irradiation de type laser, est assuré grâce à 2 galvanomètres dans les 2 directions (X et Y). La fréquence de balayage doit permettre d'acquérir le signal de fluorescence le plus rapidement possible. Un déplacement de la surplatine selon l'axe optique (Z) permet l'acquisition des différentes coupes optiques. Des diaphragmes ont pour but d'exclure physiquement le signal lumineux provenant des plans adjacents au plan focal. Ainsi, la lumière émise hors du plan de mise au point n'atteint pas le détecteur et seule la lumière d'émission de fluorescence provenant du plan focal est collectée au niveau du photomultiplicateur (PMT) pour constituer l'image. L'ouverture du diaphragme conditionnera en grande partie la qualité optique de l'image (élimination de la lumière parasite).

2.5.2 Le microscope Olympus FV10i Fluoview

Le microscope Olympus FV10i Fluoview est commercialisé depuis moins d'un an. Il a été construit avec pour idée directrice de faciliter son utilisation. Il est ainsi capable d'effectuer tout seul la mise au point, les réglages (excitation émission) et de placer les gouttes d'eau sur les objectifs sans perdre la prise de vue. De plus, il effectue une cartographie qui donne une vue d'ensemble de l'échantillon à analyser sur laquelle on peut se déplacer par simple click pour observer une zone d'intérêt. On peut enregistrer des positions, y compris dans différents puits et programmer des passages au cours du temps. L'interface du logiciel qui pilote le microscope est facile à prendre en main (Figure 2-13).

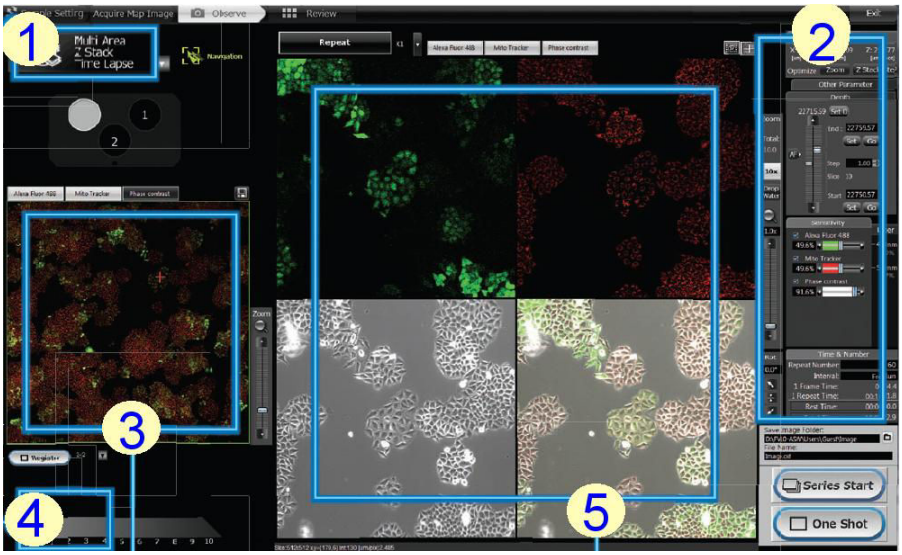


Figure 2-13 : L'interface du logiciel de commande du microscope Olympus fluoview FV10i. 1) sélection du type d'observation (time-lapse, z-stack, z-stack-time-lapse, multi-aera-time-lapse, multi-aera-Z-stack-time-lapse, 2) écran de contrôle (réglage du zoom, focus, puissance laser, sensibilité des photomultiplicateurs, conditions des time-lapse), 3)cartographie (une croix rouge indique la position actuelle, 5) image en temps réel (différents canaux et superposition).

2.5.3 Macroscope Leica TCS LSI

Le macroscope Leica TCS LSI est commercialisé depuis 1 an. C'est le premier macroscope équipé d'une tête confocale. Ce système est adapté pour visualiser des objets de grandes tailles. Comparé à un microscope confocal, le champ de vision peut être très largement supérieur (jusqu'à 2 cm). De plus, le zoom permet de choisir le grandissement idéal pour imager un objet d'intérêt (ce qui n'est pas possible avec un pistolet d'objectifs) (Figure 2-14). Un autre avantage du macroscope est la distance de travail entre le zoom et l'échantillon (Figure 2-15). La limite de ce système est d'offrir une résolution spatiale maximale inférieure à celle d'un microscope.

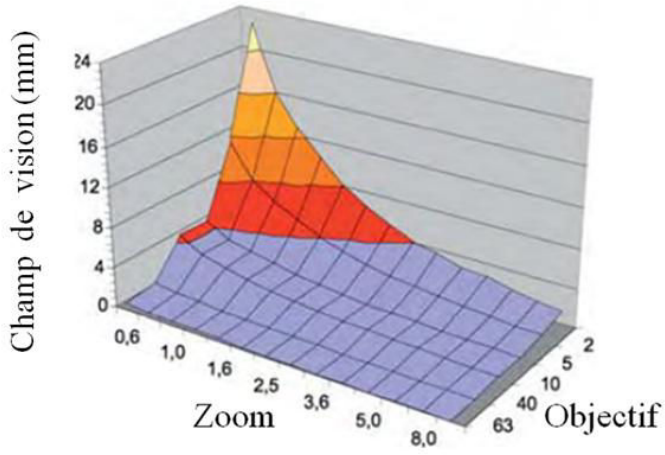


Figure 2-14 : champ de vision en fonction du zoom et de l'objectif pour le macroscope TCS LSI (source Leica microsytem)

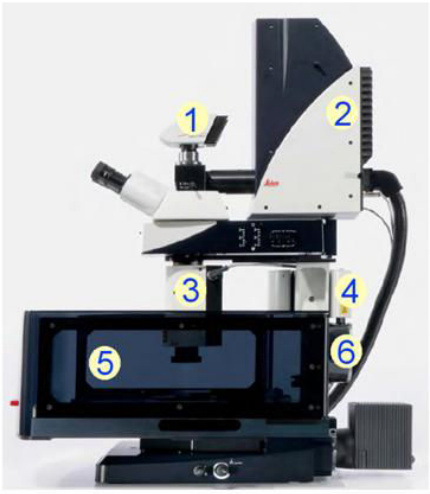


Figure 2-15 le macroscope Leica TCS LSI ; 1) DFC camera, 2) tête confocale, 3) Zoom (motorisé), 4) moteur (focus), 5) chambre de protection contre les rayons laser, 6) échangeur de chaleur (source Leica microsytems)

Bibliographie

Pandolfi D. (2005). Caractérisation morphologique et physiologique de la biomasse des boues activées par analyse d'images, Thèse, INPL.

Da Motta M. (2001). Application de l'analyse d'image à la caractérisation de la microfaune de stations d'épuration des eaux usées, Thèse INPL, Nancy.

Ferrée M.A., Shannon A.D. (2001). Evaluation of second derivative UV/visible spectroscopy technique for nitrate and total nitrogen analysis wastewater samples. Water Research. 35, No. (1), 327-332.

Kapuscinski J., Wlodzimierz S., 1979. Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. Nucleic Acids Res. 6, 3519-3534

Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., Millard, P. J. (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2421-2431.

Pons M.N., Le Bonté S., Potier O. 2004. Spectral analysis and fingerprinting for biomedia characterisation. Journal of Biotechnology 113, 211–230.

Molecular Probes. 2001. ViaGram Red^{+} Bacterial Gram Stain and Viability Kit (V-7023) product information. MP 07022

Molecular Probes. 2004. BacLight^{TM} Bacterial Stains. Product information. 3p.

Russ, C.R., The Image Processing handbook, CRC Press, Boca Raton.

Chapitre 3

3 Conséquences négatives de l'érythromycine sur l'épuration et la structure des flocs de boues activées

Extrait de:

Louvet J.N, Giammarino C., Potier O., Pons M.N., (2010). Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge. Environmental Pollution 158, 688–693

Ce chapitre présente les variations de l'effet de l'érythromycine sur l'épuration de l'eau en réacteur batch. L'effet est étudié en fonction de la date de prélèvement de la liqueur mixte ainsi qu'en fonction de l'origine des boues (deux stations d'épuration ont été étudiées, celle de Nancy et celle d'Epinal).

Abstract:

This study examines the effects of erythromycin on activated sludge from two French urban wastewater treatment plants (WWTPs). Wastewater spiked with 10 mg/L erythromycin inhibited the specific evolution rate of chemical oxygen demand (COD) by 79% (standard deviation 34%) and the specific $N\text{-}NH_4^+$ evolution rate by 41% (standard deviation 25%). A temporary increase in COD and tryptophan-like fluorescence, as well as a decrease in suspended solids, were observed in reactors with wastewater containing erythromycin. The destruction of activated sludge flocs was monitored by automated image analysis. The effect of erythromycin on nitrification was variable depending on the sludge origin. Erythromycin inhibited the specific nitrification rate in sludge from one WWTP, but increased the nitrification rate at the other facility.

3.1 INTRODUCTION

Due to anthropogenic wastewater discharge, antibiotics are detected in surface and ground water, including untreated drinking water sources (Focazio et al., 2008). This discharge can disturb aquatic ecosystems (Lee et al., 2008, Isidori et al., 2005) and may increase bacterial resistance in activated sludge and the environment (Baquero et al., 2008). However, Al-Ahmad et al. (2009) reported that antibiotics did not favor a multi-resistant bacterium added to activated sludge in a laboratory scale study. Moreover, Richard et al. (2004) have shown that tylosin, a macrolide antibiotic used in veterinary medicine, is non-toxic to freshwater macrophytes. Human antibiotics are discharged mainly in brown water, which is a mixture of urine, feces and water. Hospital effluents are mainly treated in urban wastewater treatment plants. However, hospitals are minor sources of the pharmaceuticals detected in aquatic environments when compared to non-point emissions from households. Nonetheless, the opportunity to treat hospital effluent should be taken into account (Schuster et al., 2008). Drug manufacturers already treat their concentrated wastewater in their own plants. Examples of antibiotic concentrations in wastewater and river water are presented in Tableau 3-1.

Tableau 3-1 : examples of antibiotic concentrations.

	Antibiotic	Type	Concentrations (μg/L)			Reference
			Median	Min	Max	
Raw urban wastewater influents	Erythromycin-H_2O	Macrolide	0.34	0.07	1.2	Karthikeyan and Meyer, 2006
	Erythromycin-H_2O	Macrolide	0.63	0.47	0.81	Gulkowska et al., 2008
	Erythromycin-H_2O	Macrolide		0.25	1.98	Xu et al., 2007a
	Roxithromycin	Macrolide		0.07	0.16	Xu et al., 2007a
	Clarithromycin	Macrolide	0.11	0.11	0.72	Spongberg and Witter, 2008
	Azithromycin	Macrolide	0.17	0.09	0.38	Göbel et al., 2005
Hospital effluents	Erythromycin-H_2O	Macrolide	0.94		6.11	Yu-Chen Lin and Tsai, 2009
	Sulfamethoxazole	Sulfonamide	1.33		7.35	Yu-Chen Lin and Tsai, 2009
	Ofloxacin	Fluoroquinolone	30	4.9	35.5	Brown et al., 2006
	Lincomycin	Lincosamide		0.3	2	Brown et al., 2006
	Sulfamethoxazole	Sulfonamide	0.8	0.4	2.1	Brown et al., 2006
	Ciprofloxacin	Fluoroquinolone		3	87	Hartmann et al., 1998
Drug manufacture effluents	Erythromycin-H_2O	Macrolide	0.11		7.8	Yu-Chen Lin and Tsai, 2009
	Sulfamethoxazole	Sulfonamide	0.03		1340	Yu-Chen Lin and Tsai, 2009
	Ciprofloxacin	Fluoroquinolone		28,000	31,000	Larsson et al., 2007
	Norfloxacin	Fluoroquinolone		320	390	Larsson et al., 2007
	Enoxacin	Fluoroquinolone		150	300	Larsson et al., 2007
Urban wastewater treatment plant treated effluents	Erythromycin-H_2O	Macrolide			<LOQ[a]	McArdell et al., 2003
	Erythromycin-H_2O	Macrolide			<LOQ[a]	McArdell et al., 2003
	Erythromycin-H_2O	Macrolide		0.11	0.2	McArdell et al., 2003
	Erythromycin-H_2O	Macrolide	0.27	0.09	0.3	Karthikeyan and Meyer 2006
	Sulfamethoxazole	Sulfonamide	0.9	0.37	1.34	Batt et al., 2006
River water	Erythromycin-H_2O	Macrolide	0.034	<LOD[b]	0.044	Gros et al., 2007
	Erythromycin-H_2O	Macrolide			75.5	Lin and Tsai, 2009
	Erythromycin-H_2O	Macrolide	0.46		0.636	Xu et al., 2007b
	Erythromycin-H_2O	Macrolide	0.03		0.423	Xu et al., 2007b
	Azithromycin	Macrolide	0.017	0.009	0.068	Gros et al., 2007
	Sulfamethoxazole	Sulfonamide	0.037	0.022	0.169	Gros et al., 2007

[a] <LOQ: lower than limit of quantification.
[b] <LOD: lower than limit of detection.

Runoff from livestock farms and antibiotic use in fish farming are two other untreated sources of contamination. For reviews of these topics, see Kümmerer (2001, 2009a, 2009b).

Wastewater treatment plants (WWTPs) are expected to eliminate partially micropollutants such as antibiotics. However, WWTPs are constructed mainly with the purpose to remove nitrogen and chemical oxygen demand (COD) and not micropollutants such as antibiotics that can be toxic to their biomass. This toxicity could reduce the chemical oxygen demand (COD) removal rate and the nitrification rate, which are key components of treatment in WWTPs. There is still a lack of data describing the effects of antibiotics on wastewater treatment processes, especially on the COD removal rate inhibition. Moreover, few studies examine the effects of antibiotics on floc morphologies. Halling-Sørensen (2001) reported that antibiotics, especially those with a broad spectrum of activity, were toxic to activated sludge. However, when the toxicological effects of tylosin were investigated, an increase in nitrification was reported.

Erythromycin is a bacteriostatic antibiotic macrolide widely used in human medicine (principally in ambulatory care), as well as by farmers to control bacterial diseases and promote animal growth. With regard to environmental contamination, erythromycin A was more frequently detected in 139 United States stream sites than 21 other veterinary and

human antibiotics (Kolpin et al., 2002). Due to its widespread use and frequent environmental detection, this study uses batch toxicity tests to assess the effects of erythromycin on activated sludge.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Reactor preparation

Four identical batch reactors (3-L working volume) were used to study the effects of erythromycin. Samples of sludge were obtained from the following two urban WWTPs located in Northeast France: Epinal WWTP (60,000 person-equivalents) and Nancy WWTP (350,000 person-equivalents). Sludge samples were aerated using an air diffuser placed at the bottom of each batch reactor. The WWTPs have different activated sludge processes. The Epinal WWTP uses an oxidation ditch with no primary settling, while the Nancy WWTP uses a hybrid system of activated sludge and biofilm on sand particles. At the beginning of the experiment, each reactor was filled with 1 L of activated sludge. One reactor was exclusively used as a control system, and 2 L of raw wastewater containing no erythromycin was added to sludge in this reactor. The other reactors contained 2 L of raw wastewater spiked with erythromycin (CAS 114-07-8; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) to a final concentration ranging from 0.1-20 mg/L.

We focused mainly on a 10 mg/L erythromycin concentration in order to study sample date variability caused by changes in the biomass characteristics of the WWTPs. Furthermore, we did not adhere strictly to the ISO 9509:2006 recommendations for inhibition tests on nitrifying bacteria because real wastewater was used to make the experiment as realistic as possible.

3.2.2 Sample and wastewater measurements

Reactors were monitored for 24 hours. Samples were regularly taken from the reactors, with each reactor being sampled at least once per hour during the first 8 hours of the experiment. After filtration (paper filter pore size ≈ 1.5 µm), ammonia levels were determined in a part of the sample applying Hach Nessler Method 8038 on a Hach DR/2400 spectrophotometer (Hach Co., Colorado, USA) (error ± 0.5 $N\text{-}NH_4^+$ mg/L). Spectroscopic analysis was conducted on the remaining volume of sample by applying 1) ultraviolet (UV)-visible spectroscopy (Anthelie Light, Secomam, Domont, France) measuring light absorbance

between 200 and 600 nm using 1-cm-path quartz cuvettes; and 2) synchronous fluorescence spectroscopy (FL-2500, Hitachi Corp., Tokyo, Japan). Absorbance at 254 nm was used to monitor dissolved COD (Pons et al., 2004). The tryptophan-like fluorescence at an excitation wavelength of 280 nm and an emission wavelength of 330 nm made it feasible to monitor the fate of soluble organic nitrogen. Nitrite and nitrate were measured by ion chromatography (Dionex, Voisins-le Bretonneux, France) (error ± 1 mg $N\text{-}NO_3^-$/L). Suspended solids were obtained after filtration (pore size = 0.45 µm) of 10 mL of mixed liquor (i.e., microorganism population) and by drying at 105 °C for 24 hours.

3.2.3 Removal rate and inhibition calculations

The specific evolution rates of the COD and nitrogen to ammonium ($N\text{-}NH_4^+$) as well as the specific nitrification rates were calculated during the first 4 hours of the experiment as follows:

Specific $N\text{-}NH_4^+$ evolution rate = d ($[N\text{-}NH_4^+]$) / dt / suspended solid, where t = time;
Specific COD evolution rate = d ([COD]) / dt / suspended solid; and
Specific nitrification rate = d ($[N\text{-}NO_2^-] + [N\text{-}NO_3^-]$) / dt / suspended solid, with nitrite ($N\text{-}NO_2^-$) in mg N/L and nitrate ($N\text{-}NO_3^-$) in mg N/L.
The degree of inhibition was calculated as:
Percent inhibition = $(rate_{control} - rate_{erythromycin\ reactor}) / rate_{control} \times 100$.
Evolution rates represent concentration variations and are not equivalent to removal rates. For instance, the $N\text{-}NH_4^+$ evolution rate is not equivalent to the $N\text{-}NH_4^+$ removal rate. The $N\text{-}NH_4^+$ removal rate corresponds only to the $N\text{-}NO_2^-$ production rate ($NH_4^+ + 3/2\ O_2 \rightarrow NO_2^- + 2\ H^+ + H_2O$), whereas the $N\text{-}NH_4^+$ evolution rate also depends on $N\text{-}NH_4^+$ production from organic nitrogen.

3.2.4 Activated sludge morphology assessment

To conduct a morphological assessment of the activated sludge, a smear of mixed liquor (100 µL) was spread on a glass slide with a wide-bore pipette and air dried. The assessment procedure applied was developed by Da Motta et al. (2001) and adapted to evaluate filament abundance and activated sludge floc sizes. The following parameters were determined: Average total biomass values (flocs + filaments); floc biomass; and filament numbers detected per analyzed field. Slides were examined on a Zeiss axio imager A1 coupled with a Zeiss AxioCam MRn camera (Zeiss, Oberkochen, Germany). Fifty images (1384 x 1036

pixels, 1 pixel = 1,029 μm^2) were taken by systematic examination of the slides (no overlap of fields). All images were analyzed using the standard procedures embedded in the Visilog 5 software (Noésis, Les Ulis, France).

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Removal rates and inhibition

The antibiotic concentrations used in the current work (between 0.1 and 20 mg L^{-1}) might seem large with respect to the levels reported in urban wastewater (Tableau 3-1). However, those concentrations are in the same order of magnitude as antibiotics concentrations in drug manufacture effluents. Moreover, higher concentrations have been previously used for similar assays (Alighardashi et al. 2009, Campos et al. 2001). COD and N-NH_4^+ specific evolution rates were inhibited for sludge samples from both WWTPs. The average specific COD evolution rate in control reactors was -13.5 $mgO_2/(g_{SS} \cdot h)$. The average specific COD evolution rate in reactors containing wastewater spiked with 10 mg/L erythromycin was -3.2 $mgO_2/(g_{SS} \cdot h)$, and the average inhibition was 79% (standard deviation 34%) (Figure 3- and Figure 3-1A).

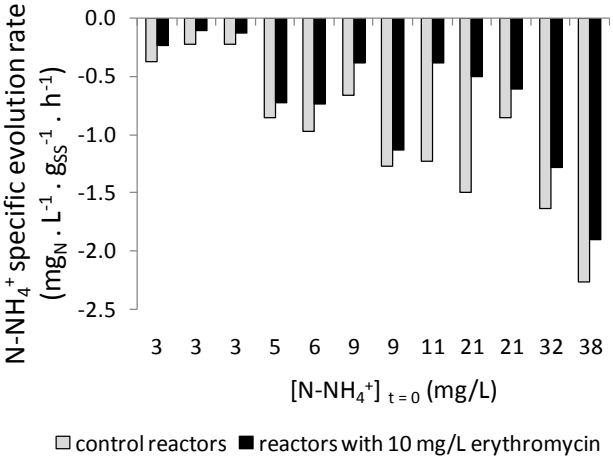


Figure 3-1: Specific N-NH_4^+ evolution rate as a function of the initial N-NH_4^+ concentration in control reactors and reactors containing wastewater spiked with 10 mg/L erythromycin.

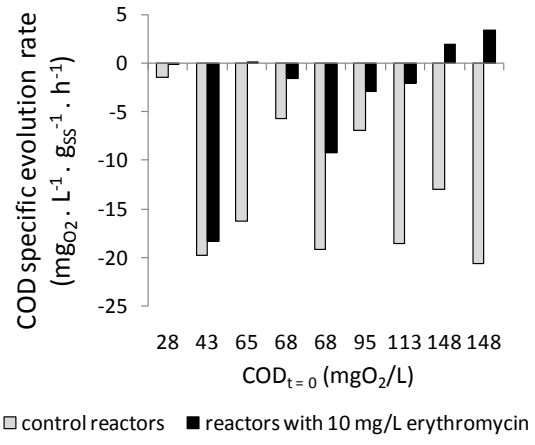


Figure 3-2 Specific COD evolution rate as a function of the initial COD in control reactors and reactors containing wastewater spiked with 10 mg/L.

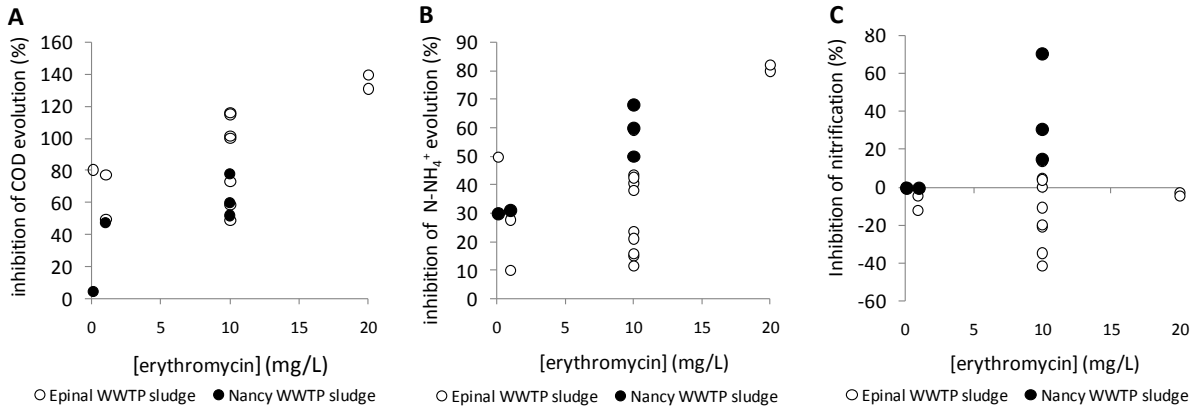


Figure 3-1 : Inhibition of the specific COD evolution rate (A); specific $N\text{-}NH_4^+$ evolution rate (B); and specific nitrification rate (C), all as a function of erythromycin concentration.

The inhibition of the COD evolution rate was caused by the death of bacteria and the release of biomass byproducts in the water. In support of this finding, we measured a temporary increase in COD and tryptophan-like fluorescence in reactors with 10 mg/L erythromycin (Figure 3-2 and Figure 3-3).

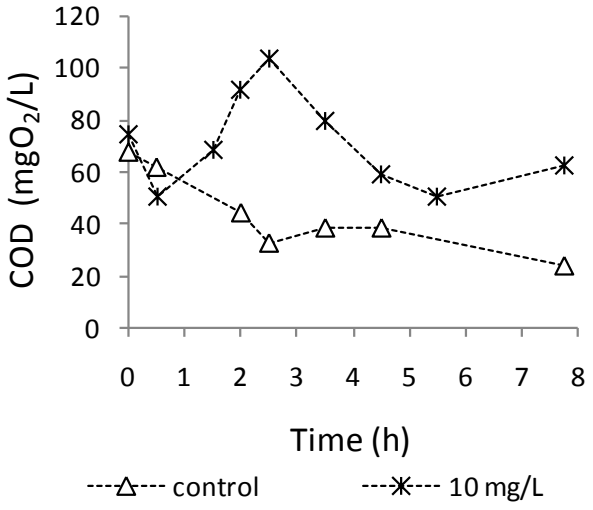


Figure 3-2**:** Example of COD evolution versus time in a control reactor and a reactor containing wastewater spiked with 10 mg/L erythromycin.

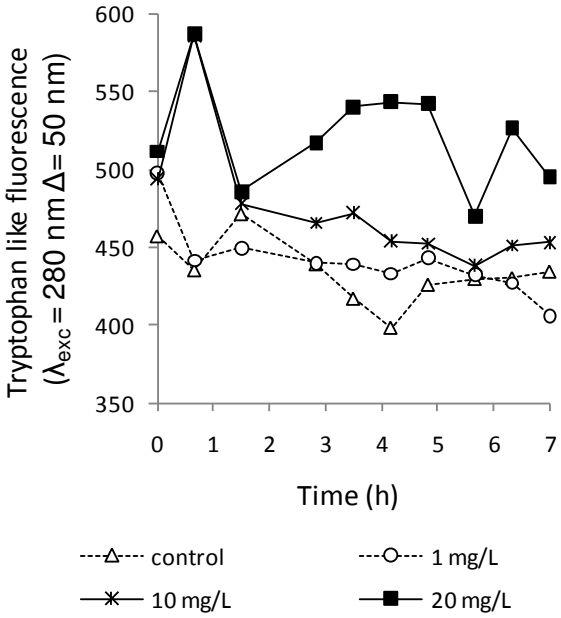


Figure 3-3**:** Example of evolution of tryptophan like fluorescence versus time as a function of erythromycin concentration (control, 1 mg/L, 10 mg/L and 20 mg/L).

The average N-NH_4^+ specific evolution rate in control reactors was -0.94 mgN·L^{-1}·gSS^{-1}·h^{-1}.

This rate depended on initial N-NH_4^+ concentrations in the wastewater ([N-$NH_{4\,t=0}^+$]) consistent with Monod kinetics. The average N-NH_4^+ specific evolution rate in reactors with 10 mg/L of erythromycin was -0.62 mgN/(g_{SS}·h). The average N-NH_4^+ specific evolution rate inhibition was 40% (standard deviation 25%) (Figure 3-1**:** Specific N-NH_4^+ evolution rate as a function of the initial N-NH_4^+ concentration in control reactors and reactors containing wastewater spiked with 10 mg/L erythromycin.

Figure 3- and 3-3b). The observed increase in N-NH_4^+ concentrations started within 10 minutes of erythromycin-spiked wastewater being added to the reactors (Figure 3-4A and Figure 3-5A).

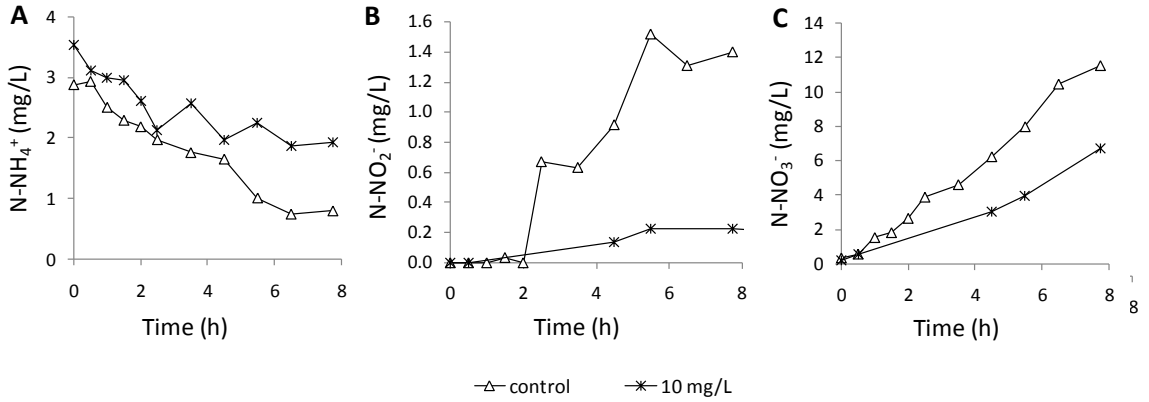


Figure 3-4 : Example of N-NH_4^+, N-NO_2^- and N-NO_3^- concentration over time as a function of erythromycin concentration (control, 10 mg/L) for the Nancy WWTP sludge.

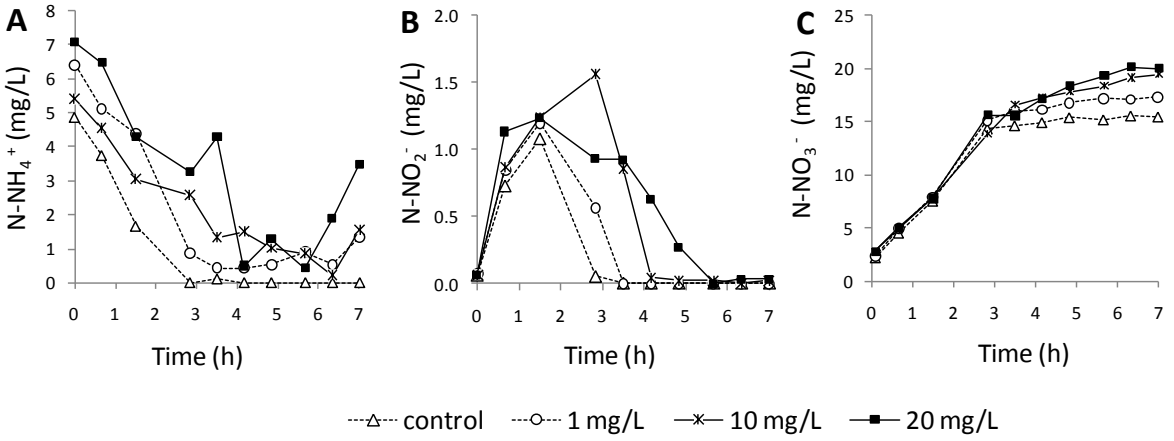


Figure 3-5 : Example of N-NH_4^+, N-NO_2^- and N-NO_3^- concentration over time as a function of erythromycin concentration (control, 1 mg/L, 10 mg/L and 20 mg/L) for the Epinal WWTP sludge.

In most cases, the specific nitrification rate was promoted in Epinal WWTP sludge containing erythromycin, whereas nitrification rates were inhibited in erythromycin-spiked sludge from the Nancy WWTP. Alighardashi (2009) observed inhibition of nitrification of Nancy WWTP

sludge. Consistent with these results, we measured an average specific nitrification rate inhibition of 38% in the Nancy WWTP reactors with 10 mg/L erythromycin (Figure 3-1C and Figure 3-4). For Epinal WWTP sludge, the average specific nitrification rate in control reactors was 1.4 mgN/(g_{SS}·h). The average specific nitrification rate in reactors with 10 mg/L of erythromycin was 1.6 mgN/(g_{SS}·h), representing a -12% inhibition, with erythromycin accelerating nitrification. For Epinal WWTP sludge, the specific nitrification rates were higher in the reactors with erythromycin, and this was most evident at the end of the experiment (Figure 3-1 and Figure 3-5). Indeed, some nitrogen from the destroyed biomass was nitrified. This may explain observations by Halling-Sørensen (2001) of an increase in nitrification associated with tylosin antibiotic. Halling-Sørensen also stresses that the nitrogen cycle warrants further study. A summary of $N\text{-}NH_4^+$ and DCO evolution rate as a function of erythromycin concentration and activated sludge origin is presented Table 3-2.

Tableau 3-2 : summary of $N\text{-}NH_4^+$ and DCO evolution rate as a function of erythromycin concentration and activated sludge origin.

	activated sludge from Epinal WWTP			activated sludge from Nancy WWTP		
Erythromycin (mg/L)	$N\text{-}NH_4^+$ evolution rate (mg N/(gSS.h))	DCO evolution rate (mgO2/(gSS.h))	Number of experiments	$N\text{-}NH_4^+$ evolution rate (mg N/(gSS.h))	DCO evolution rate (mgO2/(gSS.h))	Number of experiments
0	-1.1	-12.0	(n=10)	-0.5	-18.9	(n=3)
0.1	-0.5	-1.3	(n=1)	-0.05	-17.76	(n=1)
1	-0.7	-3.6	(n=2)	-0.04	-9.33	(n=1)
10	-0.8	-2.5	(n=10)	-0.2	-6.9	(n=3)
20	0.0	2.9	(n=2)			

Our study showed that the differences in nitrification rate inhibition depended on the origin of the sludge. While variability with respect to the sampling date for each plant was evident, no differences of behavior of the sludge between summer experiments and winter experiments could be established for the 10 replicates with sludge from Epinal. The difference in behavior could be related to the nature of the raw wastewater or to the treatment process, but this conclusion requires further investigation.

3.3.2 Biomass destruction by erythromycin

In reactors containing wastewater spiked with erythromycin, biomass transfer to a foam layer was observed immediately at the start of the experiment. Measurement of suspended solids confirmed this biomass loss. Deterioration of activated sludge could be monitored by image analysis; the mean surface of flocs decreased because flocs were divided before disappearing

(Figure 3-6A and Figure 3-6B). An example of the evolution of mean surface of activated sludge flocs is presented (Figure 3-6C). Brightfield microscopic image analysis was found to be a sensitive parameter to study directly the antibiotic toxicity to sludge. Microscopic studies, should be done when studying antibiotics toxicity to activated sludge. Fluorescence microscopy could be an interesting tool (Lopez el al. 2005).

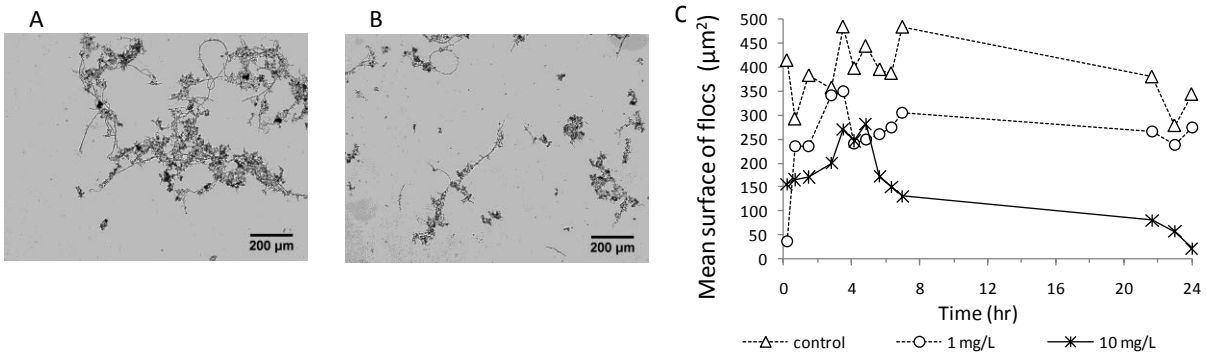


Figure 3-6 : Example of activated sludge floc images (from Epinal sludge) at the beginning of the experiment (A) and after 1 hr 40 min (B) in a reactor containing wastewater spiked with 10 mg/L erythromycin. The image analysis procedure enabled measurement of the evolution of the mean surface of flocs over time as a function of erythromycin concentration (control, 1 mg/L and 10 mg/L) (C).

3.4 CONCLUSIONS

Erythromycin was toxic to activated sludge from two French urban WWTPs. Erythromycin destroyed flocs and reduced the specific COD and N-NH_4^+ evolution rates. The effect of erythromycin on nitrification was variable and depended on the sludge origin. Biomass defloculation could promote the environmental release of bacteria or antibiotic-resistant genes possibly acquired by bacterial species in the WWTP. Examination of other WWTP sludge is needed to further elucidate the underlying reasons for variability in the behavior of biomass containing erythromycin.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support of ANR (Project ANTIBI-EAU ANR-07-BLAN-0195-02), Zone Atelier Moselle (ZAM) and CPER (Lorraine).

References

Al-Ahmad A., Haiβ A. Unger J., Brunswick-Tietze A. Wiethan J., Kümmerer K., 2009. Effects of a realistic mixture of antibiotics on resistant and nonresistant sewage sludge bacteria in laboratory-scale treatment plants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 57, pp264-273.

Alighardashi A., Pandolfi D., Potier O., Pons M.N., 2009. Acute sensitivity of activated sludge bacteria to erythromycin. Journal of Hazardous Materials. 172(2-3), 685-692..

Baquero, F., Martinez, J.L,, Canton, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion in Biotechnology 19, pp 260-265.

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. Environmental Pollution 142, pp 295-302.

Brain, R. A., Bestarie, K. J., Sanderson, H., Hanson, M. L., Wilson, C. J., Johnson, D. J., Sibley, P. K., Solomon, K. R. 2005. Aquatic microcosm assessment of the effects of tylosin on *Lemna gibba* and *Myriophyllum spicatu*. Environmental Pollution 133, pp 389-401.

Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H., Mawhinney, D. B., 2006. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. Science of the Total Environment 366, pp. 772-783.

Da Motta, M, Pons, M.N., Roche, N, Vivier, H., 2001. Characterization of activated sludge by automated image analysis. Biochemical Engineering Journal 9, pp 165-173.

Focazio, M. J., Kolpin, D. W., Barnes, K. K., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Thurm, M., 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — II) Untreated drinking water sources. Science of the Total Environment 402, pp. 201-216.

Campos J. L., Garrido, J., Méndez, M. R., Lema, J. M., 2001. Effect of two broad-spectrum antibiotics on activity and stability of continuous nitrifying system, Applied Biochemistry and Biotechnology. 95 pp 1–10.

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, pp 3981-3989.

Gros, M., Petrović M., Barceló D., 2007. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northeast Spain). Environmental Chemistry, 26, pp 1553-1562.

Gulkowska, A. Leung, H. W., So M. K., Taniyasu S., Yamashita N., W.Y. Yeung L., Richardson B. J., Lei A.P., Giesy J.P., Lam K.S. P., 2008. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. Water Research 42, pp 395-403.

Halling-Sørensen, B, 2001. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 40, pp 451-460.

Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T., Widmer, R.M., 1998. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. Environmental Toxicology and Chemistry, 17 pp. 377–382.

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A., 2005: Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. Science of the Total Environment 346, pp 87-98.

ISO 9509:2006 Water quality –Toxicity test for assessing inhibition of nitrification of activated sludge microorganisms.

Karthikeyan, K.G., Meyer, M.T., 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. Science of the Total Environment 361, pp 196-207.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.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. Environmental Science and Technology 36, pp 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, pp 957-969.

Kümmerer, K., 2009a. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere 75, pp 417-434.

Kümmerer, K., 2009b. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. Chemosphere 75, pp 435-441.

Larsson, DGJ, de Pedro, C, Paxeus, N., 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. Journal of Hazardous Materials 148, pp. 751-755.

Lee, Y.J., Lee, S.E., Lee, D.S. and Kim, Y.H., 2008. Risk assessment of human antibiotics in Korean aquatic environment. Environmental Toxicology and Pharmacology 26, pp 216-221.

Lopez, C., Pons, M.N., Morgenroth, E., 2005. Evaluation of microscopic techniques (epifluorescence microscopy, CLSM, TPE-LSM) as a basis for the quantitative image analysis of activated sludge. Water Research 39, pp 456-468.

McArdell, C. S., Molnar, E., Suter, M. J. F., Giger, W., 2003. Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the GlattValley Watershed, Switzerland. Environmental Science and Technology 24, p 5479-5486.

Pons M.N., Le Bonté S., Potier O., 2004. Spectral analysis and fingerprinting for biomedia characterization. Journal of Biotechnology 13, pp. 211-230

Schuster, A., Hädrich, C., Kümmerer, K., 2008. Flows of Active Pharmaceutical Ingredients Originating from Health Care Practices on a Local, Regional, and Nationwide Level in Germany—Is Hospital Effluent Treatment an Effective Approach for Risk Reduction? Water, Air, and Soil Pollution 8, pp. 457–471.

Spongberg, A. L., Witter, J. D., 2008. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. Science of the Total Environment 397, pp 148-157.

Xu, W, Zhang, G., Li, X., Zouc, S. Lia P., Hua, Z., Lia J., 2007a Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. Water Research 41, pp 4526-4534.

Xu, W.H., Zhang, G., Zou S.C., Li, X.D., Liu, Y.C., 2007b. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Environmental Pollution 145, pp 672-679.

Yu-Chen L. A. and Tsai Y.T., 2009. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. Science of the Total Environment 407, pp 3793–3802.

Chapitre 4

4 Effet toxique de l'érythromycine sur les boues activées : Expériences en réacteurs batch et utilisation de techniques microscopiques (épifluorescence, et microscopie confocale)

Extrait de:

Assessment of erythromycin toxicity on activated sludge via batch experiments and microscopic techniques (epifluorescence and CLSM)

Process Biochemistry, In Press, Corrected Proof, Available online 7 April 2010

Jean-Noël Louvet, Yannick Heluin, Ghania Attik, Dominique Dumas, Olivier Potier, Marie-Noëlle Pons

Ce chapitre présente l'effet de faibles concentrations d'érythromycine lorsque le temps d'exposition est prolongé jusqu'à 5 jours. De plus, des chambres pour microscopie ont été utilisées comme micro-réacteurs et l'usage de la microscopie au cours du temps (confocale et à épifluorescence) combinée à des marqueurs de viabilité fluorescents a permis de déterminer les vitesses de mortalité.

Abstract:

This study investigates erythromycin toxicity toward activated sludge as a function of exposure time and antibiotic concentration. Batch experiments were conducted and microscopic techniques ranging from brightfield microscopy to epifluorescence and confocal laser scanning microscopy (CLSM), combined with a fluorescent viability indicator (*BacLight*® Bacterial Viability Kit, Molecular Probes), allowed us to study erythromycin time-kill activity. The erythromycin toxicity was observed at lower concentration when exposure time increased. A 4 µg/L erythromycin concentration was toxic to heterotrophic bacteria on a 5-day time exposure, and a 0.5 mg/L concentration inhibited nitrification. These findings are in agreement with the microscopic studies, which showed a latency time before the lower antibiotic concentrations began to kill bacteria. Microscope slide wells were used as micro-reactors in which erythromycin concentration ranged from 0.1 to 1 mg/L. After 45 minutes there were 94 % (SD 3.8) of living bacteria in control micro-reactors, 67 % (SD 3.1) in micro-reactors that contained 0.1 mg/L erythromycin and 37 % (SD 18.6) in micro-reactors that contained 1 mg/L erythromycin. CLSM allowed visualization of isolated stained cells in the three-dimensional structure of damaged flocs.

4.1 INTRODUCTION

Antibiotics for human use are partially metabolized [1], and the excess is excreted with metabolites into brown water before being transported to wastewater treatment plants (WWTP) by sewage. Due to their incomplete removal from the aqueous phase in WWTPs, antibiotics are detected in surface and ground water, including in untreated drinking water sources [2]. Runoff from livestock farms and antibiotic use in fish farming are two other sources of contamination.

The discharge of antibiotics and their residues can disturb aquatic ecosystems [3, 4], and may increase bacterial resistance in water environments [5]. Whether resistance may develop in WWTP is currently under discussion [6, 7]. However most WWTPs focus on bacterial activity, and are not designed to cope with antibiotics that can be toxic to their biomass. This toxicity can reduce chemical oxygen demand (COD) removal and nitrification, which are key processes in WWTPs. Besides influent and effluent characteristics, the biomass activity should be monitored, since the bacteria are responsible for pollutant degradation. Microscopy associated with image analysis can help to visualize complex microbial aggregates such as activated sludge flocs [8].

There is still a lack of data describing the effects of antibiotics on wastewater treatment processes, especially when it comes to studying long-term and chronic effects. Nevertheless a few studies have already highlighted the importance of these effects [4, 9]. Tomlison ***et al.*** also reported that chronic toxicity of low concentrations of antibiotics can decrease the WWTP efficiency [9]. Moreover, the opportunity to treat highly concentrated effluent such as hospital [10], livestock and fish farms effluents should also be taken into account. For reviews of these topics, see Kümmerer [6, 11, 12].

Drug manufacturers should normally treat their concentrated wastewater in their own plants. Ciprofloxacin (antibiotic of fluoroquinolone type) was measured up to 87 µg/L in hospital effluent [13] and up to 31 mg/L in a drug manufacture effluent [14]. In urban WWTP minimum macrolide antibiotics concentration vary according to location ranging from 0.07 µg/L to 0.45 µg/L, median concentration vary ranging from 0.11 to 0.63 µg/L, maximum concentrations vary from 0.16 to 1.98 µg/L [15-19]. Erythromycin is a bacteriostatic macrolide antibiotic widely used in human medicine, as well as in farms to control bacterial

diseases and to promote animal growth. Kolpin *et al.* [20] studied 139 United States stream sites and detected erythromycin more frequently than 21 other veterinary and human antibiotics. As most WWTPs rely on bacterial consortium to treat pollution, it seems reasonable to investigate the potential effect of a widely used antibiotic such as erythromycin, on activated sludge. Consequently, this study uses short and long term toxicity tests in batch reactors, and microscopic techniques ranging from brightfield microscopy to epifluorescence microscopy and confocal laser scanning microscopy (CLSM) combined with fluorescent stains, to assess erythromycin toxicity on activated sludge.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Sludge and wastewater origin

In the morning, just before the experiments started, wastewater was collected after grid removal and activated sludge was collected in the recycle line from an urban wastewater treatment plant (Nancy-Maxéville, France, 350,000 person-equivalents). The Nancy WWTP uses a hybrid system of activated sludge and biofilm on sand particles. In this plant, the daily average characteristics of the wastewater are as follows: Chemical Oxygen Demand (COD): 260 mg/L; Biological Oxygen Demand $(BOD)_5$: 120 mg /L; Kjeldahl nitrogen (NTK): 30 mg/L; $N–NH_4^+$: 18 mg/L.

4.2.2 Batch experiments

Two types of experiments were conducted in batch reactors: 30-hour-long experiments and 5-day-long experiments.

4.2.3 Reactor preparation for 30-hour-long experiments

Four identical batch reactors (3 L working volume) were used. Aeration and mixing were provided by an air diffuser located at the bottom of the reactor. At the beginning of each experiment, each reactor was filled with 1 L of fresh activated sludge. One reactor was systematically used as the control, and 2 L of wastewater was added to the sludge. Wastewater (2 L) spiked with erythromycin (CAS 114-07-8 from Sigma–Aldrich) was added

to the other reactors. Different amounts of erythromycin were used in each reactor of a series. The final erythromycin concentration was 0.1 mg/L, 1 mg/L and 10 mg/L. The initial biomass concentration was about 2 g/L (suspended solids). Four replicates were performed at different dates to take into account the variability of the biomass and the wastewater.

4.2.4 Reactor preparation for five-day-long experiments

Those experiments were conducted in eight reactors (500 mL working volume) with a low biomass concentration (about 0.6 g/L of suspended solids). At the beginning of the experiment, each reactor was filled with 50 mL of activated sludge. Two reactors were exclusively used as a control system, and 450 mL of raw wastewater containing no erythromycin was added to sludge in those reactors. The other reactors contained 450 mL of raw wastewater spiked with erythromycin. The final erythromycin concentration ranged from 0.004 to 5 mg/L. Two series of experiments were performed at two dates. In each series two reactors were used for each erythromycin concentration tested (reactor a and reactor b).

4.2.5 Analyses

Samples were taken from the reactors during the experiments and were immediately filtered (paper filter pore size ≈ 1.5 µm) prior to analysis. Ammonium content was determined on a sample aliquot by applying the Hach Nessler Method 8038 on a Hach DR/2400 spectrophotometer (Hach Co., Colorado, USA) (error ± 0.5 $N\text{-}NH_4^+$ mg/L). Spectroscopic analysis was conducted on other sample aliquots by applying (1) ultraviolet (UV)-visible spectroscopy (Anthelie Light, Secomam, Domant, France), measuring light absorbance between 200 and 600 nm using 1-cm-path quartz cuvettes; and (2) synchronous fluorescence spectroscopy (FL-2500, Hitachi Corp., Tokyo, Japan). Absorbance at 254 nm was used to monitor dissolved COD. The tryptophan-like fluorescence at an excitation wavelength of 280 nm and an emission wavelength of 330 nm were used as surrogate measurements of soluble organic nitrogen. Nitrite and nitrate were measured by ion chromatography (Dionex, Voisin-le-Bretonneux, France) (error ± 1 mg/L $N\text{-}NO_3^-$). Suspended solids were obtained after filtration (pore size = 0.45 µm) of 10 mL of mixed liquor and by drying at 105 °C for 24 hours.

4.2.6 Activated sludge morphology assessment via bright-field imaging

To conduct a morphological assessment of the activated sludge, a smear of mixed liquor (100 µL) was spread on a glass slide with a wide-bore pipette and air dried. The assessment procedure applied was developed by Da Motta *et al.* [21], and was adapted to evaluate filament abundance and activated sludge floc sizes. The following parameters were determined: Average total biomass values (flocs and filaments); floc biomass; filament numbers detected per analyzed field; and floc size distribution. Slides were examined on a Zeiss Axio Imager A1 coupled with a Zeiss AxioCam MRn camera (Zeiss, Oberkochen, Germany) at a 10x total magnification. Fifty images (1384 x 1036 pixels, 1 pixel = 1,029 μm^2) were acquired by a systematic examination of the slides (no overlap of fields).

4.2.7 Viability assessment via Live/Dead® *BacLight*™

STAINING

The Live/Dead® *BacLight*™ bacterial viability stain was used according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).The kit provides a two-color fluorescence assay of bacterial viability relying on membrane integrity: viable bacteria are stained by SYTO® 9 and fluoresce green, while damaged bacteria are stained by propidium iodide and fluoresce red. Protocol established by Lopez *et al.* [22] was performed: one milliliter of undiluted biomass suspension was mixed with 3 µL of a mixture of equal parts of SYTO®9 and propidium iodide. This short staining protocol allowed direct observation of the original floc structure and the time-lapse microscopy. No centrifugation or fixation steps were needed. Microscopic observations started 15 min after staining. Excitation maxima for SYTO®9 and propidium iodide bound to DNA are 480 and 540 nm, respectively [20].

EPIFLUORESCENCE MICROSCOPY

Slides were examined on the Zeiss Axio Imager A1. Images were obtained at 100x total magnification (1384 x 1036 pixels, 1 pixel = 1,029 μm^2). For kinetic experiments microscope slide wells (µ-Slide 18 well – flat, Ibidi) were used as micro-reactors in which erythromycin

concentration ranged from 0.1 to 1 mg/L. For each erythromycin concentration tested, three wells were used. Each well contained 20 µl of stained mix liquor. Fluorescence images for the green channel were taken with a blue excitation filter, whereas images for the red channel where taken with a green excitation filter. Bright field images were also grabbed.

CONFOCAL LASER SCANNING MACROSCOPY

For the image series a Leica TCS LSI-AOTF confocal macrosope (Leica Microsystems, Germany) equipped with 488 nm and 532 nm laser diode was used with an HCX x5/0.5. The bandwidth of the detected fluorescence wavelengths has been optimized to uniquely channel the maximum emission in sequential mode to avoid potential cross-talking (502-530 nm for SYTO®9 and 600-630 nm for propidium iodide). Fluorescence emissions were recorded within 1 Airy disk confocal pinhole opening and 1024 x 1024 images at a 1.36 µm (x,y) pixel size were obtained. Instead of selecting a constant step size in the vertical direction, the step size was determined by choosing start and end points in the z-direction of the flocs, and by then selecting a number of optical sections. The resulting voxel depths for the flocs analyzed ranged from 1 to 2 µm.

CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY

For the images series, a Leica TCS SP2-AOBS confocal microscope (Leica Microsystems, Germany) equipped with an acousto-optical beamsplitter, an argon laser (488 nm) and a Helium Neon laser (543 nm) was used with an HCX APO L x40/0.8 NA and 60x/1.2 NA lenses. The bandwidths of the detected fluorescence wavelengths have been optimized for each channel to the maximum emission (502-530 nm for green channel (SYTO9®) and 620-670 nm for red channel (propidium iodide)) with 678-volt and 752-volt photomultiplier gains respectively. All regular acquisitions were collected at 400 Hz sequentially (458 nm / 543 nm) to avoid potential cross-talking. Fluorescence emissions were recorded within an Airy disk confocal pinhole opening and 512 x 512 images at a 0.238 µm (x, y) pixel size were obtained. All the images were stored as TIFF files and analyzed using the procedures developed with Visilog 6.2 software (Noésis, Les Ulis, France).

FLUORESCENCE IMAGE ANALYSIS

The procedure developed by Lopez *et al* [22] was used. The percentage of viable cells and damaged cells was calculated with the percentage of green or red pixels contained in the area defined by the biomass silhouette, respectively. A pixel was considered to be colored when its green (G) and red (R) levels were both larger than ε where ε, characterized the color level of

the background. A pixel was considered as green when $\varepsilon \leq R < G$ or as red when $\varepsilon \leq G < R$. This procedure [22] was used both for confocal laser scanning macroscopy and confocal laser scanning microscopy. Epifluorescence images were analyzed only combined with bright-field images; bright-field images were used to obtain biomass silhouette by automated thresholding. Indeed, this procedure was found to be more precise to obtain biomass sihouette. In fact, propidium iodide stains bacteria with damaged membranes, but dead cells burst completely after a while. Therefore, they can no longer be observed with propidium iodide, especially with epifluorescence microscopy where the signal-to-noise ratio is lower than with CLSM. Epifluorescence and CLSM images were stored as TIFF files and analyzed using Visilog 6.2 software (Noésis, Les Ulis, France).

4.3 RESULTS

4.3.1 Batch experiments

30-HOUR PERIOD BATCH TESTS

The 30-hour experiments showed the acute toxicity of erythromycin (Figure 4-1). Inhibition levels increased with the antibiotic concentration. Indeed, with the highest erythromycin concentrations (10 mg/L), nitrification was inhibited since the beginning of the experiment. Therefore, there were an $N\text{-}NH_4^+$ accumulation and no $N\text{-}NO_2^-$ accumulation in spite of a low $N\text{-}NO_3^-$ production. In contrast, at the 1 mg/L erythromycin concentration the $N\text{-}NO_2^-$ and $N\text{-}NO_3^-$ production was not inhibited during the first 8 hours of the experiments but was inhibited during the 22 h - 30 h period. However, for the same 1 mg/L concentration, there were an $N\text{-}NH_4^+$ accumulation during the 2h-6h period and again during the 22h-28h period. This N-NH_4+ came from the ammonification of biomass byproducts coming from the destroyed biomass. The $N\text{-}NH_4^+$ overproduction caused an abnormal evolution of the $N\text{-}NO_2^-$ which has continued to accumulate and has reached 11 mg/L at t = 48h (we took a sample over the 30 h period (Figure 4-1B)).

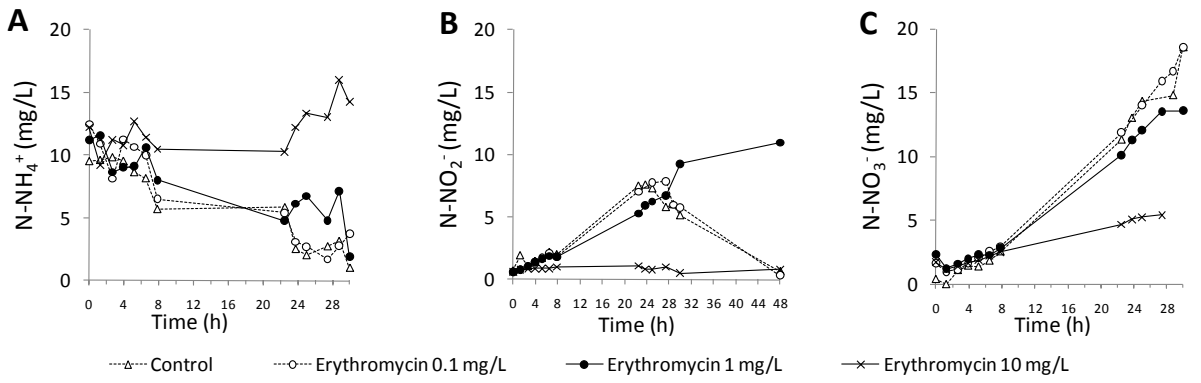


Figure 4-1 : $N\text{-}NH_4^+$ (A), $N\text{-}NO_2^-$ (B) and $N\text{-}NO_3^-$ (B) concentration evolution versus time as a function of the erythromycin concentration (control, 0.1 mg/L, 1 mg/L and 10 mg/L).

For the 0.1 mg/L concentration results also showed there were an $N\text{-}NH_4^+$ overproduction. Nevertheless the nitrification was not inhibited. The release of biomass byproducts increased the soluble COD level measured via absorbance at 254 nm (Figure 4-2).

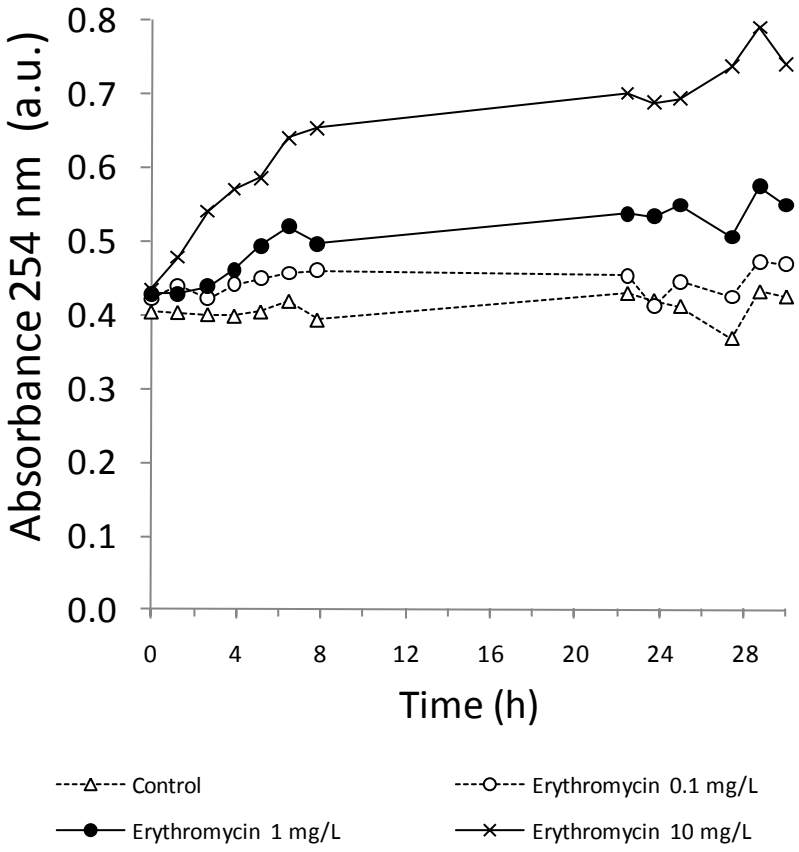


Figure 4-2 : Evolution of soluble COD measured via UV-visible absorbance versus time as a function of erythromycin concentration (control, 0.1 mg/L, 1 mg/L and 10 mg/L).

FIVE-DAY PERIOD BATCH TESTS

Erythromycin toxicity was observed at lower concentrations during a prolonged test period of five days on both nitrifiers and heterotrophic bacteria. Indeed, the 0.5 mg/L erythromycin concentration inhibited the nitrification (Figure 4-3A and Figure 4-3B). However, the nitrification rate was higher in reactors with 4 µg/L erythromycin, and this was more evident at the end of the experiment (Figure 4-3B). Some nitrogen from the destroyed heterotrophic biomass was nitrified, as shown by the soluble COD monitored by 254 nm UV-visible absorbance (Figure 4-3C) and ammonia evolution (Figure 4-3A).

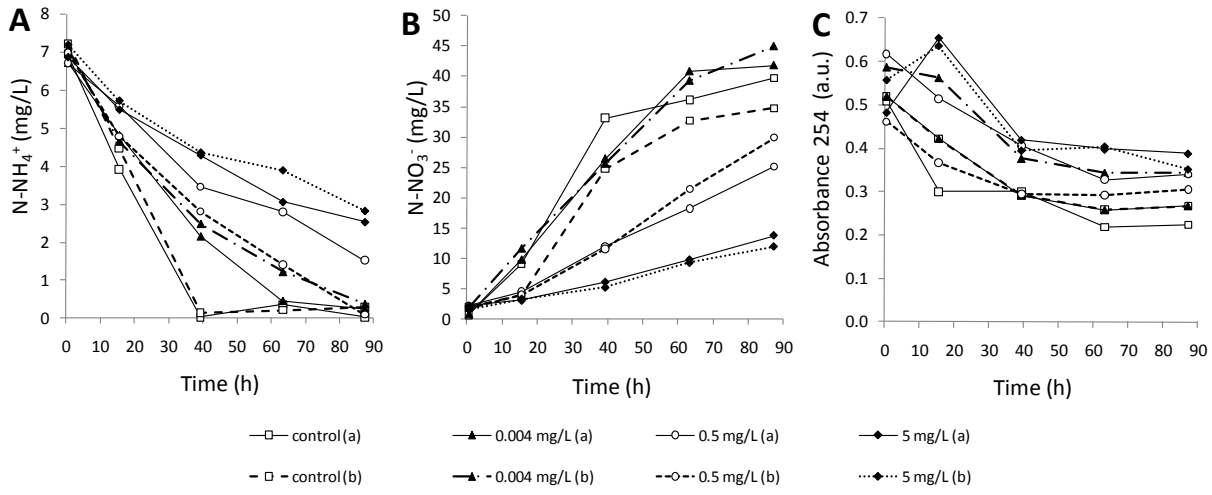


Figure 4-3 : $N\text{-}NH_4^+$ (A), $N\text{-}NO_3^-$ (B) and 254 nm absorbance (C) evolution versus time as a function of the erythromycin concentration (control, 0.004 mg/L, 0.5 mg/L and 5 mg/L). a and b series are replicates of a same erythromycin concentration in the same date of experiment.

ACTIVATED SLUDGE MORPHOLOGY VIA BRIGHT-FIELD IMAGING

The deterioration of activated sludge morphology was monitored by image analysis for erythromycin concentrations equal to or higher than 1 mg/L. As a result of biomass destruction, the flocs were disintegrated and the number of flocs with diameters smaller than 50 µm increased in the first three hours of the experiments (Figure 4-4B, Figure 4-5B).

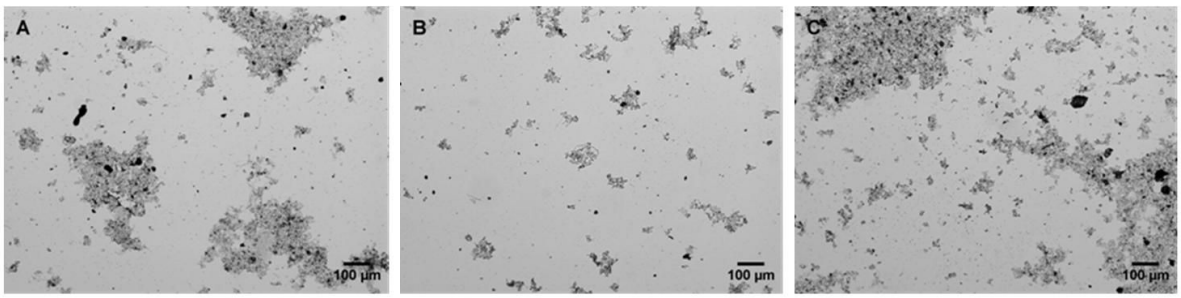


Figure 4-4 : Typical brightfield images showing floc morphology evolution versus time in a reactor with 10 mg/L erythromycin concentration after 10 minutes (A), 2 h 40 (B) and 29 h (C).

The total length of detected filaments (i.e longer than 60 µm) in each image increased in the first hour of the tests and then decreased. After 29 hours of experimentation in erythromycin reactors some flocs were found to stick together. This technique showed abnormally large flocs with diameters larger than 200 µm (Figure 4-4C, Figure 4-5C). On the contrary, there was little change of the size of flocs in the control reactor (Figure 4-5).

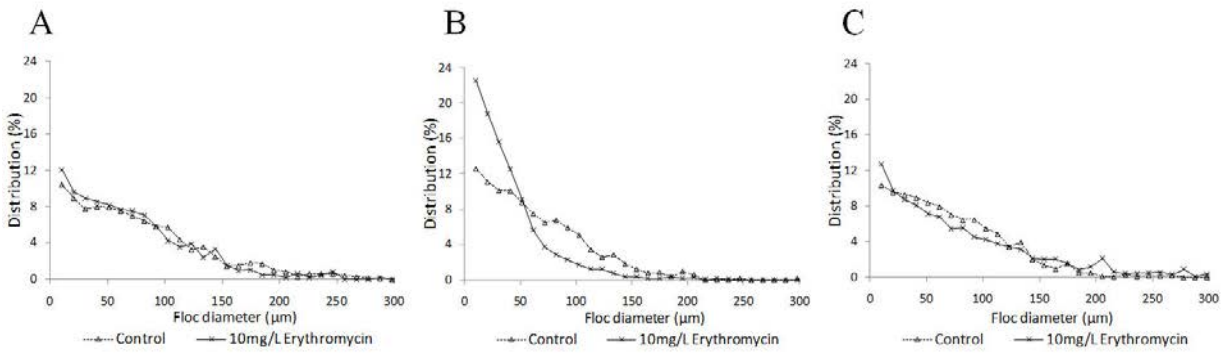


Figure 4-5 : Change in size distribution of flocs (% of total number of flocs) versus time in reactor with 10 mg/L erythromycin concentration after 10 minutes (A), 2 h 40 (B) and 29 h. The image analysis was based on brightfield images.

4.3.2 Toxicity assessment via Live/Dead® *BacLight*™

EPIFLUORESCENCE MICROSCOPY

Cell death kinetics was monitored by epifluorescence time-lapse microscopy. Images showed that dead cells were mainly present on the outer surface of the flocs. Erythromycin time-kill activity was measured even for the lowest concentrations tested (0.1 mg/L of erythromycin). Results showed a latency period before the bacteria began to die. This latency time was shorter with high erythromycin concentrations. After 45 minutes there were 94 % (SD 3.8) of living bacteria in control reactors, 67 % (SD 3.1) in reactors that contained 0.1 mg/L erythromycin and 37 % (SD 18.6) in reactors that contained 1 mg/L erythromycin (Figure 4-6).

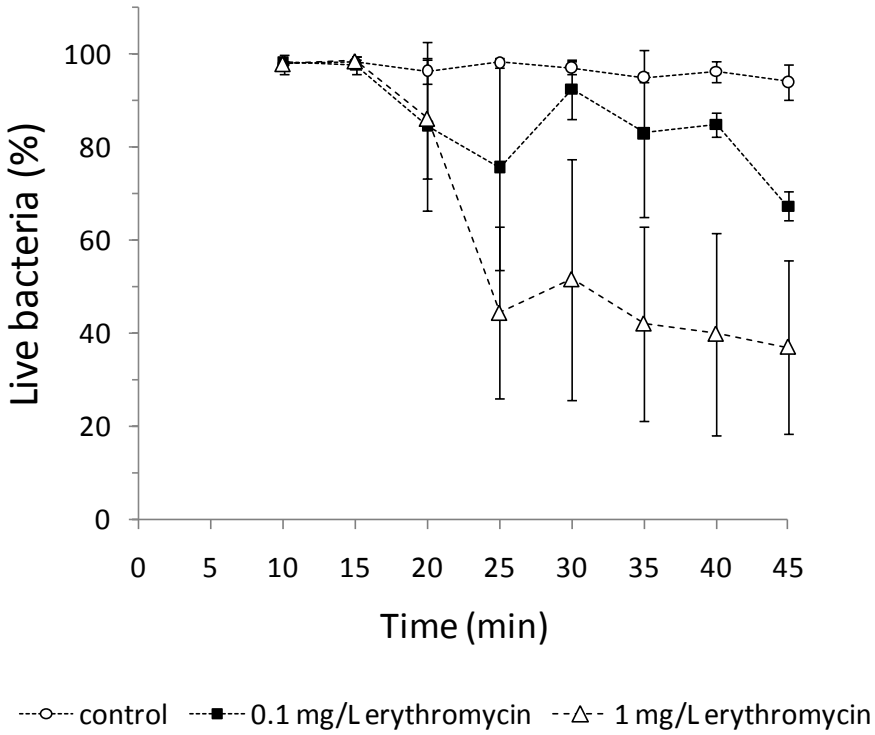


Figure 4-6 : Percent live bacteria evolution versus time in microscopic slide wells in function of erythromycin concentration (control, 0.1 mg/L and 1 mg/L) calculated from epifluorescence time-lapse microscopy images. Bacterial viability was assayed by staining using the Live/Dead ® ***BacLight***™ viability kit. Error bars represent standard deviation calculated on three replicates.

CONFOCAL LASER SCANNING MACROSCOPY

The level of visible details significantly improved with the use of a confocal macroscope compared to the epifluorescence images. The optical zoom allowed a fast overview of the slides before zooming on a selected activated sludge floc with optimal magnification. The three dimensional structure of flocs could be visualized. Visualization of a floc collected in the control reactor and of a floc collected in a reactor after a 6-hour exposure time to a 10 mg/L erythromycin concentration is presented in Figure 4-7.

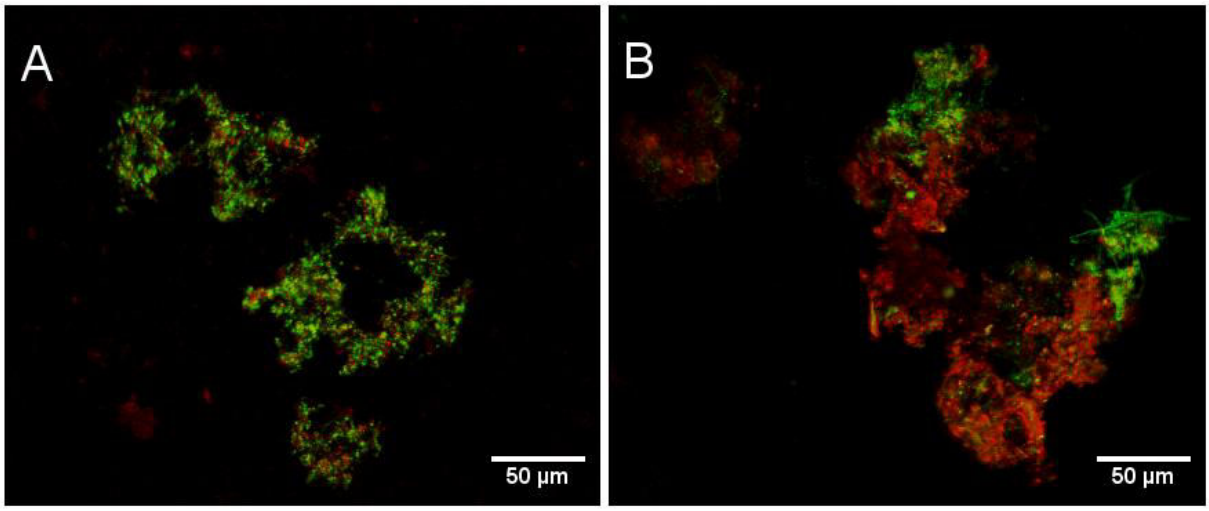


Figure 4-7 : Confocal laser scanning macroscopy images of a floc coming from a control reactor (A) and from a 10 mg/L erythromycin-spiked reactor (B) after six hours of exposure. Green areas are live bacteria and red areas are damaged bacteria. Bacterial viability was assayed by staining using the Live/Dead ® ***BacLight***™ viability kit.

Moreover, a floc was observed during a two hours exposure to 10 mg/L erythromycin (Figure 4-8). Eight stacks of images (137 images per stacks, voxel-width 1.37 µm, voxel-height 1.37 µm, voxel-depth 2.00 µm) were obtained during this period. A decrease in green fluorescence and an increase in red fluorescence were obtained (Figure 4-9). The percentage of live bacteria was found to decrease from 37 % to 28 % during the two hours, which represented the death of 24 % of initially live bacteria (Figure 4-10).

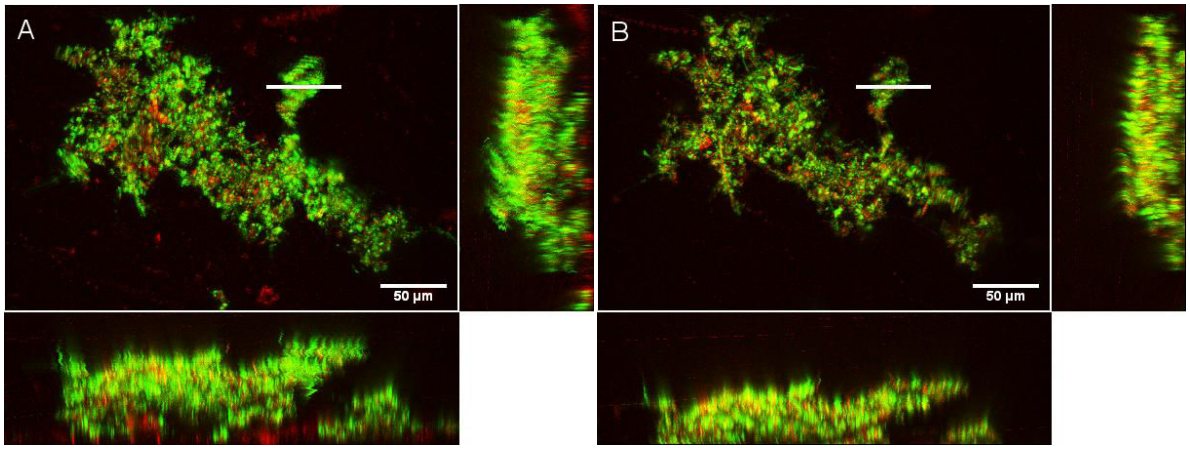


Figure 4-8 : Top and side projections of confocal laser scanning macroscopy images of a floc exposed to 10 mg/L erythromycin after 15 minutes (A) and two hours (B). Green areas are live bacteria and red areas are damaged bacteria. Bacterial viability was assayed by staining using the Live/Dead ® ***BacLight***™ viability kit. The white bar indicates the location of line profile presented Figure 4-9.

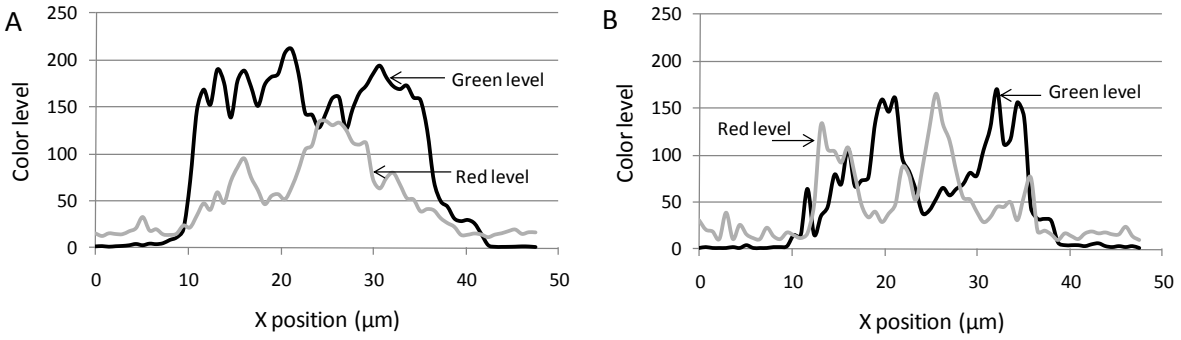


Figure 4-9 : Line profile for the activated sludge floc observed in time-lapse microscopy within the white bar shown in Figure 4-8A and Figure 4-8B. The floc was exposed to 10 mg/L erythromycin and bacterial viability was assayed by staining using the Live/Dead ® ***BacLight***™ viability kit. A) t= 15 min, B) t= 2h.

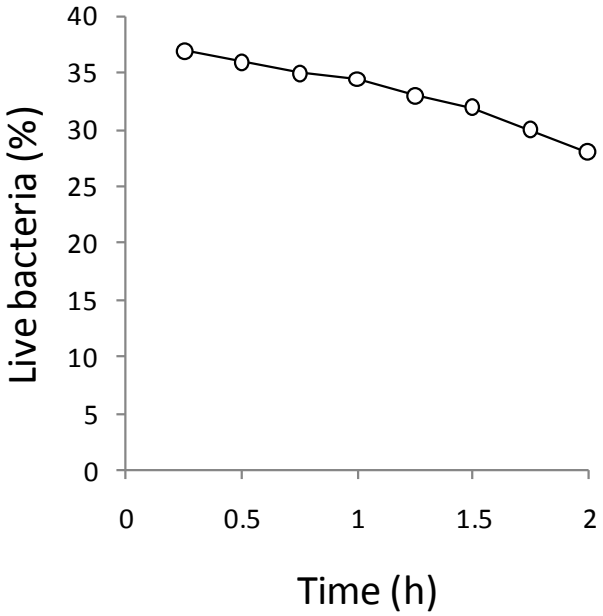


Figure 4-10 : Percent live bacteria evolution versus time during a two hours exposure to 10 mg/L erythromycin for the floc presented Figure 4-8. Bacterial viability was assayed by staining using the Live/Dead ® ***BacLight***™ viability kit.

CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY

SYTO®9 and propidium iodide fluorescence emission intensity were measured on a control sample and on a sample exposed for four hours to a 100 mg/L erythromycin concentration. The green/red fluorescence ratio based on integrated intensities of the green (510-540 nm) and red (620-650) was equal to 3.9 for the control sample and to 2.3 for the sample exposed to erythromycin (Figure 4-11). Those ratios agree well with those presented in the Baclight data sheet [23]. If a ratio of 3.9 corresponds to 100 % live bacteria, a 2.3 ratio corresponds to 60 % live bacteria. The same ratios are presented in the reference method. Moreover, the filamentous bacteria were largely found to be alive (Figure 4-12).

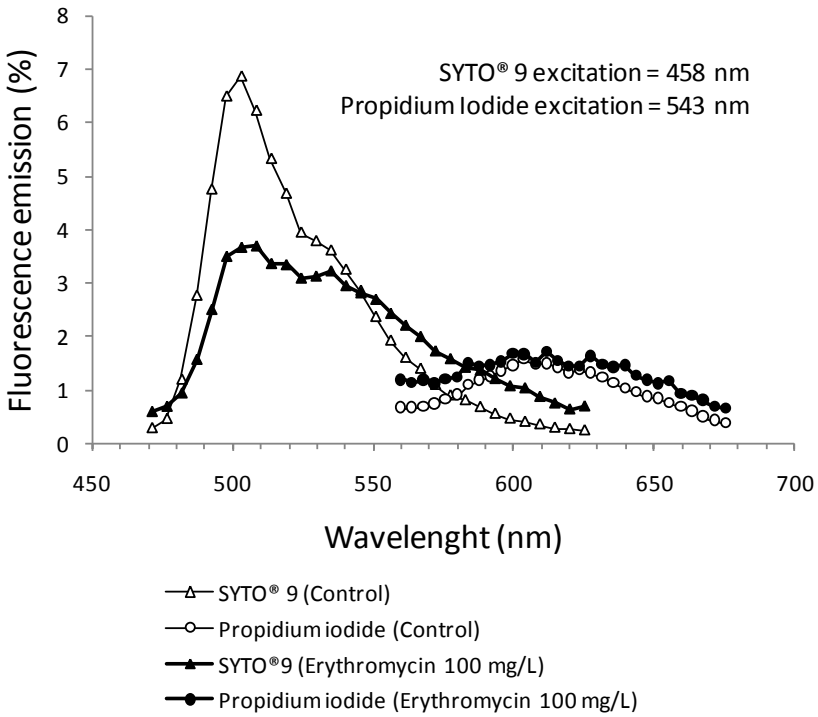


Figure 4-11 : SYTO®9 and propidium iodide fluorescence integrated spectra for control and 100 mg/L erythromycin concentration obtained via confocal laser scanning microscopy spectral imaging. Bacterial viability was assayed by staining using the Live/Dead ® ***BacLight***™ viability kit.

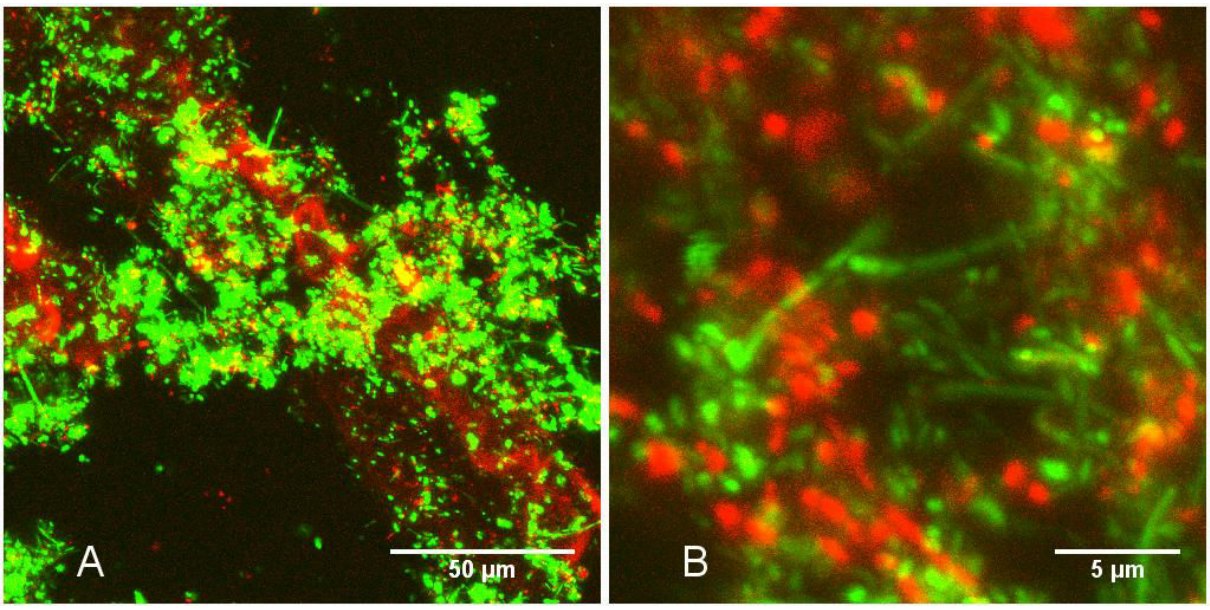


Figure 4-12 : CLSM imaging of activated sludge after four hours of exposure to a 100 mg/L erythromycin concentration at the scale of floc (A) and at the scale of bacteria (B). Green areas are live bacteria and red areas are damaged bacteria. Bacterial viability was assayed by staining using the Live/Dead ® ***BacLight***™ viability kit.

4.4 DISCUSSION

4.4.1 Batch experiments

30-HOUR PERIOD BATCH TESTS

As expected from the experimental results previously obtained [24, 25, 26], nitrifiers were sensitive to erythromycin at a concentration higher than 1 mg/L. The decrease in nitratation rate was not observed for a 0.1 mg/L erythromycin concentration. However, an absorbance measurement (254 nm) showed a release of byproducts from the biomass that increased the soluble COD even for the 0.1 mg/L erythromycin concentration. Most of nitrifying bacteria are known as gram-negative. This could explain why nitrification was less inhibited than COD removal as erythromycin is more active against gram-positive bacteria.

5-DAY PERIOD BATCH TESTS

The 5-day experiments showed that an erythromycin concentration as low as 4 µg/L could inhibit the $N\text{-}NH_4^+$ removal. However, no difference was observed between the control reactors and reactors with 4 µg/L erythromycin during the first 15 hours (Figure 4-3A). This result showed there was a latency time before the erythromycin toxic effect began at a low concentration, as previously observed by Tomlison ***et al.*** [9]. The author reported that a 400 mg/L streptomycin concentration did not show a 75 % inhibition of nitrification in a 2-4-hour experiment, whereas a 10 mg/L streptomycin concentration completely inhibited the nitrification in a 5-day experiment. The latency time could be explained by the reduced antibiotic transfer rate into the exopolysaccharide barrier and the cells membranes at low concentration. The erythromycin toxicity on activated sludge depends not only on the erythromycin concentration but also on the exposure time. This suggests that the antibiotic concentrations typically measured in urban WWTP influents could be toxic to activated sludge. A five day-day period batch test with lower biomass concentration was found to be a valuable experimental set up to study low antibiotic concentrations effects on activated sludge. However, only continuous reactors could give information about bacteria recovery after an antibiotic loading as was measured by Fernández ***et al.*** [27].

ACTIVATED SLUDGE MORPHOLOGY

As a result of biomass destruction a floc breakage was observed. The increase in filament numbers could be explained by the filamentous initial position in the flocs: the destruction of other bacteria makes them visible. The biomass defloculation could promote the environmental release of bacteria and antibiotic-resistant genes possibly acquired by bacterial species in the WWTP.

4.4.2 Toxicity assessment via Live/Dead ® *BacLight*™

4.4.2.1 EPIFLUORESCENCE MICROSCOPY

Epifluorescence microscopy can be used as a rapid method to assess viable but non-cultivable cells in environmental samples [28]. In agreement with Lopez ***et al.*** [22], epifluorescence allowed the quantification of damaged cells. The latency time observed with epifluorescence microscopy confirmed the results of the batch experiments, which also showed the importance of both concentration and exposure time. At the WWTP scale, those results suggest that both the antibiotics concentration variations in the wastewater influent and the WWTP hydrodynamics impact antibiotic toxicity on activated sludge. At the scale of flocs, the toxicity should also depend on the hydrodynamics, as it was found that bacteria in the outer surface of flocs were the first ones to die.

4.4.2.2 CONFOCAL LASER SCANNING MACROSOPY AND MICROSCOPY

Confocal laser microscopy observations permitted the validation of staining as the magnification and the resolution of pictures allowed clearer observation of isolated stained cells. The green and red fluorescence emission spectra were similar to those presented in the fluorescence kit method [23], and allowed the quantification of the percentage of live bacteria with the calibration curve. Results obtained with brightfield microscopy could also be confirmed, as the filamentous bacteria were found to be mostly present among the living bacteria (Figure 4-12). CLSM studies could help understanding of antibiotic diffusion within flocs [29], and the importance of exopolymeric substances.

Conclusion

This study showed that both concentration and exposure time should be taken into account when studying antibiotic toxicity on activated sludge bacteria. The effect of low concentrations could appear after the four hour time period that is usually used in toxicity tests. Epifluorescence microscopy was useful to quantify erythromycin time-kill activity. The use of a fluorescent viability indicator may be a valuable tool in toxicity studies on activated sludge and may help to define inhibition parameters in process modeling. The visualization of three-dimensional structures of damaged flocs with CLSM associated with hydrodynamic studies at the scale of flocs would help to understand how antibiotics enter the flocs and lead to cell death.

Acknowledgements

The project is sponsored through ANR (Project ANTIBI-EAU, ANR-07-BLAN-0195-194 02), Zone Atelier Moselle (ZAM) , ARC and Région Lorraine (CPER). The authors wish to thank Michel Biocco from Leica Microsystems for his help.

References

[1] Lienert J, Güdel K, Escher BI. Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. Environmental Science and Technology 2007;41:4471–4478.

[2] Focazio MJ, Kolpin DW, Barnes KK, Furlong ET, Meyer MT, Zaugg SD, Barber LB, Thurman ME. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — II) Untreated drinking water sources. Science of the Total Environment 2008;402:201-216.

[3] Lee YJ, Lee SE, Lee DS, Kim YH. Risk assessment of human antibiotics in Korean aquatic environment. Environmental Toxicology and Pharmacology 2008;26:216-221.

[4] Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Pascarella L, Parrella A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. Science of the Total Environment 2005;346:87-98.

[5] Baquero F, Martinez JL, Canton R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion in Biotechnology 2008;19:260-265.

[6] Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. Chemosphere 2009;75:435-441.

[7] Al-Ahmad A, Haiβ A, Unger J, Brunswick-Tietze A, Wiethan J, Kümmerer K. Effects of a realistic mixture of antibiotics on resistant and nonresistant sewage sludge bacteria in laboratory-scale treatment plants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2009;2:264-73.

[8] Amann R, Lemmer H, Wagner M. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. FEMS Microbiology Ecology 1998;25:205-215.

[9] Tomlinson TG, Boon AG, Trotman NA. Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal. Journal of Applied Bacteriology 1966;29(2):266-291.

[10] Schuster A, Hädrich C, Kümmerer K. Flows of active pharmaceutical ingredients originating from health care practices on a local, regional, and nationwide level in Germany. Is hospital effluent treatment an effective approach for risk reduction? Water, Air, and Soil Pollution 2008;8:457-471.

[11] Kümmerer K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. Chemosphere 2001;45:957–969.

[12] Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere 2009b ; 75:417–434.

[13] Hartmann A, Alder AC, Koller T, Widmer RM. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. Environmental Toxicology and Chemistry 1998;17:377–382.

[14] Larsson DGJ, de Pedro C, Paxeus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. Journal of Hazardous Materials 2007;148:751-755.

[15] Karthikeyan, K.G.,Meyer, M.T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. Science of the Total Environment 2006;361:196–207.

[16] Gulkowska, A., Leung, H.W., So, M.K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Yeung, L.W.Y., Richardson, B.J., Lei, A.P., Giesy, J.P., Lam, P.K.S. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. Water Research 2008; 42: 395–403.

[17] Xu, W., Zhang, G., Li, X., Zouc, S., Lia, P., Hua, Z., Lia, J. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. Water Research 2007;41:4526–4534.

[18] Spongberg, A.L., Witter, J.D. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. Science of the Total Environment 2008;397:148-157.

[19] Göbel, A., Thomsen, A., Mcardell, C.S., Joss, A., Giger, W. Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. Environmental Science and Technology 2005;39:3981-3989.

[20] Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T, Thurman E.M, Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. Environmental Science and Technology 2002; 36:1202–1211.

[21] Da Motta M, Pons MN, Roche N, Vivier H. Characterization of activated sludge by automated image analysis. Biochemical Engineering Journal 2001;9:165–173.

[22] Lopez C, Pons MN, Morgenroth E. Evaluation of microscopic techniques (epifluorescence microscopy, CLSM, TPE-LSM) as a basis for the quantitative image analysis of activated sludge. Water Research 2005;39:456–468.

[23] Molecular Probes, LIVE/DEAD® *Baclight*™ Bacterial Viability Kits. Fluorescence Spectroscopy Protocols. Staining Bacteria with either Kit L7007 or L7012. Revised : 15 July 2004.

[24] Alighardashi, A., Pandolfi, D., Potier, O., Pons, M.N., 2009. Acute sensitivity of activated sludge bacteria to erythromycin. Journal of Hazardous Materials 172, 685–692.

[25] Louvet J.N, Giammarino C., Potier O., Pons M. N. Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge. Environmental Pollution 2010;158(3):688-693

[26] Fan C, Lee P.K.H., Ng W.J., Alvarez-Cohen L., Brodie E.L., Andersen G. L., He J. Influence of trace erythromycin and erythromycin-H2O on carbon and nutrients removal and on resistance selection in sequencing batch reactors (SBRs). Environmental Biotechnology 2009;85:185–195

[27] I. Fernández I., Mosquera-Corral A., Campos J. L., Méndez R., Operation of an Anammox SBR in the presence of two broad-spectrum antibiotics. Process Biochemistry 2009;44:494–498.

[28] Gião MS, Wilks SA, Azevedo NF, Vieira MJ, Keevil CW. Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*. Microbial Ecology 2009;58:56–62.

[29] Chu CP, D.J. Lee DJ, Tay JH. Floc model and intrafloc flow. Chemical Engineering Science 2005;60:565–575.

Chapitre 5

5 Marquage simultané Gram et viabilité sur des boues activées exposées à l'érythromycine. Désintégration des bactéries observée par imagerie confocale 3D au cours du temps.

Extrait de :

Simultaneous Gram and Viability Staining on Activated Sludge Exposed to Erythromycin: 3D-CLSM Time-lapse Imaging of Bacterial Disintegration. Louvet J.N., Attik G., D. Dumas, Potier O., Pons M.N. Article soumis au journal « International Journal of Hygiene and Environmental Health ».

Ce chapitre présente l'utilisation d'un marquage simultané Gram et viabilité. La microscopie confocale au cours du temps a permis d'évaluer l'efficacité de ce nouveau marquage et a montré qu'en présence d'érythromycine les bactéries $Gram^+$ étaient les premières à mourir.

Abstract

The effect of erythromycin on activated sludge bacteria according to their Gram type was investigated with 3-dimensional Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) time-lapse imaging. The fluorescent stains SYTOX Green and Texas Red-X conjugate of wheat germ agglutinin stained dying bacteria and $Gram^+$ bacteria respectively. Time-lapse imaging allowed understanding of the staining mechanism and the measurement of the death rate. In presence of erythromycin (10 mg/L), $Gram^+$ bacteria had a higher mortality rate than the $Gram^-$ bacteria. This result suggests that antibiotic in wastewater could change the activated sludge bacteria composition according to their Gram type by selecting bacteria the less sensitive to the antibiotics. However bacterial death was followed by bacterial disintegration leading to a decrease in the fluorescence. Results suggested that viability indicators based on membrane integrity should be used with a correct sampling method that can give the initial quantity of living bacteria.

5.1 INTRODUCTION

After consumption and partial metabolization (Lienert et al., 2007), antibiotics for human use and their metabolites are excreted into wastewater and transported to urban wastewater treatment plants (WWTPs) by sewage. In untreated urban wastewater antibiotics are measured from trace to approximately 2 µg/L. Macrolide antibiotics erythromycin and roxithromycin are among those that are measured in the largest concentrations (Göbel et al., 2005; Karthikeyan and Meyer, 2006; Gulkowska et al., 2008; Xu et al., 2007; Spongberg and Witter, 2008). In hospital wastewater antibiotic concentrations range from 0.3 µg/L to 87 µg/L and fluoroquinolones are measured with the highest concentrations (Hartmann et al., 1998; Brown et al., 2006). It has to be noticed that in many facilities hospital wastewater is also treated into urban WWTPs without any specific pre-treatment. Runoff from livestock farms and antibiotic use in fish farming are two other sources of contamination (Cole et al., 2009). For detailed reviews of these topics, see Kümmerer (2001, 2009a,b). Drug manufacture effluents should normally be treated into industrial WWTPs before being discharged to the aquatic environment or sent to an urban WWTP for polishing. They are the most concentrated effluents that WWTPs have to treat. As an example, Larsson et al. (2007) measured a minimal concentration of 28 mg/L of ciprofloxacin in an industrial effluent.

WWTPs were originally designed in order to remove organic pollution and nutriments (nitrogen, phosphorus). But they are not expected to eliminate the total load of micropollutants. This is particularly true for bioactive compounds such as antibiotics (Joss et al., 2006). Antibiotics are only partially removed, erythromycin being one of the antibiotics with the lowest removal rate (Rosal et al., 2010) and one of the more frequently detected antibiotics in surface and ground water including in untreated drinking water sources (Focazio et al., 2008). In addition to this poor removal rate, antibiotics cause two other subjects of concerns in WWTPs. Whether WWTPs could be reactors that favour bacterial resistance emergence and stability is currently in discussion (Baquero et al., 2008; Al-Ahmad et al., 2009). Moreover, antibiotics can reduce the capability of WWTP to remove organic pollution (Al-Ahmad et al., 1999; Louvet et al., 2010a) and inhibit nitrification (Halling-Sørensen, 2001). Erythromycin is reported as one of the antibiotics that inhibits the most pollution removal (Avella et al., 2010). This inhibition was measured at µ/L concentration range (Louvet et al., 2010b; Fan et al., 2009). Erythromycin inhibition on nitrification depends on

the sludge origin (Louvet et al., 2010a) but the reason is still unknown. Therefore there is a need to measure and understand variation of the antibiotic time-kill activity on activated sludge. One hypothesis is that the erythromycin activity on activated sludge depends on the amount of $Gram^+$ bacteria. Indeed, macrolides usually exhibit potent activity against Gram-positive bacteria but can affect also Gram-negative bacteria (Bryskier and Butzler, 1997) As cultivable bacteria measured as Colony Forming Unit represent only 1-15% of the total activated sludge bacteria (Wagner et al., 1993) the traditional plate count method would lead to "the great plate count anomally" (Amann et al., 1995). On the contrary the fluorescent viability kit Baclight^{tm} based on membrane integrity was found to be a valuable tool (Stocks, 2004; Lopez et al., 2005; Louvet et al., 2010b). However this method does not give information about bacterial Gram type. That is why in this study a simultaneous Gram and Viability staining protocol was used to observe the fate of activated sludge flocs bacteria in the presence of erythromycin. Three-dimensional time-lapse Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) imaging was conducted during a 9 hours exposure time to erythromycin. Results were compared to behavior in a control micro-reactor over 12 hours. To our knowledge this is the first report of the use of the ViaGram^{TM} Red^+ Bacterial Gram stain and viability kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) on activated sludge bacteria. Combination of this kit with FISH has been shown to be valuable in the assessment of the survival rate of fecal bacteria in drinking water (Savichtcheva et al., 2005). Our results suggest that the ViaGram^{TM} Red^+ Bacterial Gram stain could be a useful tool. However bacterial death was followed by bacterial disintegration and we discuss about this limitation concerning the viability measurement based on fluorescent membrane indicators.

5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Sludge and wastewater

Activated sludge and wastewater were collected in the final clarifier recycle line and after grid removal, respectively, on an urban wastewater treatment plant (Nancy-Maxéville, France, 350,000 person-equivalents).The Nancy WWTP uses a hybrid system of activated sludge and

biofilm on sand particles. In this plant, the daily average characteristics of the wastewater are as follows: chemical oxygen demand (COD): 260 mg/L; biological oxygen demand (BOD_5): 120 mg/L; Kjeldahl nitrogen (NTK): 30 mg/L; $N–NH_4^+$: 18 mg/L. For time-lapse imaging the sludge was maintained for a maximum of 48 hrs in a batch aerated reactor, filled with 1 liter of activated sludge and 2 liters of wastewater.

5.2.2 Classical Gram Staining

The Gram Hucker staining protocol (RAL, Martillac, France) was used. A smear of bacteria (100 µl) was deposited on a glass slide and thoroughly air dried. It was stained for 1 min in Crystal Violet solution, 1 min in iodine solution, washed for 10 s in ethanol an, finally, counterstained with safranin for 1 min. The glass slide was examined under oil immersion at 250x magnification with direct illumination with a Dialux 20 (Leitz, Solms, Germany) microscope equipped with a 3CCD colour camera Sony 3CCD EXWAWE HAD (Aries, Châtillon, France) and connected to a PC via a Meteor (Matrox, Dorval, Quebec, Canada) grabbing board.

5.2.3 ViaGram™ Staining

ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain and Viability kit was used according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).This kit provides a fluorescent staining protocol that differentially stains many $Gram^+$ and $Gram^-$ bacterial species and, at the same time, discriminates live from dead cells on the basis of plasmic membrane integrity. The kit contains three reagents: two nucleic acid stains for viability determination and a fluorescently labeled wheat germ agglutinin (Texas Red X_{CWGA}) for Gram-sign determination (red fluorescence for $Gram^+$ bacteria). Bacteria with intact cell membranes stain fluorescent blue with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent green with SYTOX® Green nucleic acid stain (Table 5-1). If

there are no nucleic acids in the bulk water, the background of the images remains poorly fluorescent. Indeed, when bounding with polynucleotides, DAPI exhibits a considerable fluorescence enhancement (Kaspuscinski and Wlodzimierz, 1979). This is also the case for SYTOX® nucleic acid stain according to Roth (1997) and the manufacturer reference method. 4 µL of SYTOX Green and DAPI solution were mixed with 4 µL of Texas Red X_{CWGA} into 1 mL of tap water (for the erythromycin reactor tap water was spiked with erythromycin to a concentration equal to 20 mg/L). 100 µL of undiluted mixed liquor was mixed with 100 µL of the tap water containing the dyes into a microscope slide well. This short staining protocol allowed direct observation of the original structures of flocs and the time-lapse microscopy. No centrifugation, washing or fixation steps were needed. Microscopic observations started 15 min after staining.

Table 5-1: ViaGram^{TM} Red $^{+}$ Bacterial Gram Stain and Viability Kit mode

Stain	**Target**	**Fluorescence Color**
4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI)	nucleic acids (all bacteria)	Blue
SYTOX Green	nucleic acids (permalibized bacteria)	Green
Texas Red-X conjugate of wheat germ agglutinin	Gram + bacteria surface	Red

	Gram $^{-}$	**Gram $^{+}$**
Live Bateria	Blue	Blue and Red
Dying Bacteria	Blue and Green	Blue and Green and Red
Dead Bacteria	Blue and Green or no fluorescence	Blue and Green and Red or no fluorescence

5.2.4 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Images series were obtained with a FV10i confocal inverted microscope. Three laser sources (405 nm (22mW), 473 nm (15mW) and 559 nm(18mW)), were used to excite DAPI, SYTOX Green and Texas Red X_{CWGA}. The bandwidths of the detected fluorescence have been optimized for each channel to the maximum emission (400-440 nm for blue channel (DAPI), 440-540 nm for the green channel (SYTOX Green) and 520-620 nm for the red channel (Texas Red X_{CWGA}). All regular acquisitions were collected sequentially (405 nm/473 nm/ 559 nm) to avoid potential cross-talking (Figure 5-1). 512x512 pixels regular images were obtained with a 60x objective, with a 0.231µm x 0.231µm pixel size. A constant 1 µm step size in the vertical direction was used. Images were stored as 12 bits/pixel TIFF files and analyzed using the procedures developed with Visilog 6.2 software (Noésis, Saint Aubin, France).

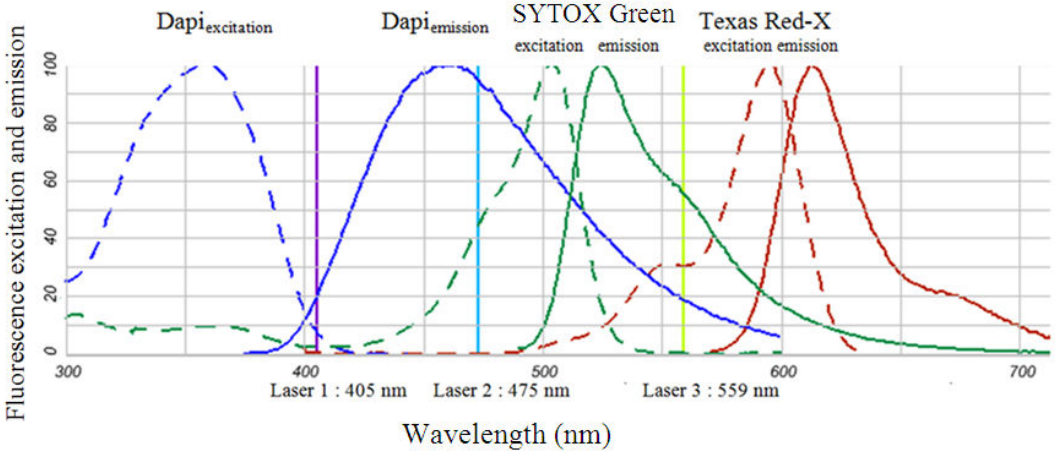


Figure 5-1 : Fluorescence and excitation and emission spectra of the three dyes used in the staining.

Time-lapse observations were performed with sludge and wastewater sampled in the batch reactor. The first experiment was done with a chamber that contained 10 mg/L erythromycin. The next day another run was performed in a control chamber without erythromycin. The two time-lapse sequences were conducted with exactly the same microscope settings excepted for the number of step size in the vertical direction (114 images per stack for the control chamber versus 126 images per stack for the chamber with erythromycin). The chamber was placed in an incubator with a 37°C temperature and a humidity level higher than 90%. Water was

automatically supplied to the water-immersion inverted objective. During the experiments the scan was continuously running.

5.2.5 Image analysis

Each set of three images (corresponding to the red, green and blue channels) was analyzed according to the following automated procedure:

- the mode of the grey-level histogram of each channel image was determined: it corresponds to the average intensity of the background.
- Each channel image was segmented between background and bacteria using an entropy-based method (Russ, 1995) in the range defined by the mode and 255 (highest possible intensity in an image)

To monitor the background intensity change over time, an average image of the whole stack was computed at each stack collecting time and for each channel. After segmentation, the total fluorescence of the background was measured according to the three channels.

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1 Validation of the staining with high resolution observations

The 60x objective lens combined with an optical zoom permitted to grab images with an increased resolution of 0.041 µm/pixel. This high resolution permitted to validate that the staining of the bacteria by the probes and check the background fluorescence that could be due to unlinked probes or probes linked with other compounds than bacteria themselves. This was an important result especially for Texas-Red-X_{cwga} that stains the $Gram^+$ bacteria. In activated sludge flocs bacteria are aggregated into flocs where the main components are the exopolymeric substances (EPS) that contain proteins, sugars and lipids and wheat germ agglutinin has been used to stain EPS (Strathmann et al., 2002). However, according to

observations, Texas Red-X_{cwga} targeted specifically bacteria and did not stain EPS. Due to the motion of bacteria between the three sequential scans, some blurring occurs and it was not possible to verify if Texas Red-X_{cwga} was linked specifically to membranes (Figure 5-2).

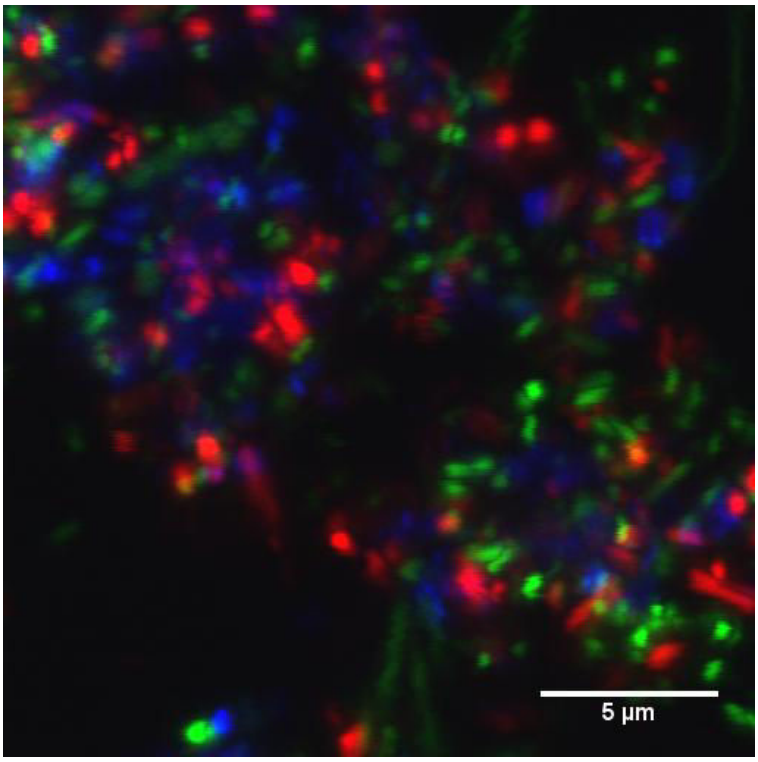


Figure 5-2 : High resolution 3D maximal projection CLSM image of an activated sludge floc in a control micro-reactor (Nancy WWTP). Viability and Gram type were assayed using the ViaGram^{TM} Red $^{+}$ Bacterial Gram Stain and Viability Kit. Blue : DAPI, all nucleic acids; Green : SYTOX Green, nucleic acids of dying bacteria; Red : Texas Red-Xcwga: Gram^{+} bacteria surface.

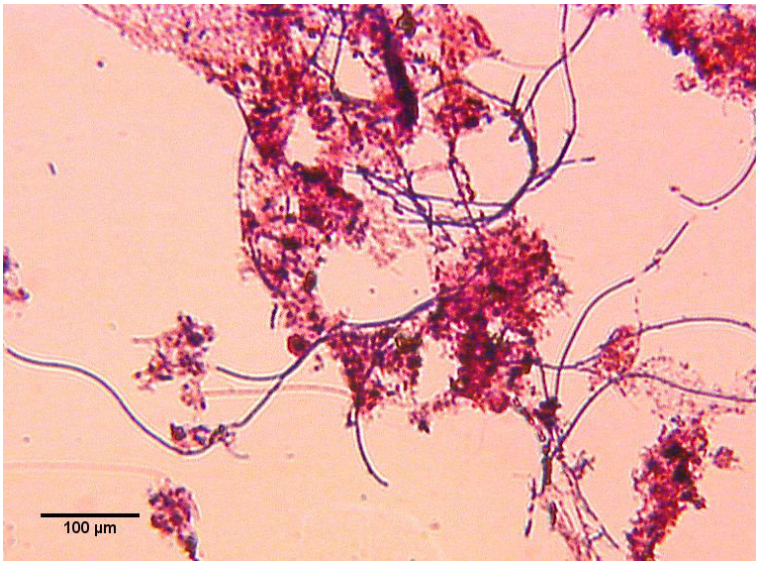


Figure 5-3 : Classical Gram staining of activated sludge flocs (Nancy WWTP)

However, the comparison of confocal images with classical Gram staining images showed that the largest filamentous bacteria that are mainly $Gram^+$ bacteria in Nancy WWTP were stained by Texas Red-X_{cwga}, confirming the validity of the staining (Figure 5-3, Figure 5-4B, Figure 5-5A, Figure 5-5B). Lower magnification was also interesting to observe heterogeneity into activated sludge bacteria distribution. In addition to areas where $Gram^+$ and $Gram^-$ bacteria were thoroughly mixed it was observed areas where $Gram^+$ bacteria were strongly clustered such as in the center of Figure 5-4A.

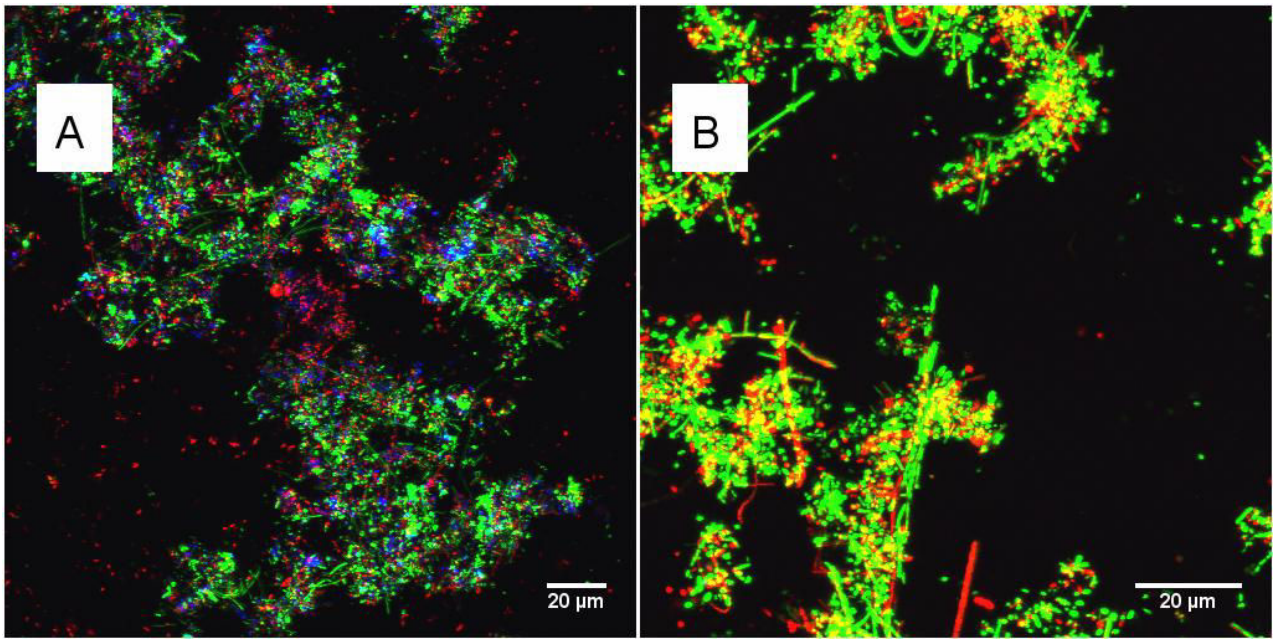


Figure 5-4 : A: 3D maximal projection CLSM image of activated sludge flocs exposed to erythromycin (30 minute exposure time). B: zoom on a zone where there were no more bacteria uniquely stained by DAPI. Viability and Gram type were assayed using the ViaGram^{TM} Red $^+$ Bacterial Gram Stain and Viability Kit.

Such observations are difficult with classical Gram staining where $Gram^+$ and $Gram^-$ bacteria are superimposed into dense flocs and are difficult do discriminate (Pandolfi et al., 2004). However the filamentous bacteria which are mainly Gram+ in the activated sludge used in the present study are not very well stained by Texas Red-X_{cwga} . In the presence of 10 mg/L erythromycin they were more bacteria stained by SYTOX Green than in control. This was an indication about the validity of the SYTOX-Green staining to mark bacteria with damaged membrane. 10 mg/L erythromycin concentration has previously been shown to cause the death of part of heterotrophic and autotrophic bacteria of the Nancy WWTP sludge (Louvet et

al., 2010a). It was even possible to zoom on zones where there were no more bacteria stained only with DAPI and where green fluorescence was strongly predominant (Figure 5-4B). Those results are in agreement with Roth et al. (1997) that monitored the *Escherichia coli* susceptibility to some antibiotics using SYTOX Green. In contrast, Lebaron et al. (1998) showed that the SYTOX Green staining of starved population of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* underestimates the fraction of dead cells and that its application to natural samples should be considered with caution. In order to monitor more closely the behavior of the dye, time-lapse observations combined with automated image analysis quantification were performed.

5.3.2 Time lapse observations

The dynamics with respect to time using the ViaGram staining were quantified by the total number of bacteria (DAPI stain), the number of dying bacteria (SYTOX Green stain) and the proportion of $Gram^+$ bacteria (Texas Red stain). Results showed that after death the bacteria were disintegrated. A decrease in the blue, the red and the green fluorescence was measured in both chambers. The decrease in the blue fluorescence in the chamber that contained erythromycin was faster than in the control which showed the effect of the antibiotic. However, in the control some bacteria entered the field of vision and led to an increase in the fluorescence between the second and third hours of the experiment, leading to a small increase of the fluorescence during this period. These bacteria are visible in the upper right of the Figure 5-5B. In the erythromycin chamber the same bacteria were observed during the 9.3 hours.

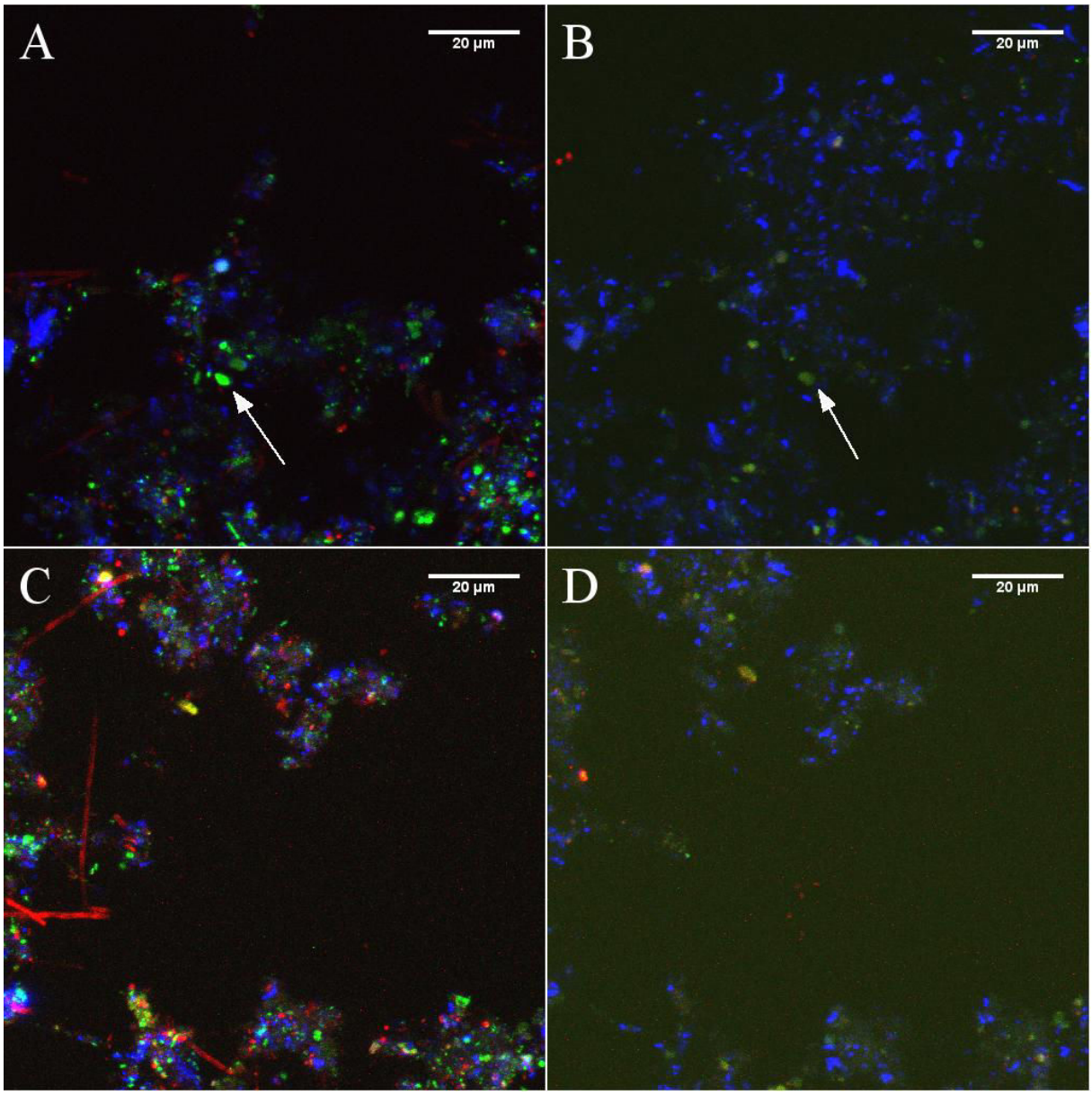


Figure 5-5 : A) 3D maximal projection CLSM image in the control micro-reactor 15 min after staining B) control reactor 9h30 after staining (the white arrow indicate a zone stained by SYTOX Green where the fluorescence decreased with time) C) micro-reactor with 10 mg/L erythromycin 15 min after staining. D) micro-reactor with 10 mg/L erythromycin 9h30 after staining. Viability and Gram type were assayed using the ViaGram^{TM} Red $^{+}$ Bacterial Gram Stain and Viability Kit.

Another evidence of the bacteria disintegration was the increase in the background fluorescence. The blue and green background fluorescence increases during the first 15 min of contact with erythromycin (Figure 5-6A and Figure 5-6B). DAPI and SYTOX Green both stained dying bacteria but there was a leakage of nucleic acids after the loss of membrane integrity.

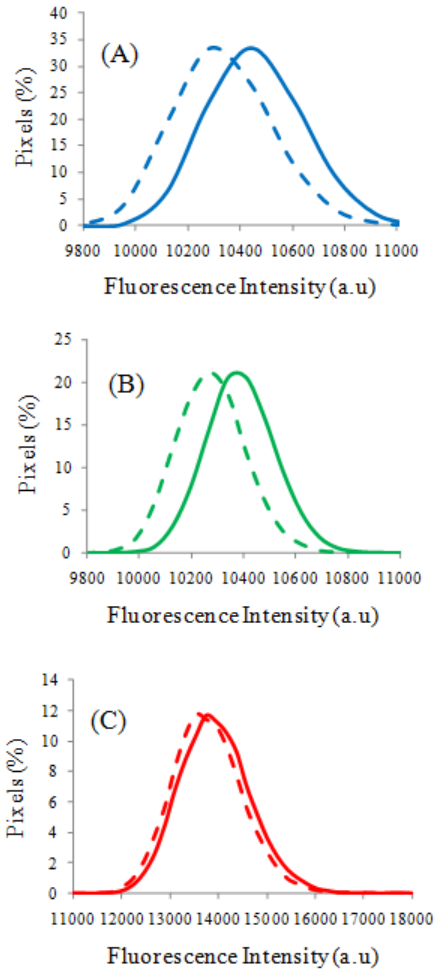
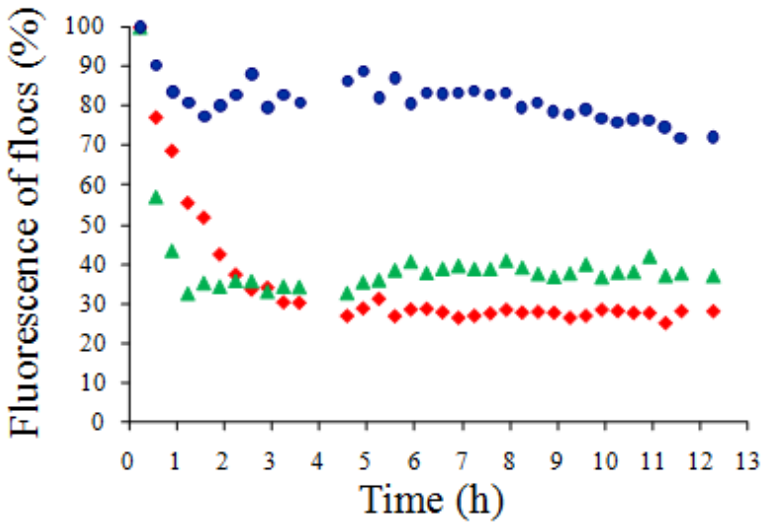


Figure 5-6 : Background fluorescence level 15 minute after staining (interupted line) and 30 minutes after stain (full line) in the micro-reactor that contained 10 mg/L erythromycin A) DAPI, B) SYTOX Green C) Texas Red-X_{cwga}

The level of SYTOX Green fluorescence is the result of two opposite processes: SYTOX Green fluorescence increases when bacteria were dying but it decreases when those bacteria are disintegrated. As a consequence, the level of SYTOX Green fluorescence depends on the rates of the reactions. As an example, the relative stability in the SYTOX Green fluorescence between 2 and 9 hours in the erythromycin chamber was the result of the balance between death and disintegration (Figure 5-7 and Table 5-2).

A



B

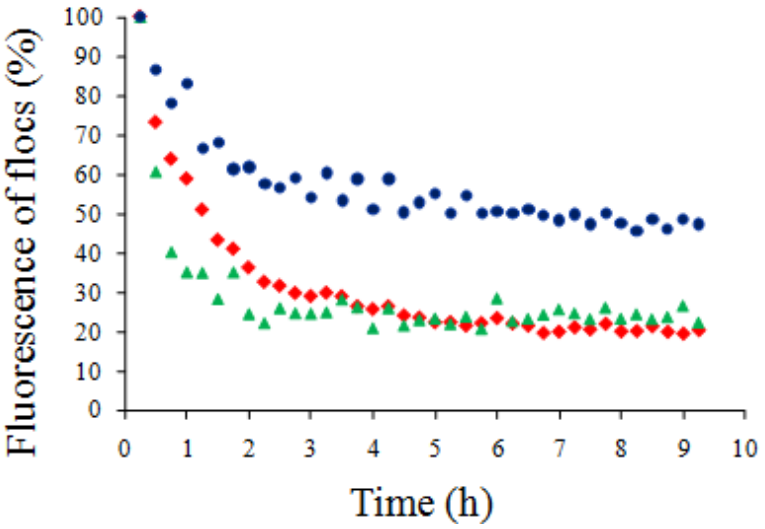
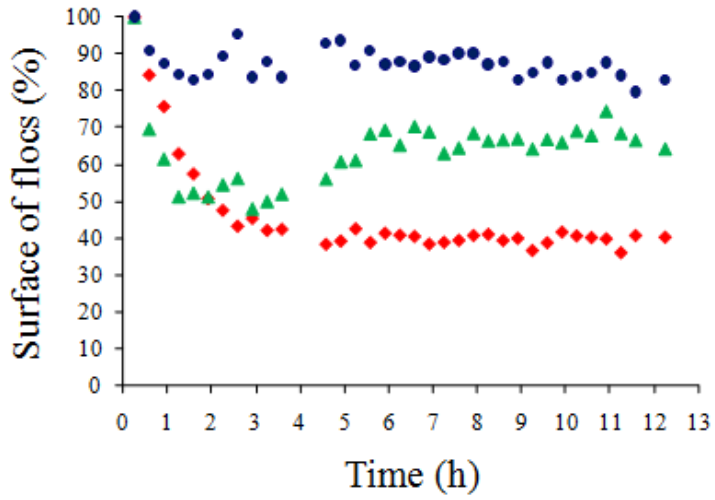


Figure 5-7 : Evolution of total fluorescence of flocs during CLSM 3d time-lapse imaging. ▲SYTOX Green, ● DAPI, ♦ Texas Red-Xcwga. A) Control chamber B) with 10 mg/L erythromycin chamber.

This phenomenon has been also discussed by Savichtcheva et al. (2005). During the same period there was also a decrease in the DAPI fluorescence in the erythromycin chamber when DAPI fluorescence was stable in the control reactor. The decrease in the blue fluorescence is a marker of the disappearance of the cells. A second evidence of these opposite reactions was the short increase in the SYTOX Green fluorescence intensity measured in the control

chamber between 8 and 12 hours when in the same time the number of green pixels increased drastically (Figure 5-8). That can be explained by a decrease in the fluorescence of the highly fluorescent green pixels when in the same time there were an increase in the number of dying bacteria. As the number of pixels is less sensitive than the total fluorescence to a decrease, the number of pixels increased more than the total fluorescence during this period.

A



B

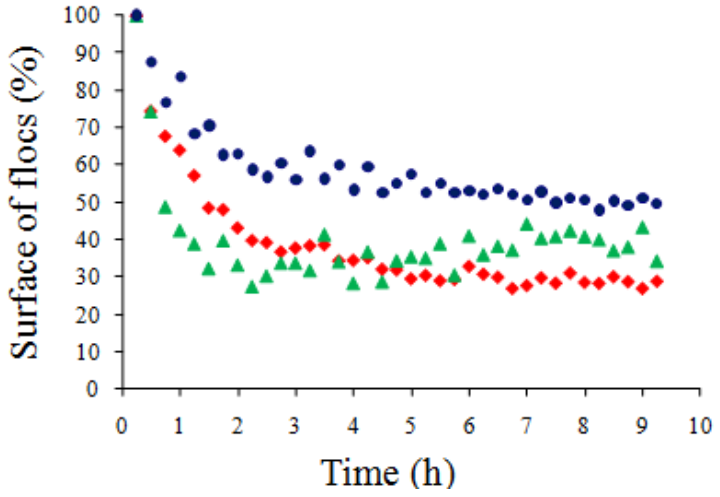


Figure 5-8 : Evolution of surface of flocs during CLSM 3d time-lapse imaging. ▲SYTOX Green, ● DAPI, ♦ Texas Red-Xcwga. A) Control micro-reactor B) micro-reactor with 10 mg/L erythromycin.

As an illustration, the white arrow indicate a bright fluorescent green zone at the beginning of the observation (Figure 5-5A) and the same green zone at the end of the experiment (Figure 5-5B).

Table 5-2: Results of image analysis at the beginning of the experiments and after 9.30 hours for control micro-reactor and reactor that contained 10 mg/L erythromycin

	Control			10 mg/L Erythromycin		
	t= 15 min	t= 9h30min	Evolution (%)	t= 15 min	t= 9h30min	Evolution (%)
DAPI (Fluorescence Intensity (a.u))	2739	2135	-22	4114	1949	-53
DAPI (k pixels)	35	29	-15	43	21	-50
CytoX Green (Fluorescence Intensity (a.u))	207	78	-62	358	80	-78
CytoX Green (k pixels)	7	5	-36	7	2	-66
Texas Red-X (Fluorescence intensity (a.u))	594	157	-74	2525	519	-79
Texas Red-X (k pixels)	15	6	-63	25	7	-71

The antibiotic concentration used in the current work (10 mg/L) might seem large with respect to the levels reported in urban wastewater. However, this concentration is in the same order of magnitude as antibiotic concentrations in drug manufacture effluents. The effect of erythromycin on bacteria has been showed at the µg/L concentration level (Fan et al. 2009, Louvet et al. 2010b). However this was with exposure times that are longer than the possible duration of CLSM time-lapse imaging experiments. At the beginning of the experiments the general appearance of activated sludge flocs was the same in both chambers. Activated sludge flocs diameters were about 20 µm. Flocs were linked together by $Gram^+$ filamentous bacteria (Figure 5-5A and 5-5C). This general appearance was in agreement with the classical Gram staining observation (Figure 5-3). The percentages of dying bacteria in the control and the erythromycin chambers were also similar (21 and 17% respectively). In contrast, the percentage of $Gram^+$ bacteria was sensibly lower in the control micro-reactor (44% versus 58%) ($Gram^+$ (%) =red pixels /blue pixels×100). This difference could be explained by the heterogeneity of the distribution of $Gram^+$ bacteria in the sludge (Figure 5-4 A) and the limitation of the observation zone. The main difference concerning the evolution of the staining was the drastic decrease in blue fluorescence in the erythromycin chamber (-53 %) whereas in the control chamber was moderate (-22%). In the control chamber, the death of bacteria was mainly measured after the first five hours of imaging and this decay may be due to the lack of substrate and to the laboratory conditions. During the first three hours, the death

rate of the Gram$^+$ bacteria was higher than the rate of the Gram$^-$ bacteria in both chambers (Figure 5-9).

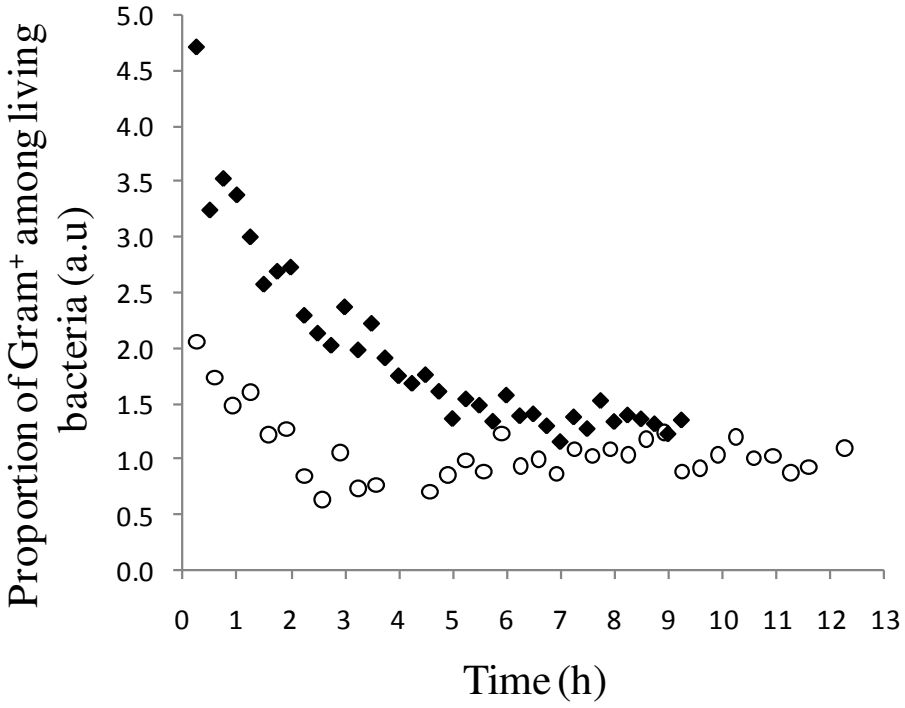


Figure 5-9 : Evolution of the percentage of Gram$^+$ alive (Gram$^+$ alive/total alive bacteria x100) bacteria. ○ control micro-reactor, ♦ reactor with 10 mg/L erythromycin.

During the second part of the experiment in the control chamber the death rate of Gram$^+$ bacteria was lower than the death rate of the Gram$^-$ bacteria. In contrast the death rate of Gram$^+$ bacteria continued to be higher than the death rate of Gram$^-$ bacteria in the erythromycin chamber. This result is in agreement with erythromycin spectrum of action (Bryskier et al. 1997). This result suggests that antibiotics in pharmaceutical industries wastewater could influence the activated sludge bacteria composition by selecting the less sensitive bacteria. More investigations have to be done with lower antibiotic concentrations and with genetic tools to show if the antibiotics in urban wastewater could influence activated sludge composition.

5.4 CONCLUSION

The fluorescent stain Texas Red-X conjugate of wheat germ agglutinin stained Gram$^+$ bacteria and its combination with the DAPI stain and CLSM permitted a good quality imaging of complex microbial aggregates such as activated sludge flocs. SYTOX Green stained dying bacteria. However as the dead bacteria could be disintegrated and lose their fluorescence the evolution of the DAPI stain which fluorescence only decreases gave results more easily explainable than the SYTOX Green fluorescence. Indeed dying bacteria made the SYTOX Green fluorescence increase but bacterial disintegration made the SYTOX Green fluorescence decrease. Therefore bacterial viability should be preferentially based on the decrease of the fluorescence of one probe and the sampling method is very important so as to know the initial quantity of living bacteria. The results suggested that antibiotic in wastewater could change the activated sludge bacteria composition according to their Gram type by selecting bacteria the less sensitive to the antibiotics.

Acknowledgements

The project is sponsored through ANR (Project ANTIBI-EAU, ANR-07-BLAN-0195-194 02), Zone Atelier Moselle (ZAM), ARC and Région Lorraine (CPER). The authors wish to thank Olympus Microsystems for their help.

References

Al-Ahmad, A., Daschner, F.D., Kümmerer, K., 1999. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37, 158-163.

Al-Ahmad, A., Haiβ, A., Unger, J., Brunswick-Tietze, A., Wiethan, J., Kümmerer, K., 2009. Effects of a realistic mixture of antibiotics on resistant and nonresistant sewage sludge bacteria in laboratory-scale treatment plants. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 57, 264–273.

Amann, R. I., Ludwig, W. , Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59, 143-169 .

Avella, A. C., Essendoubi, M., Louvet, J. N., Görner, T., Sockalingum, G. D., Pons, M. N., Manfait, M., de Donato, P. H., 2010. Activated sludge behaviour in a batch reactor in the presence of antibiotics: study of extracellular polymeric substances, Water Sci. Technol. 61, 3147-3155.

Baquero, F., Martinez, J.L., Canton, R.,2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Cur. Opinion Biotechnol. 19, 260-265.

Brown, K.D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T.H., Mawhinney, D.B., 2006. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. Sci. Total Environ. 366, 772–783.

Bryskier, A., Butzler, J.P. 1997. Macrolides. In: O'Grady, F., Lambert, H. P., Finch, R. G., Greenwood D. (Eds), Antibiotic and Chemotherapy, 7th ed., pp. Churchill Livingstone, New York , 377-393..

Cole, D.W., 2009. Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. Int. J. Hyg. Environ. Health 212, 369-377.

Fan, C., Lee, P.K.H., Ng, W.J., Alvarez-Cohen, L., Brodie, E.L., Andersen, G.L, He J., 2009. Influence of trace erythromycin and erythromycin–H_2O on carbon and nutrients removal and on resistance selection in sequencing batch reactors (SBRs). Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, 185–195.

Focazio, M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Thurm, M., 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States II) untreated drinking water sources. Sci. Total Environ. 402, 201–216.

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

Gulkowska, A, Leung, H.W., So, M.K., Taniyasu, S., Yamashita, N, Yeung, L.W.Y., Richardson, B.J., Lei, A.P., Giesy, J.P., Lam, P.K.S., 2008. Removal of antibiotics from

wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. Wat. Res. 42,395–403

Hartmann, A., Alder, A.C., Koller, T., Widmer, R.M., 1998. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. Environ. Toxicol. Chem. 17, 377–382.

Halling-Sørensen, B., 2001. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. Arch. Environl. Contam. Toxicol 40, 451–460.

Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C.S., Ternes, T.A., Thomsen, A, . Siegrist, H., 2006. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. Wat. Res. 40, 1686-1696.

Karthikeyan, K.G., Meyer, M.T., 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. Sci. Total Environ.361, 196–207.

Kapuscinski, J., Wlodzimierz, S. 1979. Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. Nucleic Acids Res. 6, 3519-3534.

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.

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.

Larsson, D.G.J., de Pedro, C., Paxeus, N., 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. J. Hazard. Mat. 148, 751–755.

Lebaron, P., Catala, P., Parthuisot, N. (1998) Effectiveness of SYTOX Green Stain for Bacterial Viability Assessment. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2697-2700.

Lienert, J., Güdel, K., Escher, B. I., 2007. Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. Environ. Sci. Technol. 41, 4471-4478.

Lin, A.Y.C., Tsai, Y.T., 2009. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. Sci. Total Environ. 407, 3793–3802.

Lopez, C., Pons, M. N., Morgenroth, E., 2005. Evaluation of microscopic techniques (epifluorescence microscopy, CLSM, TPE-LSM) as a basis for the quantitative image analysis of activated sludge. Wat. Res. 39, 456-468.

Louvet, J.N., Giammarino, C., Potier, O., Pons, M.N., 2010a. Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge. Environ. Poll. 158, 688-693.

Louvet, J. N., Heluin, Y., Attik, G., Dumas, D., Potier, O., Pons, M.-N., 2010b. Assessment of erythromycin toxicity on activated sludge via batch experiments and microscopic techniques (epifluorescence and CLSM). Proc. Biochem., in press.

Pandolfi, D., Pons, M. N. (2004) Gram-staining characterisation of activated sludge filamentous bacteria by automated colour analysis. Biotechnol. Lett. 26, 1841-1846.

Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., Millard, P. J. (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2421-2431.

Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. Wat. Res. 44, 578-588.

Roth, B.L., Poot, M., Yue, S.T., Millard, P.J., 1997. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2421-2431.

Russ, C.R., The Image Processing handbook, CRC Press, Boca Raton.

Stocks, S.M. 2004. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. Cytometry Part A, 61A,189–195 .

Spongberg, A.L, Witter J.D., 2008. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. Sci. Total Environ. 397,148–57.

Savichtcheva, O., Okayama, N., Ito T., Okabe, S. 2005. Application of a direct fluorescence-based live/dead staining procedure with fluorescence in situ hybridization for assessment of survival rate of *Bacteroides* spp. in drinking water. Biotechnol. Bioeng. 92, 356-363.

Strathmann, M., Wingender, J., Flemming, H.C., 2002. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Microbiol. Meth. 50, 237-248.

Xu, W., Zhang, G., Li, X., Zouc, S., Lia, P., Hua, Z., Lia, J., 2007. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. Wat. Res. 41, 4526–4534

Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K. H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1520-1525.

General Conclusion

This study showed that both concentration and exposure time should be taken into account when studying antibiotic toxicity on activated sludge bacteria. Erythromycin destroyed flocs and reduced the specific Chemical Oxygen Demand evolution rate and the nitrification rate. The adverse effect of concentrations in the µg/L range was observed even if they appeared after the four-hour time period that is usually used in toxicity tests. Note that in WWTPs the antibiotic discharge can last during a long period and there may be an accumulation of antibiotic in the flocs. The nitrification inhibition could be hidden by the increase in the N-NH_4^+ content that increases the nitrate production; our study underlines that the total nitrogen cycle should be monitored. Moreover, the effect of erythromycin on nitrification was variable and depended on the sludge origin. Erythromycin inhibited the specific nitrification rate with sludge from Nancy WWTP, but increased the nitrification rate with sludge from Epinal WWTP.

Time-lapse Confocal Laser Scanning Microscopy and epifluorescence microscopy combined with the BacLight™ viability indicator were powerful tools to quantify erythromycin time-kill activity. Those techniques quickly give interesting results. Automation of the protocol and its widespread use could help test the effect of a large number of toxic compounds. This would help to define inhibition parameters in process modeling and can alert the risk due to antibiotics and other toxic compounds.

Our results also provide useful information for studies on the development of resistance in treatment plants. Indeed, when exposed to erythromycin, biomass defloculation could promote the environmental release of bacteria or antibiotic-resistant genes possibly acquired by bacterial species in the WWTP. Moreover, results obtained with the simultaneous Gram and viability staining indicate that antibiotics in wastewater could select the less sensitive bacteria in activated sludge. The possible link between the level of sensitivity and the genetic resistance level should be studied.

Prospects

Examination of other WWTP sludge is needed to further elucidate the underlying reasons for variability in the behavior of biomass containing erythromycin. Results from the “Laboratoire Environnement et Minéralurgie” showed that the exopolymeric substances from the Nancy WWTP sludge are different from those of Epinal WWTP as far as their size distribution is concerned. Moreover, first results of CLSM observations indicate that the exopolymeric from Nancy WWTP are different from those of Epinal WWTP concerning their protein and sugar ratio. Ongoing work on the visualization of three-dimensional structures of damaged flocs with CLSM associated with hydrodynamic studies at the scale of flocs would help to understand how antibiotics enter the flocs and lead to cell death. Indeed, the antibiotic diffusion is assumed to control the bacterial death kinetics. Moreover, Raman microscopy could be a new powerful tool to study biochemical kinetics in the sludge and in the wastewater. Raman microscopy is a non-destructive method that quickly gives quantitative and qualitative information about the organic matter.

Concerning the process improvement it should be noticed that as antibiotics are mixed with macro-pollutants the activated sludge process remains an essential process. Process improvement should solve in an integrated way the problem of biodegradation, toxicity, and resistance to antibiotics. The solution could come from pretreatement. As antibiotics are effective due to their specific structures even a denaturation of their structure could lead to a decrease in their activity on bacteria and then increase their biodegradability and decrease the resistance development. Moreover, this pretreatement of wastewater would ideally cause the death of human associated bacteria. Concerning pharmaceutical industries and intensive-care units effluents, the use of a physico-chemical process is essential.

6 Annexes

Activated sludge behaviour in a batch reactor in the presence of antibiotics: study of extracellular polymeric substances

A. C. Avella, M. Essendoubi, J. N. Louvet, T. Görner, G. D. Sockalingum,
M. N. Pons, M. Manfait and Ph. de Donato

Water Science & Technology—WST | 61.12 | 2010

Cette étude compare l'effet de l'érythromycine sur les boues activées à celui d'autres antibiotiques. L'évolution des boues est étudiée en ce qui concerne la qualité et la quantité des exopolymères.

Cette publication est le fruit d'une collaboration entre le Laboratoire Environnement et Minéralurgie, l'Unité MéDIAN de l'Université de Reims Champagne-Ardenne et le LRGP.

Activated sludge behaviour in a batch reactor in the presence of antibiotics: Study of extracellular polymeric substances

Avella A.C.[1], Essendoubi M.[2], Louvet J.N.[3], Görner T.[1], Sockalingum G.D.[2], Pons M.N.[3], Manfait M.[2], de Donato Ph.[1]

[1] Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, LEM UMR CNRS INPL 7569, 15 avenue du Charmois, 54500 Vandœuvre-les-Nancy, France.
[2] Unité Médicament, Dynamique Intracellulaire, Architecture Nucléaire (MéDIAN). Reims – Université, UFR Pharmacie, CNRS UMR 6237, 51 Rue Cognacq-Jay, F-51096 Reims, France.
[3] Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC). Nancy – Université, CNRS UMR 5503, 1 rue Grandville B.P 20451, F-54001 Nancy, France.

Abstract The influence of *Erythromycin, Roxithromycin, Amoxicillin*, *Tetracycline* and *Sulfamethoxazole* on municipal sludge in batch reactors was investigated. The study was focused on extracellular polymeric substances (EPS) as indicator of bacteria sensitivity to toxic agents. The EPS were analysed by UV-Vis and FT-IR spectroscopies and by size exclusion chromatography. It was found that *Erythromycin* and *Roxithromycin* induced a significant increase of bound EPS in flocs. This was attributed to a protection mechanism of the bacteria. *Erythromycin* was the only antibiotic which inhibited COD and nitrogen removal.

Keywords: antibiotics, sludge extracellular polymers substances, size exclusion chromatography, Fourier transform infrared micro-spectroscopy.

Introduction

Antibiotics are important pharmaceuticals used in human and veterinary medicine. The excretion from medicated animals and the application of the contaminated manure on agricultural land are among the major routes by which veterinary antibiotics enter the environment (Kümmerer, 2009). The municipal wastewater is polluted by antibiotics due to the

human excretions. The efficiency of pharmaceuticals removal in municipal treatment plants varies between almost zero values and almost complete removal, depending on the substance and on the process taking place (Hirsch et al., 1999). Most antibiotics are not completely metabolized or eliminated in the body and between 30 % and 90 % are discharged unchanged into the sewage system (Hirsch et al., 1999). The metabolites can be even more stable than the parent compounds and may have a higher potential for accumulation compared to the parent compounds (Kümmerer, 2009). Pharmaceutical active ingredients are complex molecules with different functionalities and physico-chemical and biological properties. They could have undesired effects on non-target organisms present in the environment (Kümmerer, 2009), since they have been designed to cause DNA damage to bacteria or to eukaryotic cells.

Research papers treating antibiotics in water and wastewater systems refer to various items: *i*) Biodegradation of antibiotics by biomass; *ii*) Advanced processes for antibiotics and metabolites removal; *iii*) Antibiotic resistant bacteria; *iv*) Occurrence of antibiotics in the environment. The studies concerning the first item evaluate mainly the biological pollutant removal efficiency and antibiotic toxicity. However, little attention was paid to the action of antibiotics on bacterial behaviour, especially on extracellular polymeric substances (EPS) issued from bacteria metabolism. The production of EPS is a general property of microorganisms and is a response to stress situations (Wingender et al., 1999), thus they can be considered as an indicator of "well being" of bacteria.

Microorganisms responsible for pollutant degradation in wastewater treatment live and grow in aggregated forms as biofilm or flocs where the main component are EPS (from 50 % up to 90 % of total organic matter). The EPS are key components that determine the physicochemical and biological properties of biofilms and flocs. They are composed of up to 75-90 % of polysaccharides and proteins and small amounts of lipids, DNA and RNA (Wingender et al., 1999). Their molecular sizes range from a few hundred to several hundreds of thousands of Daltons (Garnier et al., 2005).

Wingender et al. (1999) summarized the principal functions attributed to EPS, such as: binding cells and some particles together (cohesion), formation of flocs and biofilms, adhesion to surfaces, cell-cell recognition, retention of water to prevent dehydration under water deficient conditions, sorption of exogenous organic compounds and inorganic ions, enzymatic activities, or protective barrier against adverse abiotic and biotic influences from environment.

The impact of five antibiotics on activated sludge in batch reactors was investigated in the present study: two macrolides (*Erythromycin,* and *Roxithromycin*), one sulfonamide

(*Sulfamethoxazole*), one β-lactam (*Amoxicillin),* and *Tetracycline*. Table 1 presents their concentrations reported in various studies in wastewater treatment plant (WWTP) influents and effluents and in hospital effluents. The biological response of real sludge issued from a municipal WWTP to shock load of antibiotics was examined. Hence, no acclimation period was planned and the experiments were carried out in batch reactors with relatively high antibiotic concentration (10 mg/L). Drug manufacture effluents may contain antibiotic concentrations in that order of magnitude (Larsson et al., 2007). At these concentrations the bacteria still survive and it is possible to study the bacteria response such as EPS production. It was reported that crisis situations induced modification of EPS production (Aquino and Stuckey, 2004; Garnier et al., 2005; Avella et al., 2010). The contact time of the experiments was limited to 24 hours with no external nutriments supply. At a longer contact time other undesired process, such as starvation could appear. We have followed the EPS bound to bacteria in flocs and the soluble part in the bulk phase by different methods. The total protein and total polysaccharide contents were examined by UV-Vis spectroscopy. The high pressure size exclusion chromatography (HPSEC) and the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) allowed to obtain information about macromolecular size distribution and possible chemical changes respectively. The pollutant removal efficiency (Chemical Oxygen Demand (COD) and nitrogen) was also followed.

Table 1: concentrations of Erythromycin, Roxithromycin, Sulfamethoxale, Amoxicilin and Tetracycline reported in different studies: in WWTP and in hospital effluents

	WWTP				
Antibiotic	Influent (ng/L)	Bioreactor (ng/L)	Secondary effluent (ng/L)	Hospital effluents (ng/L)	Comments
Erythromycin					*Erythromycin:* macrolide antibiotic. Macrolides were the second antibiotic class mostly used in human care in european countries between 1998–2005 (ESAC). *Erythromycin* is usually applied for respiratory tract infections, infections of soft tissues and when infections are persistent to penicillin antibiotics. Its principal metabolite *Erythromycin*-H_2O is the mostly frequently detected macrolide antibiotic in WWTP effluents (Watkinson *et al.* 2009). This indicates its potential to pass through conventional treatment (Hirsch *et al.* 1999). The elimination of *Erythromycin* in conventional WWTP is incomplete. It persists in the water phase and no significant sorption process takes place on biological sludge (Göbel *et al.* 2005).
Gulkowska *et al.* (2008)	470–810				
Watkinson *et al.* (2007) and (2009)	d	d	d	N.D	
Göbel *et al.* (2005)	70 ± 120 E_{H_2O}		80 ± 60		
Roxithromycin					*Roxithromycin:* macrolide antibiotic. It is better tolerated by human than *Erythromycin*. Göbel *et al.* (2005) observed that *Roxithromycin* was persistent in the effluent from WWTP with conventional activated sludge treatment. They reported that no significant sorption of this antibiotic was detected on biological sludge.
Watkinson *et al.* (2007)	0–18	0–60	0–100		
Watkinson *et al.* (2009)	~ 8		~ 20	~ 50	
Göbel *et al.* (2005)	20 ± 20		20 ± 10		
Sulfamethoxazole					*Sulfamethoxazole* is applied in the treatment of human infections, bronchitis, bacterial meningitis, certain eye infections and urinary tract infections (www.medicinenet.com). The main human metabolite, N^4-acetylsulfamethoxazole, accounts for about 50% of the administered parent dose. In conventional WWTP, the elimination of *Sulfamethoxazole* was found to be incomplete (Göbel *et al.* 2005). Therefore it is frequently detected in rivers. In sequencing batch reactor Drillia *et al.* (2005) suggested that bacteria used *Sulfamethoxazole* as a nitrogen source when more readily biodegradable source of nitrogen was absent. They observed undetectable effluent levels after an acclimation period. Göbel *et al.* (2005) reported the sorption of *Sulfamethoxazole* on biological sludge, however N^4-acetylsulfamethoxazole was not detected in sludge despite its high concentrations in the influent.
Watkinson *et al.* (2007)	360–500	185–200	270–320	1300–2,100	
Brown *et al.* (2006)				400–2100	
Watkinson *et al.* (2009)	250 ± 2750		50 ± 150	100 ± 200	
Göbel *et al.* (2005)	430 ± 200		280 ± 560		
Amoxicillin					*Amoxicillin*: penicillin antibiotic class. The penicillin was the most consumed antibiotic in european countries (ESAC, 1998–2005). *Amoxicillin* belongs to β-lactams (cyclic amide) which are not generally considered as important environmental pollutants because they undergo thermal degradation until ultimate mineralisation to CO_2 and water (Hirsch *et al.* 1999).
Watkinson *et al.* (2007)	190–280		0–30		
Watkinson *et al.* (2009)	~ 1400		< 50	90	
Tetracycline					*Tetracycline* undergoes photochemical degradation and forms a number of degradates products. Many of them are highly soluble and stable in receiving waters. *Tetracycline* has also a tendency to form relatively stable complexes with double cations such as calcium and magnesium and with particulates matter (Halling-Sorensen *et al.* 2002). *Tetracycline* removal of water phase is not complete (Watkinson *et al.* 2009). However, *Tetracycline* is eliminated by more than 50% due to sorption on sewage sludge (Watkinson *et al.* 2007).
Watkinson *et al.* (2007)	0–35	0–20	0–30		
Watkinson *et al.* (2009)	<10		<20	<40	

Materials and Methods

Samples and reactors

Two series of experiments were performed with sludge collected in the municipal WWTP of Epinal (France, 50000 eq. inhab.) at two different dates within four weeks. The biomass efficiency for pollutant removal was studied using the inlet wastewater of the WWTP. The fresh inlet wastewater (2 L) was mixed with the sludge (1 L) sampled in the recycling line (where sludge is more concentrated) to obtain the biomass concentration in reactor of about 2,5 g/L (concentration close to the mixed liquor of the secondary tank in the WWTP). Four batch reactors (volume = 4 L) were running simultaneously during 24 hours with the biological mixture and 10 mg/L of each antibiotic (AB). One reactor without AB served as a control reactor. The aeration was performed by the air diffuser at the bottom of each reactor. After 24 hours of operation, the biomass was separated from the supernatant by centrifugation (15 min at 4500g). The soluble matter was directly analysed by methods described later. The settled biomass, before further analysis, was submitted to EPS extraction according to Frolund et al., (1996) using Dowex resin with modification of the extraction time (4 h instead of 1 h). A series of reproducibility experiments were also performed: the reproducibility of two reactors operating in parallel with a WWTP sludge sample and a given antibiotic was around 93 %. The reproducibility of EPS extraction on the same sludge sample was better than 95 %.

Mixed liquor suspended solids (MLSS) were measured according to the 2540 G protocol (Standard methods, 2005).

The soluble COD was measured during the 24 h of culture by UV-vis spectroscopy at 254 nm; this method allows a rapid estimation of COD (Mrkva, 1983). The reproducibility of COD measures was around 99 %. The ammonium content was determined by the Nessler colorimetric method (Hach Nessler Method 8038 on a Hach DR/2400 spectrophotometer (Hach Co., Colorado, USA)) using ammonium chloride for the calibration. The reproducibility was better than 97 %.

Total protein and total polysaccharide analysis by UV-Vis spectroscopy

Protein determination was performed with the Total Protein Kit; Micro Lowry® with Peterson's modification (Sigma-Aldrich, France) using bovine serum albumin as a standard for calibration from 20 to 200 mg/L, absorbance was measured at 750 nm. Polysaccharide were determined according to the classical Dubois protocol (Dubois et al., 1956) at 485 nm, calibration was performed with glucose within the concentration range from 10 to 100 mg/L. All samples were measured in duplicate and the reproducibility was better than 98 %.

HPSEC analysis

Soluble matter and extracted EPS from biomass were analysed by HPSEC to estimate the molecular sizes of present chemical species. The separation of EPS samples was carried out on a Hewlett Packard 1100 series chromatograph. A Zorbax Bio series column (GF-250, 25cm x 9.4mm, Agilent Technologies, France) thermostated at 25°C was used. The mobile phase (flow rate 1 mL/min) was 0.2 M NaCl. The detection was carried out at 25°C with a diode array UV detector at 215 nm. All samples were filtered with 0.2 μm (Chromafil®) filters prior to injection. Each obtained chromatographic peak can be a pure chemical molecule or a mixture of the EPS species and it corresponds to a given hydrodynamic molecular size depending on the nature of chemical species and depending of the chromatographic conditions. The chromatographic column elution volumes V_e were calibrated by the main EPS constituents: protein and polysaccharide. The calibration was carried out by the standard polysaccharides and standard proteins as described elsewhere (Avella et al., 2010). The variation in the chromatogram area of the same sample was less than 7 %.

FTIR analysis

The IR spectral analysis was performed using a High Throughput System (HTS-XT) coupled to a Tensor 27 FT-IR spectrometer (Bruker Optics) in the transmission mode. Thirty microlitres of the suspension were deposited on a 96-well plate made of silicon and dried under mild vacuum. Sample measurements were done in triplicate. The time-averaged signal was collected over 64 scans with a spectral resolution of 4 cm^{-1}.

Results and discussion

The mixed liquor suspended solids (MLSS) were measured at the beginning (t = 0 h) and at the end of experiment (t = 24 h) (figure 1). A decrease of suspended solids appeared in the first series of experiments in the presence of *Erythromycin* and *Roxithromycin* (figure 1a). This was probably due to the release of organic particulate matter from flocs towards the foam accumulated on top of the liquid. In the second series of experiments (figure 1b) no significant variation of MLSS was observed and the biomass seemed to be less sensitive to AB than in the first series. The sludge was sampled four weeks later in the municipal WWTP when the microbial consortium could have been exposed to different conditions.

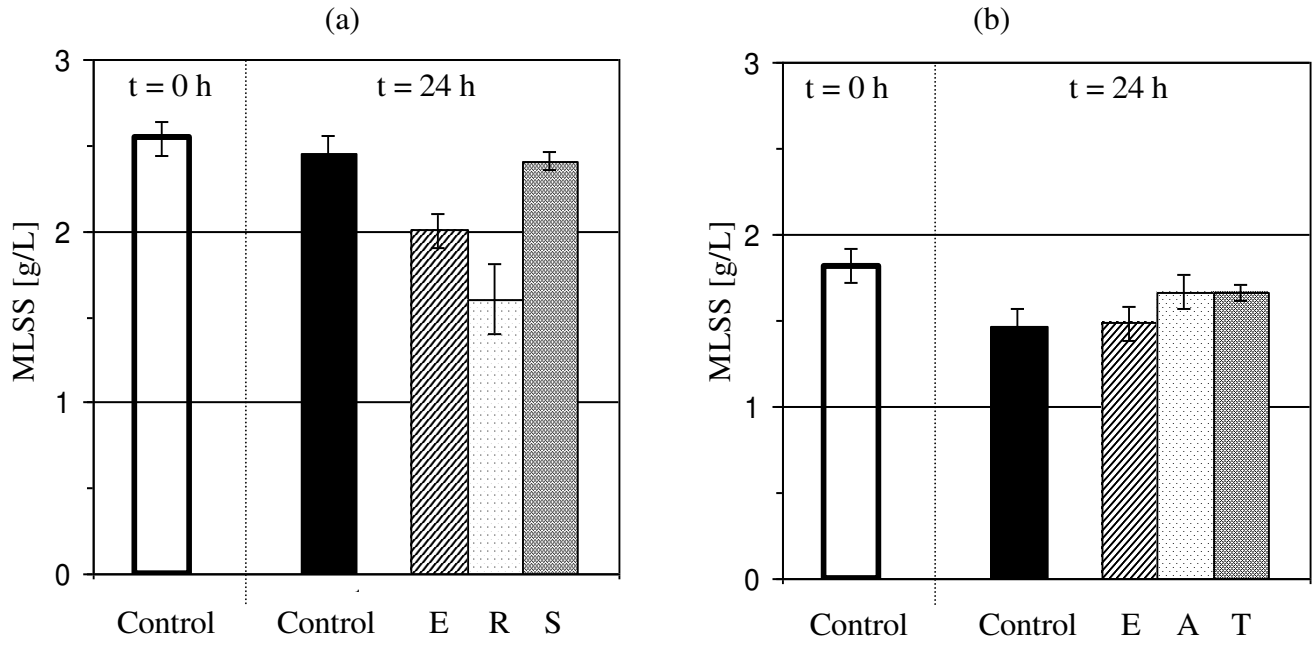


Figure 1. Mixed liquor suspended solids in the control reactor at the beginning of the experiment and after 24 hours of culture and in reactors with different antibiotics after 24 hours.

Erythromycin (E), *Roxithromycin* (R), *Sulfamethoxazole* (S), *Amoxicillin* (A) and *Tetracycline* (T)

(a) first series, (b) second series.

The area of chromatograms can be related to the EPS concentration. Figure 2 shows the chromatograms of EPS (soluble and bound in flocs), obtained in both series of experiments in the presence of antibiotics and in the control reactor.

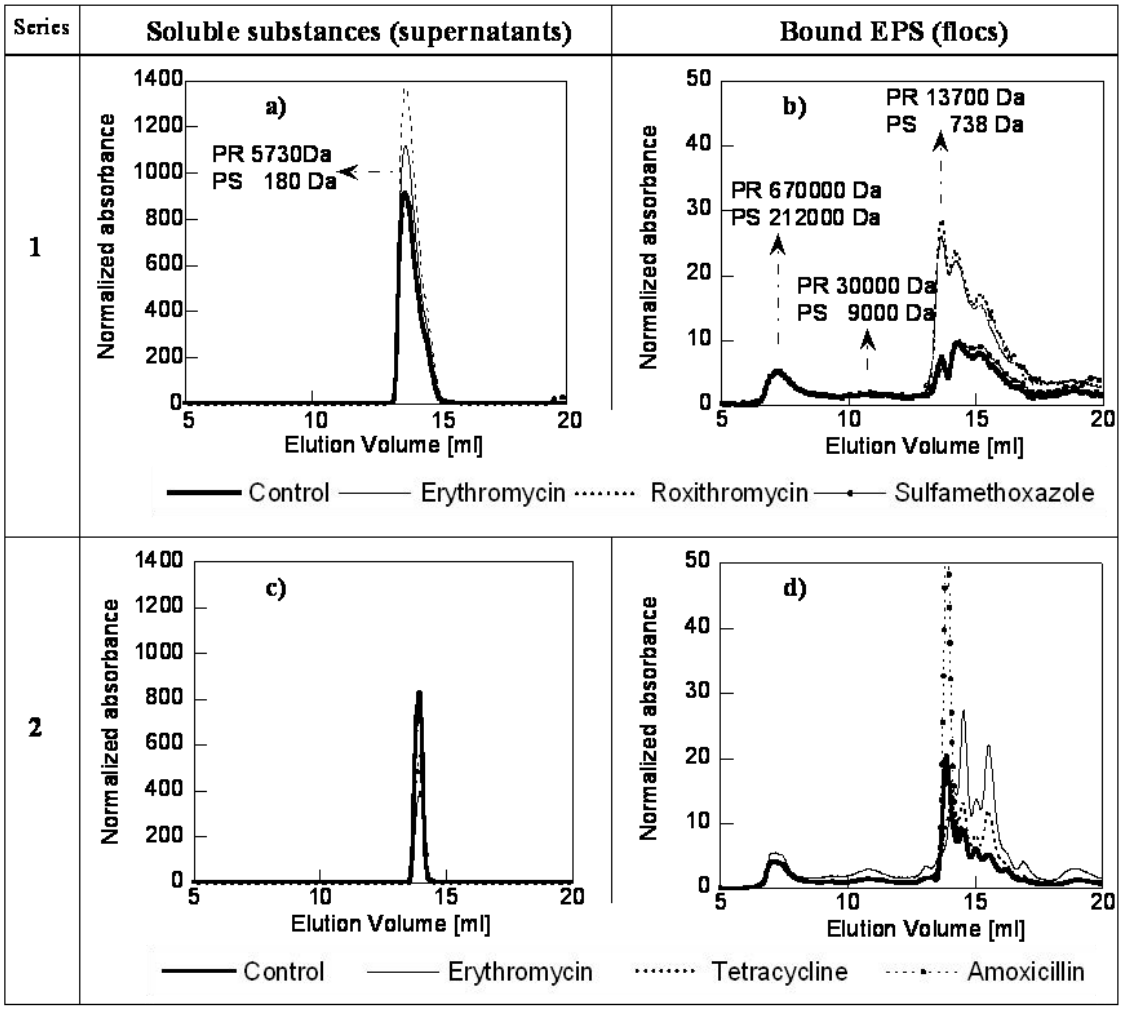


Figure 2. Normalized chromatograms of soluble substances present in supernatants (a and c) and of bound EPS (b and d) in control reactor and in reactors with antibiotics

The chromatograms were normalized by dividing their area by the biomass content (assimilated to MLSS) in each reactor, thus they are reported per gram of biomass. Both control reactors did not give identical chromatograms, especially for bound EPS: each had its own fingerprint due to the fact that the sludge was sampled in the WWTP at two different dates.

Consequently, the reactors with AB should be compared only to their corresponding control reactor.

The chromatograms of soluble matters (figure 2a and 2c) are very simple: one single peak with a maximum at V_e = 13.3 mL corresponding to small molecules (of about 5730 Da for protein and of about 180 Da for polysaccharide calibration). Slight variations in concentration of soluble matter was found between the control reactor and reactors with AB.

The bound EPS (figure 2b and 2d) have a complex chromatographic profile with different peak maxima corresponding to small, medium and high macromolecular species (up to 670000 Da for protein and up to 212000 Da for polysaccharide calibration). The presence of *Erythromycin* and of *Roxithromycin* induced a significant increase of peak corresponding to small size polymers (about 13700 Da for protein and 738 Da for polysaccharide calibration) and of molecules with retention mechanism not strictly based on the size exclusion (Ve >13.3 mL). Results obtained with *Amoxicillin* should be considered with caution because only one peak increased. The increase of EPS suggests that the biomass was sensitive to the presence of these three antibiotics. On the other hand, *Sulfamethoxazole* and *Tetracycline* seem to have no influence on the bound EPS present in flocs, their chromatograms are practically identical to the EPS in the control reactor.

The total protein and total polysaccharide concentrations determined by classical UV-Vis spectroscopy are presented on figure 3. It can be observed that their distribution is different in soluble and in bound phases. Soluble phases contain higher polysaccharide content than that of protein (except in *Amoxicillin* presence). On the contrary, the bound phases exhibited systematically higher protein content compared to polysaccharide.

In the first series of experiments (figure 3a and 3b), an increase of protein and polysaccharide concentrations was seen mainly in bound EPS in the presence of *Erythromycin* and *Roxitromycin* and to a lesser extent in the presence of *Sulfamethoxazole*. In the second series (figure 3c and 3d) no important variations were observed between the control reactor and reactors with AB, only very slight increase of the protein and polysaccharide content in *Erythromycin* presence and high protein content in soluble phase in reactor with *Amoxicillin*.

Soluble and bound phases were analysed by FTIR. The spectra of soluble phase substances exhibited amine and polysaccharide functionalities. However, amides functions were

absent, it means that proteins were not an abundant compound in the soluble phase (results not shown).

The spectra of bound EPS exhibited the bands of proteins and of polysaccharides. Their quantification was performed by integrating their corresponding IR regions: protein at 1500-1700 cm^{-1} (amide groups) and polysaccharide at 900-1200 cm^{-1} (ether groups). The figure 3 shows the FTIR spectra of bound EPS and their corresponding protein and polysaccharide quantification. All spectra were reported per gram of MLSS. It can be observed that spectra exhibit the same IR regions in the presence or absence of antibiotics. Only a global variation in absorbance was noted (figure 3e and 3g) which can be related to the variation of the total amount of protein and polysaccharide (figure 3f and 3h). *Erythromycin* and *Roxithromycin* induced an important increase of bound EPS while *Amoxicillin*, *Tetracycline* and *Sulfamethoxazole* influence was lower.

When comparing the protein and polysaccharide quantification by classical UV-Vis and by FTIR spectroscopy the tendency remained identical: *Erythromycin* and *Roxithromycin* induced the most important increase of bound EPS. Some results may be slightly different due to the fact that each method has its own bias (sensitivity, preparation of samples or interferences).

The DNA patterns were found in the supernatants of all reactors, including the control. It means that the presence of AB did not seem to be at the origin of this phenomenon; it can be attributed to the natural bacterial decay. The thorough examination of IR spectra in the 600-650 cm^{-1} region showed that in the presence of *Erythromycin* a shoulder appeared. This might be related to the guanine presence (Akhebat et al., 1992) relative probably to cells damages.

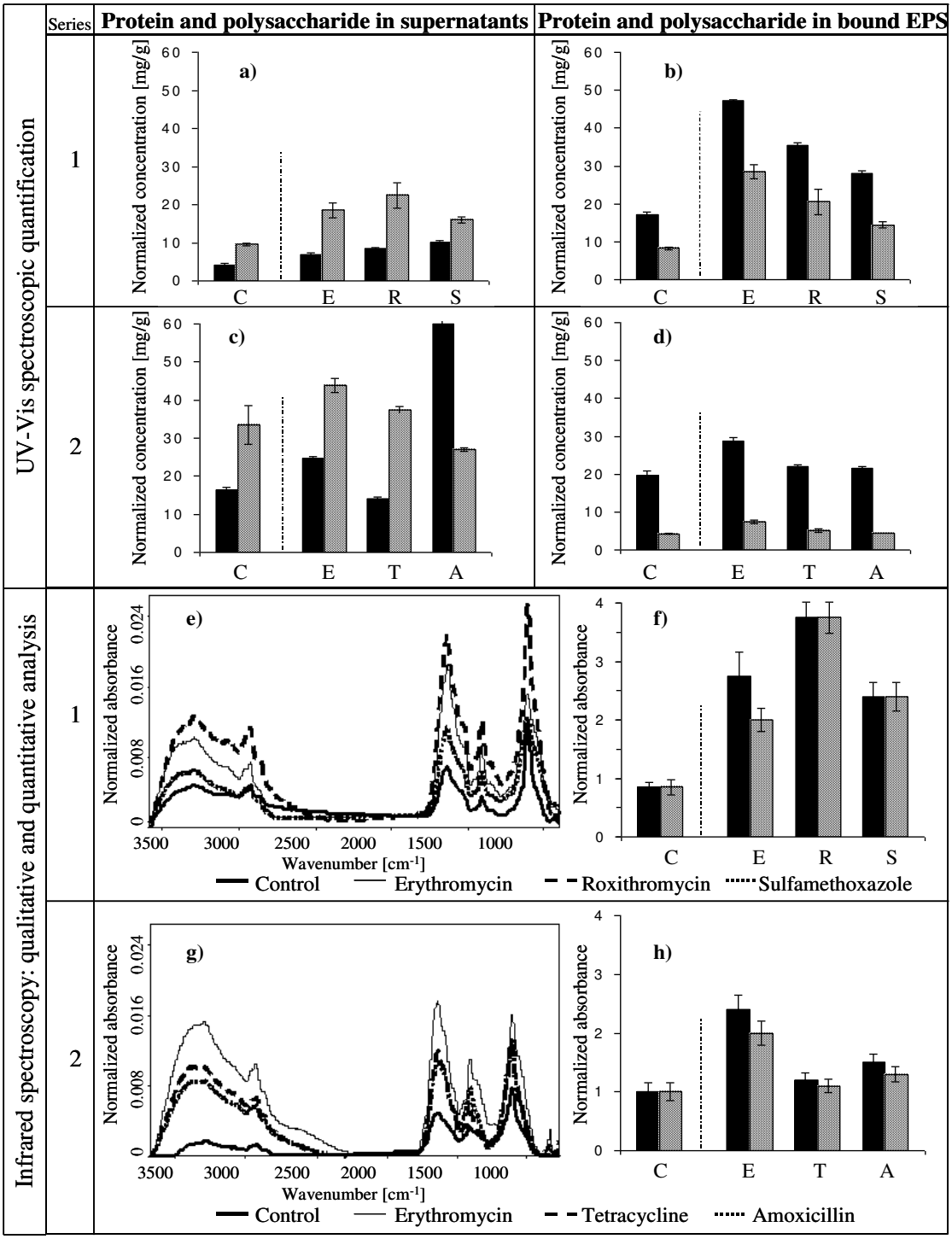


Figure 3. UV-Vis spectroscopic quantification. Normalized concentrations (per gram of MLSS) of protein and polysaccharide present in supernatant (a and c) and in bound EPS (b and d) issued from control reactor (C) and from reactors with antibiotics: *Erythromycin* (E), *Roxithromycin* (R), *Sulfamethoxazole* (S), *Tetracycline* (T) and *Amoxicillin* (A).

Normalized FT-IR spectra of bound EPS (e and g) obtained in experiments of series 1 and of series 2. Quantification of protein and polysaccharide (f and h) by integrating the corresponding IR bands.

■ protein ⧄ polysaccharide.

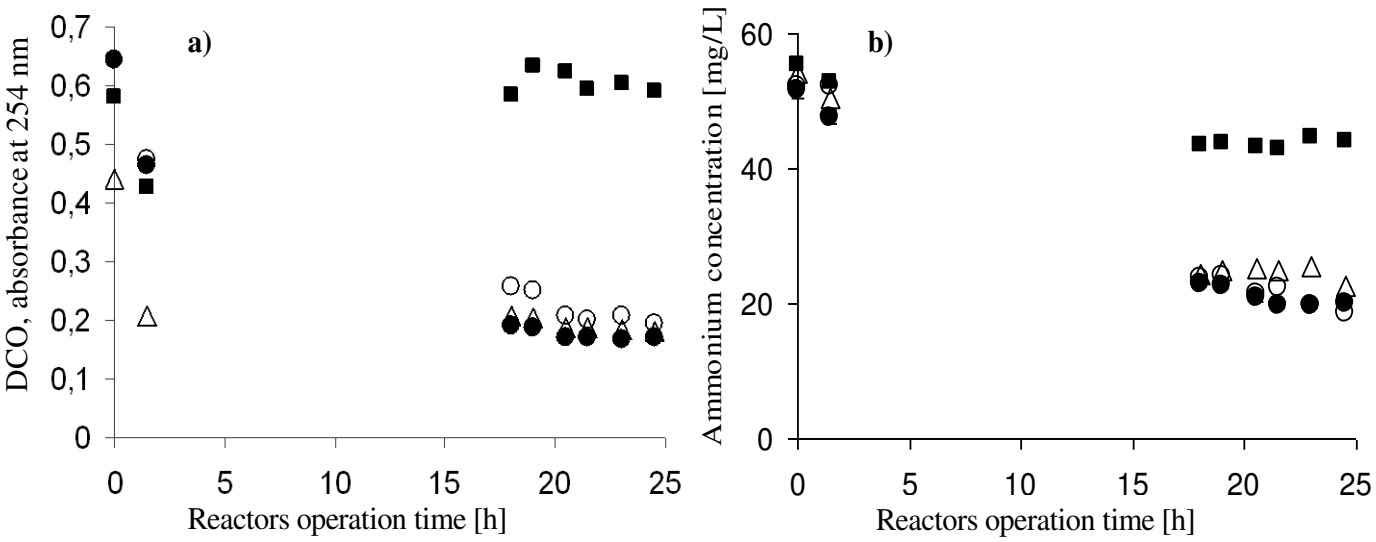


Figure 4. Evolution of the COD and nitrogen removal over the reactors operation time: in control reactor (●) and in reactors with antibiotics: *Erythromycin* (■), *Tetracycline* (○) and *Amoxicillin* (△).

The biomass ability for COD and nitrogen removal was measured in both series of experiments. *Roxithromycin, Sulfamethoxazole, Amoxicillin* and *Tetracycline* did not alter the bacteria capacity to degrade the pollutants. The COD and nitrogen removal performance (70 % and 55 %, respectively) were identical in the control reactor and in the reactors with these antibiotics. However *Erythromycin* inhibited the biological removal of pollutants in both series. Even when biomass appeared to be less sensitive to AB in second series. In reactor with *Erythromycin* (figure 4), the COD removal was inhibited and the NH_4^+ concentration was reduced only slightly (18 %).

The chromatographic analysis, together with UV-Vis and FT-IR analysis, showed that *Erythromycin* and *Roxithromycin* induced an increase of the bound EPS concentration in flocs. At the same time, these antibiotics provoked a partial disintegration of flocs (observed by the decrease of MLSS). It was reported that bacterial stress response mechanism called K^+ efflux plays a significant role in the deflocculation (Bott and Love, 2002). The release of floc organic matter to the bulk and to the foam can be attributed to this phenomenon. The enhanced EPS production in flocs may be a bacteria response to the stress situation to compensate for the loss of protective barrier. Moreover, *Erythromycin* inhibited the pollutants removal, suggesting that *Erythromycin* has a stronger toxic effect on the biomass than *Roxithromycin*. Indeed, the FTIR spectra exhibited the possible guanine presence only in the supernatant of the reactor with *Erythromycin*. This is a complementary hint about the particular action of *Erythromycin* on biomass.

Stewart and Costerton (2001) suggested that antibiotics might kill free-floating bacteria, but fail to eradicate the bacterial cells still embedded in the biofilm. Antibiotics must cross the thick mixture of EPS to reach their targets cells. In that diffusion process, AB could be deactivated. The bacteria in the surface layers of the biofilm could degrade the antimicrobial agent and could preserve the more deeply embedded cells.

In our experiments the sludge bacteria might have been accustomed to some of AB. Indeed, *Sulfamethoxazole* is today almost obsolete as a single agent due to the development of bacterial resistance; now it is used in combination with trimethoprim (www.medicinenet.com). Our experiments showed that the biomass exposed to this AB behaved in the same manner as in the control reactor and no complementary EPS were produced. Further, the bacteria were not sensitive to the *Tetracycline* presence. Prado et al. (2009) observed also only a slight impact of *Tetracycline* on biomass at four times higher concentrations than that in our experiments.

Conclusions

The influence of *Erythromycin, Roxithromycin Amoxicillin*, *Tetracycline* and *Sulfamethoxazole* on the biological properties of the sludge was studied in lab-scale batch reactors. The study of EPS (bound and soluble fraction) allowed to assess the bacteria sensitivity to different antibiotics.

In spite of shock loads of 10 mg/L, *Amoxicillin*, *Tetracycline* and *Sulfamethoxazole* had no observable impact: the bacteria continued to consume the organic pollution and no significant increase of bound or soluble EPS was found.

Erythromycin and *Roxithromycin* induced an increase of bound EPS in flocs, a phenomenon attributed to the protective mechanism of bacteria exposed to the toxic stress. The release of flocs organic matter to the bulk and foam was also observed. The *Erythromycin* toxic effect on the biomass was more important than that of *Roxithromycin*, the *Erythromycin* presence inhibited the COD and nitrogen removal.

The biomass in WWTP can vary depending on the treatment process, pollutants or climatic conditions and thus it may be more or less sensitive to the antibiotics. The EPS considered as indicator of bacteria behaviour showed that bacteria seem tolerant or to be accustomed to some antibiotics while they can be very sensitive to others such as both studied macrolides. For a better understanding of these antibiotics action on biomass, further studies are necessary.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support of ANR (Project ANTIBI-EAU ANR-07-BLAN-0195-02), project EC2CO, Zone Atelier Moselle (ZAM) and CPER (Lorraine).

References

Akhebat A., Dagneaux C., Liquier J. and Taillandier E. (1992). Triple helical polynucleotidic structures: an FTIR study of the C+ .G. C triplet. *J Biomol Struct Dyn.*, **10**(3), 577-588.

Anderson G.G. and O'Toole G.A. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. in: Bacterial biofilms. Tony Romeo (ed.). Springer.

Aquino S. and Stuckey D. (2004). Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research*, **38**(2), 255-266.

Avella A.C., Delgado L.F., Görner T., Albasi C., Galmiche M. and de Donato Ph. (2010). Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, **101**(2), 518-526.

Bott C. and Love N. (2002). Investigating a mechanistic cause for activated sludge deflocculation in response to shock loads of toxic electrophilic chemicals. *Water Environment Research,* **74**(3), 306-315.

Brown K.D., Kulis J., Thomson B., Chapman T.H. and Mawhinney D.B. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, **366**(2-3), 772-783.

Drillia P., Dokianakis S.N., Fountoulakis M.S., Kornaros M., Stamatelatou K. and Lyberatos G. (2005). On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: the example of the antibiotic sulfamethoxazole. *Journal of Hazardous Materials*, **122**(3), 259-265.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry,* **28**(3), 350–356.

ESAC (The European Surveillance of Antimicrobial Consumption)

http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3284

(accessed 30 January 2009)

Frolund B., Palmgren R., Keiding K. and Nielsen P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research,* **30**(8), 1749-1758.

Garnier Ch., Görner T., Lartiges B., Abdelouhab S. and de Donato Ph. (2005). Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: a combined size-exclusion chromatography and infrared microspectroscopy study. *Water Research*, **39**(13), 3044-3054.

Göbel A., Thomsen A., Mcardell C., Joss A. and Giger W. (2005). Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides and trimethoprim in activated sludge treatment *Environ. Sci. Technol*., **39**(11), 3981-3989.

Gulkowska A., Leung H.W., So M.K., Taniyasu S., Yamashita N., Yeung L.W.Y., Richardson B.J., Lei A.P., Giesy J.P. and Lam K.S.P. (2008). Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water Research*, **42**(1-2), 395-403.

Hirsch R., Ternes T., Haberer K. and Kratz K.L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*., **225**(1-2), 109-118.

Halling-Sorensen B., Sengelov G. and Tjornelund J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*., **42**(3), 263-271.

Kümmerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – a review - part I. *Chemosphere,* **75**(4), 417-434.

Larsson D., de Pedro C. and Paxeus N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, **148**(3), 751-755.

Mrkva M. (1983). Evaluation of correlations between absorbance at 254nm and COD or river waters. *Water Research,* 17, 231-235.

Prado N., Ochoa J. and Amrane A. (2009). Biodegradation by activated sludge and toxicity of tetracycline into a semi-industrial membrane reactor. *Bioresource Technology*, **100**(15), 3769-3774.

Standard methods for the examination of water and wastewater (2005). 21st Ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. Washington D.C., USA.

Stewart P. and Costerton J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms-Review. *The Lancet*, **358**, 135-138.

Watkinson A.J., Murby E.J. and Costanzo S.D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research,* **41**(18), 4164-4176.

Watkinson A.J., Murby E.J., Kolpin D.W. and Costanzo S.D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Science of the total environment*, **407**(8), 2711-2723.

Wingender, J., Neu, T.R. and Flemming, H.C. (eds.) (1999). Microbial Extracellular Polymeric Substances. Springer, Heidelberg.

http://www. medicinenet.com/sulfamethoxazole/article.htm/ (accessed 22 June 2009)

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Christophe DAGOT, Professeur, ENSIL, Limoges

Monsieur Eberhard MORGENROTH, Professeur, EAWAG, Process Engineering, Duebendorf, Suisse

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur LOUVET Jean-Noël

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Effets des antibiotiques sur le procédé d'épuration par boues activées. Etude du cas de l'érythromycine, du floc bactérien au réacteur biologique"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Génie des Procédés et des Produits »**

Fait à Vandoeuvre, le 26 octobre 2010
Le Président de l'I.N.P.L.,
F. LAURENT

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE - NANCY -

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Effets des antibiotiques sur le procédé d'épuration par boues activées. Etude du cas de l'érythromycine, du floc bactérien au réacteur biologique

L'objectif de ce travail est de caractériser l'effet de l'érythromycine sur l'activité bactérienne et l'inhibition de l'épuration dans les réacteurs de traitement des eaux usées urbaines. L'étude a montré l'importance du temps d'exposition à l'érythromycine. L'inhibition de la nitrification et de l'épuration de la DCO a été mesurée sur une période de 4 h pour des concentrations supérieures à 1 mg/L d'érythromycine alors que l'inhibition de l'épuration pour une concentration d'érythromycine de 4 µg/L a été mesurée suite à 20 h d'exposition. L'origine de la liqueur mixte est également déterminante : l'érythromycine a inhibé la nitrification avec les boues de Nancy mais n'a pas inhibé la nitrification avec les boues et d'Epinal. Par contre, l'inhibition de l'épuration de la DCO a été mesurée pour les deux boues. Des analyses microscopiques ont montré qu'en présence d'érythromycine les flocs bactériens se fractionnaient suite aux lyses bactériennes. La microscopie en épifluorescence et la microscopie confocale combinées à des marqueurs de viabilité fluorescents ont permis de déterminer les vitesses de mortalité bactérienne. Ces études ont mis en évidence un temps de latence qui précède la mortalité des bactéries. Ce temps de latence pourrait être lié aux mécanismes d'adsorption de l'antibiotique et de diffusion dans les flocs, ainsi qu'à la vitesse biologique de mortalité. Enfin, un marquage simultané Gram et viabilité (microscopie confocale 3D au cours du temps) a montré que l'érythromycine pourrait modifier la composition bactérienne des boues en sélectionnant les bactéries les moins sensibles.

Mots clés : boues activées, antibiotiques, microscopie confocale, viabilité, inhibition nitrification

Effects of antibiotics on activated sludge process. The Erythromycine case, from activated sludge flocs to the biological reactor.

This study examines the effect of erythromycin on activated sludge bacteria and the inhibition of the pollution removal in batch reactors treating urban wastewater. Results showed the importance of exposure time to erythromycin. Inhibition of nitrification and COD removal was measured during a 4 h period for erythromytcin concentrations higher than 1 mg/L. A 4 µg/L erythromycin concentration inhibited COD removal during a 20 h exposure time. The effect of erythromycin on nitrification was variable depending on the sludge origin. Erythromycin inhibited the specific nitrification rate with sludge from Nancy WWTP, but increased the nitrification rate at the other facility (Epinal WWTP). The cell lysis resulted in destruction of activated sludge flocs. Microscopic techniques (epifluorescence and confocal laser scanning microscopy (CLSM)), combined with a fluorescent viability indicator, allowed us to study erythromycin time-kill activity.Viability staining results showed a latency time before the lower antibiotic concentrations began to kill bacteria. This latency time could be related to antibiotic adsorption and diffusion into activated sludge flocs as well as the rate of bateria death. The effect of erythromycin according to the bacterial Gram type was investigated with 3-dimensional Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) time-lapse imaging combined with a Gram and Viability staining. $Gram^+$ bacteria had a higher mortality rate than the $Gram^-$ bacteria. This result suggests that antibiotic in wastewater could change the activated sludge bacteria composition according to their Gram type by selecting bacteria the less sensitive to the antibiotics.

Key words : activated sludge, antibiotics, microscopy, viability staining, inhibition nitrification