



**HAL**  
open science

# Ecodynamique et activité toxicologique des oestrogènes au cours du traitement des eaux résiduaires et des boues urbaines

Mathieu Muller

► **To cite this version:**

Mathieu Muller. Ecodynamique et activité toxicologique des oestrogènes au cours du traitement des eaux résiduaires et des boues urbaines. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2008. Français. NNT : . tel-02824302

**HAL Id: tel-02824302**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02824302>**

Submitted on 6 Jun 2020

**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.

# T H E S E

*pour obtenir le grade de*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

*Formation Doctorale : Biotechnologie et microbiologie*  
*Ecole Doctorale : Sciences des procédés – Sciences des aliments*

*présentée et soutenue publiquement le 21 mai 2008 par*

**Mathieu MULLER**

---

## ECODYNAMIQUE ET ACTIVITE TOXICOLOGIQUE DES ŒSTROGENES AU COURS DU TRAITEMENT DES EAUX RESIDUAIRES ET DES BOUES URBAINES

---

### JURY

<b>M<sup>me</sup> Claude CASELLAS</b>	<i>professeur UM1, rapporteur</i>
<b>M Robert DURAN</b>	<i>professeur UPPA, rapporteur</i>
<b>M Alain GRASMICK</b>	<i>professeur UM2, président du jury</i>
<b>M Gilles MONOD</b>	<i>chargé de recherche INRA, examinateur</i>
<b>M Jean Philippe DELGENES</b>	<i>directeur de recherche INRA, directeur de thèse</i>
<b>M Damia BARCELO</b>	<i>directeur de recherche IIQAB, invité</i>
<b>M<sup>me</sup> Cécile MIEGE</b>	<i>chargée de recherche Cemagref, invitée</i>

---

Année :

N° :

---

---

*... à Nadine Delgenès,  
... une grande dame qui manque beaucoup à beaucoup de monde ici au LBE  
... reviens vite pour nous mais reviens vite pour toi avant tout.*

*... à mon Grand-Père,  
... un sacré monsieur parti quelques jours avant la naissance de ce manuscrit  
... merci pour tout ce que tu m'as enseigné sur la vie  
... merci de nous avoir tous conduits jusque là.*

---

## AVANT-PROPOS

Mes travaux de thèse ont été menés au sein du département Environnement et Agronomie (E&A) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). J'ai intégré le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE)<sup>1</sup>, situé à Narbonne dans l'Aude, et administrativement rattaché au centre INRA de Montpellier. Le LBE est composé de trois équipes de recherche : écologie microbienne (EM), ingénierie des procédés (IP) et transfert technologique (TT). Ces équipes travaillent en synergie sur le thème du traitement biologique des effluents et des résidus solides d'origine agricole, urbaine ou industrielle. Les travaux portent principalement sur la dépollution carbonée, azotée et phosphorée ; l'élimination des micropolluants organiques ; la valorisation de sous-produits par production de molécules d'intérêt industriel ; et la détection moléculaire de microorganismes dans les boues et les procédés de dépollution. L'objectif de ces recherches est la production de connaissances fondamentales ainsi que le développement de solutions technologiques au stade pilote pour les professionnels. Au sein de l'équipe IP, la thématique Composés Traces Organiques (CTO) porte sur l'étude de la dynamique de micropolluants organiques au sein des systèmes de traitement des eaux et des boues et la compréhension des mécanismes influençant cette dynamique. L'objectif est d'évaluer et de réduire l'impact écotoxicologique des ces composés sur les milieux récepteurs. Les molécules étudiées appartiennent, essentiellement, au groupe des composés perturbateurs endocriniens (PE).

Ma thèse a été financée conjointement par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) et l'INRA. Elle a, par ailleurs, nécessité la mise en place de collaboration avec des instituts de recherche publique et avec des gestionnaires privés ou publics du secteur de l'eau.

---

<sup>1</sup> <http://www.montpellier.inra.fr/narbonne/>

---

## REMERCIEMENTS

*Merci, c'est un beau mot, un mot fort à mes yeux, que j'apprécie tout particulièrement et qui se suffit presque à lui-même.*

*Alors plutôt que de chercher mille et une formules, je dirai simplement :*

Merci à **Jean-Philippe Delgenès**,

en tant que directeur du LBE, pour m'avoir accueilli ici,

en tant que directeur de thèse, pour avoir suivi mon travail, pour m'avoir conseillé et soutenu dans des moments plus difficiles.

Merci à **Dominique Patureau et Guillermina Hernandez**, mes encadrantes scientifiques... ☯

différentes mais complémentaires, vous m'avez énormément apporté scientifiquement et humainement chacune à votre manière... et c'est tant mieux.

Merci à **Nadine Delgenès**, mon gourou ...

pour ton aide quotidienne, ta très grande sympathie et ta philosophie qui me suivra désormais... et notamment "*Il faut savoir perdre du temps pour en gagner*"... une variante de *de La Fontaine* finalement.

Merci à **Sylvain Davidson, Laure Espinasse et Célia Boutinaud**,

stagiaires qui ont participé à ces travaux de recherches... votre contribution est grande.

Merci à **Isabelle Deportes, Patricia Bonin et Etienne Paul**,

membres de mon comité de thèse... vos remarques et conseils ont toujours été très judicieux.

Merci à l'**ADEME** et à l'**INRA**,

pour m'avoir permis de manger et de vivre correctement.

Merci à **Patrick Balaguer, Sonia Dagnino et Fanja Rabenoelina** (INSERM)

**Rocher Vincent** (SIAAP)

**Valérie Bergheaud, Pierre Benoît et Sabine Houot** (INRA EGC)

... d'indispensables partenaires pour tout cela.

Plus particulièrement, **Vincent et Sam**,

merci de m'avoir donné goût à ce métier en toute simplicité... mais aussi pour m'avoir mis en garde sur certains points.





Merci à tous les techniciens du LBE qui font que "ça marche" ...

et notamment : **Valérie, Gaëlle, Thierry, Emmanuelle, Philippe, Guillaume** et **Pascal**... votre patience est souvent mise à rude épreuve !

Merci à tout le personnel administratif qui fait aussi que "ça marche" ...

la "dream team" : **Nadine, Sylvie, Annie, Véronique** et **Isabelle**.

Merci à tous **les scientifiques** du LBE...

qui, de près ou de loin, m'ont apporté leur aide ou, simplement, participent à la dynamique scientifique de ce laboratoire.

Merci à **mes camarades** thésards, précaires et stagiaires qui ont fait de ce séjour au LBE ce qu'il est... un véritable bonheur ! La liste serait longue mais je tiens à citer ceux qui m'ont marqué ou avec qui j'ai partagé de bons moments... voire d'inoubliables moments !

**Sylvain** et **Julien** (belles ballades en VTT), **Antoine, Djallel, César, Olivier, Annelyse, Maëva** et **Emeline** (les âmes de la première heure), **Anthony** (belles ballades en VTT aussi), **Tobias** (king of LAS), **Stephano** et **Caterina** (supers souvenirs d'Italie), **Djimmy** (tu m'a marqué mais sûrement moins que le canapé de Maga), **Yanis** (incroyable), **Romy-Alice** et **Seb** (désolé pour le radiateur), **Magali** (tout aussi incroyable), **Bruneo** (il faut que tu passe la 3<sup>e</sup> leçon... courage), **Bruno** (toute bonne loose a une fin), **Alexis** (arrête de courir), **Jérémy** (ou **monsieur Connard**), **Max & Co** (merci aussi à leur terrasse), **Mathieu L** (pardon... et fais pas genre que t'as pas entendu), **Juan** (ou **Juanito Banana**), **Flo** (**Valentin** aussi... en espérant mieux vous connaître), **Sarah** et **Maia** (vous êtes toutes les deux adorables d'attentions... des perles), **Yan** (dans les incroyables... t'es pas mal aussi), **Marie-Laure** (une sacrée pote...) **David** (si tous les Bretons étaient comme toi il faudrait vous donner l'indépendance... et vite), **JB** (la même chose... mais pour les Corses), **Romain** (gaffe... fais pas comme l'oiseau tu risques de te faire mal), **Caro** (ta naïveté est attendrissante) et **Amélie** (j'aurais beaucoup de choses à te dire mais juste une... le sac poubelle te va à merveille).

Merci à celles qui ont partagé ma vie durant ces trois années...

**Laura**, mes racines....

**Laure**, ma délivrance...

**Emilie**, mon espoir...

leur soutien, leur amour au quotidien et leur courage sont très loin de n'y être pour rien dans l'aboutissement de ce travail... merci pour toutes les joies, les folies, le bien-être dont vous m'avez illuminé... vous m'avez toutes beaucoup enrichi.

Enfin, merci à **ma famille** (l'union fait la force... on l'oublie un peu vite)



## SOMMAIRE

<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>5</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>7</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>21</b>
<b>I. Les œstrogènes en tant que perturbateurs endocriniens</b>	<b>21</b>
<i>I.1 Propriétés physico-chimiques des œstrogènes</i>	<i>21</i>
<i>I.2 Fonctions biologiques des œstrogènes</i>	<i>23</i>
<i>I.2.1 Le système endocrinien</i>	<i>23</i>
<i>I.2.2 Les œstrogènes en particulier</i>	<i>23</i>
<i>I.2.3 Cas des œstrogènes de synthèse</i>	<i>24</i>
<i>I.1 Transfert des œstrogènes vers les milieux naturels</i>	<i>25</i>
<i>I.2.4 Excrétion des œstrogènes</i>	<i>25</i>
<i>I.2.5 Présence des œstrogènes dans les milieux naturels</i>	<i>26</i>
<i>I.3 Aspects écotoxicologiques</i>	<i>27</i>
<i>I.3.1 La disruption endocrinienne</i>	<i>27</i>
<i>I.3.2 L'activité œstrogénique ou œstrogénicité</i>	<i>28</i>
<i>I.3.3 Evaluation de l'activité œstrogénique : bio-test <i>in vitro</i></i>	<i>30</i>
<i>I.3.4 Effets des œstrogènes observés <i>in vivo</i></i>	<i>33</i>
<b>II. Les œstrogènes et le cycle de l'eau urbaine</b>	<b>34</b>
<i>II.1 Les œstrogènes dans les eaux résiduaires urbaines</i>	<i>35</i>
<i>II.1.1 Concentrations en œstrogènes et activité œstrogénique</i>	<i>35</i>
<i>II.1.2 Estimation des concentrations d'œstrogènes dans les eaux résiduaires urbaines</i>	<i>37</i>
<i>II.2 Comportement dans les stations d'épuration</i>	<i>39</i>
<i>II.2.1 Efficacité globale et impact des différents traitements</i>	<i>39</i>
<i>II.2.2 Paramètres influant l'efficacité des traitements secondaires</i>	<i>41</i>
<i>II.2.3 Mécanismes impliqués dans l'élimination des œstrogènes</i>	<i>43</i>
<i>II.2.3.1 La biodégradation des œstrogènes</i>	<i>43</i>
<i>Potentiel de biodégradation des boues activées</i>	<i>43</i>
<i>Acteurs microbiens de la biodégradation</i>	<i>45</i>
<i>II.2.3.2 L'adsorption des œstrogènes</i>	<i>46</i>
<i>II.2.4 Impact des traitements appliqués aux boues d'épuration</i>	<i>48</i>
<i>II.3 Les œstrogènes dans les eaux traitées</i>	<i>50</i>
<b>III. Conclusions sur la synthèse bibliographique</b>	<b>53</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>57</b>
<b>I. Prélèvements effectués sur les systèmes réels de traitement des eaux et des boues</b>	<b>57</b>
<i>I.1 Prélèvements et conditionnement des échantillons dans le cas des suivis de procédés</i>	<i>57</i>
<i>I.2 Prélèvements et conditionnement d'inocula pour les cultures d'enrichissement</i>	<i>57</i>
<b>II. Méthodes d'analyses utilisées dans le cas des suivis de procédés</b>	<b>57</b>
<i>II.1 Dosage et extraction des œstrogènes</i>	<i>57</i>
<i>II.1.1 Cas des échantillons liquides</i>	<i>57</i>
<i>II.1.2 Cas des échantillons solides</i>	<i>58</i>
<i>II.1.3 Dosage en chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse</i>	<i>60</i>
<i>II.1.4 Dosage des œstrogènes en chromatographie liquide-spectrométrie de masse tandem</i>	<i>60</i>
<i>II.2 Mesure des activités endocriniennes : Bio-tests MELN, HahLP et HGPXR</i>	<i>61</i>
<b>III. Méthodes d'analyses des œstrogènes radiomarqués</b>	<b>62</b>
<i>III.1 Mesure de la radioactivité totale</i>	<i>62</i>

<i>III.2 Dosage des œstrogènes radiomarqués</i>	62
<b>IV. Cultures bactériennes : enrichissements et cinétiques de dégradation</b>	<b>63</b>
<b>V. Méthodes d'analyse utilisées dans le cas des cultures bactériennes</b>	<b>64</b>
<i>V.1 Analyse des œstrogènes en chromatographie liquide-fluorimétrie</i>	64
<i>V.2 Méthodes de quantification de la biomasse</i>	64
<i>V.3 Isolement sur milieu gélosé</i>	65
<i>V.4 Méthodes d'analyses moléculaires</i>	65
V.4.1 Suivi des communautés bactériennes : PCR-SSCP	65
V.4.2 Identification des espèces bactériennes : clonage-séquençage	65
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>69</b>
<b>I. Devenir des œstrogènes dans les systèmes de traitement des eaux résiduaires et des boues urbaines</b>	<b>69</b>
<i>I.1 Dynamique des œstrogènes et de l'activité œstrogénique au cours du traitement des eaux résiduaires urbaines</i>	69
CHEMICAL AND BIOLOGICAL ANALYSIS OF ENDOCRINE DISRUPTING HORMONES AND ESTROGENIC ACTIVITY IN AN ADVANCED SEWAGE TREATMENT PLANT	71
<i>I.2 Dynamique des œstrogènes et de l'activité œstrogénique au cours du traitement des boues urbaines</i>	89
OCCURRENCE OF ESTROGENS IN URBAN SEWAGE SLUDGE AND FATE DURING A PLANT-SCALE ANAEROBIC TREATMENT	91
FATE OF ORGANIC MICROPOLLUTANTS AND ENDOCRINE DISRUPTING ACTIVITIES DURING BIOSOLIDS COMPOSTING	107
<b>II. Mécanisme de biodégradation des œstrogènes et identification des bactéries impliquées</b>	<b>122</b>
BIODEGRADATION OF NATURAL AND SYNTHETIC ESTROGENS BY ENRICHED MIXED CULTURES OBTAINED FROM AN EFFECTIVE POLLUTANT-REMOVING ACTIVATED SLUDGE PROCESS	124
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>143</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>149</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>155</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>155</b>

---

## INTRODUCTION

---

---

## INTRODUCTION

De nombreuses molécules organiques, produites et utilisées par l'homme, mais aussi d'origine naturelle se retrouvent dans les eaux usées urbaines. Ces molécules, présentes à de très faibles concentrations, possèdent généralement des toxicités élevées. Elles sont dénommées *micropolluants organiques* ou *composés traces organiques* (CTO). L'éventail de leurs sources et leur nature n'a cessé de s'élargir. L'intérêt, surtout porté sur les activités industrielles au départ, s'est étendu aux activités domestiques, de soins médicaux et personnels, tout aussi problématiques. Ces molécules peuvent présenter des propriétés cancérogènes, mutagènes, tératogènes, induire des antibiorésistances ou perturber le système endocrinien.

Le système endocrinien est, avec le système nerveux, l'un des deux systèmes de communication cellulaire dans l'organisme. Les CTO peuvent perturber ce système soit par mimétisme, soit par antagonisme, en se fixant sur les récepteurs endocriniens. Ils modifient ainsi la réponse naturelle de l'organisme. Les CTO capables de perturber les systèmes endocriniens sont appelés *composés perturbateurs endocriniens* (PE). Parmi ces PE, certains présentent, plus particulièrement, une activité œstrogénique. Ils vont alors être capables de se fixer, avec plus ou moins d'affinité, sur le récepteur aux œstrogènes (ER) et induire une réponse similaire à celle provoquée par les œstrogènes. L'activité œstrogénique peut aussi résulter de l'activation d'autres récepteurs que ER qui vont être impliqués dans le métabolisme des œstrogènes et de leurs récepteurs. Parmi ces PE, présentant une activité œstrogénique, on distingue les xœstrogènes et les œstrogènes eux-mêmes.

Les xœstrogènes regroupent des molécules synthétiques d'origine industrielle ou domestique : les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les dioxines/furanes (PCCD/F), issus des combustions ; les biphényles polychlorés (PCB), les biphényles polybromés (PBB), les alkylphénols (AP), les phthalates (PAE), les organohalogénés (AOX) et le bisphénol A (BPA) entrant dans la composition de produits manufacturés courants tels que les plastiques, les textiles, les peintures, les détergents, les cosmétiques et les pesticides. Les œstrogènes, pour leur part, sont des molécules naturelles faisant partie du groupe des hormones stéroïdiennes. Nous pouvons citer l'estrone (E1), l'estradiol (E2) et l'estriol (E3). Des œstrogènes synthétiques sont également utilisés chez l'humain en tant que contraceptif ; c'est le cas de l'éthinylestradiol (EE2). Les œstrogènes sont excrétés via les urines et les fèces sous formes conjuguées, sulfates ou glucuronates. Leur présence dans l'environnement est alors, comme pour les xœstrogènes, susceptible d'induire des perturbations du système endocrinien des organismes exposés. Il faut noter que l'activité œstrogénique des œstrogènes naturels et synthétiques est largement plus élevée que celle des xœstrogènes.



Etant donné leur origine, les œstrogènes se retrouvent dans les eaux usées urbaines à des concentrations de plusieurs centaines de ng/L. Toutefois, comme dans le cas de nombreux autres CTO, les stations d'épuration (STEP) ne sont pas capables d'éliminer complètement ces hormones. En effet, initialement, les STEP ont été conçues pour éliminer les polluants majeurs, c'est à dire, les particules en suspension et la matière organique carbonée. Elles ont été adaptées par la suite pour traiter également l'azote et le phosphore, responsables de l'eutrophisation des eaux. Elles n'ont pas été conçues pour éliminer les micropolluants. Par conséquent, les œstrogènes sont retrouvés dans les effluents de STEP à des concentrations de quelques ng/L et dans les boues d'épuration, à quelques ng/g de matière sèche. Via les STEP, les œstrogènes vont donc être transférés vers les eaux naturelles mais aussi vers les sols, lors de l'épandage des boues d'épuration. Aujourd'hui les gestionnaires du secteur de l'eau sont donc confrontés à un nouveau défi : celui d'adapter les STEP pour éliminer les micropolluants dont font partie les œstrogènes, et plus largement, les PE. Tout le paradoxe de la problématique des CTO est que la politique d'assainissement collectif des eaux usées dans les pays occidentaux conduit à une convergence de ces composés dans les rejets liquides ou solides des STEP et est donc, en partie, responsable des cas de perturbations endocriniennes observés dans l'environnement.

Tous les organismes dont le système endocrinien dispose de ER peuvent être concernés par le risque d'exposition aux œstrogènes et xœstrogènes. C'est notamment le cas des oiseaux, des reptiles, des poissons, des mollusques et des mammifères, dont l'être humain. Les principales conséquences physiologiques concernent l'altération des fonctions reproductrices, du développement et de la croissance des organismes. Les cas de perturbations endocriniennes observés dans l'environnement portent essentiellement sur les animaux aquatiques et en particulier les poissons. Des cas d'infertilité des poissons mâles ont en effet été rapportés, due notamment à l'apparition d'ovocytes dans les testicules. Chez les individus mâles, ont également été observées des augmentations de la concentration plasmatique en vitellogénine, une protéine constituant le jaune des œufs, retrouvée à l'origine chez les femelles. Les populations de poissons exposés aux composés œstrogéniques voient leur sex-ratio modifié avec une plus grande proportion d'individus femelles, mais aussi d'individus asexués. Etant donné leur fort potentiel œstrogénique, les œstrogènes se sont révélés capables d'induire ce genre d'effets à de très faibles concentrations, inférieures au ng/L, pour les organismes les plus sensibles. En comparaison, chez l'homme, les conséquences de l'exposition aux œstrogènes ne sont pas clairement établies. Toutefois ils sont suspectés d'être, en partie, responsables de la baisse de fertilité des hommes et contribueraient à l'apparition de certains cancers, tels que ceux des testicules chez l'homme et du sein chez la femme.

Les moyens d'action possibles pour réduire le transfert des PE vers les milieux naturels sont la limitation à la source et l'amélioration des capacités de traitement des STEP. Le premier moyen n'est envisageable que dans le cas des molécules synthétiques issues de

l'industrie ou entrant dans la composition des produits manufacturés. Concernant les œstrogènes, ces molécules étant d'origine naturelle, on ne peut que les éliminer des eaux avant rejet dans les milieux récepteurs, en limitant au maximum leur transfert ou persistance dans les boues d'épuration. Même pour la molécule synthétique EE2, qui constitue le premier moyen de contraception en France et l'un des premiers dans de nombreux autres pays, son ancrage socio-culturel est tel qu'on ne peut envisager une réduction à la source. Par ailleurs, des solutions alternatives présentant les mêmes avantages d'utilisation et d'efficacité ne sont pas disponibles. Ainsi, il apparaît opportun dans un premier temps d'agir au niveau des STEP où les œstrogènes se trouvent concentrées et où il existe déjà un potentiel microbien capable de les éliminer.

La variabilité de comportement des STEP vis à vis de ces CTO est importante. De nombreux paramètres semblent influencer la capacité d'élimination tels que la nature des procédés d'épuration utilisés, les paramètres opératoires appliqués, mais aussi, des paramètres environnementaux. Le devenir des œstrogènes dans les eaux usées a été assez bien étudié à ce jour mais de nombreuses lacunes persistent encore. Les informations, souvent partielles, sont obtenues sur différents sites. Par conséquent, leurs synthèse et généralisation restent délicates. A l'inverse, le transfert des œstrogènes vers les boues d'épuration et leur devenir dans celles-ci n'ont été que très peu étudiés, essentiellement dûs à des limitations analytiques. Par conséquent, il est difficile d'évaluer avec précision la part d'œstrogènes réellement biodégradable et celle susceptible d'être transférée vers les sols par épandage des boues. Les mécanismes d'élimination des œstrogènes par les STEP, adsorption et biodégradation, sont très peu décrits. Ainsi, par exemple, les voies métaboliques de dégradation des œstrogènes et les microorganismes responsables de cette dégradation sont encore mal connus. Enfin, un intérêt insuffisant est porté à l'impact de ces composés via une évaluation toxicologique systématique.

L'objectif de mes travaux de thèse est donc d'améliorer les connaissances disponibles concernant la dynamique des œstrogènes, et parallèlement l'évolution de leur toxicité, au cours du traitement des eaux. Il s'agira d'évaluer aussi la part respective de la biodégradation et de l'adsorption dans l'élimination des œstrogènes via la prise en compte de tous les compartiments : eaux et boues. Le devenir des œstrogènes et de leur toxicité au cours du traitement des boues sera également abordé. Pour cela, une méthode d'analyse des œstrogènes présents dans les matrices solides devra être définie et validée. Enfin, un regard particulier sera porté au mécanisme de biodégradation, qui constitue la voie à favoriser, et notamment sur les espèces ou consortia impliqués. Ce travail s'inscrit directement dans les préoccupations de recherche, environnementales et sanitaires de l'Union Européenne qui, dès 1999, s'était saisie de la question des PE et a depuis classé comme prioritaires les recherches portant sur ces composés dans le cadre des 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> programmes cadres de recherche et de développement (PCRD).

Dans un premier temps nous ferons une synthèse de la bibliographie disponible concernant les œstrogènes et l'activité œstrogénique au cours du cycle de l'eau, de l'organisme émetteur à l'organisme récepteur en passant par les systèmes de traitement des eaux usées. Nous nous concentrerons, dans notre cas, sur le cycle de l'eau urbaine ainsi que sur les sources domestiques d'œstrogènes. Cette synthèse nous amènera à redéfinir plus précisément nos objectifs en fonction des lacunes et besoins mis en évidence dans la synthèse bibliographique. Ensuite, seront présentés les outils méthodologiques et analytiques, ainsi que le matériel, utilisés pour répondre par l'expérimentation aux objectifs. Les résultats obtenus seront décrits et commentés sous forme d'articles scientifiques en anglais, publiés ou en préparation. Chacun de ces articles sera préalablement introduit et résumé en français. Pour finir, nous conclurons sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux de recherches, en replaçant ces derniers dans le contexte national et international, avant de proposer des perspectives, à plus ou moins long terme, à ces travaux.

---

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---

---

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Les œstrogènes en tant que perturbateurs endocriniens

#### I.1 Propriétés physico-chimiques des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes ayant, comme composé parent, le cholestérol. Ils présentent une structure hydrocarbonée polycyclique de 18 carbones (noyau cyclopentanophenanthrene) constituée de 3 cycles hexagonaux et d'un cycle pentagonal (Figure 1). Les œstrogènes sont caractérisés par leur cycle phénolique (cycle A), essentiel à leur activité biologique. Des fonctions hydroxyles, carbonyles et éthylnyles se substituent au niveau du cycle pentagonal (cycle D) et distinguent entre eux les différentes molécules naturelles, estrone<sup>2</sup> (E1), 17 $\beta$ -estradiol<sup>2</sup> (E2), estriol<sup>2</sup> (E3) et le composé synthétique, 17 $\alpha$ -éthynylestradiol<sup>2</sup> (EE2) (Birkett 2003a). Leur masse moléculaire est comprise entre 270 et 296 g/mol.

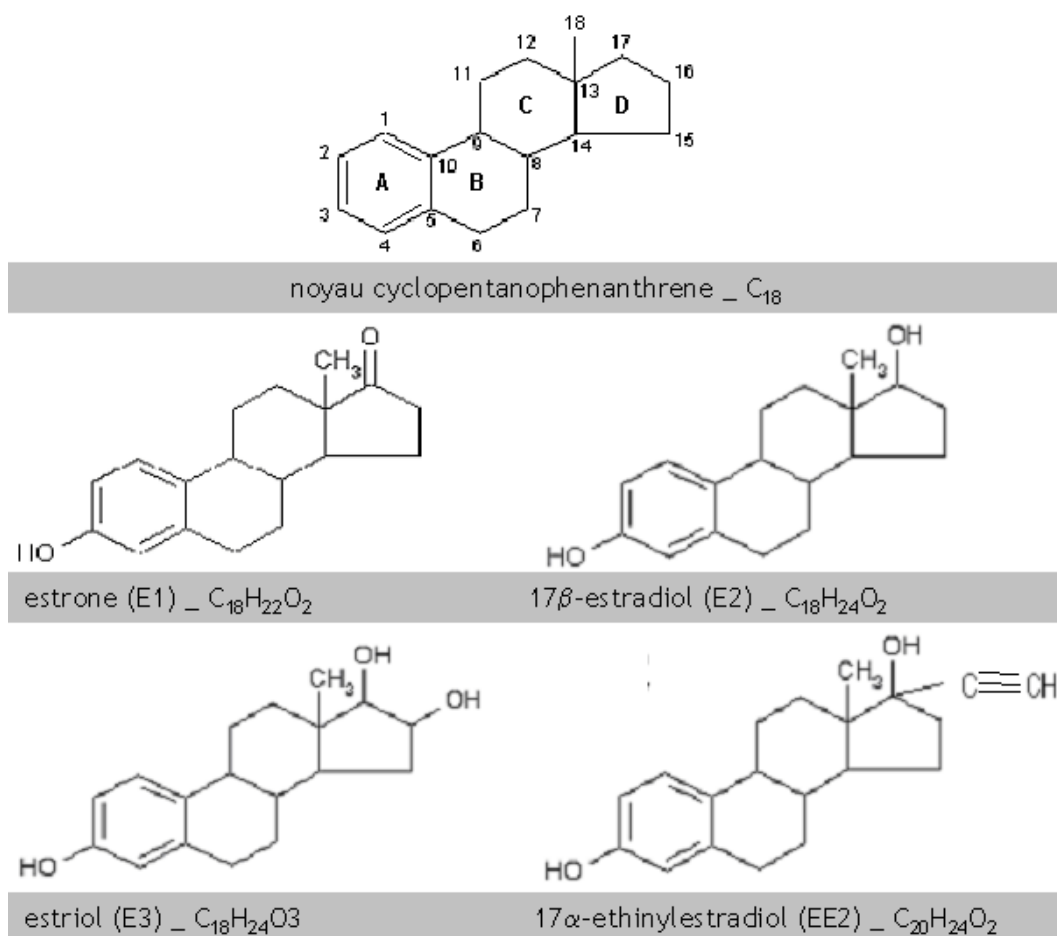


Figure 1 : Structure chimique du noyau cyclopentanophenanthrene et de différents œstrogènes.

<sup>2</sup> Selon DCI (Dénomination Commune Internationale)

Le logarithme décimal du coefficient de partition octanol/eau ( $\log K_{ow}$ ) des œstrogènes est compris entre 2,81 et 4,15. Les œstrogènes sont donc des molécules modérément à fortement hydrophobes. De plus, ils s'avèrent n'être que partiellement solubles dans l'eau puisque leur solubilité varie de 4,8 à 13 mg/l. Enfin, avec des pressions de vapeur de l'ordre de  $3 \times 10^{-8}$  à  $9 \times 10^{-13}$  Pa, ils sont considérés comme très peu volatils. Par conséquent, les œstrogènes sont susceptibles de se répartir, essentiellement, entre la phase soluble et la phase particulaire d'un milieu donné (Lai *et al.* 2002; Ying *et al.* 2002).

Les propriétés physico-chimiques des œstrogènes sont cependant fortement modifiées en fonction de leur degré de conjugaison et du pH. En effet, les œstrogènes peuvent être liés à des glucuronates et sulfates par conjugaison d'une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles (Figure 2). Sous ces formes, dites "conjuguées", les œstrogènes sont beaucoup plus hydrophiles (Birkett 2003a). Ils sont donc suspectés de se retrouver majoritairement en phase soluble. Par opposition, lorsqu'aucune fonction hydroxyle n'est conjuguée, les œstrogènes sont dits "libres". Les œstrogènes libres possèdent une constante de dissociation  $K_a$  de l'ordre de  $3.16 \times 10^{-11}$  ( $pK_a = 10.5$ ). A un pH supérieur au  $pK_a$ , la majorité des fonctions hydroxyles sont déprotonnées conduisant à des formes ionisées également plus solubles, présentant donc moins d'affinité pour la phase particulaire (Clara *et al.* 2004; Ivashechkin *et al.* 2004).

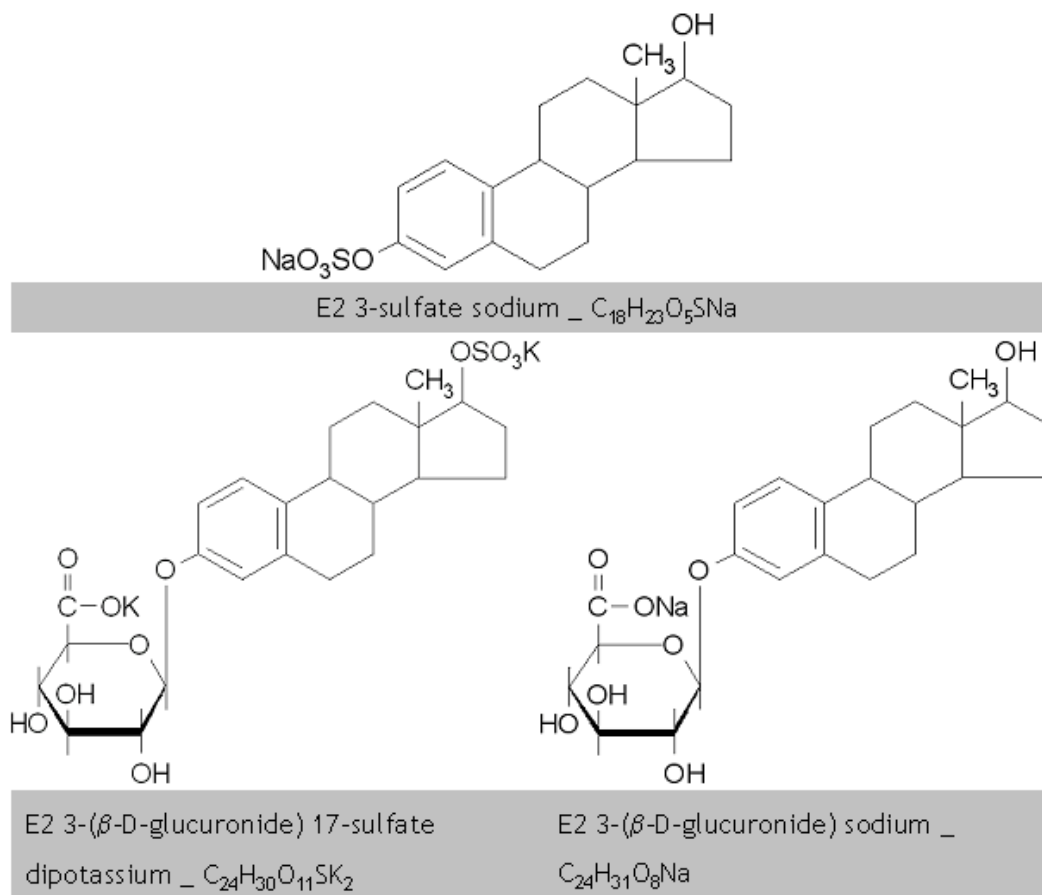
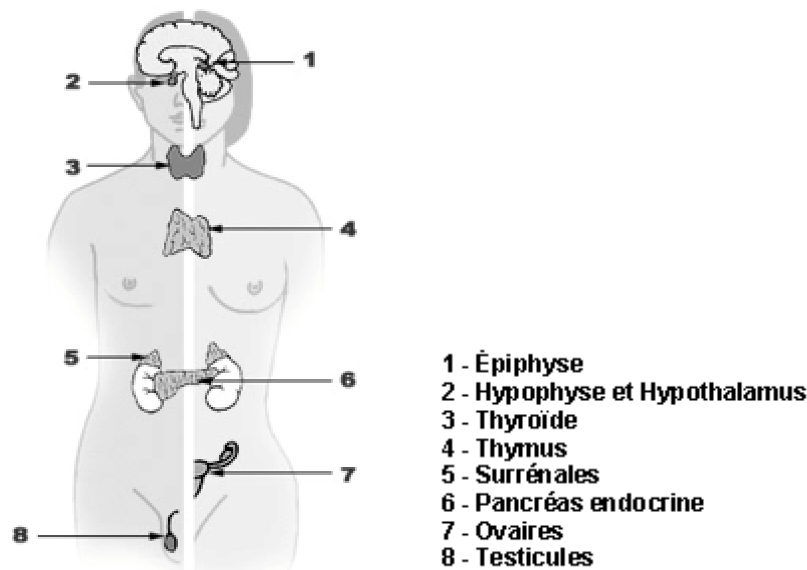


Figure 2 : Structure chimique de différentes formes conjuguées de l'œstradiol avec un glucuronate et/ou un sulfate.

## I.2 Fonctions biologiques des œstrogènes

### I.2.1 Le système endocrinien

Le système endocrinien est, avec le système nerveux, l'un des deux systèmes de transmission de l'information rencontrée chez les organismes pluricellulaires. Constitué de différentes glandes productrices et sécrétrices d'hormones (Figure 3), il joue un rôle crucial dans la maintenance, la croissance, la reproduction, le comportement, le métabolisme et l'homéostasie. Les hormones, véhiculées par la lymphe ou le sang, sont des signaux solubles et ubiquitaires de communication entre les cellules. Au niveau des cellules cibles, les hormones se fixent sur des récepteurs spécifiques qui en réponse agissent sur un site effecteur afin produire la réponse physiologique ou le comportement attendu. L'hormone et le récepteur associé présentent une forte affinité l'un pour l'autre, si bien qu'une faible concentration d'hormones est nécessaire pour obtenir l'effet biologique. Avant même leur fixation sur un récepteur ou après leur action dans l'organisme, les hormones sont inactivées par conjugaison à des sulfates et glucuronates au niveau des cellules hépatiques et éliminées via le système rénal (clairance métabolique). Ainsi, la durée de vie d'une hormone dans l'organisme varie de quelques minutes à quelques heures (Birkett 2003a).



**Figure 3 : Les différents éléments du système endocrinien chez l'humain**

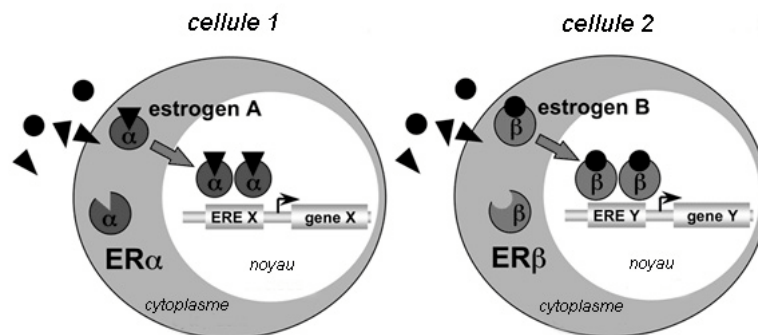
[http://training.seer.cancer.gov/module\\_anatomy/unit6\\_3\\_endo\\_glands.html](http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit6_3_endo_glands.html) (avril 2008)

### I.2.2 Les œstrogènes en particulier

Les hormones stéroïdiennes, dont font partie les œstrogènes, constituent l'une des quatre classes chimiques d'hormones ; les trois autres étant les hormones dérivées d'amines, peptidiques et lipidiques. Les œstrogènes, bien qu'étant présents chez les individus mâles et femelles, sont considérés comme des hormones sexuelles femelles. Ils sont impliqués dans la reproduction, le développement du système nerveux central, l'homéostasie du squelette et du



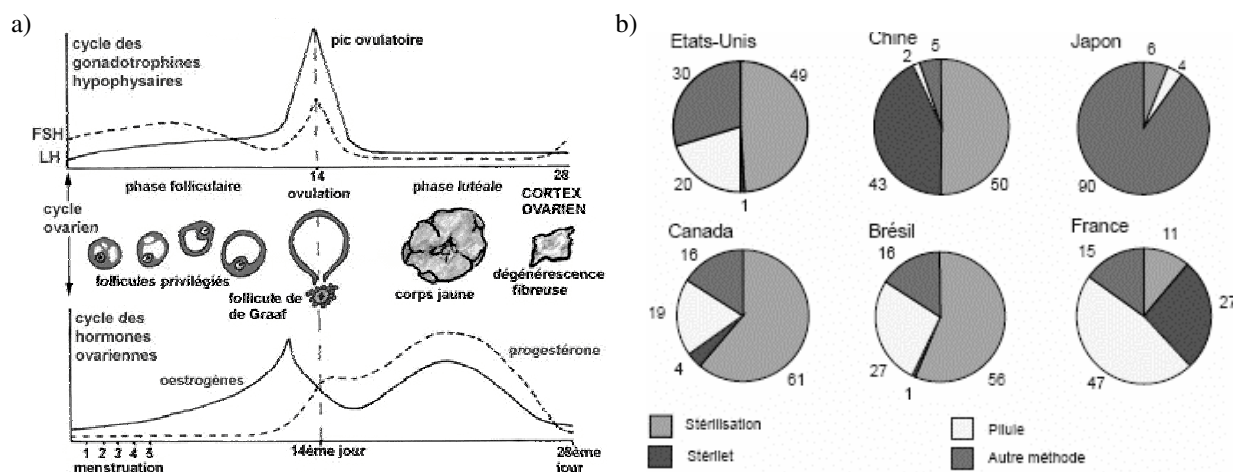
système cardio-vasculaire, la répartition du tissu adipeux et le fonctionnement du foie. Les œstrogènes sont principalement produits et sécrétés par les ovaires et le placenta chez la femelle et par les testicules chez le mâle. L'œstrogène E2 est métabolisé à partir de la testostérone, E1, à partir de l'androstènedione et E3, à partir de la déhydroépiandrostérone (DHEA). Ces hormones sont transportées dans le sang jusqu'aux cellules portant des récepteurs aux œstrogènes ( $ER\alpha$  ou  $ER\beta$ ). Ce sont des récepteurs nucléaires de nature protéique. L'activation des ER influence l'expression génétique, la croissance et la différenciation cellulaire dans les tissus cibles, via des interactions protéines-protéines avec d'autres sites présents dans la région promotrice des gènes (Figure 4). Cette activité transcriptionnelle est régulée par des cofacteurs ; elle varie selon l'œstrogène inducteur et la nature du récepteur activé (Applanat 2002; Birkett 2003a).



**Figure 4 : Mécanisme d'action des œstrogènes au niveau des cellules cibles contenant des récepteurs  $\alpha$  (cellule 1) ou  $\beta$  (cellule 2).** <http://wcentre.tours.inra.fr> (avril 2008)

### I.2.3 Cas des œstrogènes de synthèse

Du fait de l'implication des œstrogènes dans le cycle menstruel, la molécule synthétique EE2 est largement utilisée dans les pilules contraceptives. La quantité de EE2 par pilule varie de 20 à 50  $\mu\text{g}$  (communément 35  $\mu\text{g}$ ). Son action dans l'organisme repose sur le mécanisme de rétroaction négative des œstrogènes sur les neurohormones de l'hypothalamus et les hormones hypophysaires (FSH et LH) (Figure 5a). L'apport de EE2 permet le maintien d'une concentration suffisante d'œstrogènes dans l'organisme pour bloquer l'ovulation, empêchant ainsi toute fécondation (Johnson *et al.* 2000; Birkett 2003b; Johnson and Williams 2004). Il est parfois remplacé par le mestranol (MeEE2), une forme méthylée en C3 de EE2. Dérivé de l'œstradiol, l'éthinylestradiol a la propriété d'être actif oralement et plus stable chimiquement grâce à la substitution d'un groupement éthinyle en C17. Par conséquent, il possède une durée de vie plus longue dans l'organisme. Il a été synthétisé pour la première fois en 1938 en Allemagne (Inhoffen and Hohlweg 1938). Son utilisation comme contraceptif s'est démocratisée à partir des années 60 sous la forme d'un mélange d'œstrogène et de progestérone. En 2000, 60% des françaises entre 20 et 44 ans utilisaient ce mode de contraception. Toutefois, une grande disparité existe à travers le monde selon les référentiels socio-culturels (Figure 5b).



**Figure 5 : Schéma du cycle menstruel sur lequel agit l'éthinylestradiol (a) et diversité des pratiques contraceptives à travers le monde selon l'Organisation des Nations Unies (b).**

(a) <http://spiral.univ-lyon1.fr/polycops/HistologieFonctionnelleOrganes/SommaireGeneral.html#agf> (avril 2008)

(b) [http://www.ined.fr/fr/tout\\_savoir\\_population/fiches\\_pedagogiques/population\\_du\\_monde/contraception\\_monde](http://www.ined.fr/fr/tout_savoir_population/fiches_pedagogiques/population_du_monde/contraception_monde) (avril 2008)

Des œstrogènes de synthèse sont également utilisés chez la femme dans le cadre des thérapies de remplacement hormonal. Ces thérapies ont pour but de pallier l'inconfort et les maladies liés à la baisse naturelle des concentrations d'œstrogènes dans l'organisme. En France, cela concerne 52% des femmes entre 50 et 69. Aux Etats-Unis, seulement 22% des femmes de plus de 55 ans y ont recours. Les molécules alors utilisées sont des formes conjuguées de E2, de son isomère 17 $\alpha$ -E2 et d'œstrogènes équins (cycle B insaturé). La posologie est généralement de 0,625 à 2 mg par jour (Birkett 2003b; Gayet-Ageron *et al.* 2005).

Les propriétés anabolisantes des stéroïdes (œstrogènes, androgènes et gestagènes) ont conduit à leur introduction dans l'élevage animal pour stimuler la production de viande. Cette pratique, interdite dans l'Union européenne depuis 1989, reste en vigueur aux USA, au Canada, en Australie ou en Nouvelle Zélande. Les préparations anabolisantes contiennent des stéroïdes endogènes, dont E2 (20 mg), et des molécules synthétiques (zeranol, acétate de trenbolone et acétate de melengestrol) (Lange *et al.* 2002; Birkett 2003b).

## I.1 Transfert des œstrogènes vers les milieux naturels

### I.2.4 Excrétion des œstrogènes

Comme toutes les hormones, les œstrogènes sont éliminés via les urines et les fèces après inactivation par conjugaison. Toutefois, chez l'être humain, les fèces ne représenteraient que 5% de l'excrétion totale, excepté pour les femmes enceintes, 10 à 70% selon la molécule considérée. Ainsi, les niveaux d'excrétion journalière, via les urines, chez une femme en âge de procréer (15-59 ans) sont de 8-14, 3-7 et 5-14  $\mu\text{g/j}$  pour E1, E2 et E3, respectivement. En dehors de cette période, ils sont plus faibles : 4-9  $\mu\text{g/j}$  pour E1, 2-5  $\mu\text{g/j}$  pour E2 et 1-4  $\mu\text{g/j}$  pour E3. Les niveaux d'excrétion sont maximums pour les femmes enceintes avec 600-700, 170-330 et 4500-6000  $\mu\text{g/j}$  pour E1, E2 et E3, respectivement. Chez l'homme les niveaux

d'excrétion sont similaires à ceux des femmes non en âge de procréer, c'est à dire, 4 µg/j pour E1, 1,5 µg/j pour E2 et 1,5-3,5 µg/j pour E3 (Johnson *et al.* 2000; D'Ascenzo *et al.* 2003; Johnson and Williams 2004).

Les animaux d'élevage sont également une source potentielle d'œstrogènes avec des excrétions de l'ordre de 45 à 540 µg/j pour les bovins, 120 à 2300 µg/j pour les porcins, 23 à 25 µg/j pour les ovins et 0,2 à 20 µg/j pour les volailles. Les valeurs varient selon le sexe et l'âge de l'animal ; elles incluent la fraction émise par les urines et celle émise par les fèces. En effet, la part d'œstrogènes excrétés via les fèces est plus importante chez certains animaux comme les bovins (67%) et les ovins (87%) que chez l'humain. Les femelles en gestation ont comme chez les humains, des excrétions d'œstrogènes plus élevées avec 2750, 194 et 53 µg/j pour les bovins, porcins et ovins, respectivement. Par contre, les mâles peuvent présenter des niveaux d'excrétion équivalents, voir supérieurs, aux femelles (Lange *et al.* 2002).

De même, une partie des molécules synthétiques ingérées par les organismes est éliminée par les urines et les fèces. Ainsi, chez la femme, la quantité de EE2 excrété via les urines est estimée à environ 30% de la dose ingérée, soit 10 µg/j ; une fraction équivalente étant excrétée via les fèces (Johnson and Williams 2004). Chez les animaux, Lange *et al.* (2002) rapportent des pourcentages d'excrétion d'hormones de synthèse d'environ 8% dans les urines et 12% dans les fèces. Toutefois, l'utilisation des œstrogènes comme anabolisant n'augmenterait que de 0,2% les niveaux d'excrétion du bétail traité. C'est beaucoup moins que pour la testostérone dont la prise comme anabolisant induit une hausse de 20% des niveaux d'excrétion.

Généralement, les œstrogènes émis via les fèces se trouvent totalement sous forme libre, excepté pour EE2 que l'on retrouve à 20% sous formes conjuguées. Ceci s'explique par la présence dans l'intestin de bactéries capables d'hydrolyser les formes conjuguées. A l'inverse, les œstrogènes excrétés via les urines se présentent majoritairement sous formes conjuguées (60 à 100%) (Johnson and Williams 2004).

#### I.2.5 Présence des œstrogènes dans les milieux naturels

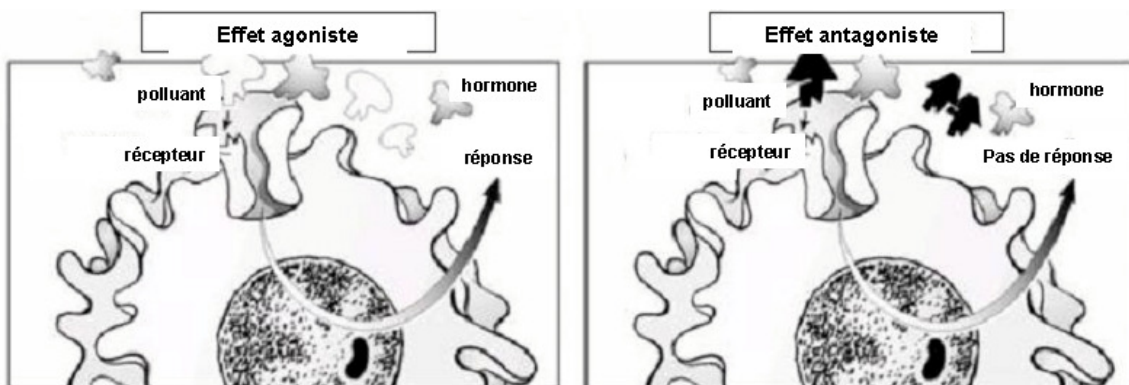
Plusieurs études ont rapporté des teneurs en œstrogènes dans les eaux naturelles de l'ordre du ng/L. Ainsi, Ternes *et al.* (1999b) lors d'une campagne de mesures sur 15 rivières allemandes ont détecté uniquement E1 à une concentration d'environ 1,6 ng/L. Cependant, des travaux menés en France, en Italie et aux Etats-Unis ont rapporté, dans des eaux de surfaces, les trois œstrogènes naturels et EE2, à des teneurs, respectivement, de 1 à 3 ng/L, 0,04 à 1,5 ng/L et 10 à 73 ng/L (Baronti *et al.* 2000 ; Koplín *et al.* 2002 ; Cargouet *et al.* 2004). D'autre part, Ternes *et al.* (2002) ont analysé les sédiments de 8 rivières allemandes et ont relevé des teneurs en œstrogènes de l'ordre de 2 ng/g, 1,5 ng/g et 0,9 ng/g, respectivement, pour E1, E2 et EE2. Dans des sédiments marins, les concentrations en E1 variaient de 0,16 à 1,17 ng/g, celles de E2 de 0,22 à 2,48 ng/g alors que celles de EE2 étaient inférieures à 0,5 ng/g (Braga *et al.* 2005). Les œstrogènes sont donc retrouvés à des teneurs

relativement faibles dans l'environnement (quelques ng/L ou ng/g), dissous dans les eaux naturelles ou adsorbés sur leurs sédiments. Ces informations nous renseignent peu sur l'impact toxique que peuvent présenter de telles concentrations. Il est donc nécessaire de s'intéresser aux propriétés toxicologiques de ces composés. Il faut noter également que, malgré leurs faibles teneurs dans l'environnement, les œstrogènes sont, en revanche, continuellement excrétés, conférant un caractère chronique à cette pollution et donc à l'exposition des organismes vivants à ces composés.

### I.3 Aspects écotoxicologiques

#### I.3.1 La disruption endocrinienne

Bien qu'ayant une forte affinité pour leur ligand endogène, les récepteurs hormonaux sont versatiles et se lient à d'autres composés possédant une structure proche de l'hormone originale. Lorsqu'un de ces ligands exogènes se lie à un récepteur, plusieurs cas peuvent alors se présenter (Figure 6). La liaison induit une réponse de la cellule similaire à celle provoquée par l'hormone : on parle d'effet agoniste. Le ligand exogène se fixe sur le récepteur sans induire d'effet mais bloque le site de fixation pour le ligand endogène : on parle d'effet antagoniste. Le ligand exogène peut également modifier la synthèse, le transport ou l'élimination d'une hormone et de son récepteur via des systèmes de régulation entre les différents éléments du système endocrinien. L'ensemble de ces mécanismes, plus ou moins complexes, conduit à une modification de la réponse naturelle de l'organisme : on parle de disruption endocrinienne. Ces ligands exogènes, généralement des molécules organiques, sont appelés composés perturbateurs endocriniens (PE).



**Figure 6 : Effets agonistes et antagonistes de perturbateurs endocriniens suite à leur fixation au récepteur hormonal.** <http://www.rbej.com/content/4/1/30> (avril 2008)

Différentes définitions ont été élaborées parmi lesquelles nous pouvons citer celle de l'Union Européenne - "Endocrine disrupters have been defined as exogenous substances that alter function(s) of the endocrine system and consequently cause adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations" - ou celle de l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (US EPA) - "Endocrine disruptors is an exogenous agent

that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body that are responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development, and/or behavior". Les PE présentent des affinités avec les récepteurs plus faibles que les hormones endogènes. Il faut donc des concentrations plus importantes de ces ligands exogènes pour altérer le fonctionnement du système endocrinien. Toutefois, contrairement aux hormones qui sont rapidement excrétées, les PE sont, généralement, plus persistants et donc sujets à une bioaccumulation dans l'organisme (Birkett 2003a).

### I.3.2 L'activité œstrogénique ou œstrogénicité

L'activité œstrogénique constitue un cas particulier de disruption endocrinienne dans lequel des ligands exogènes, via la fixation sur les ER, miment l'action des œstrogènes ou, via une autre voie endocrinienne, altèrent le métabolisme ou le transport des œstrogènes ou des ER.

Les œstrogènes naturels et synthétiques peuvent par nature se lier au récepteur et induire un effet œstrogénique. Par conséquent, les œstrogènes présents dans l'environnement, suite à leur excrétion par certains organismes via les urines et fèces, peuvent contaminer ces mêmes organismes, ou d'autres, et induire des effets endocriniens non désirés par augmentation de la concentration circulante. Les œstrogènes naturels et synthétiques ont de ce fait été classés sur une liste de 553 PE prioritaires par la commission européenne [COM(2001) 262 final du 14-06-2001]. Tous les œstrogènes n'ont cependant pas la même affinité vis à vis de ER (potentiel œstrogène). Le potentiel œstrogène obéit à une loi dose-réponse et se définit comme "la quantité de substance nécessaire pour produire un effet donné". Il est généralement estimé par la EC50, c'est à dire, la concentration produisant 50% de l'effet maximum (Figure 7). Le composé de référence pour ER est E2 avec une EC50 de 5 à 250 pM. Les œstrogènes E1 et E3 ont un potentiel 2 à 1000 fois plus faible que E2 alors que la molécule synthétique EE2 est 1,2 à 2,5 fois plus active que E2 (Matsui *et al.* 2000; Rutishauser *et al.* 2004; Pillon *et al.* 2005). Le potentiel varie légèrement selon la méthode d'évaluation et la nature du récepteur. Par exemple, la EC50 de E2 sur ER $\alpha$  est plus faible (5 pM) que sur ER $\beta$  (10 pM) (Balaguer *et al.* 1999).

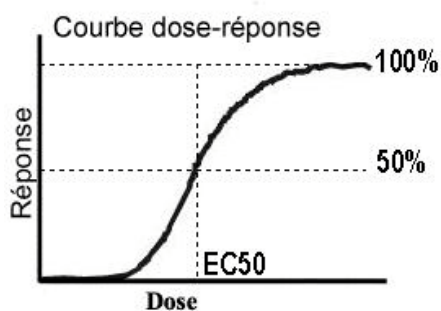
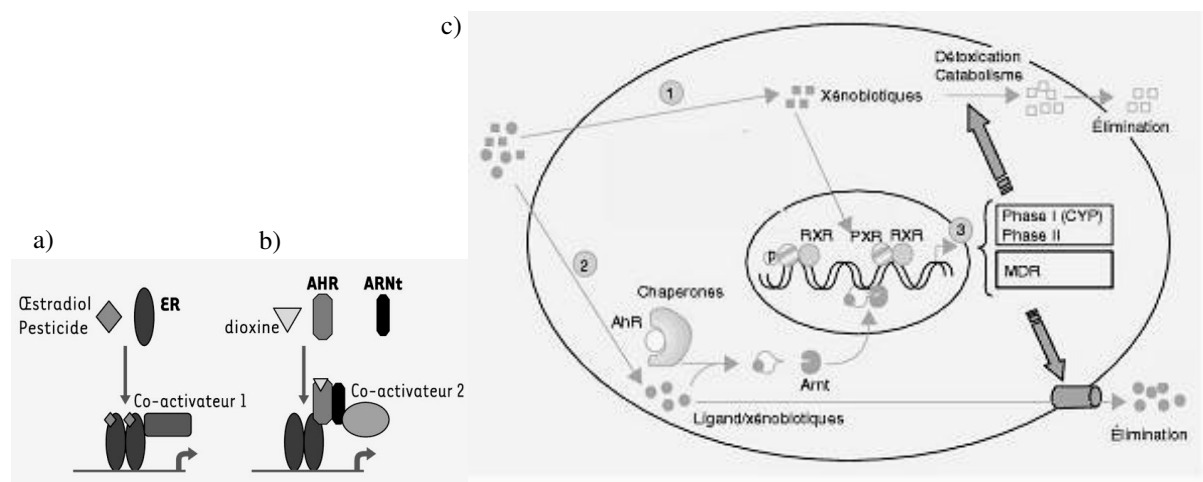


Figure 7 : Courbe dose-réponse d'une substance ayant un effet biologique

<http://www.emcom.ca/science/dosefr.shtml> (avril 2008)

De plus, un grand nombre de molécules chimiques peuvent également présenter une activité œstrogénique par affinité avec ER, telles que les phytoœstrogènes, le bisphénol A (BPA), les alkylphénols (AP), les phthalates, certains biphenyls polychlorés (PCB), biphenyls polybromés (PBB) et pesticides (Figure 8a). Ces molécules sont largement utilisées dans l'industrie ou entrent dans la composition de produits domestiques courants (plastiques, peintures, textiles, détergents, cosmétiques, phytosanitaires, etc...). Leur affinité pour ER est liée à des similitudes structurelles telles que la présence d'un ou plusieurs cycles phénoliques sur une petite molécule lipophile de 200 à 300 Da. Ces substances sont dénommées "œstrogènes environnementaux" ou "xenœstrogènes" (Birkett 2003a, b). Le potentiel des xenœstrogènes est généralement beaucoup plus faible que celui des hormones (1 millier à plus de 1 million de fois moins œstrogénique que E2) cependant ils sont retrouvés massivement dans l'environnement et sont plus persistants dans l'organisme. Les plus œstrogéniques sont les phytoœstrogènes, le BPA, les phthalates et les AP (Matsui *et al.* 2000; Birkett 2003a; Rutishauser *et al.* 2004; Leusch *et al.* 2005; Pillon *et al.* 2005). Comme pour les œstrogènes, le potentiel des xenœstrogènes diffère sensiblement selon la méthode d'évaluation et la nature du récepteur (Balaguer *et al.* 1999).



**Figure 8 :** Cas d'activité œstrogénique induite par un œstrogène ou un pesticide via ER (a), par une dioxine via le complexe AhR-ER-Arnt (b) ou par des xénobiotiques via PXR ① ou AhR ②, induisant la transcription de gènes ③ impliquée dans le métabolisme des œstrogènes et de ER (c).

(a, b) <http://www.erudit.org/revue/MS/2003/v19/n11/007279ar.html> (avril 2008)

(c) [http://www.jle.com/en/revues/bio\\_rech/abc/e-docs/00/04/26/7C/article.md?fichier=images.htm](http://www.jle.com/en/revues/bio_rech/abc/e-docs/00/04/26/7C/article.md?fichier=images.htm) (avril 2008)

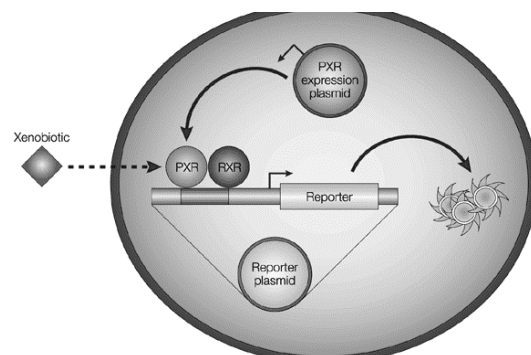
Par ailleurs, les dioxines et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), qui sont des produits de combustion, ainsi que certains PCB et pesticides, ne présentent pas d'affinité pour les ER. Cependant, ils se lient à d'autres récepteurs tels que le récepteur aux hydrocarbures aromatiques et aux dioxines (AhR) qui, une fois activé, induit un effet œstrogénique en se complexant avec ER et le cofacteur Arnt ou *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (Figure 8b). D'autres PCB (par exemple PCB29) et les hydroxy-HAP (produits de dégradation des HAP) présentent une affinité pour ces deux récepteurs AhR et ER (Pillon *et al.* 2005; Nogueroles *et al.* 2006). Enfin, les AP, le BPA, les phthalates, les PCB,

certaines pesticides et pharmaceutiques sont capables d'activer le récepteur aux prégnanes<sup>1</sup> (PXR) induisant des modifications du métabolisme des hormones stéroïdiennes après complexation avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) (Figure 8c). L'estradiol est également un ligand potentiel de PXR (Moore *et al.* 2000; Kliewer *et al.* 2002; Hurst and Waxman 2004; Lemaire *et al.* 2006). Les récepteurs AhR et PXR sont des récepteurs nucléaires dits "*orphelins*", c'est à dire que les ligands naturels et leur fonction physiologique ne sont pas clairement établis. Toutefois, il a été démontré que l'activation de ces récepteurs permettait l'expression de gènes codant pour les enzymes cytochromes P450 (CYP1 à 3) impliquées dans la détoxification de l'organisme et notamment des xénobiotiques (Figure 8c). Outre le métabolisme des xénobiotiques, mais aussi des drogues et composés pharmaceutiques, ces CYP sont impliqués dans le métabolisme des stéroïdes. De plus, l'expression des CYP 11, 17, 19 et 21, impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes, pourrait également dépendre de PXR et AhR (Honkakoski and Negishi 2000; Kliewer *et al.* 2002; Guéguen *et al.* 2006).

### 1.3.3 Evaluation de l'activité œstrogénique : bio-test *in vitro*

Le potentiel œstrogène de PE via ER, AhR et PXR peut être mesuré par des bio-tests *in vitro*. Le principe de ces tests "récepteur-gène reporter" est globalement toujours le même (Figure 9). Il repose sur l'utilisation d'une cellule eucaryote, exprimant naturellement ou non le récepteur incriminé, dans laquelle a été transféré un gène reporter comportant un élément de réponse aux œstrogènes ou xénobiotiques (ERE ou ERX). Cet élément de réponse contrôle l'expression d'une enzyme qui transforme un substrat en un produit luminescent ou induit une prolifération cellulaire. Ainsi, le potentiel œstrogène du ligand est proportionnel au degré d'expression de l'enzyme, donc à la luminescence ou à la prolifération cellulaire. Les avantages des tests *in vitro* par rapport aux tests *in vivo* sont la simplicité, la rapidité de mise en œuvre et un coût moins élevé. Cependant, ils n'intègrent pas toute la complexité des mécanismes physiologiques impliqués dans les phénomènes de toxicité. Ceci est à la fois un avantage, dans l'évaluation de l'activité d'une substance sur un récepteur donné sans l'influence d'autres mécanismes physiologiques ; mais aussi un défaut, dans l'extrapolation des résultats de bio-tests *in vitro* à une échelle biologique supérieure (organisme ou population).

**Figure 9 : Schéma de principe d'un bio-test *in vitro* récepteur-gène reporter : cas du récepteur PXR avec une cellule qui ne l'exprime pas naturellement d'où la présence d'un gène d'expression de PXR et d'un gène reporter.**  
[http://www.nature.com/nrd/journal/v1/n4/fig\\_tab/nrd753\\_F2.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v1/n4/fig_tab/nrd753_F2.html) (avril 2008)



<sup>1</sup> Les prégnanes sont des composés parents de la progestérone

Parmi les tests existants pour le récepteur ER, nous pouvons citer le *Yeast Estrogen Screen* (YES) ou *Recombinant Yeast Assay* (RYA) qui est très fréquemment employé (Arnold *et al.* 1996; Routledge and Sumpter 1996). Il fait intervenir des levures génétiquement modifiées qui expriment le récepteur aux œstrogènes. L'activation du récepteur induit la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase qui hydrolyse un substrat en un produit coloré. D'autres lignées cellulaires peuvent être employées telles que les cellules MCF-7 (cellules mammaires cancéreuses d'origine humaine) qui expriment naturellement le récepteur et qui reposent sur la production de luminescence via la luciférase (test MELN) ou sur la prolifération cellulaire (test E-Screen) (Soto *et al.* 1995; Balaguer *et al.* 1999; Korner *et al.* 1999; Leusch *et al.* 2005; Pillon *et al.* 2005). Enfin, des tests utilisant les hépatocytes (ZRP) et les cellules gonadales (RTG-2) issues de l'espèce de poissons *Oncorhynchus mykiss*, ainsi qu'un test utilisant des ER de mouton (ERBA), ont occasionnellement été utilisés (Ackermann *et al.* 2002; Rutishauser *et al.* 2004; Leusch *et al.* 2006).

Le tableau 1 compile les valeurs de EC50 pour E2 obtenues avec différents tests *in vitro*. Le test MELN apparaît être le modèle cellulaire le plus sensible avec une valeur d'environ 10 pM contre 25 à 1000 pM pour les autres tests. Par ailleurs, nous pouvons observer des variations concernant l'œstrogénicité relative d'une substance par rapport à E2 selon les tests utilisés mais également pour un même test (cas du NP dans le test YES). De plus, des substances présentant des potentiels différents dans un test (BPA, NP et OP dans le test YES, MELN ou ERBA) peuvent présenter des potentiels semblables dans un autre (mêmes composés dans E-Screen, ZRP ou RTG-2). Les différents tests n'ont donc pas la même sensibilité pour chacun des PE. L'origine du matériel biologique (fongique, humaine, ovine, piscicole,...), la nature tissulaire du matériel (ZRP versus RTG-2) et le principe de mesure utilisé (MELN versus E-Screen) pourraient expliquer les variabilités observées. Par conséquent, l'évaluation du potentiel œstrogène est une mesure relative à un référentiel (i.e. test utilisé) et qui n'est pas directement extrapolable à une échelle biologique supérieure ; ce n'est qu'une indication de l'œstrogénicité d'un composé.

**Tableau 1 : Valeurs de EC50 pour E2 (en pM) et potentiel œstrogène relatif par rapport à E2 d'œstrogènes naturels, synthétiques et de xenœstrogènes pour différents tests *in vitro***

PE	YES/RYA	MELN	E-Screen	ZRP	RTG-2	ERBA
E2	1 (50-250 pM)	1 (5-17 pM)	1 (25-30 pM)	1 (1050 pM)	1 (200 pM)	1
EE2	1.19-2.4	2.46	0.91	0.70	1.62	1.9
E1	0.019-0.38	0.025	0.096	nm	nm	0.15
E3	0.0013-0.34	0.18	nm	nm	nm	nm
BPA	$0.25-2.7 \times 10^{-4}$	$1.8 \times 10^{-4}$	$5.3 \times 10^{-5}$	$3.6 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-3}$	$2.3 \times 10^{-3}$
NP	$0.25-10 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-6}$	$7.6 \times 10^{-5}$	$7.5 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-3}$	$7.4 \times 10^{-5}$
OP	$0.8-2 \times 10^{-5}$	$3.2 \times 10^{-4}$	$7.6 \times 10^{-5}$	$3.3 \times 10^{-5}$	$1.3 \times 10^{-3}$	$3.4 \times 10^{-4}$
Phthalates	$0.6-2.4 \times 10^{-5}$	nm	nm	nm	nm	nm
PCBn	$0.5-6 \times 10^{-6}$	nm	nm	nm	nm	nm



PE	YES/RYA	MELN	E-Screen	ZRP	RTG-2	ERBA
Pesticides	$0.1-7 \times 10^{-6}$	$0.7-6.3.10^{-6}$	nm	nm	nm	nm
Phytoestro	$1.1 \times 10^{-4}$	$4-6.4 \times 10^{-4}$	nm	nm	nm	nm

nm : non mesuré ; NP : 4-nonylphenol (AP) ; OP : 4-*tert*-octylphenol (AP) ; PCBn : PCB29, 30, 50 et 104. (Balaguer *et al.* 1999; Matsui *et al.* 2000; Svenson *et al.* 2003; Cespedes *et al.* 2004; Rutishauser *et al.* 2004; Schiliro *et al.* 2004; Leusch *et al.* 2005; Pillon *et al.* 2005; Noguerol *et al.* 2006)

Des bio-test similaires à ceux évoqués pour ER sont également disponibles pour évaluer l'activité de ligands sur AhR et PXR. Pour le récepteur AhR, on peut citer deux tests qui utilisent la variante humaine du récepteur : le test HahLP, combinant des cellules cancéreuses humaines HeLa et un plasmide d'expression de la luciférase, et le test AhR-RYA, combinant des levures modifiées et un gène d'expression de la  $\beta$ -galactosidase (Pillon *et al.* 2005; Noguerol *et al.* 2006). Dans le premier cas, la dioxine est utilisée comme composé de référence (EC50 = 200 pM) alors que dans le deuxième cas, c'est le  $\beta$ -naphthoflavone (EC50 = 520 nM). Pour PXR, les tests utilisent des récepteurs humains (hPXR) ou de souris (sPXR) dont le gène d'expression est transfecté dans des cellules CV-1, HepG2 ou HeLa (test HGPXR). La détermination de l'activité de ligands est basée sur l'expression d'un gène reporter luciférase (Moore *et al.* 2000; Hurst and Waxman 2004; Lemaire *et al.* 2006). Des molécules telles que le prégnane 17 $\beta$ -pregnane-3,20-dione, l'antibiotique rifampicine ou le médicament anti-cholestérol SRM12813 peuvent être utilisées comme standards. La EC50 de la rifampicine est de 0,71, 0,4 et 0,72  $\mu$ M pour CV-1/hPXR, HepG2/hPXR et HGPXR, respectivement (Tableau 2).

**Tableau 2 : Valeurs de EC50 des molécules de références sur AhR et PXR (pM à  $\mu$ M) et potentiel endocrinien relatif par rapport à ces molécules de quelques xénobiotiques pour différents test *in vitro*.**

PE	HahLP	AhR-RYA	HGPXR	HepG2 / h	HepG2 / s	CV-1 / h	CV-1 / s
Dioxines	(200 pM)	nm	nm	nm	nm	nm	nm
$\beta$ -N-flavone	nm	1 (520 nM)	nm	nm	nm	nm	nm
rifampicine	nm	nm	1 (720 nM)	1 (400 nM)	nm	1 (710 nM)	nm
SRM12813	nm	nm	5.1 (140 nM)	nm	nm	5.9 (120 nM)	0.3 (4.1 $\mu$ M)
17 $\beta$ -P-one	nm	nm	nm	nm	nm	0.23 (3.1 $\mu$ M)	1 (1.1 $\mu$ M)
PCBn	nm	0.12-10	nm	nm	nm	nm	nm
Pesticides	nm	0.0035-0.54	0.17-1.3	nm	nm	nm	nm
Phthalates	nm	nm	nm	0.05 (7.5 $\mu$ M)	(8.1 $\mu$ M)	nm	nm
Stéroïd. sy.	nm	nm	nm	nm	nm	0.07-0.13	0.11-5.5
Clotrimazo.	nm	nm	nm	nm	nm	0.44	1.1

nm : non mesuré ; PCBn : PCB9, 29, 77 et 126 ; 17 $\beta$ -P-one : 17 $\beta$ -pregnane-3,20-dione ; Stéroïd. sy. : stéroïdes synthétiques ; Clotrimazo. : clotrimazole (anti-mycose).

(Moore *et al.* 2000; Hurst and Waxman 2004; Pillon *et al.* 2005; Lemaire *et al.* 2006; Noguerol *et al.* 2006)

Comme pour ER, des variabilités sont notables entre les différents tests relatifs au PXR humain. De même, les EC50 obtenus diffèrent selon la provenance du récepteur (humain ou de souris). Les mêmes remarques que pour les bio-tests ER, concernant la relativité et l'extrapolabilité des résultats, peuvent donc être effectuées. Par ailleurs, contrairement à ER,

nous pouvons remarquer que les données d'activité de xénobiotiques sur ces différents tests sont encore très incomplètes.

Outre l'évaluation du potentiel endocrinien de composés purs, ces bio-tests sont aussi utilisés pour évaluer l'activité œstrogénique d'échantillons environnementaux contenant des mélanges de molécules potentiellement actives sur ces différents récepteurs. Les résultats sont alors exprimés par rapport aux molécules de référence (e.g. E2 pour MELN, Dioxine pour HahLP et SRM12813 pour HGPXR) i.e. en masse équivalente du composé de référence par unité de volume ou de masse d'échantillon. Il est également possible pour chacun des récepteurs de calculer des activités œstrogéniques, dioxine-like et prégnane-like théoriques pour un mélange de molécules donné (Equation 1). Pour cela il faut prendre en compte les potentiels relatifs des molécules pures sur le récepteur considéré et leur concentration dans le mélange, en considérant que les activités de chaque molécule sont additives (Korner *et al.* 1999; Korner *et al.* 2000).

$$A_x = \sum_{i=1}^n (AR_i \times C_i) \times M_s \quad (1)$$

$A_x$  = activité théorique sur le récepteur  $x$  (g SEQ/L ou g)

$S$  = molécule de référence sur le récepteur  $x$

$n$  = nombre de composés  $i$  ayant une activité sur le récepteur  $x$

$AR_i$  = potentiel relatif du composé  $i$  sur le récepteur  $x$  par rapport à  $S$

$C_i$  = concentration du composé  $i$  (mol/L)

$M_s$  = masse molaire du composé  $S$  (g/mol)

#### I.3.4 Effets des œstrogènes observés *in vivo*

Plusieurs études *in vivo* ont démontré le caractère perturbateur endocrinien des œstrogènes. Ainsi, l'exposition de poissons (*Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinus carpio*, *Danio rerio* et *Pimephales promelas*) à des concentrations en œstrogènes de l'ordre de 10 à 60 ng/l induit une augmentation d'un facteur 10 à 500 de la concentration en vitellogénine dans le sang des individus mâles. Or, la vitellogénine est une protéine constitutive des œufs qui d'ordinaire se retrouve surtout chez la femelle et très peu chez le mâle. L'effet des œstrogènes sur la vitellogénèse est détectable à partir de seulement 0,1 ng/l de EE2. De plus, même quand l'exposition a lieu durant la phase embryonnaire, une fois les œufs éclos, les effets persistent chez les jeunes poissons. Selon la phase du développement de l'individu et la durée de l'exposition, les œstrogènes peuvent entraîner l'apparition d'individus intersexués présentant des ovo-testicules (testicules contenant des ovocytes I) et une modification du sex-ratio jusqu'à la féminisation complète de la population. La population ne compte alors que des individus femelles et des individus juvéniles dont le sexe ne peut être déterminé. Les œstrogènes peuvent également freiner la croissance des poissons à des concentrations de l'ordre de 10 ng/l ou bien influencer sur la quantité d'œufs pondus par couple. La ponte est

stimulée jusqu'à des concentrations d'environ 1ng/l, puis inhibée au-delà (Aerni *et al.* 2004). Les effets des œstrogènes ont aussi été mis en évidence chez les mollusques (*Potamopyrgus antipodarum* et *Eliminius modestus*) au niveau de la production d'embryon (stimulation ou inhibition selon la concentration) et au niveau du génome (altération et mutation) chez les larves pour des concentrations de 10 ng/l (Jobling *et al.* 2003). On note également des effets sur la densité et la biodiversité du zoo- et du phytoplancton, ainsi que sur la croissance de végétaux terrestres tels que *Medicago sativa* L. (Hense *et al.* 2004).

Pour ce qui est des êtres humains, peu d'informations sont disponibles quant à l'effet des œstrogènes sur notre organisme. Les éventuelles relations entre ces molécules et les pathologies observées sont difficiles à établir du fait de la longueur du cycle de vie des humains, la multiplicité des causes pour un effet donné et des périodes de latence importantes avant l'apparition des effets. Toutefois, il existe des présomptions quant à l'implication des œstrogènes dans des troubles liés au développement, à l'homéostasie et à la reproduction (Rivas *et al.* 1997; Pflieger-Bruss *et al.* 2004). L'accent est mis, en particulier, sur la diminution de la qualité des semences et l'apparition de cancers des testicules chez l'homme et de cancers du sein chez la femme. Par ailleurs, la pré-puberté chez les garçons semble être une tranche d'âge plus risquée du fait, notamment, de la faible production durant cette période d'œstrogènes endogènes (Ganmaa *et al.* 2001). De même, l'exposition mère-enfant durant la grossesse et l'alimentation au sein semblent être des étapes du développement plus propices à la disruption endocrinienne (Rivas *et al.* 1997). L'activité orale des œstrogènes naturels est soumise à des doutes scientifiques (Ganmaa *et al.* 2001; Lange *et al.* 2002; Birkett 2003b), néanmoins celle du E1-sulfate a été prouvée et une fois dans le corps humain, celui-ci est converti en E1 et E2 (Ganmaa *et al.* 2001).

L'effet prouvé des œstrogènes aussi bien à l'échelle *in vitro* que *in vivo*, nécessite donc de s'intéresser au devenir de ces hormones de leur excrétion jusqu'à leur arrivée dans les milieux naturels. En effet, c'est dans ces milieux naturels, notamment aquatiques, que les organismes vivants vont être exposés à ces perturbateurs endocriniens. La connaissance du devenir des œstrogènes au cours du cycle de l'eau, en particulier de l'eau urbaine, est donc primordiale.

## II. Les œstrogènes et le cycle de l'eau urbaine

Dans le chapitre précédent nous avons vu que les œstrogènes étaient des molécules naturelles, parfois synthétiques, notamment excrétées par les humains via les urines et les fèces. Ces œstrogènes excrétés se retrouvent dans l'environnement à des niveaux non négligeables et, par voie de conséquence, peuvent contaminer les organismes vivants. L'exposition des organismes vivants à des concentrations significatives d'œstrogènes induit des effets endocriniens non désirés chez ces derniers. Toutefois, les œstrogènes ne sont pas les seuls composés présentant un effet œstrogénique. Beaucoup de xénobiotiques d'origine anthropique sont capables d'induire des effets similaires. Dans ce chapitre nous aborderons la question du devenir des œstrogènes, suite à leur excrétion par les humains. Nous verrons

comment et pourquoi ils sont transférés vers les milieux naturels et dans quelle mesure ils sont impliqués dans l'activité œstrogénique observée pour différentes matrices environnementales.

## II.1 Les œstrogènes dans les eaux résiduaires urbaines

### II.1.1 Concentrations en œstrogènes et activité œstrogénique

Du fait de l'origine des œstrogènes, ces derniers sont retrouvés à des concentrations de l'ordre du ng à la centaine de ng/L dans les eaux résiduaires urbaines (ERU). Les concentrations diffèrent selon les composés, en fonction de leur niveau d'excrétion. Ainsi, E1 et E3 sont les œstrogènes majoritairement détectés dans les ERU à des concentrations variant de 30 à 80 ng/L et 80 à 300 ng/L, respectivement (Tableau 3). Le composé E2, plus faiblement excrété que E1 et E3, est logiquement retrouvé à des teneurs plus faibles, de l'ordre de 5 à 30 ng/L. Enfin, la molécule synthétique EE2 est détectée jusqu'à 10 ng/L. Cependant, elle demeure fréquemment en dessous de la limite de détection (LOD). Ceci n'est pas étonnant puisque les niveaux d'excrétion sont plus faibles que les composés naturels. Globalement, les teneurs dans les ERU sont assez homogènes quelle que soit la région du globe concernée. Cependant, dans certains cas, des valeurs exceptionnelles sont rapportées. Ces valeurs sont, soit inférieures aux LOD, soit, au contraire, extrêmement hautes. Elles pourraient notamment s'expliquer par la dilution des effluents domestiques avec d'autres types de rejets (industriels ou pluviaux) ou leur contamination par d'autres sources d'œstrogènes (industrielles ou animales).

**Tableau 3 : Concentrations des œstrogènes naturels (E1, E2 et E3) et synthétiques (EE2) en entrée de STEP dans différents pays à travers le monde (ng/L).**

Référence	Pays / n STEP / procédé	E1 <sup>a</sup>	E2 <sup>a</sup>	E3 <sup>a</sup>	EE2 <sup>a</sup>
(Baronti et al. 2000)	Italie / 6 / AS	52 ± 22	12 ± 5	80 ± 48	3 ± 2,6
(D'Ascenzo et al. 2003)	Italie / 6 / AS	44 ± 17	11 ± 8	72 ± 27	nm
(Ternes et al. 1999b)	Brésil / 1 / AS + BF	40	21	nm	5
	Allemagne / 1 / AS	27	15	nm	2
(Nakada et al. 2006)	Japon / 5 / AS	30-200	10-30	80-300	nm
(Carballa et al. 2004)	Espagne / 1 / AS	2,4	3	nm	<1
(Joss et al. 2004)	Suisse / 3 / AS + BF	7-75	5-11	nm	<1-5
(Servos et al. 2005)	Canada / 18 / AS + LG	19-78	2,5-26	nm	nm
(Johnson et al. 2000)	Italie / 5 / AS	<0,5-75	<0,5-20	2-120	<0,5-10
	Pays-bas / 3 / AS	11-140	<0,5-48	nm	<0,2-8,8
(Leusch et al. 2006)	Australie / 13 / AS + BF	<1-617	<1-24	nm	nm
(Braga et al. 2005)	Australie / 1 / AS	55 ± 14	22 ± 15	nm	<0,5
(Andersen et al. 2003)	Allemagne / 1 / AS	55-77	12-19	nm	6-10
(Clara et al. 2005)	Autriche / 4 / AS	29-670	14-125	23-660	3-70

Référence	Pays / n STEP / procédé	E1 <sup>a</sup>	E2 <sup>a</sup>	E3 <sup>a</sup>	EE2 <sup>a</sup>
(Lee et al. 2004)	Canada / 4 / AS	28-67	9-26	nm	<1
(Cargouet et al. 2004)	France / 4 / AS + BF	10-18	11-17	11-15	5-7

<sup>a</sup> formes libres uniquement ; nm : non mesuré ; AS : boue activée ; BF : biomasse fixée ; LG : lagunage.

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, les œstrogènes humains sont principalement excrétés sous formes conjuguées via les urines. Les œstrogènes conjuguées ne représentent pas un risque toxicologique majeur puisque leur potentiel œstrogène est 100000 à 10 millions de fois plus faible que E2 (Matsui *et al.* 2000). Cependant, il a été montré que les formes glucuronides, qui représentent environ 88% des formes conjuguées au niveau des urines, étaient rapidement hydrolysées après leur excrétion au cours du transit dans le réseau d'assainissement. Ce phénomène s'explique par la concentration importante dans les ERU d'enzyme  $\beta$ -glucuronidase produite par les bactéries fécales telles que *Escherichia coli*. Ainsi, la proportion de formes glucuronides dans les ERU au sein du réseau d'assainissement diminue à 45%, alors que la part des formes libres augmente à 48%. A l'entrée de la STEP, les formes glucuronides dans les ERU se maintiennent à 40% et la part des œstrogènes libres croît à environ 64% (D'Ascenzo *et al.* 2003). Ces observations signifient que les œstrogènes glucuronides sont plus rapidement hydrolysés que les œstrogènes sulfates, essentiellement parce que les bactéries présentes dans les eaux usées possèdent, comparativement, une faible activité arylsulfatase. Cette hypothèse est d'ailleurs confortée par D'Ascenzo *et al.* (2003) grâce à des tests à échelle du laboratoire avec des ERU fraîches. Pour une même concentration initiale (25  $\mu\text{g/L}$ ), les formes glucuronides se sont montrées plus facilement hydrolysables (<1 j) que les formes sulfates (>5 j). La rapide déconjugaison des glucuronides par des boues activées (<1 j) avait déjà été mise en évidence antérieurement pour des concentrations initiales de l'ordre du ng au  $\mu\text{g/L}$ . L'activité glucuronidase avait alors été estimée à 0,1  $\mu\text{mol/L}$  (Ternes *et al.* 1999a). La conséquence immédiate de la déconjugaison des œstrogènes dans les ERU au sein du réseau d'assainissement est l'augmentation de la concentration des formes libres qui, du point de vue toxicologique, posent davantage de problèmes.

L'activité œstrogénique mesurée dans les ERU varient, selon les sites étudiés et la méthode d'évaluation utilisée, de quelques ng à 163 ngEEQ/L (Tableau 4). Généralement, les valeurs se situent autour de 20-80 ngEEQ/L. Etant donné les concentrations seuils à partir desquelles des effets œstrogènes *in vivo* sont notés (dès 0,25 ngEEQ/L), il apparaît que les ERU constituent un risque écotoxicologique important pour les milieux naturels. Leur traitement au niveau des STEP est donc primordial. Par ailleurs, dans la plupart des cas, la majeure partie de l'œstrogénicité mesurée dans les ERU est attribuable aux œstrogènes naturels et synthétiques. En effet, les xœstrogènes tels que le NP, le BPA et les phthalates, principalement d'origine industrielle, sont présents dans les ERU à des concentrations variant du  $\mu\text{g}$  à la centaine de  $\mu\text{g/L}$  (Korner *et al.* 2000; Matsui *et al.* 2000; Nasu *et al.* 2001; Lee *et al.* 2004). Ils sont donc environ 10 à 1000 fois plus concentrés que les œstrogènes. Toutefois,

du fait de leur faible potentiel œstrogène, ils représentent généralement moins de 5% de l'activité œstrogénique, même quand la part des apports industriels aux ERU n'est pas négligeable (Tableau 4). Ainsi, c'est essentiellement le devenir des œstrogènes au sein des systèmes de traitement qui va conditionner le transfert d'œstrogénicité vers les milieux récepteurs.

**Tableau 4 : Activité œstrogénique des ERU (ngEEQ/L), part estimée des xénobiotiques dans cette activité mesurée (%) et part des apports industriels aux ERU (%).**

Référence	Pays / n STEP / procédé	EEQ	xénobiotiques	industrie	test
(Matsui <i>et al.</i> 2000)	Japon / 1 / AS	150	~4%	"High"	YES
(Korner <i>et al.</i> 2000)	Allemagne / 1 / AS	32-70	~1%	40%	E-Screen
(Cargouet <i>et al.</i> 2004)	France / 4 / AS + BF	46-63	~50%	0-30%	MELN
(Svenson <i>et al.</i> 2003)	Suède / 12 / AS	3-30	nm	nm	YES
(Leusch <i>et al.</i> 2005)	Australie / 1 / AS	20 ± 3	~0%	<5%	E-Screen
		54 ± 30	~5-70		ERBA
(Leusch <i>et al.</i> 2006)	Australie / 13 / AS + BF	<4-163	~2%	0-15%	ERBA
(Holbrook <i>et al.</i> 2002)	USA / 2 / AS	18-24	nm	nm	YES

nm : non mesuré ; AS : boue activée ; BF : biomasse fixée.

Par ailleurs, aucune étude ne s'est penchée, via des méthodes physico-chimiques, sur l'évaluation de la fraction d'œstrogènes arrivant sur la STEP adsorbée sur les particules en suspension. Néanmoins, il a été montré que l'œstrogénicité contenue sur les particules (> 20 µm) représentait moins de 2% de l'œstrogénicité totale des ERU (Svenson *et al.* 2003). Cependant, une estimation basée sur le  $K_d$  et la concentration de particules dans les ERU aboutit à une proportion d'environ 12% de E1 et 30% de E2 arrivant sous forme adsorbée (Braga *et al.* 2005). A leur arrivée sur la STEP, les œstrogènes se trouveraient donc majoritairement dans la fraction dissoute. Toutefois, à la vue de ses propriétés physico-chimiques, la molécule synthétique EE2 pourrait, comme E2, s'adsorber de manière significative sur les particules en suspension des ERU.

### II.1.2 Estimation des concentrations d'œstrogènes dans les eaux résiduaires urbaines

La mesure des œstrogènes et de l'œstrogénicité présents dans les ERU nécessite l'utilisation de méthodes analytiques lourdes, longues et coûteuses. Nous avons vu que les œstrogènes étaient les principaux responsables de l'activité œstrogénique au niveau des ERU. De plus, leur concentration est assez homogène d'un site à l'autre puisqu'elle dépend essentiellement du niveau d'excrétion de la population. Par conséquent, un modèle pour estimer les concentrations des œstrogènes naturels (E1, E2, E3) et synthétiques (EE2) dans les ERU a été développé (Johnson *et al.* 2000; Johnson and Williams 2004). Ce modèle se base sur les caractéristiques de la population et de la STEP dans le bassin versant considéré (Equations 2 et 3). Ainsi, il prend en compte la taille de la population, sa structure (par âge et

par sexe), la part de femmes enceintes ou prenant des hormones de synthèses, les niveaux d'excrétion de chaque sous-groupe et le flux des ERU entrant sur la STEP. Les concentrations estimées en œstrogènes peuvent ensuite être utilisées pour calculer l'activité œstrogénique théorique telle que décrit au chapitre précédent.

$$U_x = \sum_{i=1}^n f_i \times U_i \quad (2) \quad \Rightarrow \quad C_x = \frac{U_x \times P}{F} \quad (3)$$

$U_x$  = flux d'œstrogène  $x$  excrété par la population totale ( $\mu\text{g/j}$ )

$n$  = nombre de sous-groupe populationnelle  $i$

$f_i$  = part du sous-groupe populationnelle  $i$  (%)

$U_i$  = flux d'œstrogène excrété par la population  $i$  ( $\mu\text{g/j}$ )

$C_x$  = concentration d'œstrogène  $x$  dans les ERU ( $\mu\text{g/L}$ )

$P$  = taille de la population totale (nombre d'individus)

$F$  = flux de ERU entrant sur la STEP ( $\text{L/j}$ )

(Johnson *et al.* 2000)

Le modèle est d'autant plus précis que les données entrantes sont valables à échelle du bassin versant étudié. Les niveaux d'excrétion de chaque sous-groupe, établis en fonction de l'âge et du sexe, sont globalement constants quelle que soit la population considérée. La connaissance exacte du flux des ERU entrant sur la STEP est absolument nécessaire ; son obtention auprès des gestionnaires n'est généralement pas limitante. La taille et la structure de la population sont des données statistiques facilement accessibles même à des échelles fines (i.e. département, ville). Par contre, le nombre de femmes enceintes, estimé à partir du nombre de naissances, et la proportion de femmes utilisant des hormones de synthèse sont plus délicats à obtenir. Ils nécessitent, soit des approximations, soit l'utilisation de valeurs nationales. Or, de part les forts niveaux d'excrétion des femmes enceintes et la forte activité de EE2, ces données vont justement avoir un poids important dans l'approximation des concentrations en œstrogènes et de l'activité œstrogénique à partir des concentrations estimées. Par la suite, Johnson *et al.* (2004) ont révisé leur modèle. Ils y ont intégré des modules qui incluent la part d'œstrogènes excrétés via les fèces, la part d'œstrogènes conjugués (sulfates et glucuronates) et les modifications subies par les œstrogènes au cours de leur transit dans le réseau d'assainissement. Les données paramétrant ces extensions sont principalement tirées de la littérature.

Ce modèle a pu être confronté à des échantillons réels. La version initiale du modèle a montré des difficultés à prédire les valeurs mesurées chimiquement (Johnson *et al.* 2000). La majorité des valeurs estimées pour E1 et E2 était deux fois moins importante que les valeurs mesurées. Pour EE2, les valeurs estimées ne correspondaient qu'au quart ou au tiers des valeurs réelles. Au contraire, pour E3, le modèle surestimait d'un facteur 4 les valeurs réelles. Les facteurs de corrélations ( $r^2$ ) entre les valeurs prédites et les valeurs réelles étaient d'environ 0,5 pour E1, E2 et 0,15 pour EE2. Avec le modèle révisé, la sous-estimation des concentrations de E1, E2 et EE2 était sensiblement réduite puisqu'elle n'était plus que d'un

facteur 1,25 en moyenne. De plus, les facteurs de corrélation étaient nettement améliorés avec environ 0,7 pour E1, E2 et 0,53 pour EE2 (Johnson and Williams 2004).

## **II.2 Comportement dans les stations d'épuration**

Les STEP qui permettent d'épurer les ERU avant leur rejet dans le milieu naturel ont initialement été dimensionnées pour traiter la pollution particulaire et carbonée. Ce n'est que dans les deux dernières décennies qu'elles ont, en partie, été modernisées pour pouvoir éliminer la pollution azotée et phosphorée. Cependant, elles n'ont pas été conçues pour traiter les micropolluants organiques tels que les œstrogènes.

Les principaux traitements opérés sur une STEP sont un pré-traitement physico-chimique pour éliminer les déchets volumineux, les graisses et le sable. Les eaux pré-traitées peuvent ensuite être soumises à une décantation primaire pour éliminer les matières en suspension qui constituent alors les boues primaires. Après ces traitements préliminaires, les eaux subissent généralement un traitement biologique secondaire en condition aérobie qui permet d'éliminer la pollution carbonée. Les principaux procédés sont les systèmes à boue activée et les systèmes à biomasse fixée. Des étapes en conditions anoxiques et anaérobies sont parfois ajoutées à ce traitement aérobie pour éliminer par voie biologique la pollution azotée et phosphorée. Les eaux sont ensuite séparées de la biomasse produite dans le traitement biologique au sein de clarificateurs ou décanteurs secondaires. Une partie de la biomasse est recirculée à l'intérieur du bassin biologique, l'excédant constituant les boues secondaires. Les eaux sont ensuite rejetées dans le milieu récepteur après avoir éventuellement subi des traitements tertiaires physico-chimiques pour parfaire l'épuration (élimination de l'azote et du phosphore, oxydation avancée ou désinfection).

### **II.2.1 Efficacité globale et impact des différents traitements**

Le tableau 5 présente les abattements observés au niveau de différentes STEP à travers le monde. Il apparaît tout d'abord que tous les œstrogènes ne sont pas éliminés de la même façon. En effet, E3 est la molécule la plus efficacement éliminée avec, généralement, des abattements supérieurs à 95%. Pour E2, l'élimination apparaît plus délicate, mais aussi plus variable d'une STEP à l'autre, puisque son abattement est compris entre 40 et 100%. L'élimination de EE2 présente la même variabilité et n'est généralement jamais complète, au maximum 98%, et même parfois nulle. Enfin pour E1, l'efficacité du traitement varie de 0 à 100%. De plus, dans certains cas, le bilan de masse est négatif suggérant qu'il puisse également être formé au cours du traitement. Les différences observées entre les composés peuvent s'expliquer par leurs propriétés chimiques. En effet, E3 qui est peu hydrophobe et relativement bien soluble dans l'eau est celui qui est le mieux éliminé. EE2, composé très hydrophobe, peu soluble et stabilisé par la substitution d'un groupement éthynyl



en C17 est le plus récalcitrant. Quant à E2 et E1, ils sont plus solubles que EE2 mais également plus hydrophobes que E3, ce qui se traduit par une élimination intermédiaire.

Par ailleurs, l'une des hypothèses pour expliquer la faible dégradation des œstrogènes dans certains cas et même, l'augmentation de la concentration de E1, est l'hydrolyse des formes conjuguées. En effet, nous avons vu que les formes conjuguées représentaient environ 36% des œstrogènes en entrée de STEP. Or, D'Ascenzo *et al.* (2003) ont montré que l'hydrolyse de ces formes, qui avait lieu au sein du réseau d'assainissement, se poursuivait ensuite au cours de l'épuration des ERU. Ainsi, l'abattement des œstrogènes conjugués oscille entre 84 et 100%, sauf pour le E1-3S, 64%. Ce sont les conjugués glucuronates et sulfates de E2 qui sont le plus facilement hydrolysés (100%), suivis de ceux de E3 (84-100%), alors que les formes conjuguées de E1 paraissent être hydrolysées plus lentement (64-84%). Ce résultat explique notamment que l'élimination de E1 est faible (61%) puisqu'il est continuellement produit à partir de l'hydrolyse des conjugués.

**Tableau 5 : Abattements des œstrogènes naturels (E1, E2 et E3) et synthétiques (EE2) par les STEP dans différents pays à travers le monde (%).**

Référence	Pays / n STEP / procédé	E1 <sup>a</sup>	E2 <sup>a</sup>	E3 <sup>a</sup>	EE2 <sup>a</sup>
(Baronti <i>et al.</i> 2000)	Italie / 6 / AS	61 ± 38 (+)	87 ± 9	95 ± 6	85 ± 14
(D'Ascenzo <i>et al.</i> 2003)	Italie / 6 / AS	61	85	97	nm
(Ternes <i>et al.</i> 1999b)	Brésil / 1 / AS + BF	83	100	nm	78
	Allemagne / 1 / AS	~0	64	nm	~0
(Nakada <i>et al.</i> 2006)	Japon / 5 / AS	86	90	100	nm
(Carballa <i>et al.</i> 2004)	Espagne / 1 / AS	(+)	60	nm	nm
(Joss <i>et al.</i> 2004)	Suisse / 3 / AS + BF	50-99	88-98	nm	70-94
(Servos <i>et al.</i> 2005)	Canada / 18 / AS + LG	50-98 (+)	40-99	nm	nm
(Johnson <i>et al.</i> 2000)	Italie / 5 / AS	nm	nm	nm	nm
	Pays-bas / 3 / AS	64-98	75-98	nm	77-98
(Leusch <i>et al.</i> 2006)	Australie / 13 / AS + BF	<1-100	100	nm	nm
(Braga <i>et al.</i> 2005)	Australie / 1 / AS	85	96	nm	nm
(Andersen <i>et al.</i> 2003)	Allemagne / 1 / AS	98	98	nm	90
(Clara <i>et al.</i> 2005)	Autriche / 4 / AS	nm	nm	nm	nm
(Lee <i>et al.</i> 2004)	Canada / 4 / AS	nm	nm	nm	nm
(Cargouet <i>et al.</i> 2004)	France / 4 / AS + BF	40-60	40-60	40-70	40-55

<sup>a</sup> formes libres uniquement ; nm : non mesuré ; (+) signifie que E1 est produit au cours de l'épuration ; ; AS : boue activée ; BF : biomasse fixée ; LG : lagunage.

Concernant la dynamique des œstrogènes au cours du traitement, il a été rapporté que les pré-traitements et les traitements primaires avaient peu ou pas d'impact sur l'élimination des œstrogènes. En effet, les concentrations de E1, E2 et EE2 à l'issue de ces étapes sont souvent du même ordre de grandeur ou même plus élevées que les concentrations entrantes. Cette augmentation des teneurs à ce niveau pourrait également être expliquée par l'hydrolyse des

formes conjuguées. L'essentiel de l'abattement a donc lieu au cours du traitement biologique secondaire (Ternes *et al.* 1999b; Matsui *et al.* 2000; Andersen *et al.* 2003; Carballa *et al.* 2004). Il en résulte que les STEP ne possédant qu'un traitement primaire présentent une faible capacité à éliminer les œstrogènes (Braga *et al.* 2005; Servos *et al.* 2005). De la même manière, le passage dans les clarificateurs secondaires des eaux sortant du traitement biologique n'influe pas sur la concentration en œstrogènes résiduaire (Matsui *et al.* 2000; Carballa *et al.* 2004).

L'activité œstrogénique, quant à elle, est abattue à hauteur de 60-100% et comme pour les œstrogènes, c'est essentiellement le traitement biologique qui en est responsable (Tableau 6). Les traitements primaires n'ont, soit pas d'impact, soit un impact négatif, avec une augmentation de l'œstrogénicité des eaux une fois pré-traitées et décantées (Matsui *et al.* 2000; Holbrook *et al.* 2002; Svenson *et al.* 2003; Leusch *et al.* 2005; Leusch *et al.* 2006). La production de formes libres, plus actives, par déconjugaison des formes glucuronates et sulfates, faiblement actives, pourrait en être la cause. A l'inverse du devenir des œstrogènes, la clarification secondaire a une influence sur l'œstrogénicité dans certains cas (Leusch *et al.* 2005), mais pas dans d'autres (Matsui *et al.* 2000).

**Tableau 6 : Abattement de l'activité œstrogénique par les STEP dans différents pays à travers le monde (%) et impacts respectifs des traitements primaires (I) et secondaires (II).**

Référence	Pays / n STEP / procédé	EEQ	traitement I	traitement II	test
(Matsui <i>et al.</i> 2000)	Japon / 1 / AS	96	-	+	YES
(Korner <i>et al.</i> 2000)	Allemagne / 1 / AS	89	nm	nm	E-Screen
(Cargouet <i>et al.</i> 2004)	France / 4 / AS + BF	62-97	nm	nm	MELN
(Svenson <i>et al.</i> 2003)	Suède / 12 / AS	58-100	-	+	YES
(Leusch <i>et al.</i> 2005)	Australie / 1 / AS	87	+	+	E-Screen
		98	-	+	ERBA
(Leusch <i>et al.</i> 2006)	Australie / 13 / AS + BF	>90	-	+	ERBA
(Holbrook <i>et al.</i> 2002)	USA / 2 / AS	56-64	-	+	YES

nm : non mesuré ; - : impact nul ou impact négatif ; + : impact positif ; AS : boue activée ; BF : biomasse fixée.

## II.2.2 Paramètres influant l'efficacité des traitements secondaires

Après comparaison des abattements entre les différentes STEP, il apparaît clairement que toutes les STEP n'offrent pas les mêmes performances d'élimination des œstrogènes. Il existe en effet une grande variabilité des rendements épuratoires selon les sites étudiés. Nous avons vu que l'hydrolyse des formes conjuguées pouvait être une des explications pour interpréter les cas où l'abattement des œstrogènes était faible. Ainsi, lorsque la charge entrante des formes conjuguées est élevée, leur déconjugaison au cours du traitement induit une libération des formes libres, et donc parallèlement, d'œstrogénicité, qui ne sont pas forcément complètement dégradées par la suite faute d'un temps de traitement suffisant. La dynamique des formes conjuguées au sein du réseau d'assainissement peut donc avoir un impact positif

ou négatif sur l'efficacité des STEP. D'Ascenzo *et al.* (2003), rapportent des écart-types importants sur les mesures de formes conjuguées effectuées en entrée de 6 STEP sur 3 mois consécutifs i.e. 70 à 120%. Ainsi, de nombreux paramètres sont suspectés d'influer sur le devenir des conjugués au sein du réseau d'assainissement comme l'activité glucuronidase et arylsulfatase, propre aux ERU ; mais aussi, le dimensionnement du réseau (longueur de canalisation) et l'hydrodynamique (débit) qui vont influer sur le temps de séjour des ERU dans le réseau ; et enfin, des paramètres environnementaux comme la température ambiante.

Au niveau des STEP, certains paramètres opératoires pourraient également conditionner le devenir des œstrogènes au cours du traitement secondaire. Ainsi, comme précédemment évoqué, le temps de traitement pourrait avoir un rôle clef. Le temps de séjour hydraulique (HRT) et le temps de séjour des boues (SRT) sont déjà considérés comme des paramètres majeurs pour l'élimination des macropolluants. Or, plusieurs travaux suggèrent également leur importance dans l'élimination des œstrogènes. Aucune corrélation significative ( $r^2 < 0.5$ ) n'a pu être obtenue entre le HRT ou le SRT et l'efficacité de traitement (Johnson *et al.* 2005; Servos *et al.* 2005). Toutefois, il apparaît que pour les SRT inférieurs à 10 jours, les rendements d'élimination des œstrogènes et de l'œstrogénicité sont très variables. Pour des SRT compris entre 10 et 20 jours, des rendements généralement hauts (> 60%) sont atteints. Enfin, des SRT supérieurs à 20 jours permettent d'atteindre des rendements supérieurs à 90% (Clara *et al.* 2005; Johnson *et al.* 2005; Servos *et al.* 2005). Le même type de répartition des rendements en fonction des ordres de grandeur de HRT est également observable ; des rendements généralement supérieurs à 60% étant atteints pour des HRT supérieurs à 20 h (Johnson *et al.* 2005; Servos *et al.* 2005). L'influence du HRT et du SRT sur l'abattement des œstrogènes et de l'œstrogénicité suggère que la biodégradation ait un rôle important dans l'élimination des œstrogènes. En effet, des HRT et SRT élevés favorisent un contact prolongé entre les bactéries et les œstrogènes, la présence d'une concentration en biomasse plus importante et l'émergence de bactéries présentant des taux de croissance faibles mais qui seraient capables de dégrader les œstrogènes (Andersen *et al.* 2003; Svenson *et al.* 2003; Johnson *et al.* 2005).

Nous avons vu précédemment que les traitements primaires ne permettaient pas d'assurer une élimination convenable des œstrogènes et de l'œstrogénicité contrairement aux traitements biologiques secondaires. Cependant, tous les traitements biologiques ne présentent pas une efficacité similaire. Ainsi, le lagunage semble plus efficace que les boues activées qui sont elles-mêmes plus efficaces que les systèmes à biomasse fixée. En effet, les abattements obtenus par les systèmes à lagunage sont, dans la plupart des cas, supérieurs à 90%, alors que ceux obtenus par les systèmes à biomasse fixée sont plus bas (0 à 90%). Les systèmes à boue activée présentent, quant à eux, des rendements épuratoires variables mais le plus souvent compris entre 70 et 100% (Ternes *et al.* 1999b; Svenson *et al.* 2003; Johnson *et al.* 2005; Servos *et al.* 2005). Ces différences d'efficacité pourraient notamment s'expliquer par la variabilité des HRT et SRT selon le procédé considéré (Tableau 7).

**Tableau 7 : HRT global, HRT dans le bassin d'aération (en heures) et SRT (en jours) pour différents types de procédés d'épuration biologique**

Procédé	HRT (HRT bassin d'aération)	SRT
Biomasse fixée	6-8 (0,5-1)	2
Boue activée	10-30 (3-15)	2-15
Lagunage	>150 (>150)	>150

(Johnson and Sumpter 2001; Servos *et al.* 2005)

Il a été démontré par ailleurs que parmi les systèmes à boue activée, ceux qui étaient adaptés pour effectuer le traitement de l'azote offraient également de bons taux d'élimination des œstrogènes (Andersen *et al.* 2003; Svenson *et al.* 2003; Servos *et al.* 2005). Cette efficacité accrue est due soit à la prolongation du traitement biologique, soit à l'existence d'une phase anoxique. En effet, avec des HRT et SRT élevés, supérieurs à 20 h et 10 jours, respectivement, les conditions nitrifiantes permettent des temps de contact importants entre les bactéries et les œstrogènes. Par ailleurs, le traitement de l'azote nécessite la présence d'une phase anoxique qui pourrait permettre la croissance de bactéries impliquées dans le traitement de l'azote et également capables de métaboliser les œstrogènes.

Enfin, la température est un paramètre environnemental, mis en avant par Ternes *et al.* (1999b) et Leusch *et al.* (2006), susceptible d'influencer l'élimination des œstrogènes. Toutefois, cette hypothèse a été réfutée par Johnson *et al.* (2000, 2005) qui n'observent aucune corrélation entre l'élimination de E1 ou E2 et la température.

### II.2.3 Mécanismes impliqués dans l'élimination des œstrogènes

Nous avons vu que la capacité des STEP à éliminer les œstrogènes était variable d'un site à l'autre et qu'un certain nombre de paramètres opératoires ou environnementaux pouvaient en être la cause. L'incapacité des traitements primaires à abattre les charges en œstrogènes et l'influence des HRT et SRT suggèrent que le mécanisme de biodégradation puisse avoir un rôle majeur dans l'élimination de ces hormones sexuelles. Toutefois, étant donné leurs propriétés physico-chimiques, notamment leurs log  $K_{ow}$ , l'implication de phénomènes d'adsorption sur les boues activées n'est pas à exclure. L'objectif de cette partie est donc de faire la lumière sur le rôle respectif de la biodégradation et de l'adsorption dans l'élimination des œstrogènes.

#### II.2.3.1 La biodégradation des œstrogènes

##### *Potentiel de biodégradation des boues activées*

Un certain nombre d'études, menées à l'échelle du laboratoire, ont mis en évidence le potentiel de biodégradation des œstrogènes par des boues activées. Ainsi, en conditions aérobies, les œstrogènes naturels E1, E2 et E3 sont facilement dégradés. La dégradation de E2 conduit à la formation de E1, lequel est ensuite dégradé sans accumulation d'autres sous-

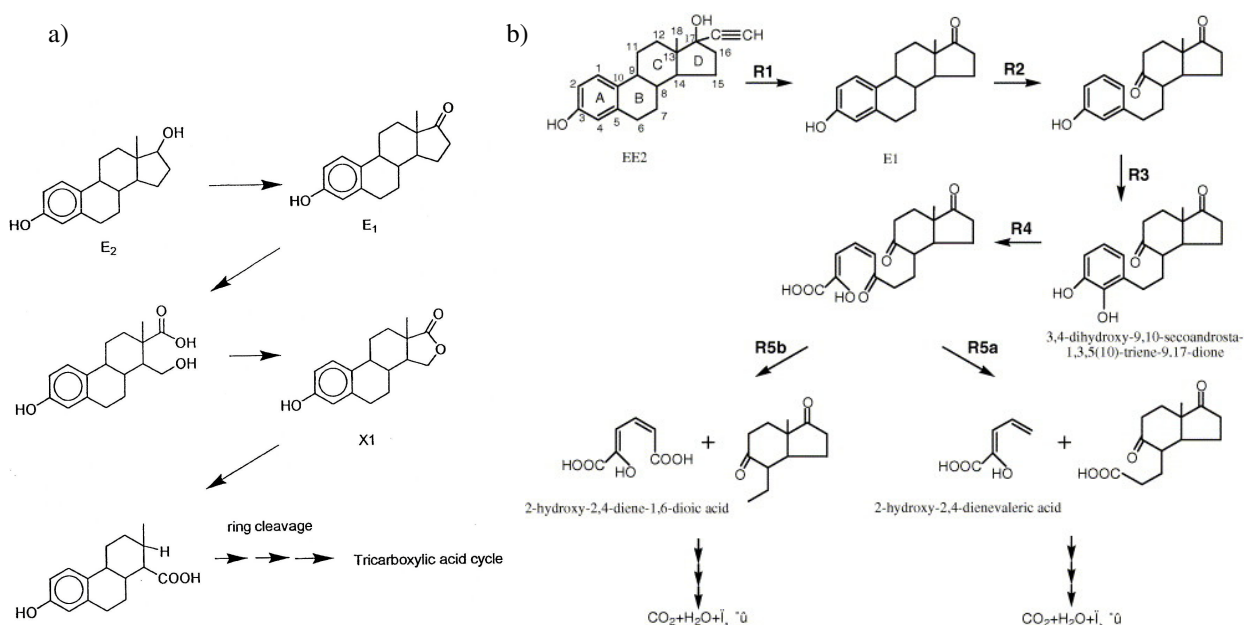
produits. Selon la concentration initiale en E2 et en biomasse, la conversion de E2 en E1 prend de quelques heures à 48h. La dégradation de E1 est plus longue et nécessite des temps de contacts de 3 à 14 jours alors que E3 est complètement dégradé en 2 jours (Ternes *et al.* 1999a; Lee and Liu 2002). Le métabolite 16 $\alpha$ -hydroxyestrone a, par ailleurs, été identifié comme étant un sous-produit de dégradation de E3 (Ke *et al.* 2007).

A l'inverse des œstrogènes naturels, la molécule synthétique EE2 semble plus persistante en condition aérobie. Seulement 20 à 40% sont dégradés après 24 à 72h de traitement (Ternes *et al.* 1999a ; Layton *et al.* 2000; Weber *et al.* 2005). De plus, Ternes *et al.* (1999a) notent que le ménastrol, un autre œstrogène synthétique, est, en partie, rapidement dégradé (80% en 24h) et également partiellement converti en EE2 par déméthylation (7%) avec accumulation de ce dernier. Comme l'avaient suggéré les études à l'échelle réelle, les boues activées nitrifiantes apparaissent particulièrement adaptées pour éliminer les œstrogènes, et notamment, EE2 (Vader *et al.* 2000; Shi *et al.* 2004). Ainsi avec une biomasse initiale de 1 à 3 g/L et une concentration en EE2 de 0,05 à 1 mg/L, EE2 est totalement dégradé en 4 à 6 jours sans accumulation de sous-produits. Cette dégradation de EE2 pourrait être le résultat de co-métabolisme par les bactéries nitrifiantes et impliquerait l'enzyme ammonium monooxygénase (AMO). Ainsi, l'espèce nitrifiante *Nitrosomonas europaea* s'est révélée capable de dégrader tous les œstrogènes naturels et synthétiques mais pas leurs sous-produits de dégradation. Ce résultat suggère que ce soit les bactéries hétérotrophes des boues nitrifiantes qui assureraient la dégradation de ces sous-produits (Shi *et al.* 2004). Les bactéries nitrifiantes possèdent des taux de croissance faibles et dépendant fortement de la température (Vader *et al.* 2000). Ceci confirme les résultats des études *in situ* où des SRT longs permettaient de meilleurs abattements et où la température semblait, dans certains cas, avoir un impact sur l'efficacité de dégradation.

Plusieurs paramètres vont donc conditionner la biodégradation des œstrogènes par les boues activées. Nous l'avons vu précédemment, le SRT est un paramètre clef qui a également été mis en évidence à l'échelle du laboratoire (Clara *et al.* 2005). Par ailleurs, Layton *et al.* (2000) soulignent l'importance de disposer d'une boue adaptée. En effet, la minéralisation de E2 par une boue de STEP municipale est de 84% contre 4% seulement, dans les mêmes conditions, avec une boue de STEP industrielle. Concernant le facteur température, il apparaît qu'à basse température (5-10°C), la vitesse de dégradation de E2 est statistiquement plus faible qu'à des températures plus hautes (22-25°C). Cependant, il est difficile de statuer sur l'effet de la température car dans certains cas un effet est noté (Li *et al.* 2005) et dans d'autres non (Suzuki and Maruyama 2006). Enfin, il ne semble pas y avoir de différence entre les potentiels de dégradation de boues forte charge (2294 mgMLSS/L) et de boues faible charge (1770 mgMLSS/L).

Nous avons vu que dans le cas des bactéries nitrifiantes, l'AMO était impliquée dans la dégradation des œstrogènes. Une autre enzyme, la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase (17 $\beta$ -OH-SDH) est suspectée d'être impliquée dans la conversion de E2 en E1 par oxydation du C-

17 (Donova *et al.* 2005). Une voie métabolique (Figure 10a) a été proposée par Lee and Liu (2001). Toutefois, cette voie ne semble pas être la seule notamment au regard des bactéries nitrifiantes (Shi *et al.* 2004) avec lesquelles E1 n'est pas retrouvé au cours de la dégradation de E2. Pour EE2, la première étape consisterait également en une oxydation en E1 (Figure 10b), suivie par les ruptures successives du cycle B et A (Haiyan *et al.* 2006). Toutefois, dans ce cas, la 17 $\beta$ -OH-SDH ne serait pas impliquée car son centre réactionnel est bloqué par les substitutions en C-17 telles que le groupement éthynyl de EE2 (Donova *et al.* 2005). Ceci expliquerait pourquoi les bactéries nitrifiantes, via l'AMO, seraient mieux adaptées pour dégrader EE2 et pourquoi l'inhibition de l'AMO, dans le cas de boues nitrifiantes, affecte plus la dégradation de EE2 que celle des œstrogènes naturels (Shi *et al.* 2004).



**Figure 10 : Voies métaboliques proposées pour l'œstrogène naturel E2 (a) et l'œstrogène synthétique EE2 (b) par Lee and Liu (2001) et Haiyan *et al.* (2006), respectivement.**

### Acteurs microbiens de la biodégradation

Différents travaux ont permis d'identifier des espèces ou consortium bactériens, présents dans les boues activées urbaines, capables de dégrader les œstrogènes. Ainsi, deux nouvelles espèces appartenant au genre *Novosphingobium*, *N. tardagens*, et à la classe des *Rhodocyclaceae*, *Denitratisoma oestradiolicum*, ont été isolées à partir des boues activées de STEP japonaise et allemande, respectivement. Ces espèces sont capables, en condition aérobie pour *N. tardagens* et en condition anoxique dénitrifiante pour *D. oestradiolicum*, de dégrader les œstrogènes naturels mais pas EE2. Toutes les deux utilisent E2 comme source de carbone sans formation du métabolite potentiel E1 (Fujii *et al.* 2002; Fujii *et al.* 2003; Fahrbach *et al.* 2006). La molécule E1 n'est pas détectée non plus lors de la dégradation de E2 par les espèces *Rhodococcus zopfii* et *Rhodococcus equi*, également isolées d'une boue de STEP japonaise. Ces bactéries sont capables de métaboliser tous les œstrogènes naturels en

tant que source de carbone mais aussi EE2 (Yoshimoto *et al.* 2004). A l'inverse, le consortium, constitué de *Achromobacter xyloxidans* et *Ralstonia* sp., provenant de la boue d'un bioréacteur à membrane, conduit à la production de E1 lors de la dégradation de E2. Seuls les œstrogènes naturels sont métabolisés par ce consortium, toutefois, leur utilisation comme source de carbone n'est pas précisée (Weber *et al.* 2005). La capacité de convertir E2 en E1 semble impliquer une activité métabolique largement répandue dans le monde bactérien puisque 14 souches, possédant cette capacité, ont pu être isolées à partir d'une boue activée. Ces 14 souches se répartissent dans 8 genres : *Aminobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardioides*, *Rhodococcus* et *Sphingomonas*. Cependant, la capacité de dégrader E1 n'a été observée que dans 3 de ces souches : 2 espèces d'*Aminobacter* et une espèce de *Sphingomonas*. De plus, seule cette dernière est capable d'utiliser E1 comme source de carbone (Yu *et al.* 2007). Dans le contexte industriel, une espèce proche du genre *Sphingobacterium* a été isolée de la boue activée d'une STEP implantée sur un site de fabrication de pilules contraceptives. Par conséquent, cette souche s'est montrée particulièrement adaptée pour dégrader les hormones synthétiques (Haiyan *et al.* 2006). Pour l'ensemble des bactéries précédemment mentionnées, aucune accumulation de sous-produits à activité œstrogénique n'a été détectée lors de la dégradation des œstrogènes.

### II.2.3.2 L'adsorption des œstrogènes

Contrairement au devenir des œstrogènes dans la filière eau, leur adsorption sur les boues d'épuration a été très peu étudiée. Ceci est essentiellement dû à la difficulté de mesurer des composés à des concentrations de l'ordre du ng/g ms dans des matrices aussi complexes (Kuster *et al.* 2004). Les données collectées par Andersen *et al.* (2003) permettent de conclure que l'essentiel des œstrogènes dans les boues se trouve associé à la fraction particulaire. Cependant, quatre études seulement ont rapporté des concentrations en œstrogènes dans cette fraction des boues activées (Tableau 8). Le composé E1 apparaît être l'œstrogène majoritaire avec des teneurs allant jusqu'à 37 ng/g ms, suivi de E2, jusqu'à 17 ng/g ms et EE2, jusqu'à 4 ng/g ms. E3 n'a jamais été considéré dans ces études du fait de sa plus grande polarité ( $\log K_{ow} = 2,81$ ) et donc, de sa moins grande capacité à s'adsorber sur la matière particulaire.

**Tableau 8 : Concentrations des œstrogènes naturels (E1 et E2) et synthétiques (EE2) dans des boues de STEP (ng/g ms).**

Référence	Pays / n STEP / procédé	E1 <sup>a</sup>	E2 <sup>a</sup>	E3 <sup>a</sup>	EE2 <sup>a</sup>
(Ternes <i>et al.</i> 2002)	Allemagne / 2 / AS	<2-37	5-17	nm	<2-4
(Andersen <i>et al.</i> 2003)	Allemagne / 1 / AS	7	1,7	nm	3
(Braga <i>et al.</i> 2005)	Australie / 1 / AS	12	0,3	nm	0,4
(Joss <i>et al.</i> 2004)	Suisse / 2 / AS	<2	<2-2,1	nm	<2-2,4

<sup>a</sup> formes libres uniquement ; nm : non mesuré ; AS : boue activée.

Cependant, des bilans de masse effectués sur des STEP ont montré que seulement 5 à 6% des œstrogènes étaient éliminés de la phase liquide via des mécanismes d'adsorption (Andersen *et al.* 2003; Braga *et al.* 2005). Ce chiffre a par ailleurs été confirmé par des estimations effectuées à partir du coefficient de distribution  $K_d$  (Equation 4). Ces estimations indiquent qu'entre 1,5 et 12% de la charge entrante d'œstrogènes seraient éliminés par adsorption (Joss *et al.* 2004; Ternes *et al.* 2004; Andersen *et al.* 2005). Johnson *et al.* (2000) suggèrent que la prolongation du SRT n'influence pas uniquement l'activité biologique, mais aussi l'adsorption des œstrogènes. En effet, la nature physique des floccs bactériens, c'est à dire le caractère hydrophile ou hydrophobe des exopolymères qui constituent ces floccs et conditionnent l'adsorption des œstrogènes, serait dépendant du SRT.

$$K_d = 1000 \times \frac{C_s}{C_{aq}} \quad (4)$$

$K_d$  = coefficient de distribution (l/kgTSS)  
 $C_s$  = concentration particulaire (mg/gTSS)  
 $C_{aq}$  = concentration dissoute (mg/l)  
 TSS = total suspended solids

(Clara *et al.* 2004)

En outre, Ternes *et al.* (2004) obtiennent des  $K_d$  comparables pour des boues primaires et secondaires vis à vis des œstrogènes, suggérant des niveaux d'adsorption similaires. Ainsi, à partir du  $K_d$ , la proportion des œstrogènes éliminée des eaux au niveau du traitement primaire a pu être estimée à 6-15%, selon les molécules (Braga *et al.* 2005). Toutefois, seule la fraction déjà associée aux particules dans les ERU serait affectée par ce type de traitement. Les données collectées dans les travaux d'Andersen *et al.* (2003) s'accordent avec ces estimations. Toutefois, étant donnée la plus forte concentration en particules des boues primaires (40 g/L) par rapport aux boues secondaires (7 g/L), les teneurs en œstrogènes des boues primaires seraient beaucoup plus importantes (environ 30 ng/g ms) que celles des boues secondaires (Tableau 8 ; Andersen *et al.* 2003).

Concernant l'activité œstrogénique, la fraction éliminée des ERU par adsorption a également été évaluée à 2-14%. Il y a donc une convergence avec les résultats obtenus pour les œstrogènes, via des mesures directes ou via des estimations. L'activité œstrogénique des boues mixtes ou secondaires était comprise entre 3 et 20 ngEEQ/g ms (Korner *et al.* 2000; Holbrook *et al.* 2002). De plus, Holbrook *et al.* (2002) montrent que la majeure partie de l'activité œstrogénique des boues est retrouvée associée à la fraction particulaire. Ceci va dans le même sens que la répartition précédemment évoquée pour les œstrogènes, issue des travaux d'Andersen *et al.* (2003). Ils notent, de surcroît, qu'il existe une relation entre le SRT et l'activité œstrogénique des boues, celle-ci augmentant quand le SRT augmente.

Ainsi, le mécanisme d'adsorption ne semble être responsable que d'une faible partie de l'élimination des œstrogènes et de l'œstrogénicité. La biodégradation apparaît donc comme étant la voie d'élimination majoritaire. Ce constat explique, notamment, pourquoi les STEP



ne disposant que d'un traitement primaire ne sont pas capables d'éliminer correctement les œstrogènes des ERU. Néanmoins, la question du devenir des œstrogènes adsorbés sur les boues, lors du traitement de celles-ci, peut se poser. Cette question est d'autant plus pertinente dans le cas où les boues sont épandues sur des terres agricoles en tant qu'amendement organique.

#### II.2.4 Impact des traitements appliqués aux boues d'épuration

Le devenir des œstrogènes et de l'activité œstrogénique contenue dans les boues a été très peu étudié pour les mêmes raisons que les aspects d'adsorption au cours du traitement des ERU. Toutefois, il a été noté qu'à des pH supérieurs à 8, une désorption significative des œstrogènes était observée. Ce constat découle directement de la capacité des œstrogènes à se déprotonner ( $pK_a = 10,5$ ) conduisant à des formes ionisées plus solubles. Ainsi pour un pH de l'ordre du  $pK_a$ , 50% des œstrogènes sont désorbés et jusqu'à la totalité à des pH de l'ordre de 12 (Clara *et al.* 2004). Or, des pH de cet ordre sont atteints, au cours du processus de déshydratation des boues, lorsqu'un conditionnement à la chaux ( $CaOH_2$ ) a lieu. De ce fait, il est probable qu'un tel traitement des boues permet de diminuer la charge d'œstrogènes adsorbée mais, en contrepartie, conduise à la recirculation d'une forte quantité de ces hormones en tête de STEP. Les œstrogènes ne sont d'ailleurs pas les seuls PE à présenter ce type de comportement, il a également été mis en évidence pour le BPA et est suspecté pour le NP (Ivashechkin *et al.* 2004). La solubilisation des PE adsorbés sur les boues, à des pH élevés, expliquerait pourquoi Matsui *et al.* (2000) observent une forte œstrogénicité dans les eaux issues du procédé de déshydratation, avec des valeurs proches de 500 ngEEQ/L.

A l'inverse, des concentrations similaires, voire légèrement plus élevées, sont rapportées par Braga *et al.* (2005) pour des boues activées après déshydratation ( $E1 = 14,3$ ,  $E2 = 0,6$  et  $EE2 = 0,7$  ng/g ms, à comparer avec le Tableau 8). Dans ce cas, les conditions de la déshydratation ne sont pas précisées mais il est probable que la chaux ne soit pas utilisée. Enfin, Korner *et al.* (2000) ont mesuré l'activité œstrogénique dans des boues activées secondaires brutes et ces mêmes boues activées, mélangées avec des boues primaires, et déshydratées (centrifugation et chauffage à  $100^\circ C$ ). Il en ressort que l'œstrogénicité dans les boues secondaires brutes est d'environ 2 ngEEQ/g ms, contre 4 ngEEQ/g ms dans les boues mixtes déshydratées. Ces chiffres ne permettent pas pour autant de conclure sur l'effet d'une telle déshydratation car l'activité des boues primaires, seules, n'a pas été mesurée. De plus, le ratio boues primaires/secondaires des boues mixtes est inconnu.

Lorsque les boues activées et/ou primaires ne sont pas directement déshydratées, elles sont préalablement stabilisées en digestion anaérobie. Ce procédé biologique permet de diminuer la fraction fermentescible des boues, de réduire leur volume et l'émission des odeurs. Parallèlement, un biogaz est produit contenant une forte proportion de méthane valorisable sur le plan énergétique. Au regard des résultats de Ternes *et al.* (2002), qui notent, dans la plupart des cas, une augmentation des teneurs après digestion, nous pouvons estimer que les

œstrogènes sont, globalement, moins bien dégradés que la matière sèche. Ainsi, les teneurs dans les boues digérées sont de <2-16, 9-49 et 2-17 ng/g ms pour E1, E2 et EE2, respectivement (à comparer avec le Tableau 8). Cependant, aucun bilan de masse ni rendement n'a pu être établi. Andersen *et al.* (2003) observent également une augmentation des teneurs en œstrogènes des boues après digestion anaérobie mésophile (33°C, 20 j), sauf pour EE2 (E1 = 25, E2 = 5 et EE2 < 1,5 ng/g ms, à comparer avec le Tableau 8). Le bilan de masse partiel qu'ils accomplissent sur le digesteur leur permet d'estimer que les œstrogènes ne sont quasiment pas dégradés au cours de la digestion anaérobie. De plus, il semble qu'une partie des œstrogènes adsorbés soit resolubilisée au cours du procédé puisque les concentrations de certaines molécules (E1 et E2) augmentent dans la fraction soluble des boues. Elles passent de 1,4 à 67 ng/L pour E1, et de <1 à 5 ng/L pour E2. Cela s'explique par la solubilisation générale de la matière organique observée au cours de la digestion anaérobie.

L'impact quasi-nul de la digestion anaérobie observée *in situ* confirme des travaux antérieurs réalisés à l'échelle du laboratoire. Ces travaux avaient en effet montré que les conditions anaérobies (21°C) étaient moins favorables à la dégradation de E2 (Lee and Liu 2002). Toutefois, d'autres travaux indiquent que des abattements importants sont atteints pour E1, E2 et EE2 (75-85%) en condition anaérobie mésophile (37°C) ou thermophile (55°C). Ni la température, ni le HRT ne semblent affecter l'élimination des œstrogènes dans ces réacteurs. Cependant, la nécessité d'assurer à la boue un temps d'adaptation suffisant est soulignée (Carballa *et al.* 2006).

Enfin, le devenir de l'activité œstrogénique des boues a été étudié par Holbrook *et al.* (2002). Après digestion anaérobie mésophile (30-40°C, 10 j), ils rapportent des concentrations dans les boues variant de 23 à 57 ngEEQ/g ms (contre 20 ngEEQ/g en entrée de digesteur). Ainsi, comme observé pour les œstrogènes, l'œstrogénicité est soit identique, soit augmentée après digestion anaérobie. De plus, le bilan de masse suggère que de l'activité œstrogénique soit produite au cours de la digestion anaérobie. Ce phénomène peut s'expliquer soit par la formation de sous-produits plus toxiques, soit par une meilleure extractabilité des composés œstrogéniques résultant de modifications structurelles de la matrice au cours de la digestion. La digestion aérobie est aussi parfois utilisée pour stabiliser les boues. Ainsi, Holbrook *et al.* (2002) ont suivi l'œstrogénicité au cours de digestions aérobies thermophiles/mésophiles successives (40-58, 3 j et 30-35°C, 10-20 j, respectivement). Après l'étape thermophile, les teneurs oscillaient de 4 à 11 ngEEQ/g ms (contre 3 ngEEQ/g en entrée de digesteur). L'activité augmente encore après l'étape mésophile avec des valeurs de l'ordre de 20-40 ngEEQ/g ms. Comme pour la digestion anaérobie, une production d'activité a lieu au cours de la digestion aérobie, surtout au niveau de l'étape mésophile.

Les traitements opérés sur les boues d'épuration vont donc conditionner les teneurs en œstrogènes et l'activité œstrogénique ultime de celles-ci. Ainsi, les étapes de déshydratation et stabilisation des boues vont induire, selon les cas, soit une désorption des œstrogènes (cas de l'utilisation de chaux), soit, le plus souvent, un maintien ou même une augmentation des

concentrations en œstrogènes et de l'activité œstrogénique. Ainsi, même si une faible part des œstrogènes s'adsorbe sur les boues, ils se montrent persistants au cours du traitement de celles-ci, induisant un risque toxicologique potentiel lors de leur épandage en agriculture.

### II.3 Les œstrogènes dans les eaux traitées

Les œstrogènes sont donc éliminés de manière plus ou moins complète au cours du processus épuratoire. Des différences sont observées en fonction de la molécule, mais aussi en fonction de la STEP considérée. Les paramètres opératoires et environnementaux au niveau de la STEP peuvent effectivement influencer sur le devenir de ces hormones sexuelles. La majeure partie de l'élimination des œstrogènes apparaît être due à l'activité biologique ; les mécanismes d'adsorption n'étant impliqués que pour une faible part seulement. Nous avons vu, par conséquent, que les boues contenaient des œstrogènes à des concentrations de quelques ng/g ms. De la même manière, la fraction résiduaire, c'est à dire non dégradée, des œstrogènes va persister dans les effluents traités.

Du fait de la grande diversité de l'efficacité des STEP, une grande diversité au niveau des concentrations mesurées dans les effluents est également observable (Tableau 9). Ainsi, la concentration en sortie de STEP pour E3, qui est assez bien dégradé, est généralement faible i.e. inférieure à 5 ng/L. Toutefois, étant donné les fortes concentrations en entrée, elle peut monter à des niveaux de l'ordre de la centaine de ng/L dans des cas où le procédé est vraiment inefficace (e.g. SRT faible, etc.). Les concentrations de E2 sont basses, la plupart du temps, inférieures à 10 ng/L, et au maximum, autour de 20-30 ng/L. La molécule synthétique EE2, déjà faiblement présente dans les ERU, se retrouve souvent en dessous du ng/L, voire à quelques ng/L, occasionnellement. Enfin pour E1, nous avons rapporté précédemment des abattements faibles avec même des cas de production au cours du traitement. Par conséquent, les concentrations retrouvées en sortie oscillent de quelques ng/L à 100 ng/L. A l'exception de E1, où cela est variable d'un cas à l'autre, il apparaît que les concentrations en sortie de STEP sont, dans l'ensemble, plus faibles qu'en entrée. De plus, très fréquemment, les concentrations dans les effluents sont inférieures aux LOD.

**Tableau 9 : Concentrations des œstrogènes naturels (E1, E2 et E3) et synthétiques (EE2) en sortie de STEP dans différents pays à travers le monde (ng/L).**

Référence	Pays / n STEP / procédé	E1 <sup>a</sup>	E2 <sup>a</sup>	E3 <sup>a</sup>	EE2 <sup>a</sup>
(Baronti et al. 2000)	Italie / 6 / AS	3-80	<1-4	<1-18	<1-2
(D'Ascenzo et al. 2003)	Italie / 6 / AS	17 ± 7	1,6 ± 1,9	2,3 ± 3	nm
(Ternes et al. 1999b)	Canada / 10 / AS	3	6	nm	9
	Allemagne / 16 / AS	9	<1	nm	1
(Nakada et al. 2006)	Japon / 5 / AS	3-100	<1-20	<1	nm
(Carballa et al. 2004)	Espagne / 1 / AS	4,4	<1	nm	<1
(Joss et al. 2004)	Suisse / 3 / AS + BF	0,5-9	0,5-1	nm	<1
(Servos et al. 2005)	Canada / 18 / AS + LG	1-96	0,2-15	nm	nm

Référence	Pays / n STEP / procédé	E1 <sup>a</sup>	E2 <sup>a</sup>	E3 <sup>a</sup>	EE2 <sup>a</sup>
(Johnson et al. 2000)	Italie / 5 / AS	<0,5-54	<0,5-7	<0,5-28	<0,5-2,2
	Pays-bas / 3 / AS	<0,4-47	<0,4-12	nm	<1,8
(Leusch et al. 2006)	Australie / 13 / AS + BF	<1-27	<1-5	nm	nm
(Braga et al. 2005)	Australie / 1 / AS	8 ± 4	1 ± 0,5	nm	<0,1
(Andersen et al. 2003)	Allemagne / 1 / AS	<1	<1	nm	<2
(Clara et al. 2005)	Autriche / 4 / AS	<1-72	<1-30	<1-275	<1-5
(Lee et al. 2004)	Canada / 4 / AS	9-75	<1-7	nm	<1
(Cargouet et al. 2004)	France / 4 / AS + BF	4-7	4-9	5-7	3-5

<sup>a</sup> formes libres uniquement ; nm : non mesuré ; AS : boue activée ; BF : biomasse fixée ; LG : lagunage.

Concernant les œstrogènes conjugués, il a été montré qu'ils étaient assez efficacement hydrolysés au cours de l'épuration des ERU, sauf pour le E1-3S. Par conséquent, la plupart des formes conjuguées se retrouvent en dessous de la LOD et jusqu'à 2 ng/L. L'œstrogène conjugué le plus abondant est E1-3S, 9 ng/L, du fait de sa plus grande persistance dans le système. Toutefois, étant donné la dégradation en parallèle des formes libres, la proportion de conjugués dans les effluents se maintient à 37% (36% dans les ERU). Les glucuronides qui représentaient encore 40% des formes conjuguées dans les ERU, ne comptent plus que pour 6% dans les effluents (D'Ascenzo *et al.* 2003). Nous voyons donc que ce sont surtout les formes glucuronates qui sont affectées par le traitement biologique ; les formes sulfates, plus réfractaires à l'hydrolyse, persistent légèrement dans les effluents. Ainsi, les observations faites pour les réseaux d'assainissement sont également valables pour la STEP ; les boues activées ne présentant probablement qu'une faible activité arylsulfatase. Toutefois, le devenir des conjugués sulfates dans les eaux de surface n'a jamais été étudié. Or ces composés peuvent potentiellement s'hydrolyser dans l'environnement et induire la libération de formes libres plus œstrogéniques.

L'activité œstrogénique des eaux traitées oscille entre la LOD et 24 ngEEQ/L mais est, le plus souvent, inférieure à la dizaine de ngEEQ/L (Tableau 10). De plus, comme pour les ERU, la majeure partie de cette activité peut être attribuée aux œstrogènes. La part due aux xœstrogènes, présents à des concentrations de l'ordre du µg/L, ne s'élève qu'à quelques pour-cents, à l'exception de certains cas (Tableau 10; Desbrow *et al.* 1998; Aerni *et al.* 2004; Rutishauser *et al.* 2004). Aerni *et al.* (2004) aboutissent à une corrélation positive ( $r^2 = 0,6$ ) entre l'activité œstrogénique estimée et mesurée (5 STEP,  $n = 70$ ). Ce résultat suggère la forte implication des œstrogènes dans l'activité œstrogénique sauf dans les cas où les apports industriels sont importants; les xœstrogènes pouvant alors entrer en considération. Bien qu'assez variable et souvent inférieure au ngEEQ/L, l'œstrogénicité des effluents de STEP se révèle, non négligeable sur le plan toxicologique, dans de nombreux cas. Cependant, les effluents sont dilués dans les eaux réceptrices et ce facteur doit être pris en considération pour évaluer l'impact des effluents sur les milieux récepteurs. Les œstrogènes ainsi rejetés dans les milieux naturels via les eaux traitées se sont montrés responsables d'un apport d'activité

œstrogénique dans ces milieux. Cargouët *et al.* (2004) montrent que l'œstrogénicité des eaux de la Seine est multipliée par un facteur 6 entre l'amont et l'aval du rejet d'une STEP. Svenson *et al.* (2003) rapportent un impact encore plus marqué des effluents de deux STEP sur l'œstrogénicité des eaux de la rivière Viskan (Suède). Cependant, l'œstrogénicité des eaux de la rivière décroît à des niveaux plus bas (quelques pg/L) au bout de 1 à 4 km. Il faut rappeler que cette activité est mesurée à partir de tests *in vitro* et que *in vivo* l'impact des effluents de STEP peut être différent. Ainsi, l'exposition en laboratoire de poissons *Oncorhynchus mykiss* à 5 effluents de STEP a induit une production de vitellogénine chez ces derniers dans 2 cas seulement. Parallèlement, tous les effluents présentaient une activité œstrogénique avec le test YES (Aerni *et al.* 2004). Néanmoins, il a clairement été observé chez des poissons sauvages ou placés en aval de rejets de STEP dans des cages, une augmentation de la concentration en vitellogénine par rapport à la normale (Folmar *et al.* 2002).

**Tableau 10 : Activité œstrogénique des effluents de STEP (ngEEQ/L), part estimée des xénobiotiques dans cette activité mesurée (%) et part des apports industriels aux ERU (%).**

Référence	Pays / n STEP / procédé	EEQ	xénobiotiques	industrie	test
(Matsui <i>et al.</i> 2000)	Japon / 1 / AS	5-15	~1-4%	"High"	YES
(Korner <i>et al.</i> 2000)	Allemagne / 1 / AS	6	~1-4%	40%	E-Screen
(Cargouët <i>et al.</i> 2004)	France / 4 / AS + BF	2-24	~0-33%	0-30%	MELN
(Svenson <i>et al.</i> 2003)	Suède / 12 / AS	<1-12	nm	nm	YES
(Leusch <i>et al.</i> 2005)	Australie / 1 / AS	5 ± 2	nm	<5%	E-Screen
		<1	nm		ERBA
(Leusch <i>et al.</i> 2006)	Australie / 13 / AS + BF	<1-6	~0-28%	0-15%	ERBA
(Holbrook <i>et al.</i> 2002)	USA / 2 / AS	6-11	nm	nm	YES

nm : non mesuré ; AS : boue activée ; BF : biomasse fixée.

Par ailleurs, comme pour les ERU, il a été montré que la fraction particulaire des eaux traitées (> 20 µm) ne contenait pas plus de 5-7% de l'œstrogénicité rejetée (Desbrow *et al.* 1998; Svenson *et al.* 2003). Ceci s'explique par la faible concentration de particules dans les effluents de STEP, de l'ordre de 5 mg/L. Même si les concentrations en œstrogènes adsorbés sur les particules sont probablement du même ordre de grandeur que dans les boues en excès (environ 10 ng/g ms), ils ne représentent que quelques dizaines de pg/L dans l'effluent final (Andersen *et al.* 2003).

Ainsi, dans de nombreux cas les concentrations en œstrogènes et les niveaux d'activités œstrogéniques rejetés via les effluents de STEP sont vraiment négligeables. Cependant, la forte variabilité observée par rapport à l'efficacité des STEP fait que, dans certains cas, les concentrations rejetées en œstrogènes dissous sont responsables d'une activité œstrogénique significative sur le pan toxicologique. Dans ce cas, même en tenant compte du facteur de dilution, les effluents peuvent induire une augmentation de l'œstrogénicité des eaux

réceptrices et, par conséquent, des perturbations endocriniennes, mises en évidence chez les poissons en conditions réelles.

### III. Conclusions sur la synthèse bibliographique

Les œstrogènes naturels et synthétiques, continuellement excrétés par les êtres humains, se retrouvent donc à des concentrations de l'ordre du ng/L ou ng/g dans les matrices environnementales (eaux de surfaces ou sédiments). L'effet toxique de leur présence sur les systèmes endocriniens de plusieurs espèces a de surcroît été prouvé. Ce sont les STEP qui, paradoxalement, s'avèrent être à l'origine du transfert de ces composés vers l'environnement. Ceci s'explique par leur efficacité variable à éliminer les œstrogènes des eaux usées avant rejet. De même les systèmes utilisés pour traiter les boues d'épuration présentent une faible capacité à éliminer la fraction adsorbée, d'où un risque toxicologique potentiel lors de l'épandage agricole.

Toutefois, la plupart des études effectuées précédemment sur le devenir des œstrogènes dans les STEP n'ont établi qu'un bilan entrée/sortie sur la ligne de traitement des eaux. La dynamique des œstrogènes au sein de la STEP en considérant les différentes étapes a été moins fréquemment étudiée. De même, la variabilité saisonnière n'a fait l'objet que de peu de travaux. Lors du suivi des œstrogènes au cours du traitement des eaux, seules les formes libres sont généralement prises en compte au détriment des formes conjuguées. Des limitations d'ordre analytique ont par ailleurs limité l'obtention d'informations sur l'adsorption des œstrogènes sur les boues activées. Pour ces mêmes raisons techniques, le devenir des œstrogènes au cours du traitement des boues n'a que très peu été considéré. Quelques travaux existent à propos du procédé de digestion anaérobie mais, par exemple, rien n'a été publié sur la dynamique des œstrogènes au cours du compostage des boues urbaines. La majeure partie des données disponibles dans la littérature porte sur les concentrations chimiques en œstrogènes, mais les informations sur la présence et le devenir de l'activité œstrogénique dans les eaux urbaines, et surtout sur les boues, sont rares. Ce n'est pas seulement le manque de données sur certains aspects qui est problématique mais surtout le fait que les données soient généralement obtenues sur différents sites ce qui rend leur analyse, comparaison et interprétation délicates.

Dans le cadre de cette thèse il a donc été choisi, pour un même site ou sujet d'étude, d'avoir des approches multiples. L'objectif est dans une première partie d'étudier le devenir des œstrogènes au sein de systèmes réels de traitements des eaux et des boues en considérant :

- les variations temporelles,
- l'impact des différentes étapes,
- les différentes formes d'une famille de composés ou différentes familles de composés,
- les différents compartiments, dont les matrices boues et composts qui nécessitent des mises au point analytiques,

- 
- l'évaluation chimique et toxicologique,

De même, dans une seconde partie, le mécanisme de biodégradation des œstrogènes sera étudié de manière plus fine, à l'échelle du laboratoire, en s'intéressant parallèlement aux acteurs microbiens impliqués ; cet aspect ayant été encore très peu étudié à ce jour. Pour cela, nous combinerons deux approches de caractérisation des communautés bactériennes :

- une approche "culture dépendante", basée sur l'isolement des bactéries cultivables en milieu solide,
- une approche "culture indépendante", basée sur l'analyse moléculaire de l'ADN ribosomique des bactéries, cultivables ou non.

---

## MATERIEL ET METHODES

---





## MATERIEL ET METHODES

### I. Prélèvements effectués sur les systèmes réels de traitement des eaux et des boues

#### I.1 Prélèvements et conditionnement des échantillons dans le cas des suivis de procédés

Les effluents liquides prélevés sur les STEP sont des prélèvements moyens sur 24 heures, proportionnels au flux moyen entrant, obtenus par des préleveurs automatiques. Les échantillons de boues sont des prélèvements moyens sur 24 heures obtenus manuellement. Enfin les prélèvements de composts sont des prélèvements moyens effectués en plusieurs points dans la longueur et la hauteur d'un andin, homogénéisés et refractionnés en plusieurs échantillons représentatifs.

Pour l'analyse chimique, les échantillons liquides sont additionnés de formaldéhyde (37%) à raison de 1% (v/v) et conservés à -20°C. Pour les analyses biologiques, les échantillons sont uniquement congelés sans ajout de formaldéhyde. Les échantillons de boues sont centrifugés à 16800 g, à 4°C pendant 30 min puis le culot est lyophilisé (figure 11). Les boues déshydratées et les composts sont directement congelés et lyophilisés. Après lyophilisation, les boues sont tamisées manuellement à 2 mm ; les composts et co-déchets sont, successivement, broyés et tamisés mécaniquement jusqu'à 2 mm. Ces échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

#### I.2 Prélèvements et conditionnement d'inocula pour les cultures d'enrichissement

L'inoculum servant aux études de biodégradation a été prélevée dans un bassin à boue activée de STEP. Cet échantillon, dont la concentration en matière sèche est d'environ 3-4 g/L, est aliquoté. Les aliquots sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Cette procédure est une garantie de disposer d'inocula similaires pour toutes les expériences.

### II. Méthodes d'analyses utilisées dans le cas des suivis de procédés

#### II.1 Dosage et extraction des œstrogènes

**Bibliographie rattachée :** Céspedes *et al.* 2004 ; Labadie et Budzinski 2005 ; Farre *et al.* 2006

##### II.1.1 Cas des échantillons liquides

Comme indiqué dans la Figure 11, un volume de 1 ou 2 litres d'échantillon est filtré (0,7 µm, Wattman GFF, préalablement pyrolysés à 450°C pendant 24h) puis acidifié à un pH de 3-4 (HCl, 10%). Pour le dosage en chromatographie gazeuse, environ 60 ng de chacun des étalons internes deutérés E2-d4 et EE2-d4 sont ajoutés à l'échantillon avant extraction.

L'extraction des œstrogènes se fait en SPE (solid phase extraction) à l'aide du système Visisprep (Supelco) sur des cartouches de silice greffée (Oasis HLB, Waters) à un débit de 15 à 20 ml/min. Les cartouches sont préalablement conditionnées avec 6 ml de méthanol puis 6 ml d'eau milliQ. Après passage de l'échantillon, la cartouche est rincée avec 3 ml d'eau milliQ. Dans un premier temps, les œstrogènes sous formes conjuguées sont élués avec 5 ml d'un mélange méthanol/eau (60:40) contenant du triéthylamine (5mM). Cette fraction est récupérée dans des vials contenant les étalons internes (60 ng chacun), puis la cartouche est séchée sous flux d'azote pendant 15 minutes. Les stéroïdes sous formes libres, contenant les étalons internes initialement ajoutés aux échantillons, sont finalement élués avec deux fois 5 ml de méthanol.

La fraction d'œstrogènes conjugués subit une première hydrolyse chimique pour rompre les liaisons œstrogènes-sulfates. Après évaporation à sec de l'extrait, celui-ci est dissout dans un mélange méthanol/tétrahydrofurane (20:80) additionné de 10µl d'acide trifluoracétique et incubé à 45°C pendant 30 min. La seconde hydrolyse est enzymatique et assure la rupture des liaisons œstrogènes-glucuronates. Les œstrogènes sont transférés en milieu aqueux (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 0,2M) puis la solution obtenue est diluée dans 5ml de tampon acétate et additionnée de 30µl de β-glucuronidase. Après incubation du mélange à 55°C pendant 3 h, les œstrogènes, alors sous forme libre, sont récupérés en SPE comme décrit précédemment.

Les fractions d'œstrogènes libres et d'œstrogènes conjugués hydrolysés sont ensuite purifiées. Pour cela, après évaporation, les extraits sont remis en suspension dans un mélange méthanol/éthyle acétate (20:80) puis filtrés sur une cartouche de silice greffée LC-NH<sub>2</sub> (Supelco). Celle-ci est préalablement conditionnée avec deux fois 2 ml de éthyl acétate et deux fois 2 ml d'un mélange éthyle acétate/méthanol (80:20). Après passage de l'échantillon, la cartouche est rincée avec 2 ml du mélange éthyle acétate/ méthanol (80:20).

Les extraits purifiés sont évaporés à sec, remis en suspension dans 30µl de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, puis conservés à -20°C jusqu'à leur analyse en chromatographie gazeuse. Pour les échantillons destinés aux bio-tests, les extraits purifiés sont évaporés à sec, remis en suspension dans un volume connu de méthanol et également conservés à -20°C jusqu'à leur envoi au laboratoire de l'Inserm pour analyse.

Parallèlement aux échantillons, des témoins négatifs et positifs sont analysés pour chaque série d'extraction SPE. Ces témoins sont réalisés en passant sur la cartouche un volume connu d'eau milliQ additionnée, dans le cas des témoins positifs, de 120 ng de chacune des molécules cibles et 60 ng d'étalons internes, pour les témoins négatifs, seulement des étalons internes.

### II.1.2 Cas des échantillons solides

L'extraction des échantillons solides est réalisée à l'ASE (Dionex ASE 200). Une masse de 1 g de matrice lyophilisée est mélangée à du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans des cellules d'extraction en acier de

11 mL (Figure 11). Dans le cas de l'analyse en GC-MS, une masse précise d'étalons internes deutérés (60 ng) est ajoutée directement dans la cellule avant extraction. L'extraction est pratiquée à 75 °C et 105 bars avec un mélange acétone/méthanol (50:50). Pour chaque cellule, deux cycles d'extraction sont effectués successivement. Chacun de ces cycles est constitué d'une étape de chauffage de 5 min, suivi de deux phases d'extraction statiques de 5 min chacune et enfin, d'une purge à l'azote. Le volume d'extraction final est de 20 mL. Pour les bio-tests, les extraits sont évaporés à sec et dissous dans un volume connu de méthanol. Dans le cas de l'analyse chimique, les extraits sont évaporés jusqu'à un volume de 2 mL puis dissous dans de l'eau MilliQ à raison de 1%. Les solutions aqueuses obtenues sont ensuite traitées comme des échantillons liquides, selon la procédure décrite précédemment, afin de purifier les œstrogènes extraits. Toutefois, seuls les œstrogènes sous formes libres sont pris en compte dans l'analyse des matrices solides. Dans le cas des analyses en chromatographie gazeuse, des blancs constitués de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dopés avec le mélange d'étalons internes, sont également extraits et purifiés en même temps que les échantillons.

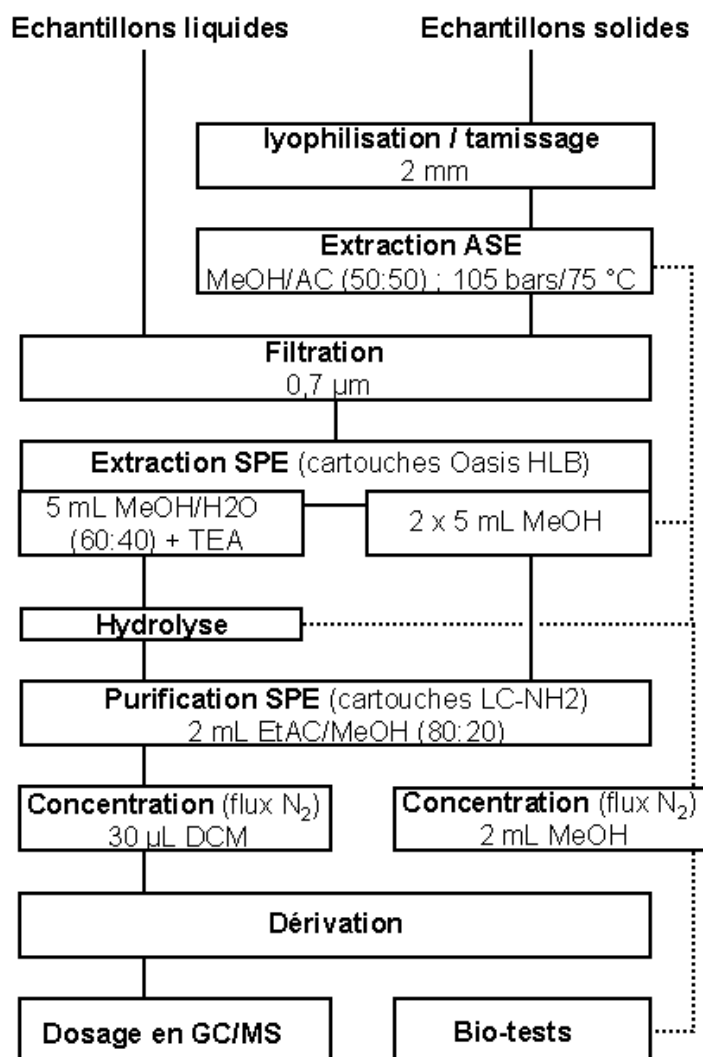


Figure 11: Protocole d'analyse des œstrogènes utilisé dans le cas des suivis de procédés ; MeOH = méthanol ; H<sub>2</sub>O = eau milliQ ; TEA = triéthylamine ; EtAC = éthyle acétate ; DCM = dichlorométhane

### II.1.3 Dosage en chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse

Le dosage des œstrogènes contenus dans les extraits se fait en chromatographie gazeuse (Perkin Elmer, Auto System XL) couplée à un spectromètre de masse (Perkin Elmer, Turbo Mass Gold). La colonne utilisée est recouverte d'une phase stationnaire composée de 5% de diphenyl et 95% de diméthyl polysiloxane (Perkin Elmer, Elite 5MS, 30m × 0,25mm, 0,25µm). Le programme de chromatographie démarre en maintenant une température de 90°C pendant 1 min, suivi d'un gradient de 7,5 °C/min, jusqu'à 290°C, puis la température est maintenue constante durant 5 min. L'injection d'un volume de 2,5 µl se fait en mode "splitless" alors que la température de l'injecteur est de 250°C. Auparavant, les œstrogènes sont dérivés (réaction de silylation) en ajoutant à l'extrait 30 µl d'une solution de dérivation diluée (1/10 dans du MSTFA ; solution mère : 250 µl de MSTFA, 10 mg de NH<sub>4</sub>I et 15 µl de mercaptoéthanol) puis en incubant le mélange à 65°C pendant 45 min. Les molécules recherchées sont E1 (rapport de la masse sur la charge, m/z : 414 et 399), E2 (m/z : 416 et 285), E3 (m/z : 504 et 386) et EE2 s(m/z : 425 et 440). Afin de quantifier les différentes molécules recherchées, des aliquots de calibration sont dérivés parallèlement aux échantillons. Ces aliquots sont obtenus en mélangeant une masse connue d'étalons internes (60 ng) et de stéroïdes cibles (100 ng). Leur analyse permet de déterminer le facteur de réponse de chaque hormone par rapport à celui de l'étalon interne correspondant. L'œstrogène deutéré E2d<sub>4</sub> (m/z : 420) est utilisé pour quantifier E1, E2 et E3. L'œstrogène deutéré EE2d<sub>4</sub> (m/z : 429) est utilisé pour quantifier EE2.

### II.1.4 Dosage des œstrogènes en chromatographie liquide-spectrométrie de masse tandem

La séparation des œstrogènes est réalisée en chromatographie liquide sur une colonne Purospher STAR-RP-18e précédée d'une pré-colonne (Merck, 4 x 4 mm, 5 µm) contenant la même phase interne que la colonne (Merck, 125 x 24 mm, 5 µm). Le gradient réalisé débute avec 10% d'acétonitrile et 90% d'eau ultra-pure HPLC pour passer à 100% d'acétonitrile en 30 minutes; le retour aux conditions initiales se faisant en 10 min. Le débit est fixé à 0,2 ml/min. Le système analytique employé est constitué d'une pompe équipée d'un passeur automatique (Waters Alliance 2690) et d'un spectromètre de masse triple quadrupole (Quattro, Micromass). Les analyses sont réalisées avec une interface electrospray en mode ion négatif et SRM (selected reaction monitoring) comme indiqué dans le Tableau 11. Les autres paramètres de la masse sont fixés comme suit : pression du nébulisateur à 3,79 bars; débit du gaz déshydratant à 13 L/min; température du gaz déshydratant à 300 °C; tension du capillaire à 3500 V et du fragmenteur à 10 V. L'azote est utilisé comme gaz nébulisant et déshydratant (99,5%). Les limites de détection sont de 2 ± 0,3 ng/g pour E1, 10 ± 2 ng/g pour E2, 6 ± 2 ng/g pour E3, and 16 ± 2 ng/g pour EE2.

**Tableau 11 : Paramètres de réglage pour l'analyse des œstrogènes en chromatographie liquide-spectrométrie de masse tandem.**

Composé	Temps (min)	Transitions SRM <sup>a</sup> (m/z) : ion précurseur → ion produit	Cone (Volt)	Collision (Volt)
E3	00,0-11,5	287 → 171	50	40
		287 → 145	50	40
E2	11,5-20,5	271 → 145	50	45
		271 → 183	50	45
EE2		295 → 145	50	40
		295 → 159	50	40
E1		269 → 145	50	40
		269 → 143	50	45

## II.2 Mesure des activités endocriniennes : Bio-tests MELN, HAhLP et HGPXR

**Bibliographie rattachée :** Balaguer *et al.* 1999 ; Pillon *et al.*, 2005; Lemaire *et al.*, 2006

Le modèle utilisé pour déterminer l'activité sur ER $\alpha$  est la lignée cellulaire MELN obtenue par transfection de cellules MCF7, provenant de tumeurs mammaires, par le gène ERE- $\beta$ Glob-Luc-SVNeo (Figure 12). Pour le récepteur AhR, le modèle utilisé est la lignée cellulaire HAhLP, obtenue par transfection de cellules HeLa par les gènes XRE-tk-Luc et pSG5-puro. Pour le récepteur PXR, la lignée cellulaire HG<sub>5</sub>LN PXR a été utilisée. Elle est issue de la transfection de cellules HG<sub>5</sub>LN (dérivées de cellules HeLa contenant le gène Gal4RE<sub>5</sub>- $\beta$ Glob) avec le gène Gal4(DBD)-hPXR(LBD). Ces gènes contiennent des éléments de réponse aux œstrogènes ou aux xénobiotiques qui contrôlent le gène codant pour la luciférase.

Des dilutions croissantes de l'extrait organique à analyser, jusqu'à 0,3 % (v/v), sont réalisées dans des milieux de culture disposés en plaques 96 puits, un jour après leur inoculation ( $5 \cdot 10^4$  cellules par puits). Les cellules sont incubées pendant 8 h, excepté pour les cellules MELN, 24 h. Les expériences sont réalisées en triplicat. Le milieu contenant l'extrait est ensuite remplacé par un milieu neuf contenant 0.3 mM de luciférine qui diffuse à l'intérieur des cellules. L'activation des récepteurs ER $\alpha$ , AhR et PXR présents dans les cellules induit la synthèse de luciférase qui transforme la luciférine en une molécule luminescente. Nous observons alors un signal luminescent stable au bout de 5 min. Ce signal, quantifié par un luminomètre (Microbeta Wallac, Perkin Elmer), est proportionnel au degré d'activation des récepteurs et donc à la concentration de perturbateurs endocriniens dans les extraits testés.

L'activation des récepteurs par les extraits d'échantillons est exprimée en pourcentage de l'activation maximum obtenue en présence du ligand de référence à concentration saturante : 10 nM de E2, 100 nM de dioxine, and 1  $\mu$ M de SR12813, pour les cellules MELN, HAhLP, et

HGPXR, respectivement. Des courbes dose-réponse sont ainsi établies pour chaque échantillon (Graph-Pad Prism, version 4.0, 2003, Graphpad Incorporated) afin de déterminer la dilution de l'extrait pour laquelle 50% de l'activation maximale est obtenu (EC50). Par comparaison à la EC50 du ligand de référence, on détermine l'activité de l'échantillon exprimé en masse de ligand de référence par masse ou volume d'échantillon extrait. Les EC50 des ligands de référence sont de 17,6 pM pour E2 (MELN), 1,6 nM pour la dioxine (HAhLP) et 0,14  $\mu$ M pour SR12813 (HGPXR).

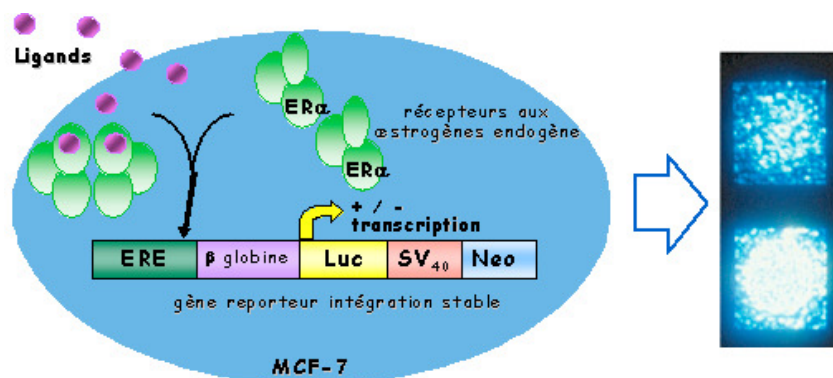


Figure 12 : Principe du modèle cellulaire MELN utilisé pour mesurer l'activité œstrogénique

### III. Méthodes d'analyses des œstrogènes radiomarqués

#### III.1 Mesure de la radioactivité totale

La radioactivité totale d'un échantillon liquide est mesurée en utilisant un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb 2100TR Packard, Perkin Elmer) après ajout de 5 mL de liquide à scintillation (UltimaGold) à 500  $\mu$ L d'échantillon, dans le cas d'extraits de boue, ou à la totalité de l'échantillon, dans le cas de piège à  $^{14}\text{CO}_2$  (3 mL de soude 2N). Pour les échantillons solides, 100 mg de matrice sèche est oxydé en  $\text{CO}_2$  avec un rendement de 98% (Oxidizer, Packard, Perkin Elmer). Le  $^{14}\text{CO}_2$  formé est piégé dans 8 mL de Carbosorb. La radioactivité du Carbosorb additionné de 12 mL de liquide à scintillation (Permafluor) est ensuite mesurée avec un compteur à scintillation liquide.

#### III.2 Dosage des œstrogènes radiomarqués

Les extraits de boues sont évaporés à sec (Rotavapor Buchi, Cloup) et solubilisés dans 1 mL de méthanol/eau (50:50, v/v). Cette solution est alors filtrée (filtres pour seringue, 0,45  $\mu$ m, Alltech) avant analyse en chromatographie liquide (HPLC, Waters). Un volume de 100  $\mu$ L est injecté sur une colonne Nova Pak C18 (250 mm  $\times$  4,6 mm i.d./guard column, 20 mm  $\times$  3,9 mm i.d., Waters) maintenue entre 18 et 22  $^{\circ}\text{C}$ . Le débit de solvant est fixé à 1 mL/min en mode gradient. Le gradient débute avec un mélange méthanol/eau (50:50) à 0 min pendant 3 min, (65:35) à 35 min, (100:0) à 40 min et (50:50) à 45 min. La détection est réalisée à 240 nm (détecteur à barrettes de diodes, DAD, Waters) et par mesure de radioactivité (Packard,

Perkin Elmer). L'estradiol radiomarqué et ses métabolites connus, comme E1, ou inconnus, sont recherchés.

#### IV. Cultures bactériennes : enrichissements et cinétiques de dégradation

Les compositions du milieu minimum, de la solution de vitamines et de la solution d'oligo-éléments utilisés sont présentées dans le Tableau 12. Le milieu minimum et la solution d'oligo-éléments sont autoclavés (120°C, 20 min) alors que la solution de vitamines est stérilisée par filtration à 0,2 µm (filtres pour seringue, Nalgene). Les oligo-éléments et les vitamines sont ajoutés au milieu minimum dans les proportions de 0,1 et 0,05% (v/v) juste avant l'inoculation à 4% (v/v). Des contrôles abiotiques sont réalisés par acidification à pH 2 (HCl, 10%, v/v). L'estradiol et l'éthinylestradiol sont ajoutés dans le milieu de culture à environ 6 et 4 mg/L, respectivement. Les solutions stocks d'hormones (conservées à -20°C) sont préparées dans l'acétonitrile à des concentrations de 5 g/L pour E2 et 2 g/L pour EE2. L'acétonitrile est donc ajouté simultanément aux hormones, à une concentration d'environ 1,5 g/L, afin de fournir une source additionnelle de carbone organique.

**Tableau 12 : Composition et proportion des différentes solutions constituant le milieu de culture.**

Solution	% v/v	Composition	Concentration		
Milieu minimum	100	NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g/L		
		NaCl	0,5 g/L		
		MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,15 g/L		
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g/L		
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,5 g/L		
		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,34 g/L		
		Oligo-éléments	0,1	Fe (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	2 g/L
				H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 mg/L
				Zn SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g/L
				Cu SO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	10 mg/L
Mn SO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 g/L				
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 g/L				
AlCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	40 mg/L				
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 g/L				
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	25 mg/L				
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	2 g/L				
Vitamines	0,05	Biotine (vit H)	2 mg/L		
		Folic acid	20 mg/L		
		Pyridoxamine (vit B6)	50 mg/L		
		Riboflavine (vit B2)	50 mg/L		
		Thiamine (vit B1)	10 mg/L		
		Cyanocobalamine (vit B12)	20 mg/L		
		Nicotinate	20 mg/L		
		P-aminobenzoic acid (PABA)	10 mg/L		
		Pantothenate	5 mg/L		

Les enrichissements sont menés en duplicat, avec un seul contrôle abiotique, en cultures discontinues aérobies, à 30°C et sous agitation (150 rpm). Les ajouts d'oestrogènes sont renouvelés après chaque dégradation complète du précédent ajout. Tous les trois ajouts, la



culture bactérienne est transférée dans un milieu neuf. Cette procédure est conduite jusqu'à l'obtention de cultures bactériennes enrichies en microorganismes dégradant E2 et EE2.

La détermination des cinétiques de dégradation est obtenue dans les mêmes conditions que précédemment. Le ratio d'inoculation varie de 1 à 4% (v/v), afin d'obtenir des quantités initiales de biomasse comparables entre les expériences. L'estrone est ajouté dans le milieu de culture à une concentration de 2 mg/L à partir d'une solution stock préparée dans l'acétone à 5 g/L. Dans ce cas, un volume suffisant d'acétonitrile est ajouté séparément pour fournir les mêmes conditions de sources de carbone que dans les cas de E2 et EE2. La détermination des cinétiques de dégradation sans source de carbone additionnelle est obtenue en dissolvant, par sonication à 40°C, les hormones en poudre directement dans le milieu minimum. Les cultures discontinues sont conduites en triplicat. Parallèlement, des contrôles abiotiques et des contrôles sans hormones mais avec acétonitrile sont réalisés, au minimum, en duplicat.

## V. Méthodes d'analyse utilisées dans le cas des cultures bactériennes

### V.1 Analyse des œstrogènes en chromatographie liquide-fluorimétrie

Un volume de 1 mL de culture est centrifugé (12000 g, 10 min) et 10 µL de surnageant sont injectés en chromatographie liquide haute performance (HPLC, Alliance 2695, Waters). La séparation est réalisée à 30°C sur une colonne en phase inverse (LiChroCART 250 mm × 4 mm/LiChrospher 100 RP-18 5µm, Merck). Le débit est fixé à 1 mL/min et le gradient d'éluion consiste en un mélange acétonitrile/eau 40:60 (v/v) à 0 min, 80:20 (v/v) à 20 min pendant 2 min et 40:60 (v/v) à 24 min pendant 6 min. Le détecteur utilisé est un fluorimètre (Multi λ FD 2475, Waters) opérant à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 220 et 315 nm, respectivement. L'intervalle de quantification est compris entre 0,1 mg/L and 10 mg/L.

### V.2 Méthodes de quantification de la biomasse

Trois méthodes de quantification de la biomasse ont été utilisées :

- Mesure de la densité optique OD à 600 nm (DU 640, Beckman) dans l'intervalle de linéarité 0 à 0,7 sur 1 mL de culture.
- Mesure de la matière sèche en suspension par filtration à 0,2 µm de 5mL de culture et déshydratation à 105°C pendant 24h.
- Mesure des protéines selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.* 1951). Les échantillons sont dilués au demi dans de l'eau distillée. La courbe étalon est réalisée entre 0 et 100 mg/L avec la sérum albumine bovine. Les résultats sont exprimés en équivalent sérum albumine bovine (Eq-SAB).

### V.3 Isolement sur milieu gélosé

Les isollements sur milieu gélosé sont obtenus en étalant 100 µL de dilutions croissantes de culture bactérienne ( $10^{-2}$  à  $10^{-9}$ , v/v) sur un milieu riche (Standard Count Agar, Merck). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 48h. Les colonies morphologiquement distinctes sont ensuite repiquées séparément, en stries, dans de nouvelles boîtes contenant du milieu frais. Cette procédure est conduite jusqu'à l'obtention de souches axéniques.

### V.4 Méthodes d'analyses moléculaires

**Bibliographie rattachée :** Stephen *et al.* 1997 ; Zumstein *et al.* 2000 ; Peu *et al.* 2006

#### V.4.1 Suivi des communautés bactériennes : PCR-SSCP

Un volume de 1 mL de culture ou d'isolat en suspension dans du milieu minimum est centrifugé (12000 g, 10 min) et le culot stocké à -20°C avec 500 µL de guanidine thiocyanate (4 M dans 0,1 M Tris-HCl) et 150 µL de N-lauroyl sarcosine (10%, v/v). L'extraction et la purification de l'ADN sont effectuées après décongélation de l'échantillon (Figure 13) en utilisant une méthode rapide en kit (QIAamp DNA Mini kit, Quiagen).

La région V3 de l'ADNr 16s est amplifiée par une PCR (Polymerase Chain Reaction) de 25 cycles (Mastercycler, egradient S, Eppendorf) à partir des amorces bactériennes W49-W104 et de l'ADN polymérase *Pfu* Turbo. Le produit PCR est ensuite analysé par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) en utilisant une électrophorèse capillaire couplée à un laser (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems-Hitachi).

#### V.4.2 Identification des espèces bactériennes : clonage-séquençage

Pour l'identification des espèces, l'ADNr 16s total (environ 1500 paires de base) est amplifié par une PCR de 25 cycles en utilisant les amorces bactériennes W18-W02 et l'ADN polymérase *redTaq* (Figure 13). En cas de rendement insuffisant pour l'amplification de la région totale, une région de 500 paires de base, contenant la région V3, est amplifiée à partir des amorces bactériennes W18-W31.

Pour les isolats, le produit PCR est directement séquencé (MilleGen Biotechnologies, Labège, France). Pour les cultures mixtes, le produit PCR est purifié (QIAquick PCR Purification kit, Quiagen) et cloné dans *E. coli* (TopoTa cloning kit for sequencing, Invitrogen). Entre 20 et 50 clones sont aléatoirement sélectionnés et leur insert est analysé en PCR-SSCP comme indiqué précédemment. Les inserts de clones qui co-migrent avec des pics du profil SSCP de la culture mixte sont séquencés. La séquence du fragment d'ADNr 16s est ensuite comparée pour identification finale, aux séquences répertoriées dans GenBank, utilisant le programme d'alignement BLAST.

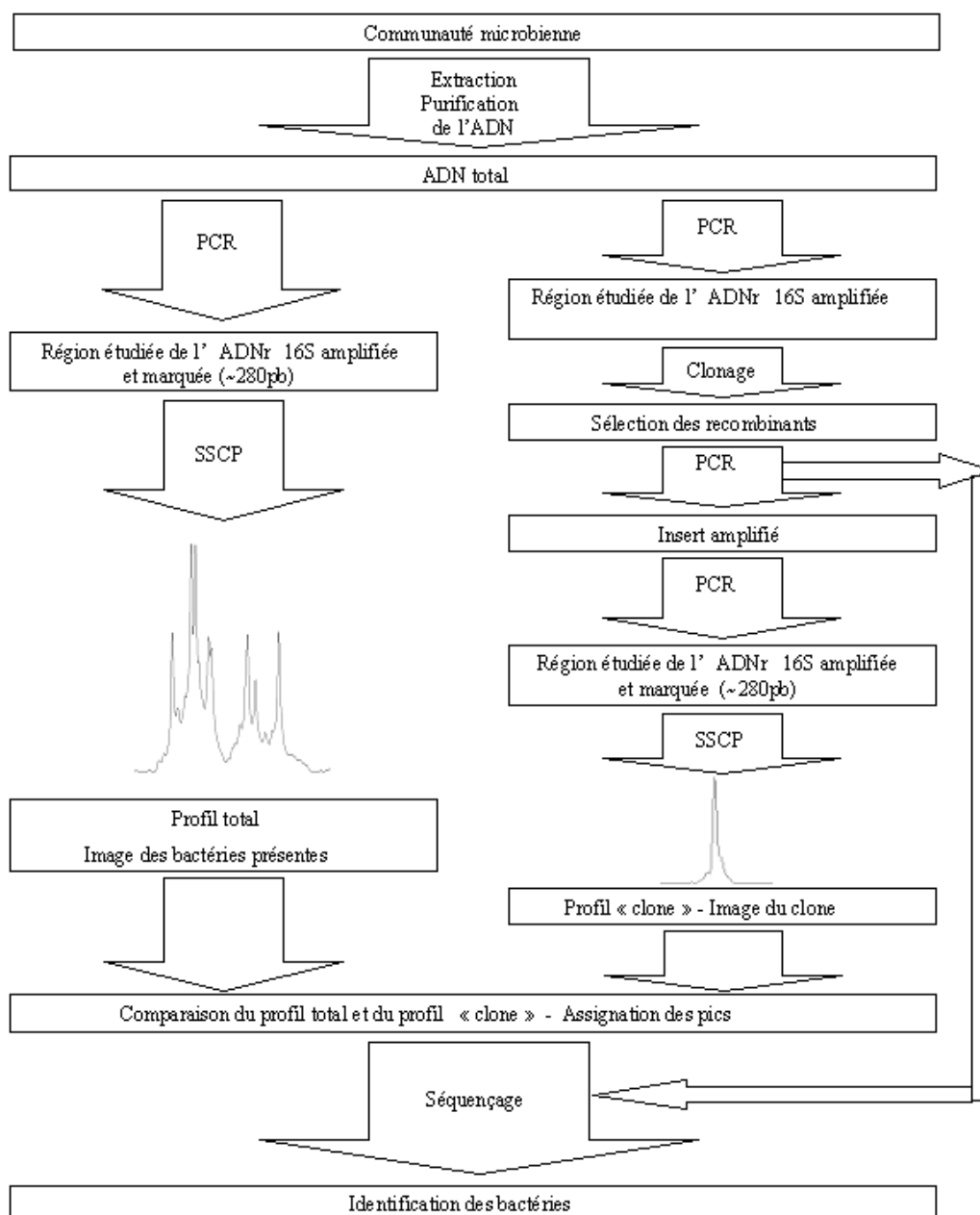


Figure 13 : Procédure analytique de caractérisation des communautés microbiennes par des méthodes de biologie moléculaire.

---

## RESULTATS ET DISCUSSION

---



## RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de mes travaux de thèse seront présentés en deux temps. Un premier chapitre sera consacré au devenir des œstrogènes au cours de l'épuration des eaux résiduaires urbaines et du traitement des boues qui en résultent. Cette partie abordera, à l'échelle industrielle, les aspects dynamiques et toxicologiques des œstrogènes au sein de matrices liquides, eaux usées, et solides, boues d'épuration. Un second chapitre se focalisera plus particulièrement sur le mécanisme de biodégradation des œstrogènes. Les aspects relatifs aux cinétiques de dégradation et à l'identification des communautés bactériennes impliquées seront alors appréhendés, à l'échelle du laboratoire, dans le cadre de cultures d'enrichissement.

### I. Devenir des œstrogènes dans les systèmes de traitement des eaux résiduaires et des boues urbaines

#### I.1 *Dynamique des œstrogènes et de l'activité œstrogénique au cours du traitement des eaux résiduaires urbaines*

*Ce premier volet de mes travaux de recherche a pour but de déterminer avec précision la dynamique des œstrogènes au sein d'une STEP récente, recevant majoritairement des effluents domestiques. Un bilan complet a donc été réalisé en prenant en compte les formes libres et conjuguées des œstrogènes, la filière eau et boue et l'activité œstrogénique. L'impact spécifique des différentes étapes du traitement ainsi que la variabilité temporelle ont également été considérés. Ces travaux ont été publiés dans **Environmental Toxicology and Chemistry** en février 2008 (Volume 27, n° 8).*

---

Les prélèvements ont été effectués sur la STEP en octobre 2004 et avril 2005 sur 3 semaines consécutives. Les eaux brutes, pré-traitées et épurées ; les boues en excès et déshydratées ; ainsi que les eaux issues de la déshydratation des boues ont été échantillonnées. L'estrone (E1), l'estradiol (E2), l'estriol (E3) et l'éthinylestradiol (EE2) ont été extraits par SPE, pour les matrices liquides et à l'ASE, suivi d'une SPE, pour les matrices solides. Ils ont ensuite été quantifiés en GC-MS. Pour les matrices liquides, la somme des formes conjuguées, sulfates et glucuronates, de chaque œstrogène a également été mesurée. Parallèlement, l'activité œstrogénique des échantillons a été évaluée sur les extraits organiques des deux types de matrices, en utilisant le bio-test *in vitro* MELN.

Il apparaît ainsi, qu'en entrée de STEP, la part des œstrogènes conjugués n'est pas négligeable puisqu'elle représente environ 50% des œstrogènes totaux. La concentration des œstrogènes totaux dans les eaux résiduaires varie de 200 à 500 ng/L avec comme œstrogènes majoritaires E1 et E3. Au niveau de l'activité œstrogénique entrante, celle-ci oscille entre 25 et 130 ngEEQ/L. Le flux entrant sur la STEP et la distribution des œstrogènes sont apparus

très peu variables d'une saison à l'autre ou d'une semaine à l'autre. Par ailleurs le modèle développé par Johnson *et al.* (2000) prédit correctement les concentrations entrantes. Les résultats obtenus sur les eaux résiduaires confirment les données retrouvées dans la littérature.

Au niveau de la dynamique observée dans la STEP, les pré-traitements et la déshydratation des boues ont peu d'impact. L'essentiel de l'abattement des œstrogènes, comme de l'activité œstrogénique, a lieu au niveau du bassin de traitement biologique. Les concentrations en sortie du clarificateur, dans les eaux traitées, sont faibles, inférieures à 10 ng/L. Les œstrogènes retrouvés dans les effluents sont surtout des formes libres et majoritairement E1, E2 et EE2. L'activité œstrogénique en sortie de STEP est inférieure à 5 ngEEQ/L. Parallèlement, E1, E2 et EE2 ont été mesurés sur la fraction solide des boues en excès, jusqu'à environ 20 ng/g de matière sèche. Toutefois, à cause d'effets d'inhibitions des extraits organiques sur la lignée cellulaire utilisée dans le test MELN, aucune activité œstrogénique n'a pu être mesurée dans les boues. La dynamique des œstrogènes ne semble pas varier temporellement aussi bien à l'échelle du mois que de l'année. Les concentrations retrouvées dans les boues sont en accord avec la littérature et celles des eaux traitées, plutôt dans la moyenne basse des valeurs rapportées par ailleurs. Dans notre cas d'étude, les œstrogènes apparaissent expliquer la majeure partie de l'activité œstrogénique détectée en entrée et sortie de STEP. En entrée de STEP, l'influence des xœstrogènes n'est cependant pas à exclure.

Les mesures opérées sur la ligne eau et boue ont permis d'effectuer un bilan de masse qui a révélé une adsorption s'élevant à 4%, maximum, du flux entrant. Les concentrations dans les effluents représentant 2 à 2,5% de la charge entrante, la biodégradation des œstrogènes apparaît être le mécanisme majoritaire avec une élimination de 93 à 97% des œstrogènes. L'efficacité de la STEP à dégrader les œstrogènes pourrait s'expliquer par son bon fonctionnement global vis à vis des polluants majeurs. De plus, la présence d'étapes de traitement biologique de l'azote et du phosphore, ainsi que des temps de séjour hydraulique et des boues élevés pourraient favoriser cette élimination.

En conclusion, cette étude a permis de réaliser un bilan complet sur une STEP en considérant toutes les formes d'œstrogènes, dans tous les compartiments, ainsi que l'activité œstrogénique associée. Peu d'études ont effectué ces mesures sur un seul site. Les résultats enrichissent les informations disponibles dans la littérature concernant les œstrogènes conjugués, la fraction adsorbée, l'impact spécifique de chacune des étapes du traitement et la variabilité temporelle, qui restaient peu étudiés. Ils confirment d'autres résultats obtenus précédemment sur le rôle des œstrogènes dans l'activité œstrogénique et l'importance du mécanisme de biodégradation. Malgré l'efficacité de la STEP, pouvant s'expliquer par les conditions opératoires appliquées, les effluents et les boues contiennent des teneurs en œstrogènes non négligeables sur le plan toxicologique. Ceci souligne l'importance d'approfondir nos connaissances sur la biodégradation des œstrogènes par les boues activées et leur devenir au cours du traitement des boues d'épuration produites.

## CHEMICAL AND BIOLOGICAL ANALYSIS OF ENDOCRINE DISRUPTING HORMONES AND ESTROGENIC ACTIVITY IN AN ADVANCED SEWAGE TREATMENT PLANT

Mathieu Muller<sup>†</sup>, Fanja Rabenoelina<sup>‡</sup>, Patrick Balaguer<sup>‡</sup>, Dominique Patureau<sup>†</sup>, Karin Lemenach<sup>§</sup>, Hélène Budzinski<sup>§</sup>, Damia Barcelo<sup>||</sup>, Miren Lopez de Alda<sup>||</sup>, Marina Kuster<sup>||</sup>, Jean-Philippe Delgenès<sup>†</sup> and Guillermina Hernandez-Raquet<sup>†</sup>

<sup>†</sup> *Institut National de la Recherche Agronomique, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France*

<sup>‡</sup> *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U824, Signalisation Hormonale, Environnement et Cancer, Centre de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Parc Euromédecine – Centre Regional de Lutte contre le Cancer (CRLC) Val d'Aurelle, Montpellier, F-34298, France*

<sup>§</sup> *Unité Mixte de Recherche (UMR) 5255 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Laboratoire de Physico-Toxico-Chimie de Systèmes Naturels, Institut des Sciences Moléculaires, Université Bordeaux I, 351 Cours de la Liberation, Talence, F-33405, France*

<sup>||</sup> *Department of Environmental Chemistry, Institute of Chemical and Environmental Research of Barcelona (IIQAB)- Superior Council of Scientific Research (CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, Spain*

\* *To whom correspondence may be addressed (hernandg@supagro.inra.fr).*

*(Received 28 September 2007; accepted 5 February 2008)*

---

**Abstract.** The steroid hormones estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2), and their conjugated forms were surveyed throughout an advanced sewage treatment plant (STP). The estrogens concentrations in water and sludge samples, collected in October 2004 and April 2005, were determined by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. Simultaneously, the estrogenic activity was quantified using estrogen-responsive reporter cell lines (MELN) to investigate the behavior of overall estrogenic compounds. The estrogen concentrations in the inlet ranged from 200 to 500 ng/L with the contribution of conjugated forms higher than 50%. The major estrogens in influent were E1 and E3. The estrogenic activity was between 25 and 130 ng/L 17 $\beta$ -estradiol equivalents (EEQ). Estrogen concentrations and estrogenicity measured in the inlet and in primary treated sewage were similar showing a weak impact of primary treatment on hormones removal. In contrast, both estrogen concentration and estrogenicity decreased during biological treatment with high removal efficiencies (>90%). Estrone, E2, and EE2 persisted in the treated water below 10 ng/L while the estrogenicity was lower than 5 ng/L EEQ. Estrogen mass flux in the effluent and sludge represented, respectively, less than 2 and 4% of the inlet. Consequently, the fraction of estrogens sorbed into the sludge was very small and biodegradation was the main vehicle for estrogen elimination. This dual approach, comparing chemical and biological analysis, allowed us to confirm that most of the estrogenic activity occurring in this STP, receiving mainly domestic sewage, was due to sex hormones.

**Keywords.** Estrogens, Estrogenic activity, Wastewater, Biodegradation, Sludge sorption.



## INTRODUCTION

A broad range of natural and man-made chemicals enters the environment through sewage treatment plants (STPs). Some of these compounds can interfere with the endocrine system of humans and wildlife, altering reproduction and development functions [1]. The presence of such endocrine disrupter compounds (EDC) in natural ecosystems has been linked to abnormalities observed in wildlife, including vitellogenin production in male fish and the development of oocytes in testes [2, 3].

Ethoxylated alkylphenols and their associated nonylphenol metabolite, as well as natural and synthetic hormones, have been identified as the major contributors to the estrogenic activity in sewage [4]. The release of ethoxylated alkylphenols into the environment has been reduced by restricting its marketing and use in manufactured products [5]. However, such strategy cannot be applied to estrogens excreted by humans and animals. Consequently, the study of wastewater treatment processes for the efficient removal of these chemicals and, thus, their estrogenic activity before discharging into the environment is of particular concern.

In the last two decades, a number of studies have reported the presence of natural and synthetic estrogens and estrogenic activity in STPs. Thus, steroid concentrations in the raw sewage from various German and Catalonian plants ranged from <2.5 to 115 ng/L for estrone (E1), <5.0 to 30 ng/L for 17- $\beta$ -estradiol (E2), and <5.0 to 10 ng/L for 17- $\alpha$ -ethynilestradiol (EE2); estriol (E3) varied from <0.25 to 70 ng/L in Spain whereas it was never detected in the German study [6-8]. In effluents, estrogen concentrations ranged from the limit of detection (LOD) up to 82, 64, 21.5, and 12 ng/L for E1, E2, E3, and EE2, respectively [7-9]. Hence, the STPs removal efficiencies estimated were between 49 and 99% for E1; higher removal rates were reported for E2 (80 to  $\geq$  98%), E3 (95 to 100%), and EE2 (69 to  $\geq$  94%) [8, 10, 11]. Elsewhere, the use of recombinant receptor-reporter gene assays have shown that estrogenicity in the raw sewage can reach 150 to 185 ng/L 17 $\beta$ -estradiol equivalents (EEQ) and it was below 15 ng/L EEQ in effluents [12-14]. Most of these estrogenicity measurements were performed by the yeast estrogen screen test (YES) or the E-screen test. The test based on the estrogen-responsive reporter Mcf-7EreLucNeo cell lines (MELN) [15] was less frequently used despite its higher sensitivity, with an effective concentration (EC<sub>50</sub>) for E2 approximately of 15 pM compared to 25 to 30 pM for the E-screen test [16] and 50 to 250 pM for the YES test [12, 14]. Moreover, analytical methods used by most researchers do not account for the conjugated form of estrogens. Natural steroids are mainly eliminated in urine and feces as inactive glucuronides or sulphated conjugates. The conjugate steroids could later be transformed into free forms (un-conjugated) by bacterial populations present in sewage, capable of producing  $\beta$ -glucuronidase and aryl-sulfatase enzymes [17, 18]. D'Ascenzo et al. showed that, respectively, 40, 43, and 31% of the amount of E1, E2, and E3 in influents of Italian STPs consisted of conjugated estrogens [18]. Thus, conjugated forms may contribute significantly to the estrogen concentrations measured in wastewater.

In addition, few studies have dealt with the measurement of estrogens in sludge. Only two papers reported concentrations in sludge up to 40 ng/g dry weight [6, 19]. Other studies, based on the sorption coefficient ( $K_d$ ), estimated that estrogen sorption in sewage sludge varies from 2 to 10% depending on the suspended solids concentration [20, 21]. Therefore, estrogen measurement in sludge is necessary to determine the role of both sorption and biodegradation in estrogen removal during sewage treatment.

In France, data on the elimination of hormones and estrogenic activity from sewage in STP systems are still lacking. In Paris, Cargouët et al. [22] reported low levels of free estrogens in influents and effluents of four different STPs. However, the estrogen removal performances recorded, in the range of 50%, were low compared to similar European studies. The lack of data in this field in France is surprising while, at the same time, there is a trend to modernizing current STPs in the country. Thus, the study of the ability of an advanced STP to remove micropollutants such as EDC, is clearly relevant to assess the impact on surface water quality of this current trend to upgrading facilities.

The objectives of the present study were, firstly, to accurately determine the fate of conjugated and free estrogens through an advanced STP; and secondly, to link the chemical analysis to the biological response as measured by MELN in-vitro bioassay. For this purpose, estrogen concentrations and estrogenicity were determined in both wastewater and sludge samples through the sewage treatment process.

## MATERIALS AND METHODS

### *Chemicals*

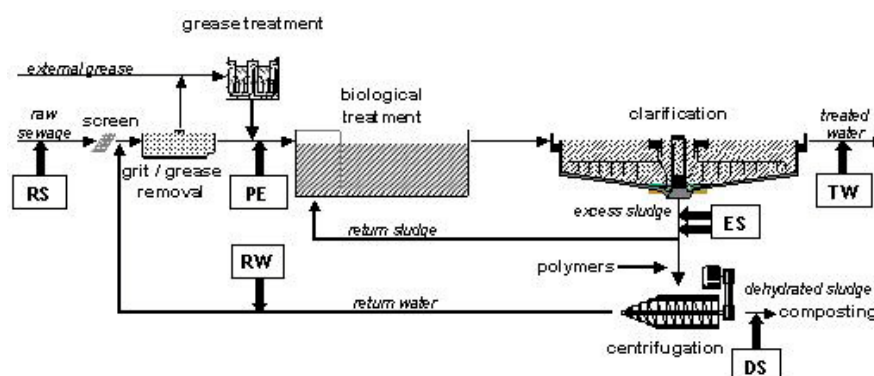
Steroids E1, E2, E3, and EE2 were supplied by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity >98%). Deuterated estrogens 17- $\beta$ -estradiol- $d_4$  (E2- $d_4$ ) and 17- $\alpha$ -ethynilestradiol- $d_4$  (EE2- $d_4$ ) (isotopic purity >99%), used as internal standards, were purchased from Cluzeau Info Labo (Ste Foy-la-Grande, France). All organic solvents were high-performance liquid chromatography grade and were obtained from Atlantic Labo (Floirac, France). Hydrochloric acid (37%, reagent grade), used for sample acidification, and triethylamine (purity >99%) used in solid-phase extraction (SPE), were supplied by Sigma-Aldrich. The silylation agent *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (purity >97%) was used for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of the steroids, in combination with mercaptoethanol and ammonium iodide (both from Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France).  $\beta$ -glucuronidase from *Helix pomatia* (HP-2, 123,000 U/ml), tetrahydrofurane (purity >99%), trifluoroacetic acid (reagent grade, purity >99%), used to deconjugate the conjugated steroids, as well as sodium acetate (purity >98%) and acetic acid (purity >99%), used to prepare acetate buffer, were purchased from Sigma-Aldrich. Deionized water was obtained with a Milli-Q<sup>®</sup> system (Millipore, Molsheim, France). For the liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry analyses, pesticide-grade solvents methanol

and acetonitrile and LC-grade water used were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

### Sampling site

The studied STP, located in Languedoc-Rusillon southern France, has a capacity of 120,000 equivalent people and treats wastewater from mainly domestic sources. The flow sheet of the STP is shown in Figure 1. The STP uses an activated sludge process including anaerobic, anoxic and aerobic periods to ensure biological removal of phosphate, nitrogen and carbon. Primary effluent was divided into two similar treatment lines; only the second line was studied. The STP was operated with a hydraulic retention time (HRT) ranging from 3 to 5 d and a solid retention time of approximately 20 d. The STP showed high efficiency in removing major pollutants when measured according to European standards: Total suspended solids (>99%), chemical oxygen demand (>95%), biological oxygen demand (>99%), total Kjeldahl nitrogen (>96%), total nitrogen (>94%) and total phosphorous (>96%). Inflow and outflow were, respectively, 3752 and 4038 m<sup>3</sup>/d in October 2004 and 4386 and 4672 m<sup>3</sup>/d in April 2005. Sludge production was 2210 and 2220 kg/d in October and April, respectively.

**Figure 1. Flow sheet of the sewage treatment plant including the sampling points: Raw sewage (RS), primary effluent (PE), excess sludge (ES), treated water (TW), dehydrated sludge (DS) and returned water (RW).**



### Samples collection

Twenty-four hour wastewater composite samples were collected in autumn (October 2004) and spring (April 2005) using flow proportional samplers. Sampling was carried out at different stages of the treatment process (Fig. 1): raw sewage (RS), primary effluent (PE), excess sludge (ES), treated water (TW) and return water (RW) from centrifuges. For each period, triplicate samples were taken at three times during consecutive weeks, taking into account the HRT between influent (RS, PE) and effluent (ES, RW, TW). Simultaneously, 24 h-averaged samples of dehydrated sludge were manually collected. Excess sludge was centrifuged (16800 g, 4°C, 30 min; Beckman Coulter Avanti J25, Palo Alto, CA, USA) to separate the liquid and solid phases. Formaldehyde was added to samples destined for chemical analysis (1%, v/v) to prevent bacterial degradation. All samples were stored at 4°C and analyzed in 24 h, or immediately frozen at -20°C until further processing. Samples were analyzed for E1, E2, E3, EE2, their respective conjugated forms and their estrogenic activity. A total of 63 samples were analyzed for each period.

### Extraction methods

Free and conjugated estrogens in wastewater samples were quantified according to the procedures reported by Labadie and Budzinski [23]. All samples were extracted and analyzed in triplicate. Briefly, samples were acidified to pH 3 to 5 with hydrochloric acid (10%) and filtered on Whatman GF-F glass fibre filters (pore size 0.7  $\mu\text{m}$ , VWR, Strasbourg, France). Analytes were extracted by SPE from 1000 ml (RS, PE) or 2000 ml (ES, TW, RW) of liquid samples using 200 mg Oasis HLB cartridges (Waters, St Quentin en Yvelines, France). Conjugated estrogens were eluted with 5mM triethylamine in methanol:H<sub>2</sub>O (60:40); then, free estrogens were eluted with methanol. The fraction containing conjugated estrogens subjected to solvolysis and enzymatic hydrolysis. Conjugated estrogens, once hydrolysed, were extracted in SPE as free compounds. Finally, free and conjugated extracts were cleaned through 500 mg LC-NH<sub>2</sub> cartridges (Supelco, St Quentin Fallavier, France). For GC-MS analysis, samples were spiked with 60 ng of E2-*d*<sub>4</sub> and EE2-*d*<sub>4</sub> as internal standards before SPE. Purified extracts were dried under a gentle stream of nitrogen (Instruments 5.0, Linde Gas, Toulouse, France) and dissolved in 30  $\mu\text{l}$  of dichloromethane for GC-MS analysis. For estrogenic activity determination, samples were extracted as before, without addition of internal standards, and dissolved in 2 ml of methanol.

Estrogens from sludge samples were extracted using the method described by Cespedes et al. for sediment [24]. Sludge samples were freeze-dried and sieved at 2 mm. Aliquots of 1 g were then mixed with sodium sulphate and extracted with an accelerated solvent extractor (ASE 200, Dionex, Voisin-le-Bretonnaux, France). For chemical analysis, samples were spiked with 60 ng of E2-*d*<sub>4</sub> and EE2-*d*<sub>4</sub> before extraction. For MELN in vitro assay, sludge extracts were dried under a gentle stream of nitrogen and dissolved in 2 ml of methanol. For chemical analysis, sludge extracts were concentrated to 2 ml and dissolved in 200 ml of Milli-Q water. This aqueous solution was then extracted and purified as liquid samples. All extractions were performed in triplicate.

#### *GC-MS analysis*

Derivatized estrogens were separated on a GC auto system XL (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Injection of 2.5  $\mu\text{l}$  of samples was performed in splitless mode at 250°C with helium as the carrier gas. The column was an Elite 5MS, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness (PerkinElmer). The GC temperature program was set as: 90°C (1 min), 7.5°C/min to 290°C, 290°C isotherm (10 min). A turbo mass gold (PerkinElmer) mass spectrometer with electron impact mode (70eV) was used to detect steroids hormones. The source temperature was set at 230°C. Data acquisition was carried out in selected ion recording mode. The estrogens were identified using two ions as described in Table 1. The response factor was determined for each analyte by analyzing samples containing known quantities of native (120 ng) and deuterated (60 ng) estrogens. Such calibration mixtures were injected every three samples. The linearity of the response was checked over analyte concentrations ranging from 1 to 300 ng; the correlation factor ( $r^2$ ) for each estrogen was higher than 0.995, with a relative

standard deviation below 12%. Percent of recoveries, as determined in 1 L MilliQ water and 1 g of sludge samples spiked with 60 ng of internal standards and 100 ng of each estrogen prior to extraction, are shown in Table 2. The LOD of steroids, defined as three times the background noise, in spiked MilliQ water and in environmental samples are shown in Table 2. The limit of quantification, defined as ten times the background noise, showed a high variability in function of the matrices and compounds and had to be determined for each experiment.

**Table 1. Ions used for identification and quantification of estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3), and ethynilestradiol (EE2) by gas chromatography mass spectrometry. Deuterated estradiol (E2-*d*<sub>4</sub>) and ethynilestradiol (EE2-*d*<sub>4</sub>) were used as internal standards.**

Steroid	Internal standard	Identification and quantification ion (m/z) <sup>a</sup>	Confirmation ion (m/z) <sup>a</sup>
E1	E2- <i>d</i> <sub>4</sub>	414	399
E2	E2- <i>d</i> <sub>4</sub>	416	285
E3	E2- <i>d</i> <sub>4</sub>	425	386
EE2	EE2- <i>d</i> <sub>4</sub>	425	440

<sup>a</sup> Mass to charge ratio.

**Table 2. Percentage of recoveries (mean value ± standard deviation ; *n*=9) obtained from analysis of spiked matrices with estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3), and ethynilestradiol (EE2) and limits of detection (LOD) obtained for each analyte in the different matrices analysed by gas chromatography mass spectrometry.**

Steroid	Recovery (%)		LOD (ng/L)			
	MilliQ water <sup>a</sup>	Sludge	MilliQ water <sup>a</sup>	Raw sewage	Effluent	Sludge <sup>b</sup>
E1	108 ± 2	91 ± 3	0.11 ± 0.05	10-20	0.2-5	1-2
E2	99 ± 5	101 ± 10	0.11 ± 0.05	1-20	0.2-3	1-2
E3	96 ± 6	132 ± 14	0.11 ± 0.02	1-5	0.5-1	~1
EE2	97 ± 3	101 ± 2	0.17 ± 0.08	1-5	1-2	1-3

<sup>a</sup> Milli-Q<sup>®</sup> system, Millipore, Molsheim, France.

<sup>b</sup> In ng/g dry weight.

### LC tandem MS analysis

Estrogens analysis in the sludge extracts was performed according to the procedure reported by Farre et al. [25]. Estrogens separation was achieved on a Purospher STAR-RP-18e column (125 x 24 mm, 5 µm) preceded by a guard column (4 x 4 mm, 5 µm) of the same packing material (Merck). Gradient elution was performed as follows: from 10% acetonitrile and 90% high-performance liquid chromatography water to 100% acetonitrile in 30 min and back to the initial conditions in 10 min. Flow rate was set at 0.2 ml/min. A system consisting of a Waters alliance 2690 LC pump equipped with an autosampler (Waters, Milford, MA, USA) and a Quattro LC triple-quadrupole mass spectrometer from Micromass (Manchester, UK) was employed. The analyses were performed with a dual Z-spray electrospray interface operating in the negative ion mode under the time-scheduled selected reaction monitoring conditions shown in Table 3. Other optimised MS conditions were as follows: nebulizer

pressure, 3,79 bar; drying gas flow, 13 L/min; drying gas temperature, 300 °C; capillary voltage, 3500 V; and fragmentor, 110 V. Nitrogen was used as nebulizing and drying gas (99.5% purity; gas generator N<sub>2</sub>FLO, Claind, Lenno, Italy). The suitability of the deuterated compounds as surrogate standards for internal standard quantification and effective compensation of potential matrix ionization (suppression or enhancement) effects was verified through the analysis of randomly selected sludge samples spiked with the analytes at 20 ng/g. The LOD was 2 ± 0.3 ng/g for E1, 10 ± 2 ng/g for E2, 6 ± 2 ng/g for E3, and 16 ± 2 ng/g for EE2.

**Table 3. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method parameters for the analysis of estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3), and ethynilestradiol (EE2).**

Compound	Time (min)	SRM <sup>a</sup> transitions (m/z) : Precursor ion → Product ion	Cone (V) <sup>b</sup>	Collision (V) <sup>b</sup>
E3	00.0-11.5	287 → 171	50	40
		287 → 145	50	40
E2	11.5-20.5	271 → 145	50	45
		271 → 183	50	45
EE2		295 → 145	50	40
		295 → 159	50	40
E1		269 → 145	50	40
		269 → 143	50	45

<sup>a</sup> Selected reaction monitoring; mass to charge ratio (m/z).

<sup>b</sup> Cone and collision voltages are expressed in volts (V).

#### *Estrogenic activity*

Estrogenic activity was determined using the recombinant receptor-reporter gene in vitro assay MELN as described previously [15]. Briefly, MELN cell lines were obtained from breast cancer MCF-7 cells by stable transfection with the estrogen responsive plasmid (ERE-βGlob-Luc-SVNeo). Endogenous estrogen receptor α (ERα) was originally expressed in the MCF-7 cells. Thereby, MELN cells were able to quantify EDCs that bind and activate ERα. This activation induced the synthesis of luciferase, which produced luminescent molecules from luciferin. This luminescence, measured by a Microbeta Wallac luminometer (PerkinElmer) was proportional to the concentration of EDC in the cell culture medium. In our experiments, dilutions of the sample extracts, ranging from 1 x 10<sup>-4</sup> to 0.3%, were added to the culture medium. Dose-response curves were established in quadruplicate to determine the dilution inducing 50% of the maximum transactivation obtained with E2 (EC50). Estrogenicity of the sample was compared to the EC50 value of E2 (14 pM), and expressed as ng/L E2 equivalent (EEQ).

#### *Statistical analysis of data*

The data were compared using a bilateral *t* test with a level of *p* <0.05 (XLstat software, <http://www.xlstat.com/fr/home/>). Correlation analysis of the data was carried out with

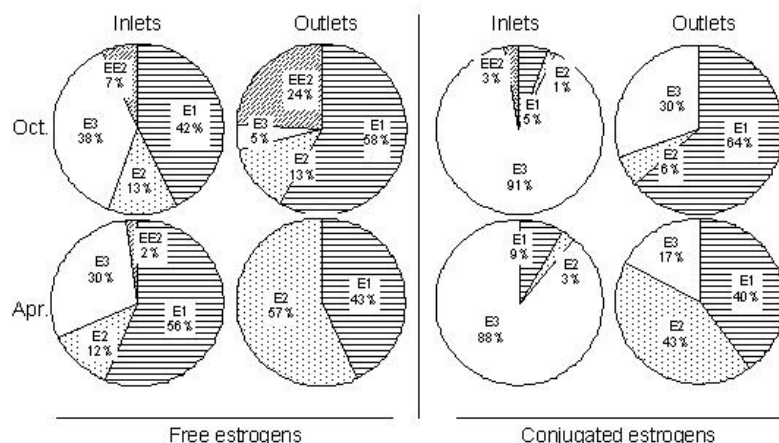
Microsoft Excel<sup>®</sup> 97 (Redmond, WA, USA) statistical tools ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Estrogens in the raw sewage

Chemical analysis of estrogens showed that E1 and E3 were the main free steroids found in raw sewage in both sampling periods (Table 4 and Fig. 2). Concentrations of E1 in raw sewage ranged from 6 to 119 ng/L, E3 was detected between 19 and 111 ng/L and E2 varied between 13 and 28 ng/L. Synthetic estrogen EE2 was detected at concentrations ranging from LOD to 20 ng/L. These values are of the same order of magnitude as those reported in other studies and compiled by de Mes et al. [26]. Our results also showed that the profiles of free estrogens were similar in the two sampling periods. Moreover, the total concentrations of free steroids in autumn 2004 and spring 2005 were not statistically different ( $n = 16$ ) (Table 5). These results agree with the findings of Baronti et al. [8] when investigating the seasonal variations of estrogen inputs for six Roman STPs. Their results suggest that over five months, from October to March, changes in estrogen profiles and total estrogen concentrations were very limited. Total estrogen concentrations were stable over the sampling period except in March where higher concentrations were found, mostly due to higher E1 levels.

**Figure 2. Distribution of free and conjugated estrogens estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3), and ethinylestradiol (EE2) in both periods at the inlet and outlet of the sewage treatment plant. Average values of the three sampling weeks, expressed in percent of the total amount of free or conjugated estrogens.**



**Table 5. Average daily mass influx, outflux and their corresponding removal rates of estrogens and estrogenic activities, expressed as estradiol equivalents (EEQ), in the sewage treatment plant at both periods. Standard deviations are expressed in parentheses. Ranges are done for removal rates.**

		Total estrogens (mg/d)	Estrogens daily mass (mg/d)		Estrogenic activity (mg/d EEQ)	
			Free form	Conjugated form	Estimated	Measured
Influx	October	1573 (147)	717 (279)	857 (229)	258 (85)	409 (84)
	April	1319 (323)	648 (91)	701 (234)	123 (23)	153 (13)
Outflux	October	34 (2)	24 (3)	8 (3)	16 (10)	5 (0)
	April	33 (6)	24 (6)	9 (2)	14 (1)	7 (10)
Removal % <sup>a</sup>	October	98	97	99-100	87-97	98-99
	April	97-98	95-97	98-99	87-90	87-96

<sup>a</sup> Removal rates were calculated as the percentage of the difference between total mass (or estrogenic activity) entering and leaving in the system divided by the mass (or estrogenic activity) entering in the system.

Table 4. Average concentrations of estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3), and ethynilestradiol (EE2) in their free and conjugated (conj.) forms. Concentrations of measured in the liquid fractions of raw sewage (RS), primary effluent (PE), excess sludge (ES), return water (RW), treated water (TW) and in the solid fractions of excess sludge (ES) and dehydrated sludge (DS) at both periods. Minimum and maximum values are expressed in parentheses.

Liquid (ng/L)	E1		E2		E3		EE2		
	Free	Conj.	Free	Conj.	Free	Conj.	Free	Conj.	
RS	October	81 (6-119)	12 (ND <sup>a</sup> -18)	25 (23-28)	3 (3-4)	72 (19-111)	212 (140-253)	13 (5-20)	7 (ND <sup>a</sup> -11)
	April	80 (52-97)	13 (8-20)	17 (13-25)	4 (4-5)	43 (35-54)	142 (101-195)	2 (ND <sup>a</sup> -2)	ND <sup>a</sup>
PE	October	64 (39-92)	6 (ND <sup>a</sup> -13)	20 (13-24)	2 (ND <sup>a</sup> -4)	69 (42-100)	247 (113-372)	12 (11-38)	3 (ND <sup>a</sup> -4)
	April	69 (47-89)	13 (7-17)	17 (14-19)	3 (2-3)	40 (28-48)	133 (83-178)	2 (2)	ND <sup>a</sup>
ES	October	10 (4-14)	< 1	1 (ND <sup>a</sup> -2)	< 1	1 (ND <sup>a</sup> -3)	< 1	6 (ND <sup>a</sup> -9)	3 (ND <sup>a</sup> -6)
	April	6 (4-8)	< 1	4 (4-5)	1 (0.5)	< 1	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
RW	October	5 (1-10)	1 (0.8-1.3)	< 1	ND <sup>a</sup>	1 (1-2)	< 1	1 (1)	1 (1)
	April	5 (4-6)	< 1	3 (3-4)	< 1	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1 (1)	ND <sup>a</sup>
TW	October	5 (8-2)	< 1	1 (ND <sup>a</sup> -2)	< 1	< 1	< 1	2 (2)	1 (1)
	April	2 (1-3)	< 1	3 (2-3)	< 1	ND <sup>a</sup>	< 1	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
<b>Solid (ng/g dw)</b>		<b>Free</b>		<b>Free</b>		<b>Free</b>		<b>Free</b>	
ES	October	4 (3-7.5)		3 (1.5-5)		ND <sup>a</sup>		2 (1-5)	
	April	6 (4-8)		3 (1-4.5)		ND <sup>a</sup>		9 (2-18)	
DS	October	4 (2-4.5)		2 (1-4)		ND <sup>a</sup>		6 (1-9)	
	April	6 (4-8)		5 (3-10)		ND <sup>a</sup>		10 (4-16)	

<sup>a</sup>ND means below the limit of detection.



Conjugated estrogens detected in the raw sewage represented approximately 50% of the total incoming amount of estrogens in both campaigns (Table 5). The conjugated fraction was mainly constituted by E3, which contributed to approximately 90% of the total incoming amount of conjugated estrogens (Fig. 2). Concentration of conjugated E3 ranged from 101 to 253 ng/L (Table 4), corresponding to approximately 75% of its total incoming amount. The conjugated forms of E1 and E2 were also frequently detected but at levels below 20 ng/L, representing, from 6 to 17% and from 10 to 25% of the incoming amount of E1 and E2 respectively. Conjugated EE2 was detected only in two weeks during the autumn campaign (<11 ng/L), representing 34 and 44% of the total incoming amount. Previous studies reported higher proportions of conjugated forms of E1 and E2 in raw sewage with values, respectively, of 40 to 58% and 43 to 50% [18, 27]. On the contrary, lower proportions of conjugated E3 and EE2 were detected in influents of German and Italian treatment facilities, with ratios of 31% for E3 and 26% for EE2. D'Ascenzo et al. [18] estimated for six activated sludge STPs that conjugated estrogens contributed to approximately 36% of the total incoming amount of estrogens. This value is lower compared to our results (~50%). Nevertheless, in their study, they found high variability between STP influents (standard deviation, SD, ranging from 70 to 120%). This variability could be the result of different hydrolysis rates of the conjugated steroids in the sewer system. Other parameters such as the length of the sewer network, the sewage flow inside the pipes and the ambient temperatures may also have played a role in the hydrolysis rates. The high concentrations of conjugated estrogens measured in the present study highlight the importance of determining this form of estrogen since its hydrolysis into biologically more active free forms may induce an increase in sewage estrogenic activity.

Our present study showed that while the free estrogen concentrations were similar in the two sampling periods, conjugated estrogens levels varied, leading to higher total estrogen concentrations in autumn 2004 (mean of 425 ng/L,  $n = 7$ ) than in spring 2005 (mean of 301 ng/L,  $n = 9$ ). A dilution of estrogens may partially explain this temporal variation since mean inflow in autumn 2004 (3752 m<sup>3</sup>/d) was lower than in spring 2005 (4386 m<sup>3</sup>/d). Thus, daily mass flows of total and conjugated estrogens were not statistically different in both periods (Table 5).

The total incoming concentrations of E1, E2, E3, and EE2 (both free and conjugated forms) found in our present study were compared to the values estimated using the model proposed by Johnson et al. [28]. As indicated by Johnson, to obtain greater accuracy, demographic and contraception practices data relating to the local population were used for calculations (<http://www.ined.fr>; <http://www.insee.fr>). The estimated estrogen concentrations in the inlet were for E1, E2, E3, and EE2 of, respectively, 55, 24, 269, and 5 ng/L while the measured estrogen concentrations ranged from 91 to 131 ng/L for E1, 22 to 28 ng/L for E2, 185 to 310 ng/L for E3, and 3 to 18 ng/L for EE2. Overall, considering suitable population criteria, the Johnson model displayed correct predictions of inlet concentrations for most of

the estrogens, except for E1, which was slightly underestimated by the model.

#### *Estrogen profiles throughout STP*

The estrogen concentrations throughout treatment (Table 4 and Fig. 3) showed that primary treatment had a low impact on the levels of free estrogens: steroid levels in primary effluent were slightly lower (spring 2005) than, or not statistically different (autumn 2004) from concentrations measured in raw sewage. For conjugated estrogens, concentrations before and after primary treatment were, for both periods, not statistically different. In contrast, the aqueous fraction of excess sludge, return water, and treated water showed considerably lower steroid concentrations than the influent. In these samples, estrogen profiles for both free and conjugated forms were similar. In addition, the total concentrations of free estrogens measured in ES, RW, and TW were not significantly different, except for TW measured in spring, which showed slightly lower concentrations (statistically significant) than those of RW and ES. In the same way, the levels of total conjugated estrogens in ES, RW, and TW showed similar levels, varying from 1 to 2.5 ng/L; although some differences between samples were observed (statistically significant) the range of variation was very narrow.

Hence, the sewage after biological treatment showed greatly reduced concentrations of free and conjugated estrogens. Residual free steroids detected in treated effluents were E1, E2, and EE2 with total concentrations ranging between 3.7 and 6.5 ng/L; the remaining conjugated estrogens were E1, E2, and E3, with total concentration below 2.5 ng/L (Table 4 and Fig. 3). These values are in the lower range of estrogen concentrations reported in the literature bringing out the high estrogen removal performances of the STP studied [7-9]. No significant differences were observed between total concentrations of free and conjugated estrogens measured in TW in autumn and spring.

Analysis of estrogens in dehydrated sludge and in the solid phase of excess sludge, revealed concentrations from 3 to 8 ng/g dry weight for E1 and from 1 to 5 ng/g dry weight for E2 (Table 4). Estriol was never detected, suggesting no sorption of this steroid, in accordance with its chemical properties ( $\log K_{OW} = 2.81$ ). For EE2, higher levels were measured in April 2005 (4-16 ng/g dry wt) compared to October 2004 (1-9 ng/g dry wt). However, for this compound, higher standard deviations were observed in spring (SD = 0.35 to 8.8 ng/g dry wt) than in autumn (SD = 0.2 to 3.3 ng/g dry wt). Consequently, no clear temporal variations of estrogen concentrations and distributions in sludge were observed. Our measurements were in the same range as previous data obtained in two different activated sludge STPs [19]. The reported values were from <2 to 37 ng/g dry weight for E1, 5 to 17 ng/g dry weight for E2 and from <2 to 4 ng/g dry weight for EE2. Similarly, Andersen et al. [6] reported concentrations in excess sludge from a German STP of, respectively, 7, 1.7 and 3 ng/g dry weight of E1, E2, and EE2.

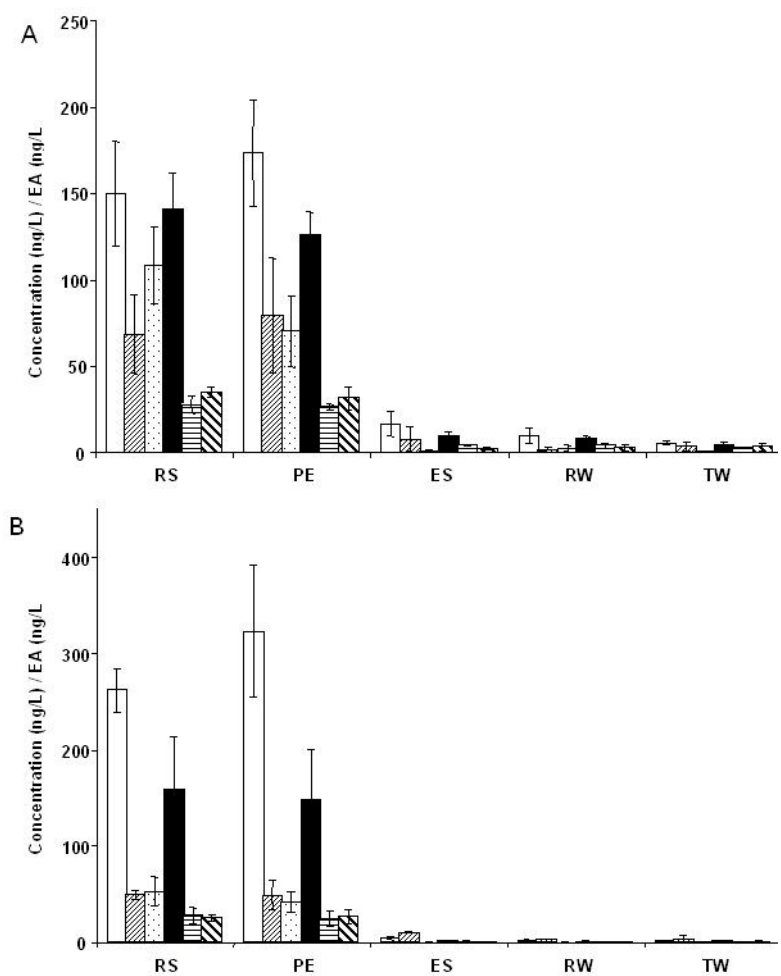
Further analysis of the excess sludge extracts taken during spring was performed by LC-tandem MS according to the procedure described by Farre et al. [25]. The obtained results

confirmed those obtained for the same samples previously analyzed by GC-MS, E1 was present in the sludge samples at concentrations between 5 and 6 ng/g dry weight. However, the presence of other estrogens could not be confirmed by this technique due to insufficient sensitivity.

Thus, primary treatment and centrifugation processes had a limited impact on the elimination of both free and conjugated estrogens. The estrogen removal was due mainly to the biological activity during the activated sludge process.

**Figure 3.** Total concentrations of free (A) and conjugated (B) estrogens and their associated estrogenic activities (EA). Mean values of the three sampling weeks. For conjugated estrogens, measured and estimated EA were given considering their hydrolyzed forms. Refer to Figure 1 for definitions of sampling points RS, PE, ES, RW, and TW.

- = total concentration (fall)
- = total concentration (spring)
- ▨ = estimated EA (fall)
- ▩ = estimated EA (spring)
- ▧ = measured EA (fall)
- ▦ = measured EA (spring)



### Estrogenic activity

The estrogenic activity measured by MELN bioassay during the sewage treatment is shown in Table 5 and Figure 3. The raw sewage and primary effluent displayed the highest estrogenic activity. In addition, higher estrogenicity was detected in autumn 2005 (86 – 131 ng/L EEQ) than in spring 2006 (33 – 71 ng/L EEQ). This difference is explained by the presence of a higher proportion of EE2, the most active estrogen, in autumn (7%) compared to spring (2%); and the higher fraction of E1, a less active estrogen, in spring (56%) compared to autumn (42%) (Fig. 2). Primary treatment did not show a clear impact on the level of estrogenic activity. In autumn, the estrogenicity measured in primary effluent was

significantly lower (35%) than in raw sewage. However, in the spring campaign, differences between estrogenicity measured in raw and primary effluent were not significant: a decrease of 18% was measured only in the second week of sampling. After activated sludge treatment, the estrogenic activity in sewage decreased strongly, varying from 1 to 5 ng/L EEQ in ES, RW, and TW. These results suggest that, as for as estrogen elimination is concerned, estrogenic activity removal occurred during the secondary treatment. For estrogenicity, our results were in the same range as the values obtained by Matsui et al. [12] in Japanese STPs using the YES bioassay. The authors reported levels of approximately 150 ng/L EEQ in the inlets and between 5 to 15 ng/L EEQ in the outlets. However, estrogenicity in raw sewage showed high variability, depending on the STP type and location. Similarly, Svenson et al. [14] reported low estrogenic activity, from 1.6 to 30 ng/L EEQ, measured in the inlet of Swedish STPs by the YES test. On the other hand, Leutsch et al. [13] reported values from <4 to 185 ng/L EEQ in Australia and New Zealand STPs (sheep estrogen receptor binding assay, ERBA). In contrast, other studies have reported a narrow range of variation, between <0.1 to 15 ng/L, for the estrogenicity of treated effluents [14, 29].

The estrogenic activity measured for conjugated estrogens, once hydrolysed, is shown in Figure 3b. This activity was not actually observed in the STP but it should be considered as potential estrogenicity that could be released after the hydrolysis of conjugated estrogens. Thus, in the spring and autumn series respectively, approximately 26 and 54 ng/L EEQ were probably released during biological treatment. Nevertheless, this estrogenicity was almost completely eliminated by the activated sludge process: the remaining estrogenicity from conjugated estrogens measured in the treated effluent was below 2 ng/L EEQ.

In excess sludge and dehydrated sludge no estrogenic activity was detected by the MELN assay, even though chemical analysis revealed the presence of low levels of E1 (confirmed by both GC-MS and LC-tandem MS), and E2 and EE2 (as determined by GC-MS but not confirmed by LC-tandem MS). Moreover, some inhibition of MELN cells was observed when testing sludge samples, behavior that could be explained by the presence of inhibitory compounds in complex matrices such as sludge.

To evaluate the contribution of estrogens to overall sewage estrogenic activity, the measured estrogenicity was compared to the theoretical estrogenic potency of estrogens estimated from steroid concentrations obtained by chemical analysis. The theoretical estrogenicity was calculated using the relative estrogenic activity of individual steroid compared to E2 in the MELN test [15] along with the concept of concentration additivity. Correlation analysis revealed that both estimated and measured estrogenic activities displayed a positive correlation of 0.77 ( $n = 55$ ); advanced correlation analysis showed that measured and estimated estrogenicity were not statistically different, given a standard error of 15 ng/L EEQ. This correlation factor was slightly higher than the value estimated by Aerni et al. [29] (0.60;  $n = 70$ ) from data of treated effluents from five STPs showing low levels of

estrogenicity (<10 ng/L EEQ). Our results lead to the conclusion that most of the estrogenic activity measured in the studied STP resulted from steroid concentrations. Indeed, complementary chemical analysis of the samples showed that ethoxylated nonylphenol, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, and phthalates were present at very low concentrations (data not shown) and due to their low relative estrogenic potency, could not play a major role in the sewage estrogenicity. However, other compounds such as phytoestrogens, pesticides, or pharmaceuticals that could contribute to the estrogenic activity were not determined. Nevertheless, when domestic inputs are the main source of sewage, and in view of the high correlation factor between chemical and biological analysis measured in the present study, it seems that chemical analysis may be sufficient to assess STP performances and effluent toxicity. However, a combined chemical and biological dual approach is pertinent on account of its information redundancy. In addition, in sites with higher agronomic or industrial inputs, a combination of in-vitro bioassays and chemical analysis could supply complementary information concerning the role of each EDC in the overall estrogenicity of sewage and the impact of treatment processes on effluent toxicity.

#### *Mass balance analysis*

Table 5 gives the removal efficiencies for hormones and estrogenic activity for the two sampling periods. The average removal rates of free and conjugated hormones were, respectively, 95 to 97% and 98 to 100%. Elimination of free E1 and E3 was higher than 96% for the two sampling dates. However, it is interesting to note that E1, considered as a by-product of E2 degradation [30], was not completely removed (maximum of 98%). Removal rates of E2 and EE2 displayed some variability between sampling periods: the elimination of free E2 was higher in autumn 2004 (90-100%) than in spring 2005 (77-86%) while EE2 removal rates for the autumn campaign were between 61 and 87% (EE2 was not detected in spring). Thus, E3 seems to be easily removed from wastewater whereas E1, E2, and EE2 appear to be recalcitrant. For comparison, removal efficiencies previously reported for activated sludge STPs ranged from 49 to 99% for E1, from 80 to 99% for E2, from 95 to 100% for E3, and from 69 to 94% for EE2 [8, 11, 28, 31]. In fact, the removal efficiencies calculated in the present research fall within the higher ranges recorded in the literature.

Conjugated estrogens showed elimination rates similar to those of free ones, except for conjugated E3 that was completely removed from wastewater. As shown by D'Ascenzo et al. [18], conjugated forms were probably converted into free forms during the biological treatment. Consequently, in the biological tank, it can be assumed there was first an increase in the concentration of free hormones due to hydrolysis of the conjugated steroids; then, the hydrolysed estrogens were subsequently degraded. As similar removal rates were observed for free and conjugated steroid, we can assume the hydrolysis of conjugated forms was not a limiting step for estrogen removal.

Similarly, elimination of estrogenicity was high, varying from 87 to 99% (Table 5).

Differences between the removal efficiency of estrogenicity and steroids (>95%) are explained by the higher removal rate for estrogens with low estrogenicity (E1, E3) compared to rates for those with high estrogenic activity (E2, EE2). Similar efficiencies were reported by Svenson et al. [14] for STPs using an activated sludge system which included nitrogen removal (>97%) while lower performances were observed in STP without such nitrogen treatment (mean 81%).

Estrogen concentrations in sludge measured by GC-MS or LC-tandem MS as well as sludge estrogenicity suggest that sorption into sludge played a minor role in estrogen elimination. Indeed, mass balance calculations indicate that between 0.5 to 4% of the incoming estrogens were sorbed into the sludge. Moreover, no estrogenic activity was detected in the sludge. Our results are close to estimations based on sorption coefficients and concentrations of estrogens in liquid phases, made in other studies, indicating that around 5% of the incoming estrogens were sorbed into the sludge during wastewater treatment [6, 20, 21]. Since between 2 and 2.5% of incoming estrogens remain in the final effluent, biodegradation appears to remove from 93 to 97% of the total initial estrogens load.

The high removal efficiency of estrogens and estrogenic activity observed in the present study may be explained by the STP operating parameters of high HRT and solid retention time which lead to prolonged contact between pollutants and bacteria, as suggested by Johnson et al. [32], Servos et al. [33], and Clara et al. [34]. As shown elsewhere, nitrogen and phosphorous treatment involving anoxic and anaerobic stages may also contribute to a high removal efficiency by facilitating the growth of bacteria able to metabolize or co-metabolize estrogens. For example, Andersen et al. [6] showed that E1, E2, and EE2 were greatly reduced in the anoxic denitrification tank of a German STP. In the same way, Servos et al. [33] suggest that nitrification/denitrification steps in STPs leads to higher removal rates for E1 and E2. The advanced STP we studied, which efficiently removed major pollutants, also appears to have high capability to eliminating estrogens.

#### *Ecotoxicological implications*

Taking into account the concentration of residual estrogens and their estrogenic potency, the estrogenic activity measured in the present study in treated effluents and the dilution factor of the final effluent in the receiving water (10 – 20-fold in this case), the ensuing estrogenicity getting into the environment can be estimated as below 0.5 ng/L EEQ. Such a level is sufficient to affect the endocrine system of sensitive species like the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [2]. For this organism, it has been reported that 0.1 ng/L of EE2 upwards (0.25 ng/L EEQ in the MELN test) produce a dose-dependent induction of plasma vitellogenin in male individuals. Similar effects have been reported for other fish and mollusc species [35]. So despite the high efficiency of modern STPs in the removal from wastewater of free and conjugated estrogens as well as estrogenic activity, the most sensitive species may still be affected by the STP effluents discharged into surface waters.

Consequently, further research is essential to improve the estrogen removal efficiency of STPs. Such research should focus on implementing tertiary treatment technologies such as ultraviolet treatment, ultrafiltration, ozonation, etc., which have shown high capabilities to eliminate micro-pollutants.

## CONCLUSIONS

In the present study we have assessed the fate and removal of hormones and estrogenic activity in a modern STP. Chemical and biological analysis of water samples showed that conjugated estrogens contributed to approximately half of the total incoming amount of hormones. This result emphasises the need of measuring conjugated estrogens to accurately assess the loads of hormones and estrogenic activity present in sewage. The estrogen content into sludge, measured by both GC-MS or LC tandem MS, showed that only a minor fraction of estrogens (<4%) was eliminated by sorption. This result was confirmed by the absence of estrogenic activity in sludge samples. The methodology used here to determine estrogens in sludge, particularly by GC-MS analysis, allowed an accurate quantification of these compounds. It should be noted only few studies have dealt with estrogens analysis in both water and sludge samples due to analytical hindrance. Thus, to our knowledge, this is the first study performing a mass balance analysis based on chemical analysis of conjugated and free estrogens in both water and sludge fractions. Moreover, the methodology used to analyse estrogens in sludge would be very useful to assess the real estrogen outputs in other STP facilities. The good correlation between estrogenic activity calculated from chemical analysis and measured by MELN test (0.77) lead to the conclusion that estrogens were the main source of estrogenicity in the STP studied.

In summary, a modern wastewater treatment plant using activated sludge process combining aerobic/anoxic/anaerobic stages with high hydraulic and solid retention times, achieves simultaneously an efficient removal of major pollutants, estrogens and estrogenic activity. Our results, based on chemical and biological analysis of water and sludge samples, allow us to conclude that the elimination of hormones and estrogenicity resulted mainly from biological degradation.

**Acknowledgement.** The present study was funded by the French National Agency for the Environment and Energy (ADEME) and two French national programs: Thematic Action Environment and Health of the National Institute of Health and Medical Research (INSERM) and Continental Ecosphere (ECCO) – Ecotoxicology and Ecodynamic of contaminants (ECODYN - 03CV117) of the National Institute of Sciences of the Universe (INSU).

## REFERENCES

1. Birkett JW. 2003. *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. Lewis, Boca Raton, FL, USA.

2. Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *J Chem Ecol* 8: 275-285.
3. Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol* 32: 2498-2506.
4. Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol* 32: 1559-1565.
5. Wenzel A, Bohmer W, Muller J, Rudel H, Schroter-Kermani C. 2004. Retrospective monitoring of alkylphenols and alkylphenol monoethoxylates in aquatic biota from 1985 to 2001: Results from the German Environmental Specimen Bank. *Environ Sci Technol* 38: 1654-1661.
6. Andersen H, Siegrist H, Halling-Sorensen B, Ternes TA. 2003. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environ Sci Technol* 37: 4021-4026.
7. Petrovic M, Sole M, de Alda MJL, Barcelo D. 2002. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ Toxicol Chem* 21: 2146-2156.
8. Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ Sci Technol* 34: 5059-5066.
9. Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* 225: 81-90.
10. Ternes TA, Kreckel P, Mueller J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci Total Environ* 225: 91-99.
11. Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K, Takada H. 2006. Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res* 40: 3297-3303.
12. Matsui S, Takigami H, Matsuda T, Taniguchi N, Adachi J, Kawami H, Shimizu Y. 2000. Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment. *Water Sci Technol* 42: 173-179.
13. Leusch FDL, Chapman HF, van den Heuvel MR, Tan BLL, Gooneratne SR, Tremblay LA. 2006. Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand. *Ecotoxicol Environ Saf* 65: 403-411.
14. Svenson A, Allard AS, Ek M. 2003. Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Res* 37: 4433-4443.
15. Pillon A, Boussioux AM, Escande A, Ait-Aissa S, Gomez E, Fenet H, Ruff M, Moras D, Vignon F, Duchesne MJ, Casellas C, Nicolas JC, Balaguer P. 2005. Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor-alpha: Application to environmental analysis. *Environ Health Perspect* 113: 278-284.
16. Schiliro T, Pignata C, Fea E, Gilli G. 2004. Toxicity and estrogenic activity of a wastewater treatment plant in Northern Italy. *Arch Environ Contam Toxicol* 47: 456-462.
17. Belfroid AC, Van des Horst A, Vethaak AD, Schäfer AJ, Rijs GBJ, Wegener J, Cofino WP. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci Total Environ* 225: 101-108.
18. D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R. 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci Total Environ* 302: 199-209.
19. Ternes TA, Andersen H, Gilberg D, Bonerz M. 2002. Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Anal Chem* 74: 3498-3504.



20. Andersen HR, Hansen M, Kjolholt J, Stuer-Lauridsen F, Ternes T, Halling-Sorensen B. 2005. Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere* 61: 139-146.
21. Ternes TA, Herrmann N, Bonerz M, Knacker T, Siegrist H, Joss A. 2004. A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient ( $K_d$ ) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res* 38: 4075-4084.
22. Cargouet M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S, Levi Y. 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci Total Environ* 324: 55-66.
23. Labadie P, Budzinski H. 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Anal Bioanal Chem* 381: 1199-1205.
24. Cespedes R, Petrovic M, Raldua D, Saura U, Pina B, Lacorte S, Viana P, Barcelo D. 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem* 378: 697-708.
25. Farre M, Brix R, Kuster M, Rubio F, Goda Y, de Alda MJL, Barcelo D. 2006. Evaluation of commercial immunoassays for the detection of estrogens in water by comparison with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry HPLC-MS/MS (QqQ). *Anal Bioanal Chem* 385: 1001-1011.
26. de Mes T, Zeeman G, Lettinga G. 2005. Occurrence and fate of estrone, 17- $\beta$ -estradiol and 17- $\alpha$ -ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater. *Rev Environ Sci Biotechnol* 4: 275-311.
27. Adler P, Steger-Hartmann T, Kalbfus W. 2001. Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from Southern and Middle Germany. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 29: 227-241.
28. Johnson AC, Belfroid A, Di Corcia A. 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci Total Environ* 256: 163-173.
29. Aerni HR, Kobler B, Rutishauser BV, Wettstein FE, Fischer R, Giger W, Hungerbuhler A, Marazuela MD, Peter A, Schonenberger R, Vogeli AC, Suter MJF, Eggen RIL. 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal Bioanal Chem* 378: 688-696.
30. Lee HB, Liu D. 2002. Degradation of 17 beta-estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water Air Soil Pollut* 134: 353-368.
31. Joss A, Andersen H, Ternes T, Richle PR, Siegrist H. 2004. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. *Environ Sci Technol* 38: 3047-3055.
32. Johnson AC, Aerni HR, Gerritsen A, Gibert M, Giger W, Hylland K, Jurgens M, Nakari T, Pickering A, Suter MJF, Svenson A, Wettstein FE. 2005. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Res* 39: 47-58.
33. Servos MR, Bennie DT, Burnison BK, Jurkovic A, McInnis R, Neheli T, Schnell A, Seto P, Smyth SA, Ternes TA. 2005. Distribution of estrogens, 17  $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* 336: 155-170.
34. Clara M, Kreuzinger N, Strenn B, Gans O, Kroiss H. 2005. The solids retention time: A suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Res* 39: 97-106.
35. Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP, Tyler CR. 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol* 65: 205-220.

## ***I.2 Dynamique des œstrogènes et de l'activité œstrogénique au cours du traitement des boues urbaines***

*Il s'agit dans ce second volet, d'approfondir les questions liées à la mesure des œstrogènes adsorbés sur les boues et à leur devenir au cours du traitement ultérieur de ces boues. Nous avons vu que ces questions avaient été très peu étudiées jusqu'ici principalement en raison de limitations d'ordre analytique. Toutefois, à la vue des résultats obtenus dans le premier volet expérimental de ma thèse et des informations déjà disponibles dans la littérature, il apparaissait que, même si la proportion d'œstrogènes éliminés par adsorption était faible, les concentrations finales mesurées dans les boues pouvaient avoir des conséquences toxicologiques. Dans un premier temps, nous avons donc mené des validations complémentaires de la méthode utilisée précédemment pour mesurer les œstrogènes dans les boues, puis celle-ci a été utilisée pour évaluer la teneur en œstrogène dans différents types de boues. Le devenir des œstrogènes au cours de deux procédés de traitement des boues largement utilisés, la digestion anaérobie et le compostage, a finalement été considéré. Les travaux sur la validation de la méthode analytique, la présence des œstrogènes dans les boues d'épuration et leur devenir au cours de la digestion anaérobie fait l'objet d'une publication en préparation, en vue d'une soumission à **Chemosphere – I**. Les travaux menés sur le procédé de compostage, qui combinaient une double approche chimique et toxicologique, ont été exposés à la conférence de l'IWA intitulée "Wastewater Biosolids Sustainability" (juin 2007, Moncton, Canada). Complétés ultérieurement par de nouvelles analyses, ces travaux sont en cours de publication dans **Environmental Pollution – II**.*

---

### **I**

---

Des prélèvements ont été effectués en janvier 2006 sur une STEP de l'agglomération parisienne. Cette STEP reçoit la majeure partie des eaux usées de l'agglomération parisienne, constituées essentiellement d'effluents domestiques. Les boues primaires, secondaires et mixtes, ainsi que les boues après digestion anaérobie et après déshydratation ont été échantillonnées sur 2 jours consécutifs. L'estrone (E1), l'estradiol (E2), l'estriol (E3) et l'éthinylestradiol (EE2) ont été quantifiés en GC-MS après extraction des œstrogènes à l'ASE suivi d'une SPE. Préalablement, la méthode analytique a subi une validation complémentaire ayant pour but d'estimer les performances de l'extraction en considérant les interactions "polluant-matière organique" qui peuvent s'établir au sein des systèmes de traitements des eaux usées.

Cette validation complémentaire de la méthode consistait à évaluer la récupération des œstrogènes lorsque ceux-ci étaient ajoutés dans la boue liquide plutôt que dans la boue lyophilisée. Des expériences de mise en contact des œstrogènes avec la boue liquide ont été menées, en utilisant des molécules natives ou radio-marquées, pendant des temps variant de 30 min à 24 h et sous agitation. Ces expériences ont montré que la fraction non extractible des

œstrogènes était mineure. Par conséquent, cela suggère que les interactions de sorption qui existent entre la boue liquide et les œstrogènes ne limitent pas leur extraction par la méthode analytique considérée. L'extraction d'étalons internes, ajoutés dans la matrice lyophilisée, serait donc représentative de l'extraction des composés originellement présents dans l'échantillon, sans risque de sous-estimation des teneurs réelles.

Les mesures effectuées sur les boues primaires et secondaires de la STEP ont révélé des teneurs comparables pour E2, E3 et EE2. Par contre, les teneurs en E1 étaient beaucoup plus élevées dans les boues secondaires que primaires. La formation de E1 à partir de l'oxydation de E2 pourrait en partie expliquer l'augmentation de sa concentration. De plus, l'hydrolyse des formes conjuguées polaires de E1, au cours du traitement secondaire des eaux, pourrait libérer des formes libres plus apolaires et donc susceptibles de s'adsorber sur les boues. La distribution et la concentration respective des œstrogènes adsorbés sont assez proches de celles observées sur les boues secondaires de la STEP étudiée précédemment. Toutefois, la concentration totale plus importante observée sur la STEP parisienne par rapport à la STEP précédente, combinée aux données disponibles dans la littérature, suggérerait que les STEP disposant d'un traitement secondaire avancé des eaux usées conduisent à une moindre adsorption des œstrogènes. Ces traitements avancés consistent en un traitement biologique de l'azote avec des temps de séjour hydraulique et des boues, élevés.

Les concentrations en œstrogènes relevés avant et après le traitement anaérobie des boues étaient assez proches indiquant un faible impact du procédé sur la dégradation des œstrogènes. Les abattements calculés étaient au maximum de 40%, c'est à dire du même ordre de grandeur que pour la matière sèche. Pour E1, la faible dégradation est aussi probablement due à son accumulation par transformation biologique de E2. Par ailleurs, le procédé de conditionnement et déshydratation des boues, utilisé en post-digestion, conduit à une augmentation des concentrations en œstrogènes. Ce traitement soumet les boues à un traitement thermique sous pression qui pourrait conduire à une plus grande extractabilité des œstrogènes et expliquer ainsi cette augmentation des concentrations mesurées.

Cette étude a montré que les œstrogènes étaient correctement extraits des boues même lorsque des interactions de sorption s'établissent avec la matière organique. La méthode utilisée, avec ajout des étalons internes dans le lyophilisat, ne conduirait donc pas à une sous-estimation des concentrations réelles. La comparaison des résultats obtenus sur les boues primaires et secondaires est innovante puisque les teneurs en œstrogènes de boues primaires n'avait jamais été mesurées auparavant. La faible capacité des digesteurs industriels à dégrader les œstrogènes a été confirmée, alors que, selon d'autres études réalisées à l'échelle du laboratoire, un potentiel élevé de dégradation des œstrogènes par digestion anaérobie existe. Par conséquent, de plus amples investigations sont nécessaires pour comprendre le devenir des œstrogènes au cours de la digestion anaérobie, mais aussi pour estimer l'importance de l'adsorption en fonction de la configuration et de la conduite de la STEP.

# OCCURRENCE OF ESTROGENS IN URBAN SEWAGE SLUDGE AND FATE DURING A PLANT-SCALE ANAEROBIC TREATMENT

Mathieu Muller <sup>a</sup>, Sarah Combalbert <sup>a</sup>, Nadine Delgenès <sup>a</sup>, Valérie Bergheaud <sup>b</sup>, Vincent Rocher <sup>c</sup>, Pierre Benoît <sup>b</sup>, Jean-Philippe Delgenès <sup>a</sup>, Dominique Patureau <sup>a</sup> and Guillermina Hernandez-Raquet <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France

<sup>b</sup> INRA, UMR Environnement et Grande Culture, Site de Grignon bâtiment EGER BP1, Thiverval-Grignon, F-78850, France

<sup>c</sup> SIAAP, Direction de la Recherche et du Développement, 82 avenue Kléber, Colombes, F-92700, France

\* Corresponding author. Tel.: +33-4 68 42 51 70; fax: +33-4 68 42 51 60.

E-mail address: hernandg@supagro.inra.fr (G. Hernandez-Raquet).

(En préparation)

---

## Abstract

The occurrence of estrogens in different urban sludge and their behavior during plant-scale anaerobic digestion were investigated. The analytical method used was previously validated focussing on the interactions between micropollutants and sludge. For this purpose, the recovery rates of estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3) and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) were determined when added in liquid sludge rather than in dehydrated sludge. The results showed that minor non-extractable residues remained in sludge, suggesting that the low energy interactions between sludge and estrogens do not limit their extraction. The presence of estrogens in sludge samples collected in sewage treatments plants (STP) varied with the sludge type, the sludge origin and the considered molecule. Secondary excess sludge showed higher E1 contents than primary sludge with, respectively, 43 and 8 ng/g dry weight (dw). This difference may be due to the conversion of E2 to E1 or the hydrolysis of conjugated E1 during the biological secondary treatment. Rather higher estrogens concentrations were found in secondary excess sludge from a high-scale conventional STP compared to a medium-scale advanced STP. Based on estimated raw sewage concentrations and data of the literature, the process and the operating parameters seem to play a role in the sorption of estrogens to the sludge. Moreover, the hydrophobic properties probably have an influence as regard the E3. This compound showed the highest estimated concentrations in raw sewage, but very low concentrations in sludge. Finally, the plant-scale anaerobic treatment shown low efficient to remove estrogens sorbed into the sludge with removal rates below 40%.

**Keywords:** Estrogens; Sludge; Anaerobic digestion; Sorption; Analytical method; Validation procedure

## 1. Introduction

The estrogens are considered as endocrine disrupting compounds (EDC) since they contribute to the feminization of male fish in rivers (Purdom et al. 1994; Jobling et al. 1998). Humans and animals daily excrete natural estrogens estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) and estriol (E3) in the range of 1-10  $\mu$ g/j and 20-2000  $\mu$ g/j, respectively. In the case of pregnant women or female, excretion can reach about 6000  $\mu$ g/j (Johnson et al. 2000; Lange et al. 2002). Moreover, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2), used as contraceptive (30-40  $\mu$ g/pills), is largely consumed by the feminine population (60% of the 20-44 years old range in France; Leridon et al. 2002) and then partially excreted (about 25%). Consequently, estrogens were detected in urban sewage from the ng/L to the hundred ng/L range (Baronti et al. 2000; Johnson et al. 2000; Andersen et al. 2003). It was shown elsewhere that these sexual hormones were the major estrogenic compounds found in sewage treatment plant (STP) influents and effluents (Routledge et al. 1998; Korner et al. 2000). According to the molecule and STP, removal efficiencies strongly varied (0-100%) and led to effluent concentrations ranging from the limit of detection (LOD) to the hundred ng/L range (Ternes et al. 1999b; Baronti et al. 2000; Johnson et al. 2000; Servos et al. 2005; Nakada et al. 2006).

Biological and sorption mechanisms are involved in the removal of estrogens during sewage treatment. Bacteria from activated sludge and nitrifying activated sludge have been shown to effectively biodegraded estrogen (Ternes et al. 1999a; Lee and Liu 2002). However, considering their chemical properties (log  $K_{ow}$  ranging from 2.81 to 4.15), sorption may also play a role in the removal of estrogens by STP. The importance of this mechanism was either determined through complete mass balance (Andersen et al. 2003; Braga et al. 2005; Muller et al. in press) or estimated from  $K_d$  distribution coefficients (Joss et al. 2004; Ternes et al. 2004; Andersen et al. 2005). Only 4 to 6% of the inlet load of estrogens was removed from water by sorption to sludge. However, despite a minor sorption, concentrations in sewage sludge appear to be non-negligible.

Only few studies have dealt with this topic, essentially due to the difficulty to measure estrogens at the ng/g range in complex matrix as sludge (Kuster et al. 2004). Up to now, four studies have reported the presence of estrogen in sludge. In activated and digested sludge, concentrations ranging from <2 to 37 ng/g dry weight (dw) were found for E1, 5 to 49 ng/g dw for E2 and <2 to 17 ng/g dw for EE2 (Ternes et al. 2002). Andersen et al. (2003) measured levels in secondary excess sludge of 7, 1.7 and 3 ng/g dw for E1, E2 and EE2, respectively. After anaerobic digestion, concentrations increased with 25.2 ng/g dw for E1 and 5.1 ng/g dw for E2, excepted for EE2 (< 1.5 ng/g dw). These three estrogens were also detected in activated and dehydrated sludge of an advanced STP in Australia at concentrations ranging from 12 to 14 ng/g dw for E1 and below 1 ng/g dw for E2 and EE2 (Braga et al. 2005). In a previous work from our laboratory (Muller et al. in press), concentrations in excess and

dehydrated secondary sludge were in the range of 2 to 8, 1 to 10 and 1 to 18 ng/g dw for E1, E2 and EE2, respectively; E3 was always below 1 ng/g dw.

In all these studies, excepted for Braga et al. (2005), the recovery rates were obtained by spiking estrogens and internal standards on freeze-dried sludge. Such validation procedure is widespread in environmental chemistry for various compounds and matrix (Budzinski et al. 1999; Petrovic et al. 2002; Cespedes et al. 2004; Helaleh et al. 2005; Ternes et al. 2005). However, interactions that occurred between spiking compounds and dried matrix are not representative of originally contaminated samples ones. So the recovery rates may be overestimated and concentrations in originally contaminated samples, underestimated (Miege et al. 2003).

Similarly, the fate of these hormones through sludge treatment is poorly documented. At high pH values, as obtained when sludge was conditioned by limestone during dewatering, significant desorption of estrogens occurred (Clara et al. 2004; Ivashechkin et al. 2004). Concerning efficiency of anaerobic digestion to remove estrogens and estrogen activity from sludge, contradictory results have been obtained between plant-scale and lab-scale experiments (Holbrook et al. 2002; Andersen et al. 2003; Carballa et al. 2006).

The aim of this paper was to investigate the occurrence of estrogens in urban sewage sludge and to assess their removal during plant-scale anaerobic sludge digestion. The analytical method used was previously validated simulating the interaction occurring between estrogens and sludge in originally contaminated samples.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Native steroids estrone (E1), 17- $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3) and 17- $\alpha$ -ethynilestradiol (EE2) were supplied by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98%). Deuterated estrogens 17- $\beta$ -estradiol- $d_4$  (E2- $d_4$ ) and 17- $\alpha$ -ethynilestradiol- $d_4$  (EE2- $d_4$ ) (isotopic purity > 99%), used as internal standards, were purchased from Cluzeau Info Labo (Ste Foy-la-Grande, France). HPLC grade organic solvents and formaldehyde (purity > 37%) were obtained from Atlantic Labo (Floirac, France). Hydrochloric acid (37%, reagent grade) and triethylamine (TEA, purity >99%) were supplied by Sigma-Aldrich. The silylation agent N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA; purity > 97%), mercaptoethanol and ammonium iodide were provided by Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Estradiol [4- $^{14}$ C] from American Radiolabeled Chemicals (Saint-Louis, USA) has a purity of 98 % and a specific activity of 55 mCi/mmol. The scintillation cocktails (Ultima Gold or Permafluor) and CO<sub>2</sub> absorber (Carbosorb) were purchased from Perkin Elmer (Waltham, USA). Methanol (purity > 99.9%) and acetone (purity > 99.8%) for radiolabeled E2 analysis were obtained

from CarloErba (Val-de-Reuil, France). Sodium hydroxide aqueous solution (30%) and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (purity > 99.5%) were supplied by VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

## 2.2. Sampling sites and procedure

Sludge was sampled in three different STP located in the suburb of Paris for two of them (Achères and site A) and in the Languedoc-Roussillon region, southern France, for the last one (site B). The site B was described in detail by Muller et al. (in press). Briefly, process consists of low-load activated sludge system without primary settling. The sludge retention time (SRT) is 20 days and the capacity, of 120,000 people equivalent (p-eq). The site A, is a 250,000 p-eq STP using high load activated sludge system after primary settling with a SRT of 9 hours. For site A and B excess secondary sludge was taken from the clarifiers and concentrated at the laboratory by centrifugation until 20 g/L of dry matter. Both sludge samples were used for the validation of the analytical procedure.

Achères (ACH), managed by the Paris urban area sewerage service (SIAAP), are situated in the downstream of Paris. ACH is the most important STP in Europe with a capacity of 1,700,000 m<sup>3</sup> per day (6,000,000 p-eq) of mainly domestic inputs. The sewage is firstly settled before high-load activated sludge treatment that removes essentially the carbon pollution. Hydraulic retention time (HRT) ranges from 1.5 to 4 h and SRT, from 2 to 3 d. The phosphorous is eliminated through a tertiary physico-chemical process. Primary and secondary sludge are anaerobically digested (T = 35°C, HRT = 15-21 days) before conditioning and dehydration by thermal-pressurized and filter-press treatments.

Sampling on ACH was achieved on two consecutive days in January 2006 at five points: primary sludge (PS), secondary excess sludge (ES), mixed sludge (MS = 65% PS + 35% ES), anaerobically digested sludge (AS) and dehydrated sludge (DS). For liquid sludge, samples were 24-h composites collected by flow proportional samplers while dehydrated sludge was taken manually. After sampling, sludge were immediately frozen and send to our laboratory within 24 h. Liquid sludge were immediately centrifuged as described by Muller et al. (in press). Resulting pellets and dehydrated sludge were freeze-dried and sieved at 2 mm. Samples were stored at -20°C until further analysis.

## 2.3. Extraction method

Estrogens from sludge samples were extracted using the method described by Cespedes et al. (2005) for sediments and modified by Muller et al. (in press) for sludge. Briefly, freeze-dried and sieved sludge (1 g) was mixed with sodium sulfate in stainless steel cells and spiked with 60 ng of internal standards (E2-*d*<sub>4</sub> and EE2-*d*<sub>4</sub>) before extraction (fig. 1). Extraction was performed in triplicate using an accelerated solvent extractor (ASE 200, Dionex, Voisin-le-Bretonnaux, France) with a solvent mixture methanol/acetone (1:1, v/v). Temperature and pressure were set at 75°C and 105 bars, respectively. Sludge extracts were concentrated to 2 ml and dissolved in 200 ml of MilliQ water. This aqueous solution was then extracted and

purified according to the method reported by Labadie and Budzinski (2005) for water samples (fig. 1). After samples filtration, (Whatman GF-F, 0.7  $\mu\text{m}$ , VWR, Strasbourg, France), analytes were extracted by solid phase extraction (SPE) using 200 mg Oasis HLB cartridges (Waters, St Quentin en Yvelines, France). Then, estrogens were eluted with 5 mL of methanol twice. The extracts were cleaned up through 500 mg LC-NH<sub>2</sub> cartridges (Supelco, St Quentin Fallavier, France). Purified extracts were dried under a gentle stream of nitrogen (Instruments 5.0, Linde Gas, Toulouse, France) and dissolved in 30  $\mu\text{l}$  of dichloromethane for further GC-MS analysis. Positive and negative SPE controls were extracted simultaneously. The negative control consisted of milliQ water spiked with deuterated estrogens while the positive ones were spiked with both native and deuterated estrogens.

#### 2.4. GC-MS analysis

The GC-MS quantification procedure was developed by Labadie and Budzinski (2005). MSTFA derivatized estrogens were separated on a GC Auto System XL (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Injection of 2.5  $\mu\text{l}$  of samples was performed in splitless mode at 250°C with helium as the carrier gas. The column was an Elite 5MS (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness; Perkin Elmer) and oven temperature program was set as: 90°C (1 min), 7.5°C/min to 290°C, 290°C (10 min). A Turbo Mass Gold (PerkinElmer) mass spectrometer with electron impact mode (70eV) was used to detect steroid hormones. The source temperature was set at 250°C. Data acquisition was carried out in selected ion recording mode (SIR). The estrogens were identified using two ions as shown in table 1. The methods used to determine the response factors, the recovery rates, the LOD, and the linearity range were previously detailed (Muller et al., in press).

**Table 1**

**Ions mass (m/z) used for identification and quantification of estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3) and ethynilestradiol (EE2) by gas chromatography mass spectrometry. Deuterates E2-d<sub>4</sub> (m/Z = 420) and EE2-d<sub>4</sub> (m/z = 429) were used as internal standards.**

Steroid	Internal standard	Identification / quantification ion	Confirmation ion
E1	E2-d <sub>4</sub>	414	399
E2	E2-d <sub>4</sub>	416	285
E3	E2-d <sub>4</sub>	425	386
EE2	EE2-d <sub>4</sub>	425	440

#### 2.5. Determination of estrogen recoveries

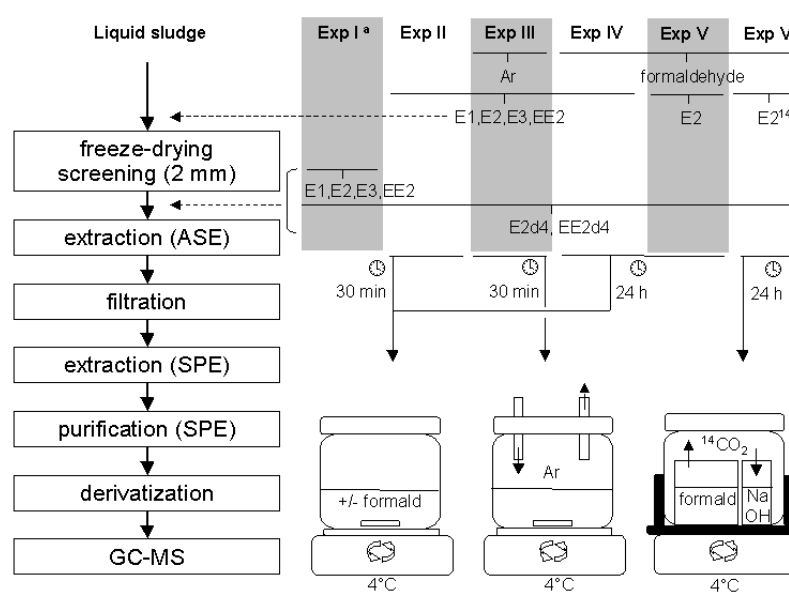
Different experiments were performed, as shown in figure 1 (Exp II–VI), to determine estrogens recoveries when spiked in liquid sludge, with sufficient contact time, to enable interactions between the molecules and the organic matter. Liquid sludge (250 mL at 20 g/L of dry matter) was put into glass flask directly adaptable on the freeze-drying appliance. Native estrogens were spiked in liquid sludge at 120 ng/g dry weight (dw) and the flasks were hermetically sealed. In Exp II-IV, native estrogens were E1, E2, E3 and EE2 while in Exp V



and VI, only E2 and  $^{14}\text{C}$ -E2 were spiked, respectively. In the case of  $^{14}\text{C}$ -E2, spiking was achieved at 400 ng/g dw to be enough sensitive for further detection ( $2 \times 10^5$  dpm or  $3.5 \times 10^3$  Bq/g dw). In Exp III–VI, biological activity inhibitors were used to assess the abiotic losses. Inhibition in Exp III was achieved through saturation of the flask atmosphere by argon (Ar). For Exp IV–VI, formaldehyde was added to sludge at 1% (v/v) and mixed together for 24 h prior to further experiments. Inhibition by formaldehyde was verified through respirometry test (with  $\text{O}_2$  probe) and cultivation on solid agar medium (24 h/30°C) of sterilized and raw sludge. Contact phase was carried out under magnetic shaking (excepted Exp VI, rotary shaking), at 4°C, during 30 min for non- or argon-inhibited sludge and 24 h for formaldehyde-inhibited ones. When  $^{14}\text{C}$ -E2 was used, radiolabeled carbon dioxide ( $^{14}\text{CO}_2$ ) formed was trapped into 3 mL of sodium hydroxide solution (2 N). For each experimental condition, spiking was made in triplicate with sludge of site B, excepted for radiolabeled experiments for which single spiking was made but with two different sludge (site A and site B). Moreover, non-spiking sludge, submitted to the same experimental conditions, was simultaneously analyzed.

**Fig. 1. Analytical method scheme (left side) and description of each validation experiments (right side). The description of the validation experiments indicates the inhibitor used, the spiked molecules, the estrogens and standard spiking step, the time and temperature of contact, and the experimental setup used.**

<sup>a</sup> Muller et al. (in press)



## 2.6. Analytical method for radiolabeled E2

The radioactivity of sludge extract and NaOH trap was measured using a liquid scintillation counter (Tri-Carb 2100TR Packard, Perkin Elmer, Waltham, USA) after addition of 5 mL of scintillation fluid UltimaGold to 500  $\mu\text{L}$  of sludge extracts and to the whole NaOH volume. For solid samples, 100 mg of air-dried extracted sludge was oxidized into  $\text{CO}_2$  at a yield of 98% (Oxidizer, Packard, Perkin Elmer) and  $^{14}\text{CO}_2$  formed was trapped into 8 mL of Carbosorb. Radioactivity of Carbosorb plus 12 mL of scintillation fluid Permafluor was then measured in liquid scintillation counter. After quantitative measurement of the radioactivity, sludge extracts were evaporated to dryness (Rotavapor Buchi, Cloup, Champigny-sur-Marne, France) and dissolved in 1 mL of methanol/water (50:50, v/v). This solution was filtered

(syringe filter, 0.45  $\mu\text{m}$ , Alltech, Templemars, France) before to be analyzed in liquid chromatography (HPLC, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). A volume of 100  $\mu\text{L}$  was injected on a Nova Pak C18 column (250 mm  $\times$  4,6 mm i.d./guard column, 20 mm  $\times$  3,9 mm i.d., Waters) maintained between 18 and 22  $^{\circ}\text{C}$ . Solvent flow was set at 1 mL/min in gradient mode as: methanol/water (50:50) at 0 min for 3 min, (65:35) at 35 min, (100:0) at 40 min and (50:50) at 45 min. Detection coupled diode arrays detector (DAD, Waters) at a wavelength of 240 nm and radioactivity detector (Packard, Perkin Elmer). The radiolabeled hormone  $^{14}\text{C}$ -E2 and possible known ( $^{14}\text{C}$ -E1) and unknown metabolites were looked for.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Recovery rates of estrogens

When the estrogens were spiked in liquid sludge (Exp II), recovery rates were all below 50% (table 2). Such values were low compared to ones reported by Muller et al. (in press) and Cespedes et al. (2004) with the same method but when estrogens were spiked in freeze-dried sludge or sediments (79 to 132%). These results could be explained by the formation of non-extractable residues during the contact phase with reactive liquid sludge, or by biological degradation.

The recovery rates obtained when biological activity inhibitors were used (Exp III-V) are shown in table 2. No consumption of oxygen and no bacterial growth were detected in formaldehyde treated sludge conversely to raw sludge (not shown). In these cases, satisfactory values were obtained for E3 and EE2, ranging from 77 to 101% (excepted for E3 with formaldehyde inhibition probably due to a chemical reaction). These results suggested that for E3 and EE2, low recovery obtained in Exp II could be explained by biodegradation. However, in Exp III and IV low value was obtained for E2 (2-24%) and, conversely, high value was obtained for E1 (144-146%). The most hydrophobic ( $\log K_{ow} = 4.15$ ) and recalcitrant estrogen EE2 was better recovered than E2, an easily biodegradable and less hydrophobic compound. Consequently, the low recovery obtained for E2 could not be explained by sorption interactions, but rather by chemical or biochemical degradation. Moreover, Exp V confirmed that these values might result from the conversion of E2 to E1.

Experiments, carried out using  $^{14}\text{C}$ -E2 (Exp VI) revealed that 95% of the initially spiked radioactivity was found in the sludge extracts (table 2) and less than 1% in the non-extractable residues (not shown). No  $^{14}\text{CO}_2$  was released during phase contact, since the radioactivity of NaOH traps was similar to the blank one. Moreover, HPLC analysis quantitatively ensured that, with sludge from site B, E2 was converted to E1. The metabolite  $^{14}\text{C}$ -E1 was detected in proportion to 92-98% of the extracted radioactivity while  $^{14}\text{C}$ -E2 accounted for around 0.5-4%. The absence of conversion with sludge from site A may be explained by the lower ability of this STP to degrade estrogens, as expected by its characteristics (e.g. low SRT).

Similar results were obtained in the literature when estrogens where spiked into non-

sterilized liquid matrix. Complete conversion of E2 to E1 occurred, while EE2 was satisfactory recovered. When matrix was autoclaved, recovery rates of E1, E2 and EE2 were correct (Gomes et al. 2004; Braga et al. 2005). Given that no conversion occurred when sludge was autoclaved and persisted when formaldehyde was used, the implication of the biological degradation could be excluded. The conversion of E2 to E1 was probably caused by extra-cellular enzyme, active even in presence of formaldehyde but degraded by high temperature. Our works, as well as, studies of Gomes et al. (2004) and Braga et al. (2005) have contributed to prove that estrogens were satisfactory recovered even when long contact times (30 min to 72 h), enabling sorption interactions, were applied. The non-extractable residues were negligible. Consequently, the addition of internal standard in freeze-dried sludge to quantify estrogens from originally contaminated samples was relevant.

**Table 2**  
**Estrogens recovery rates (%) for each experimental condition. Standard deviations are indicated in brackets and *n* represents the number of replicates.**

	Exp I <sup>a</sup>	Exp II	Exp III	Exp IV	Exp V	Exp VI
E1	91 (3)	40 (3)	144 (8)	146 (20)	38 (24)	} 95 (1)
E2	101 (10)	14 (1)	24 (5)	2 (0)	13 (5)	
E3	132 (14)	32 (11)	101 (19)	15 (6)	-	-
EE2	101 (2)	52 (2)	88 (4)	77 (7)	-	-
<i>n</i>	9	6	9	6	6	6

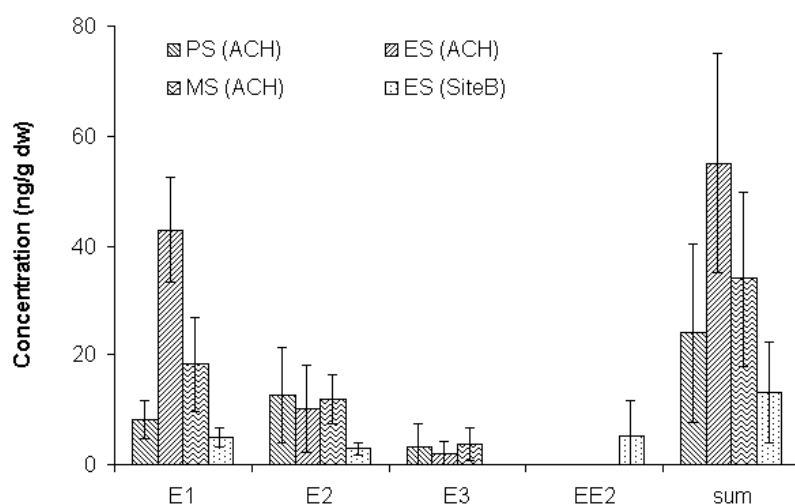
<sup>a</sup> Muller et al. (in press)

### 3.2. Occurrence of estrogens in urban sewage sludge

The estrogens contents of primary and secondary excess sludge taken from ACH were compared. Concentrations of estrogens were similar in both sludge types for E2, E3 and EE2 with 10-13, 2-3 and less than 3 ng/g dw, respectively (fig. 2). However, E1 concentration was markedly higher in secondary excess sludge ( $43 \pm 10$  ng/g dw) than in primary sludge ( $8 \pm 4$  ng/g dw). This increase of the sorbed fraction of E1 may result from either bacterial transformation of E2 to E1 (Ternes et al. 1999a; Lee and Liu 2002) or hydrolysis of conjugated estrogens (D'Ascenzo et al. 2003) during secondary treatment. To our knowledge, it was the first time that estrogens concentrations in primary sludge were determined. The distribution coefficient  $K_d$  of one primary sludge sample and one secondary sludge sample were measured and appeared to be similar (Ternes et al. 2004). Thus adsorption levels could be expected to be in the same range for both primary and secondary sludge. However,  $K_d$  depends on the sludge composition, which highly varied between STP, especially for primary sludge. Andersen *et al.* (2003) assumed that concentrations in primary sludge were higher than in secondary excess sludge. However, estrogens concentrations of the primary sludge were only estimated from other measured values of their mass balance. This estimation was achieved considering similar  $K_d$  for digested and primary sludge; as shown above such

assumption are very uncertain.

Estrogens concentrations in secondary excess sludge from a high-scale conventional activated sludge STP (ACH) were rather higher (E1, E2) or in the same range (E3, EE2) than in a medium scale advanced activated sludge STP (site B). Concentrations for ACH were  $43 \pm 10$ ,  $10 \pm 8$ ,  $2 \pm 2$  and less than 3 ng/d dw for E1, E2, E3 and EE2, respectively (fig. 2). For site B, concentrations were  $5 \pm 2$ ,  $3 \pm 1$  and  $5 \pm 6$  ng/g dw for E1, E2 and EE2 while E3 was never detected ( $< 1$  ng/g dw). To compare these levels, estrogens concentrations of raw sewage were estimated for both STP according to the model of Johnson et al. (2000). In a previous work, this model was shown to correctly predict actual values (Muller et al. in press). The estimated values for ACH were 51, 22, 339 and 5 ng/L for E1, E2, E3 and EE2, respectively. For site B, they were 71, 31, 431 and 5 ng/L for E1, E2, E3 and EE2, respectively. The estrogens concentrations in the raw sewage from site B were higher than ACH ones, excepted for EE2. Consequently, for EE2 no difference between STP was detectable. However, higher sorptions of E1, E2 and EE3 in ACH than in site B could be assumed. Thus the plant design and the operating parameters may play a role in the fate of estrogens through sewage treatment. Presence of biological nitrogen treatment and high SRT (20 d) and HRT (3-5 days) in site B may favour estrogens biodegradation (Clara et al. 2005; Johnson et al. 2005; Servos et al. 2005) explaining the lower sorption in sludge, particularly for E1.



**Fig. 2. Estrogens concentrations (ng/g dw) in primary sludge (PS), secondary excess sludge (ES) and mixed sludge (MS) taken from Achères (ACH) and site B<sup>a</sup>.**

<sup>a</sup> Muller et al. (in press)

Our results were in the range of previously reported values for secondary excess or activated sludge. Concentrations ranged up to 37 ng/g dw for E1, 17 ng/g dw for E2 and 4 ng/g dw for EE2 (Ternes et al. 2002; Andersen et al. 2003; Braga et al. 2005). As in our work, STP with nitrogen treatment and SRT in the 10-15 d range presented lower sludge estrogens contents (total concentration  $< 12$  ng/g dw) than conventional activated sludge STP (total concentration around 50 ng/g dw). The estrogen E1 was generally found as the major compound, probably due to its production during secondary treatment. The natural estrogen

E3 had been never investigated in secondary excess sludge given its low hydrophobicity ( $\log K_{ow} = 2.81$ ). Our study confirms that E3 concentration was low in secondary excess sludge despite its high estimated concentration in raw sewage. In fact, divergences were also noticed between the different estrogens molecules, which could be explained by their hydrophobic properties, illustrated by their  $\log K_{ow}$ .

### *3.3. Fate of estrogens during anaerobic digestion*

The behaviour of natural and synthetic estrogens during the anaerobic digestion of mixed sludge was studied on ACH. Mixed sludge was constituted of primary and secondary sludge at a ratio of 65:35 *v/v*. Concentrations in MS were  $18 \pm 9$ ,  $12 \pm 4$ ,  $4 \pm 3$  and less than 3 ng/g dw, for E1, E2, E3 and EE2, respectively (fig. 2). These measured concentrations were intermediate between PS and ES ones. Thus, estimations from PS and ES concentrations and mixed ratio led to values for MS close to measured ones (not illustrated). After anaerobic digestion concentration of estrogens were slightly higher for E1 ( $27 \pm 7$  ng/g dw) and similar for E2 and E3 (fig. 3). Conversely to mixed sludge, EE2 was detected in anaerobic digested sludge ( $2 \pm 3$  ng/g dw). Mass balance indicated that E1, E2 and E3 were non-efficiently removed (fig. 3) explaining the persistence of their concentrations through digester. Maximum removal was around 30-40% i.e. in the same order of magnitude than dry matter removal. The synthetic compound EE2 was also badly removed with an outlet daily mass flow rather higher than the inlet one.

In the literature, increases of estrogens concentration in digested sludge compared to untreated sludge were also reported (Ternes et al. 2002; Andersen et al. 2003). In our work, the studied digester operates at mesophilic temperature (35°C) with a HRT of 15-21 d. With similar conditions of anaerobic digestion ( $T = 33^\circ\text{C}$ , HRT = 20 d), Andersen et al. (2003) concluded that E1 and E2 were not appreciably degraded under methanogenic condition. However, their mass balance suffers from lacking data as estrogens concentrations in primary sludge, which were only estimated as described above. Otherwise, even if estrogenic activity could not be completely linked to the estrogens, persistence or increase of estrogenic activity during anaerobic digestion ( $T = 30\text{-}40^\circ\text{C}$ , HRT = 10 d) have been previously noticed (Holbrook et al. 2002). From overall these studies, anaerobic digestion appeared to be inefficient to degrade estrogens leading to similar or higher concentrations in the outlets compared to the inlets. However, lab-scale experiments have led to degradation rates of E1, E2 and EE2 between 75 and 85% during anaerobic digestion of mixed sludge (PS/ES = 65:35, *v/v*) at both 37 and 55°C with HRT ranging from 6 to 20 d (Carballa et al. 2006). Such divergences between lab-scale and plant-scale results are not explained. Carballa et al. (2006) underlined the need to provide a sufficient adaptation time for the sludge to reach such results but in plants, sludge are theoretically already adapted.

Further treatments for digested sludge conditioning and dewatering appeared to increase the concentrations of estrogens in sludge above all for E2 and E3 (fig. 3). Dehydrated sludge

contents were,  $45 \pm 14$  and  $21 \pm 15$  ng/g dw for E2 and EE2, respectively. The E1 and E3 levels remained relatively constant through these final treatment steps with  $34 \pm 13$  and  $3 \pm 4$  ng/g dw. Previous studies have reported no impacts of mechanical dewatering by centrifugation on sorbed estrogens contents (Braga et al. 2005; Muller et al. in press). However, in this case thermal-pressurised treatment ( $T = 200^{\circ}\text{C}$ , 20 bars) may lead to an enhancement of the extractability of the highest energy bound estrogens that were not recovered in previous samples.

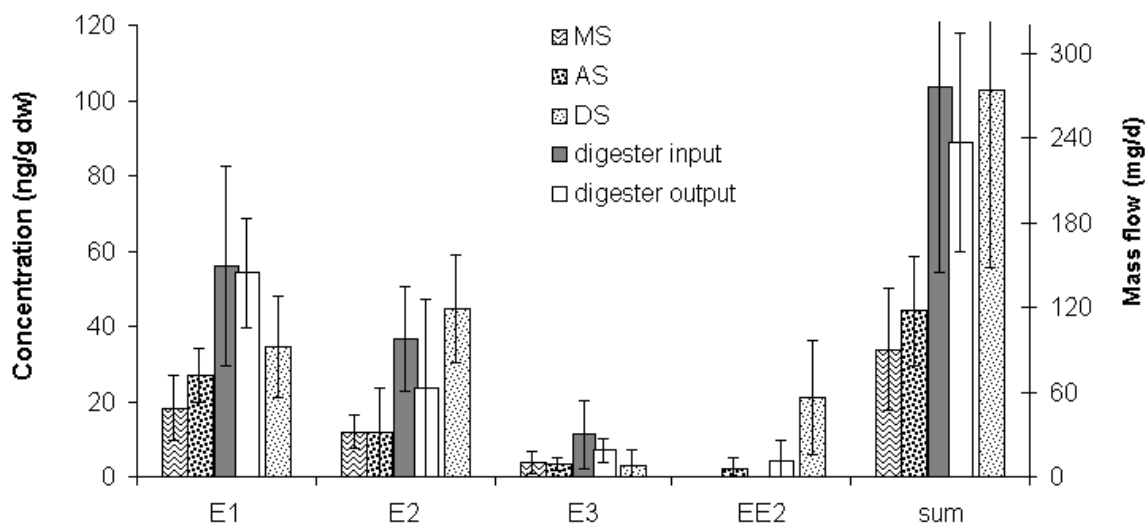


Fig. 4. Estrogen concentration (ng/g dw) in mixed sludge (MS), anaerobic digested sludge (AS) and dehydrated sludge (DS) from Achères (ACH). Daily input and output mass flow (mg/d) through the digester were illustrated with black and white bars, respectively, for each molecule.

### 3. Conclusions

In this study, advances have been made about (1) the measurement of estrogens in sewage sludge, (2) their occurrence in urban sewage sludge and (3) the evaluation of their fate during plant-scale anaerobic digestion.

- (1) Sorption interactions that occurred between the estrogens and the liquid sludge do not affect the extraction efficiency of the considered method. So, since spiking in liquid sludge is problematic, internal standard can be added in dried matrix without quantification underestimation. Nevertheless, originally contaminated certified samples should be available for analytical method validation. Only such samples are relevant regarding estrogens-sludge interactions existing in sewage treatment systems.
- (2) Several parameters have been identified as playing a role in the concentrations of estrogens in sludge. Hydrophobic properties of the estrogen molecule are an intrinsic factor that may partially explain the sorbed concentration of each molecule. Based on our work and others published data, the process design and the operating parameters applied in the STP influence the biodegradation of estrogens during sewage treatments and, consequently, their concentration in excess secondary sludge.

(3) Our study confirmed that plant-scale anaerobic digestion showed low efficiency to remove estrogens sorbed to the sludge conversely to observations that could have been made at the lab-scale. Despite low implication of the sorption mechanism in estrogens removal during sewage treatments, final concentrations in digested sludge were high, around 50 ng/g dw for the sum. Moreover, final sludge conditioning as thermal-pressurized treatment tended to increase estrogens contents from digested to dehydrated sludge or to enhance their extractability.

Until now, the occurrence and fate of estrogens sorbed to the sludge were not enough investigated. Further researches are still needed to better understand parameters influencing the concentrations of estrogens in sludge and their behavior through the different sludge treatment processes as anaerobic digestion or composting. The final objective is to assess the transfer of estrogens to soil through sludge land application in order to estimate the ecotoxicological risk of such practices.

### **Acknowledgements**

This research was funded by the French national program ECCO – ECODYN from the National Institute of the Universe Sciences (INSU) and the French National Agency for the Environment and Energy (ADEME).

### **Literature Cited**

- Andersen H, Siegrist H, Halling-Sorensen B and Ternes TA (2003) Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environmental Science & Technology* 37:4021-4026.
- Andersen HR, Hansen M, Kjolholt J, Stuer-Lauridsen F, Ternes T and Halling-Sorensen B (2005) Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere* 61:139-146.
- Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A and Samperi R (2000) Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology* 34:5059-5066.
- Braga O, Smythe GA, Schafer AI and Feitz AJ (2005) Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology* 39:3351-3358.
- Budzinski H, Letellier M, Garrigues P and Le Menach K (1999) Optimisation of the microwave-assisted extraction in open cell of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and sediments - Study of moisture effect. *Journal of Chromatography A* 837:187-200.
- Carballa M, Omil F, Alder AC and Lema JM (2006) Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. *Water Science and Technology* 53:109-117.
- Céspedes R, Petrovic M, Raldua D, Saura U, Pina B, Lacorte S, Viana P and Barcelo D (2004) Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:697-708.

- Clara M, Kreuzinger N, Strenn B, Gans O and Kroiss H (2005) The solids retention time : a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research* 39:97-106.
- Clara M, Strenn B, Saracevic E and Kreuzinger N (2004) Adsorption of bisphenol-A, 17 beta-estradiol and 17 alpha-ethinylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere* 56:843-851.
- D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M and Samperi R (2003) Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of the Total Environment* 302:199-209.
- Gomes RL, Avcioglu E, Scrimshaw MD and Lester JN (2004) Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 23:737-744.
- Helaleh MIH, Al-Omar A, Nisar A and Gevaio B (2005) Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1083:153-160.
- Holbrook RD, Novak JT, Grizzard TJ and Love NG (2002) Estrogen receptor agonist fate during wastewater and biosolids treatment processes: A mass balance analysis. *Environmental Science & Technology* 36:4533-4539.
- Ivaschekkin P, Corvini PFX and Dohmann M (2004) Behaviour of endocrine disrupting chemicals during the treatment of municipal sewage sludge. *Water Science and Technology* 50:133-140.
- Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G and Sumpter JP (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology*. 32: 2498-2506.
- Johnson AC, Aerni HR, Gerritsen A, Gibert M, Giger W, Hylland K, Jurgens M, Nakari T, Pickering A, Suter MJF, Svenson A and Wettstein FE (2005) Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research* 39:47-58.
- Johnson AC, Belfroid A and Di Corcia A (2000) Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of the Total Environment* 256:163-173.
- Joss A, Andersen H, Ternes T, Rihle PR and Siegrist H (2004) Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. *Environmental Science & Technology* 38:3047-3055.
- Korner W, Bolz U, Sussmuth W, Hiller G, Schuller W, Hanf V and Hagenmaier H (2000) Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40:1131-1142.
- Kuster M, Lopez MJ, de Alda MJL and Barcelo D (2004) Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 23:790-798.
- Lange IG, Daxenberger A, Schiffer B, Witters H, Ibarreta D and Meyer HHD (2002) Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta* 473:27-37.
- Lee HB and Liu D (2002) Degradation of 17 beta-estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water Air and Soil Pollution* 134:353-368.
- Leridon H, Oustry P and Bajos N (2002) La médicalisation croissante de la contraception en France. *Population et Sociétés* 1-4.
- Miege C, Dugay J and Hennion MC (2003) Optimization, validation and comparison of various extraction techniques for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage



- sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 995:87-97.
- Muller M, Rabenoelina F, Balaguer P, Patureau D, Lemenach K, Budzinski H, Barcelo D, Lopez de Alda M, Kuster M, Delgenès JP and Hernandez-Raquet G (In press) Chemical and biological analysis of endocrine disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environmental Toxicology and Chemistry*
- Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K and Takada H (2006) Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research* 40:3297-3303.
- Petrovic M, Lacorte S, Viana P and Barcelo D (2002) Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *Journal of Chromatography A* 959:15-23.
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR and Sumpter JP (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology*. 8: 275-285.
- Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M and Sumpter JP (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science & Technology* 32:1559-1565.
- Servos MR, Bennie DT, Burnison BK, Jurkovic R, McInnis R, Neheli T, Schnell A, Seto P, Smyth SA and Ternes TA (2005) Distribution of estrogens, 17beta-estradiol and estrone, in canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment* 336:155-170.
- Ternes TA, Andersen H, Gilberg D and Bonerz M (2002) Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry* 74:3498-3504.
- Ternes TA, Bonerz M, Herrmann N, Löffler D, Keller E, Lacida BB and Alder AC (2005) Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC/tandem MS and GC/MS. *Journal of Chromatography A* 1067:213-223.
- Ternes TA, Herrmann N, Bonerz M, Knacker T, Siegrist H and Joss A (2004) A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K<sub>d</sub>) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research* 38:4075-4084.
- Ternes TA, Kreckel P and Mueller J (1999a) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of the Total Environment* 225:91-99.
- Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD and Servos M (1999b) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment* 225:81-90.

## II

La plate-forme de compostage considérée au cours de cette étude reçoit les boues déshydratées de la STEP étudiée dans la première publication. Les prélèvements de boues déshydratées étaient donc communs aux deux études. Le procédé utilisé assure le compostage des boues avec des co-déchets, au cours des phases successives de fermentation et de maturation. Des prélèvements aux différentes étapes du procédé ont été réalisés lors de deux campagnes (octobre 2004 et avril 2005). Les co-déchets, entrant dans la composition du mélange initial, ont également été échantillonnés : déchets verts et refus de criblage. Les mesures d'œstrogènes et d'activités œstrogéniques ont été réalisées comme indiqué dans les publications précédentes. De plus, deux autres activités endocriniennes ont été suivies : l'activité sur le récepteur aux dioxines (AhR) et sur le récepteur aux prégnanes X (PXR). Parallèlement, dans le cadre d'un projet ADEME/Région Languedoc-Roussillon faisant intervenir le LBE, Veolia et le Creed, de nombreux autres micropolluants ont été quantifiés sur les mêmes échantillons. Ces micropolluants étaient les alkylbenzenes sulfonates linéaires (LAS), les NPE, les PCB, les HAP, les PAE, les dioxines/furanes (PCDD/F) et les organohalogénés (AOX), susceptibles d'être impliqués dans les activités endocriniennes mesurées.

Comme nous l'avons vu dans la première publication, la concentration totale des œstrogènes dans les boues de la STEP variait de 10 à 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de matière sèche (DM), mais l'activité œstrogénique n'avait pas pu être mesurée. Par contre, les activités AhR et PXR étaient relativement élevées, respectivement, de l'ordre de 4-5 et 100-500 mg équivalent dioxine ou SR12813/ $\text{kg}_{\text{DM}}$ . Par comparaison, l'ensemble des micropolluants analysés était en accord avec les résultats de la littérature et respectait les normes des directives européennes. Selon les concentrations, trois groupes se sont distingués : les LAS et AOX (100  $\text{mg}/\text{kg}_{\text{DM}}$ ), les NPE et PAE (15  $\text{mg}/\text{kg}_{\text{DM}}$ ) et les HAP, PCB et PCDD/F (< 1  $\text{mg}/\text{kg}_{\text{DM}}$ ). Concernant les co-déchets, des concentrations en micropolluants (excepté pour les œstrogènes) du même ordre de grandeur que dans les boues ont été mesurées. En conséquence, les micropolluants ne sont pas dilués dans le mélange initial qui présentait généralement des teneurs similaires aux boues déshydratées. Pour les œstrogènes, les valeurs sont inférieures à la limite de détection. De la même manière, les trois types d'activités endocriniennes ont été détectés dans les co-déchets conduisant à des niveaux d'activité, dans le mélange initial, similaires aux boues.

Un bilan de masse a été réalisé pour chaque classe de micropolluants. Celui-ci a montré que les micropolluants étaient éliminés au cours du compostage (60-70%), essentiellement suite à l'étape de criblage qui s'intercale entre les phases de fermentation et de maturation. Ces deux étapes de traitement biologique présentaient un impact moins marqué et permettaient d'éliminer surtout les composés les plus biodégradables comme les NPE ou les LAS. Toutefois, malgré cette élimination partielle, la plupart des micropolluants se retrouvait davantage concentrée dans le compost final que dans le compost initial. Cette évolution s'expliquait par une élimination parallèle de la matière sèche au cours du procédé (55%).

Ainsi, même si en terme de flux, le procédé a un impact sur l'élimination des œstrogènes, les concentrations observées dans la boue et le mélange initial persistent dans le compost final. Parallèlement, les activités AhR et œstrogénique apparaissent se maintenir dans le compost final, alors que l'activité PXR tend à diminuer au cours du compostage.

Etant donné l'évolution globalement similaire des activités endocriniennes et des concentrations, il semblait intéressant de relier ces deux approches. Concernant l'activité œstrogénique, il apparaît que ni les œstrogènes (non détectés), ni les autres micropolluants ne sont assez concentrés pour expliquer les niveaux d'activités relevés. Cette activité pourrait donc être attribuée à des molécules non mesurées telles que les phytoœstrogènes ou d'autres xœstrogènes. La présence du BPA, notamment, pourrait être invoquée. Si l'on considère le potentiel relatif des PCCD/F, HAP, PCB et AOX sur AhR et leurs concentrations, ces derniers pourraient être en mesure d'expliquer l'activité dioxin-like détectée. Enfin, pour ce qui est de l'activité PXR, comme dans le cas de l'activité œstrogénique, les composés mesurés ne semblent pas contribuer significativement à cette activité. Ainsi, des composés non suivis, tels que des composés pharmaceutiques ou les phytoœstrogènes, peuvent être suspectés.

En conclusion, cette étude donne un aperçu des concentrations dans les boues d'un vaste panel de perturbateurs endocriniens, en même temps que les niveaux d'activité sur trois récepteurs humains. Auparavant, aucune étude n'avait suivi les œstrogènes et des activités endocriniennes au cours du compostage de boues d'épuration. Pour les xœstrogènes, seulement une à deux familles avaient été suivies en parallèle. Les résultats ont montré que les co-déchets, tels que les déchets verts, peuvent influencer autant que les boues sur la qualité du compost produit. Le compostage apparaît abattre les micropolluants similairement à la matière sèche, essentiellement au cours du criblage, parfois, lors des étapes biologiques. Néanmoins, les concentrations en micropolluants et les activités endocriniennes persistent dans le compost final. La difficulté de corrélérer parfaitement les activités aux composés dosés souligne la nécessité de combiner l'évaluation chimique et biologique. D'autres travaux seraient aussi à envisager afin de disposer des connaissances nécessaires à la détermination du rôle de chaque classe de composés dans les activités endocriniennes mesurées.

## FATE OF ORGANIC MICROPOLLUTANTS AND ENDOCRINE DISRUPTING ACTIVITIES DURING BIOSOLIDS COMPOSTING

D. Patureau\*, G. Hernandez-Raquet\*, M. Muller\*, S. Dagnino\*\*, P. Balaguer\*\*, N. Delgenes\*, Lhoutellier C\*\*\* and JP. Delgenes\*

\*INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France

(E-mail: [patureau@supagro.inra.fr](mailto:patureau@supagro.inra.fr); [hernandg@supagro.inra.fr](mailto:hernandg@supagro.inra.fr))

\*\*INSERM U824, Montpellier, F-34298, Univ Montpellier 1, Montpellier, F-34060, France

(E-mail: [p.balaguer@valdorel.fnclcc.fr](mailto:p.balaguer@valdorel.fnclcc.fr))

\*\*\*Centre de Recherche sur la Propreté, Veolia Environnement, Limay, F-78520, France

(E-mail: [Claire.LHOUTELLIER@veolia.com](mailto:Claire.LHOUTELLIER@veolia.com))

(En préparation)

---

**Abstract** Land application of composted biosolids, which assure the recycling of nutrients for crops, is of growing concern. However, due to their adverse impact to the environment, the presence of organic micropollutants in biosolids decreases interest for this disposal route. Hence, it is important to assess the chemical and toxicological quality of biosolids, as well as, the removal of organic micropollutants and their toxicity through composting. Therefore, estrogens (E), nonylphenol ethoxylates (NPE), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), polychlorinated biphenyls (PCB), polychlorodibenzodioxins/furans (PCDD/F), phthalic acid esters (PAE), organohalogens (AOX), and linear alkyl benzene sulfonates (LAS) were quantified by chemical analysis during biosolids and green waste co-composting. Simultaneously, endocrine disrupting activities were measured using estrogen (ER $\alpha$ ), dioxin-like (AhR) and pregnan X receptor (PXR) gene reporter assays. The green waste was involved to the same extent that biosolids in the input load of contaminants and toxicity. Mass balance showed a positive impact of the aerobic treatment on the removal of the most degradable pollutants. However, some pollutants concentrations were higher in the final compost than in biosolids due to dry matter reduction. Consequently, estrogenic and AhR activities remained constant during composting whereas PXR activity slightly decreased. The difficulty to correlate chemical and toxicological results underlines the need to combine both approaches to improve compost quality assessment.

**Keywords** composting; sludge; organic pollutants; endocrine disrupters; nuclear human receptors; toxicity

## INTRODUCTION

The intensive use of wastewater treatment in Europe has resulted in production of huge amounts of sewage sludge, also named biosolids (9 millions tons of dry matter for 2005, corresponding to a 50% increase in 10 years). This increase of amount remains a challenging problem for the wastewater treatment plant (WWTP) managers since they have to find efficient and sustainable solutions for disposal. The EU Urban Wastewater Directive (91/271/EEC) and the Sewage Sludge Directive (86/278/EEC) seek to favour the use of sewage sludge in agriculture. This waste could be, with great advantage, recycled and used in farmland as fertilizers and as soil improving components. The Sewage Sludge Directive (86/278/EEC) encourages also several processes for sewage sludge treatment before disposal in order to ensure stabilisation and sanitation. Composting is one of these processes. It is an effective aerobic bioprocess for converting sewage sludge to stable organic matter. Mesophilic and thermophilic biological reactions, occurring during the process, lead also to the sanitation, drying and increase of the agronomic value of the sludge (Buyuksonmez *et al.*, 1999). In France, 60% of the produced urban sewage sludge (900 000 t/year dry matter) is reused for agricultural land application, but only 10% is composted. Due to the environmental and economical advantages of the land application, compared to incineration or landfilling, combined to the hardness of the European legislation about the waste, an increase of the sewage sludge composting practice is expected. In addition, a French regulation (AFNOR, NFU 44-095, 2004) has recently promoted the compost from waste to added value product. However, one of the harmless criteria for using composted sludge in agriculture is the presence of toxic organic micropollutants. Indeed, sewage sludge and resulting composts can contain small amounts of hazardous components, which may have adverse effects on the ecosystems. In fact, chemical pollution resulting from atmospheric washout, traffic emission, pesticides application, industrial production, use of household chemicals, personal care products and pharmaceuticals, are numerous sources for organic micropollutants to WWTP. All this contaminants ended up in sewage sludge. Among these compounds, nonylphenol ethoxylates (NPE), used as emulsifying agents; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), derived from incomplete combustion; polychlorinated biphenyls (PCB), used as hydraulic and heat transfer fluids; linear alkylbenzene sulfonates (LAS) used in household detergents; and phthalic acid esters (PAE) used in plastics have been recently identified as major anthropogenic organic contaminants present in sewage sludge (Petrovic and Barcelo, 2000). There is a special public concern about these pollutants, which may have a potential for acute toxicity, mutagenesis, carcinogenesis, teratogenesis or endocrine disrupting effects (Bogh *et al.*, 2001; Denison, 2003; Kretschmer and Baldwin, 2005, Pillon *et al.*, 2005). Thus, their presence in sewage sludge and their fate during the composting process, as well as, their associated toxic effects is of particular interest.

Up to now, scientific papers refer mainly to the presence of such pollutants in the sewage sludge. The levels reported in Table 1 differ due to various analytical methodologies, type of WWTP and stabilisation processes (anaerobic digestion, composting or lime addition). However, it seems that some compounds were found at very high level (LAS, 1 to 10 g/kg<sub>DM</sub>), other, at medium level (NPE and PAE, 50 to 400 mg/kg<sub>DM</sub>) and finally, other from low to very low level (PAH, PCB, estrogens, pesticides and PCDD/F, from mg to ng/kg<sub>DM</sub>).

**Table 1. Range of concentrations for mains groups of organic pollutants found in sludge (mg/kg<sub>DM</sub>, DM dry matter), considering that each group is a sum of molecules, e.g. 16 PAH, 7 PCB. The PCDD/F are expressed in ng TEQ/Kg<sub>DM</sub>.**

Groups	Germany	U.K.	France	USA	Switzerland	Greece	Canada
LAS/LAB	5000	11000	2000-9000		800-6000		
NPE	500	1000	10-400		890		13-1600
PAE	0.7-80 ; 66-480		20-120	3-170			2.5-80
PAH		18-125	0.3-2.6	0.02-250			0.3-30
PCB	0.43-4.5	0.5-1.2	0.006-0.15	0.7-5.3		0.4-0.6	
PCDD/F		19-206					
Estrogens	0.04						
Chloro-pesticides				0.02-2.8		0.001-0.04	

**Hall, 1995; Wild and Jones, 1992; Berti and Jacobs, 1996; Webber and Lesage, 1989; Bennie et al., 1998; Katsoyiannis and Samara, 2005; Zurmuhl, 1990; Ternes et al., 2002; Bennie, 1999; Giger et al., 1984; Brunner et al., 1988; Sewart et al. 1995.**

Despite a lot of information existing about the presence of micropollutants in sludge, little is known about their behaviour during composting process. Prats *et al.* (1999) demonstrated a 100% elimination of LAS during real-scale composting. Jones and Westmoreland (1998) and Moeller *et al.* (2003a), who worked with different sludge, highlighted nonylphenol (NP) accumulation during composting, particularly under thermophilic condition. Some studies that focused on contaminated soil composting demonstrated the potential of this process for PAH bioremediation (Potter *et al.*, 1999). Conversely, this process seemed to have a relatively low impact on PCB removal as mentioned by Lazzari *et al.* (1999). Only Moeller *et al.* (2003a) have considered the possible interaction between pollutants but reported no influence of PAE and PAH on LAS degradation in a composting system. In summary, several papers showed the potential impact of composting process on one or two pollutants removal mainly at lab-scale. It is thus important to have a better overview of sewage sludge and compost quality in terms of multiple organic micropollutant contents and toxicity potential. Moreover, information about the impact of a real-scale composting process on the micropollutants and toxicity removal is needed. For this purpose, the fate of height pollutant families and three of their associated toxic effects were assessed at different steps of an industrial-scale sludge composting process. Concentrations of estrogens (4 compounds), NPE (3 compounds), PAH (14 compounds), PCB (7 compounds), LAS (4 compounds), PAE (6 compounds), dioxins/furanes (PCDD/F) and organo-halogens (AOX) were determined at different steps of a composting process using chemical analysis. Simultaneously, endocrine disrupting activities

were measured using responsive cell lines for the estrogen, dioxin-like and pregnan X receptors (ER $\alpha$ , AhR and PXR, respectively).

## METHODS

### Composting process and sampling procedure.

The composting platform studied receives secondary sludge from an advanced sewage treatment plant of 120,000 people-equivalents. This plant uses activated sludge process and achieves carbon, nitrogen and phosphorous removal. For composting, mechanical dehydrated sludge is mixed with green waste and sifting refuse (25:25:50%, w/w/w<sub>DM</sub>) and submitted to ventilated fermentation during 4 weeks. The compost is then sieved (15 mm) and kept until maturity for 8 weeks. After maturing, the compost is stored for 3 months with frequent water spraying. The final product is used in agricultural soils as fertiliser. Composite samples of dehydrated sludge (DS), starting mixture (SM), end of fermentation (EF), beginning of maturing (BM), end of maturing (EM), and final compost after storage (FC) were manually taken. DS and SM correspond to 80 elementary 1L samples taken during the week of swath formation. EF and BM correspond to 80 elementary 1L samples taken during the sifting process. EM and FC correspond to 40 elementary 1L samples taken at 5 different heights and 8 different lengths on a trench in the middle of the swath. All samples were homogenised and fractionated until reaching 10L. This sampling procedure was realised at two periods, fall 2004 and spring 2005.

### Extraction procedure.

Organic pollutants were extracted as described by Cespedes *et al.* (2004) and Trably *et al.* (2004). Sludge and compost samples were freeze-dried and sieved (2 mm). Extractions were made in triplicate and duplicate, respectively, for chemical and biological analysis. For estrogens analysis, 1 g of solid matrix were mixed with sodium sulphate and extracted with methanol/acetone (1:1, v/v) in an accelerated solvent extractor (ASE 200, Dionex). Before extraction, samples were spiked with internal standard (E2-*d*<sub>4</sub> and EE2-*d*<sub>4</sub>). The organic extracts were concentrated to 2 mL (nitrogen stream) and dissolved in 200 mL of milliQ water. These aqueous solutions were then extracted and purified in solid phase extraction (SPE) as described by Labadie and Budzinski (2005). For NPE, PAH, LAS and PCB, from 0.5 to 1.5 g of solid matrix were mixed with alumine (excepted for LAS) and hydromatrix before extraction in ASE with hexane/acetone (1:1, v/v) for NPE, PAH and PCB or methanol for LAS. The organic extracts were then dried (nitrogen stream) and dissolved in an accurate volume of appropriate solvent according to the analytical conditions for the considered compounds. PAE were extracted using Soxhlet and hexane, followed by Florisil purification. PCDD/F and AOX were extracted according to the standard methods NF EN 1948-2,3 and NF EN 1485, respectively. For *in vitro* bioassays, 1g of solid matrix were mixed with sodium sulphate and successively extracted in ASE with methanol/acetone (1:1, v/v) and

hexane/acetone (1:1, v/v). Both organic extracts were gathered, dried (nitrogen stream) and dissolved in 2 mL of methanol.

### Chemical analysis

Estrogens analysis was achieved on a GC-MS system (XL autosystem turbomass gold, Perkin-Elmer) equipped with a Elite 5MS capillary column (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness, Perkin Elmer) as described by Labadie and Budzinski (2005). The recovery rates of analytes ranged from 91 to 132 % and limit of detection (LOD), from 1 to 3 µg/kgDM. The LAS, PAH and NPE were measured using HPLC-FLD system (controller 600, Autosampler 770, Detector 2475, Waters) according to Patureau et al. (2007). Reverse phase columns were used for PAH (C18 Bakerbond™ PAH 16-Plus, J.T.Baker) and LAS (LC-8 DB, Supelco) while NPE separation was performed on a normal phase column (Purospher® STAR NH<sub>2</sub>, Merck). Recoveries towards a certified matrix (VKI, QC Organic components in municipal sewage sludge, Promochem) were 78 to 108 ± 5 % for PAH, 35 to 130 ± 5 % for NPE and 108 to 157 ± 5 % for LAS. LOQ were 2, 7.5 and 50-100 µg/kgDM for PAH, NPE and LAS, respectively. The PCB were quantified in GC-ECD equipped with a capillary column, according to the norm XP X33-012, with a LOQ at 0.1 µg/kgDM. The PAE and PCDD/F were quantified by GC-MS; AOX by coulometry. The LOQ were 5 and 100 mg/kgDM for PAE and AOX; 3 ng I-TEQ/kgDM for PCDD/F.

### In vitro bioassays

The ER $\alpha$  responsive cell line (MELN) was obtained by transfecting ER- $\alpha$  positive breast cancer MCF-7 cell line with the estrogen responsive element cloned upstream of the luciferase reporter gene construct ERE- $\beta$ Glob-Luc-SVNeo (Balaguer *et al.*, 1999). The AhR responsive cell line (HAhLP), used to detect dioxin receptor-mediated activity, was obtained by transfecting HeLa cells with the XRE-tk-Luc and pSG5-puro plasmids (Pillon *et al.*, 2005). The PXR responsive cell line (HG5LN PXR) was obtained by transfecting HG5LN cells (derived from HeLa cells and containing a constitutively expressing luciferase downstream of Gal4RE<sub>5</sub>- $\beta$ Glob) with Gal4 (DBD) - hPXR (LBD) plasmid (Lemaire *et al.*, 2006). Sample extracts were applied at different concentrations up to 0.3 % (v/v) in test culture medium of the cells, 1 day after seeding, in 96-well white opaque tissue culture plates (5x10<sup>4</sup> cells per well). Cells were incubated for 8h except for MELN cells, which were incubated for 24h. Experiments were performed in triplicate. The effector-containing medium was then removed and replaced by a medium containing 0.3 mM of luciferin. Luciferin diffuses into the cell and produces a stable luminescent signal. The activation of ER- $\alpha$ , AhR and PXR was proportional to the cell luminescence, measured for 2 sec in a microplate luminometer (Microbeta Wallac, Perkin Elmer). Activation by sample extracts was expressed as the percentage of the maximum receptor activation in the presence of reference ligand at saturating concentration: 10 nM E<sub>2</sub>, 100 nM dioxin, and 1 µM SR12813, in MELN, HAhLP, and HG5LN PXR cells,



respectively. In parallel, tests were performed to ascertain that agonistic activities were specific. EC<sub>50</sub> values were calculated from the dose-response curves fitted using the sigmoidal dose-response function of a graphics and statistics software (Graph-Pad Prism, version 4.0, 2003, Graphpad Incorporated). The sample activities were expressed as mass of reference ligand equivalent per Kg<sub>DM</sub>. It is the ratio of the EC<sub>50</sub> values of sample extracts to the EC<sub>50</sub> values of the reference compounds, taking into account the concentration fold of the extract over the crude sample. Reference EC<sub>50</sub> values were taken from published results: 17.6 pM for E2 in MELN cells, 1.6 nM for Dioxin in HAHLp (Pillon *et al.*, 2005) and 0.14 µM for SR12813 in HGPXR cells (Lemaire *et al.*, 2004).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Pollutants in sewage sludge and compost

The pollutants concentrations, summarised in Table 2, give a good overview of the composition of dehydrated sewage sludge from an advanced French wastewater treatment plant receiving mainly domestic inputs. No statistical differences are observed between the two periods (t-test,  $p < 0.05$ ). The concentration ranges for each compound are slightly lower than the average European values. Nevertheless, they follow the general European trend showing high levels of LAS and AOX (around 100 mg/kg<sub>DM</sub>), medium levels of NPE and PAE (15 mg/kg<sub>DM</sub>) and low levels of PAH (1000 µg/kg<sub>DM</sub>), PCB (100 µg/kg<sub>DM</sub>), estrogens (15 µg/kg<sub>DM</sub>) and PCDD/PCDF (10 ng/kg<sub>DM</sub>). These values are also largely lower than those listed in the third draft of the future EU Sludge Directive for agricultural land application (2600, 500, 100, 50, 6, 0.8, 0.1 mg/kg<sub>DM</sub> for respectively LAS, AOX, PAE, NPE, PAH, PCB and PCDD/F). Very similar results were found by Paulsrud *et al.* (1998) during a survey in Norwegian sewage sludge. Abad *et al.* (2005), who studied sludge samples from different Catalan WWTPs, found that NPE values ranged from 14.3 to 3150 mg/kg<sub>DM</sub>, PAH values from 0.03 to 16 mg/kg<sub>DM</sub> and PCB values from 3 to 348 µg/kg<sub>DM</sub>. Similarly, higher estrogens concentrations, ranging from 10 to 50 µg/kg<sub>DM</sub>, were found in German sludges by Ternes *et al.* (2002).

**Table 2. Pollutants concentrations in dehydrated sludge, starting mixture and final compost. Dehydrated sludge concentrations are average values on nine extractions. Starting mixture and final compost concentrations are average values on three extractions. PAH, PCB and E concentrations are given in µg/kg<sub>DM</sub> whereas LAS and NPE in mg/kg<sub>DM</sub>. \*Sum of NPE is given on NP molar equivalent.**

Compounds		Dehydrated sludge		Starting mixture		Final compost	
		Fall 2004	Spring 2005	Fall 2004	Spring 2005	Fall 2004	Spring 2005
LAS mg/kg <sub>DM</sub>	C10	3.2 ± 0.7	8.2 ± 0.02	26.5 ± 3	7.3 ± 0.3	18.8 ± 1	9.9 ± 0.1
	C11	28 ± 3	27.3 ± 5	173.5 ± 28.5	34.8 ± 1	61.6 ± 3	49.2 ± 5
	C12	48 ± 7	47 ± 7	214.5 ± 12	46.5 ± 2	96.9 ± 6	71.4 ± 6
	C13	56 ± 7	57 ± 7	185.5 ± 14	39.9 ± 1	87.6 ± 4	64.6 ± 6
	Sum	134.7 ± 17	146.5 ± 28	600 ± 57	128.6 ± 5	265 ± 14	195.2 ± 18
NPE mg/kg <sub>DM</sub>	NP2EO	4.7 ± 1	3.7 ± 1	4.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2	< 1	1.7 ± 0.01
	NP1EO	8.6 ± 2	6.1 ± 0.5	10.5 ± 1	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.03	3 ± 0.01

Compounds	Dehydrated sludge		Starting mixture		Final compost		
	Fall 2004	Spring 2005	Fall 2004	Spring 2005	Fall 2004	Spring 2005	
NP	2.9 ± 0.6	2.6 ± 0.04	4.7 ± 0.1	2.5 ± 0.3	10.3 ± 0.4	4.4 ± 0.2	
Sum*	13.5 ± 2.7	10.4 ± 1.2	17 ± 1	6.4 ± 1	13.1 ± 0.4	8.1 ± 0.2	
PAH μg/kg <sub>DM</sub>	Phe	34 ± 4	52 ± 13	333.5 ± 13	250 ± 4	332 ± 3	326 ± 8
	Fluor	92 ± 15	93 ± 43	181 ± 2	218 ± 9	382 ± 4	365 ± 4
	Pyr	221 ± 6	239 ± 15	301 ± 6	179 ± 1	334 ± 13	369 ± 7
	B(b)fluor	122 ± 7	124 ± 10	66 ± 2	46 ± 1	93 ± 2	70 ± 4
	B(a)pyr	115 ± 6	105 ± 6	52 ± 1	39 ± 1	49 ± 5	40 ± 2
	B(g,h,i)peryl	109 ± 9	131 ± 9	72 ± 2	39 ± 1	69 ± 6	54 ± 1
	Sum	894 ± 66	1024 ± 138	1230 ± 25	936 ± 18	1590 ± 33	1540 ± 26
PCB μg/kg <sub>DM</sub>	52	24.7 ± 13	10.5 ± 0.6	8.4 ± 0.06	7.4	21.3 ± 7.5	19.5
	101	16.3 ± 12	14 ± 0.5	19.4 ± 2	9.6	38.3 ± 3	22.2
	118	24.9 ± 10	10.8 ± 0.5	12.6 ± 1	7	27.1 ± 1	15.7
	153	19.7 ± 6	11.7 ± 0.3	16.2 ± 2	8	29.8 ± 0.1	17
	Sum	119.5 ± 35	67 ± 1.5	90 ± 6	49	170 ± 11	100
E μg/kg <sub>DM</sub>	E1	3.5 ± 0.8	5.7 ± 1.5	< 2	< 2	< 2	< 2
	E2	2.1 ± 1.2	5.2 ± 2.6	< 2	< 2	< 2	< 2
	E3	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	EE2	4.8 ± 3.2	10.1 ± 4.8	< 3	< 3	< 3	< 3
	sum	10.4 ± 5.2	21 ± 8.9	< 8	< 8	< 8	< 8
PAE mg/kg <sub>DM</sub>	sum	19.9 ± 2	11.4 ± 3	11.0 ± 0.1	4.4 ± 1	8.5 ± 1	15.0 ± 1
PCDD/F ng	sum	15.5 ± 5	8.1 ± 1	11.1 ± 1	6.0 ± 1	15.0 ± 1	12.0 ± 1
I-TEQ/kg <sub>DM</sub>	sum	15.5 ± 5	8.1 ± 1	11.1 ± 1	6.0 ± 1	15.0 ± 1	12.0 ± 1
AOX mg/kg <sub>DM</sub>	sum	226.0 ± 30	336.0 ± 50	143.0 ± 1	121.0 ± 5	107.0 ± 10	200.0 ± 30

In the present study, the starting mixture (SM) is a mixture of the dehydrated sludge (DS) with green waste and sifting refuse from previous compost series in ratio of, respectively, 25:25:50% (w/w/w<sub>DM</sub>). It means that the pollutants measured in the sludge may be diluted in the starting mixture. Since estrogens concentrations in DS were just above the LOD (1-3 μg/kg<sub>DM</sub>) and sludge is four fold diluted in the SM, estrogens concentration in the starting mixture was found below the LOD. For the other pollutants, the pattern was different between DS and SM, showing higher concentrations for LAS and PAH in SM, particularly in fall (Table 2). The LAS concentration in the SM is 4.5 times higher than in the DS with a particular pattern LAS-C12 > LAS-C13 ≥ LAS-C11 >> LAS-C10 whereas in DS, the pattern was LAS-C13 > LAS-C12 > LAS-C11 >> LAS-C10. The composition of the green waste, with LAS concentrations higher than in the sludge (between 300 and 700 mg/kg<sub>DM</sub>) and LAS-C12 as predominant compound, explained this behaviour. Similar behaviour was observed for PAH. Pyrene, Benzo(b)fluoranthene and Benzo(g,h,i)perylene (25, 14 and 12%, respectively), were the dominant PAH in DS, whereas Phenanthrene, Pyrene and Fluoranthene (27, 24 and 15%, respectively) were those of the starting mixture. The analysis of co-substrates showed PAH concentration to the same order of magnitude than DS. The NPE concentration in the starting mixture was equivalent to the DS one. However, the NPE profile was different with mainly NP2EO and NP1EO (85%) in DS while higher NP level (23%) was found in SM.

Conversely, PCB, PAE, PCDD/PCDF and AOX concentrations are lower in SM by comparison to DS level. The PCB pattern was slightly different but due to the high standard deviation of the PCB level in DS, statistical t-test showed no difference between the average values. This implies that for these compounds, the co-substrates have minor impact. However, the overall data reported here underlines the importance to consider that, in addition of DS, green wastes and other co-substrates-borne pollutants participate to the overall compost quality.

Nevertheless, at the end of the process, the pollutant concentrations fitted completely the levels fixed by the French rules NFU 44-095 for compost application on agricultural land, as well as, the levels proposed in the third draft of the future sewage sludge EU Directive. LAS levels in the final compost were either lower (fall) or higher (spring) than in the starting mixture. NPE, PAE, PCDD/PCDF and AOX levels did not really evolved during the process whereas PAH and PCB levels increased. In comparison, Abad *et al.* (2005) mentioned that their composted sludge were the less contaminated by NPE, with a mean value of 89.3 mg/kg<sub>DM</sub> and contained 100 to 1600 µg/kg<sub>DM</sub> PAH and 6 to 70 µg/kg<sub>DM</sub> PCB. Pausrud *et al.* (1998) have measured similar levels of LAS, PAH, PCB, PAE and PCDD/F as ours in samples of compost from source separated organic household waste. We observed also different patterns between the final compost and the SM, particularly for NPE and PAH. Indeed, NP and Fluoranthene were the main compounds of, respectively, the NPE and PAH families, contributing to 77 and 24% of the total amount in the final compost, against 23 and 15% in SM. This means that the composting process impacts on the fate of pollutants. However, due to dry matter reduction along the process, it is necessary to consider the mass balance to assess the real impact of composting on pollutants removal.

### **Impact of composting on pollutants removal**

Pollutant mass balance was calculated taken into account the initial pollutant mass for the different stages of the composting process, i.e. fermentation, sifting, maturing and storage. The Figure 1 shows the evolution of pollutant masses through composting. The sifting step corresponds to the elimination of the major size particles. This step contributed to a 55% removal of dry matter and a 60-70% removal of pollutants adsorbed on this fraction as illustrated by the sharp decrease of pollutants between the EF and BM samples (Figure 1).

The biological steps, i.e. fermentation, maturing and storage contributed also to the pollutants removal, particularly for the most biodegradable compounds. Globally, LAS was removed during the biological steps, either during fermentation phase (spring 2005) or maturing-storage phases (fall 2004). NPE was partially removed (between 20 and 50%) whereas PCB and PAH were not removed during biological stages (Figure 1). For the LAS, the most degradable compounds were the lower average molecular weight compounds (LAS-C10 and LAS-C11). Their removal rates (50-56%) were however lower than those (60 to 100%)

reported by Sanz *et al.* (2006). These authors demonstrated also a large influence of the compost temperature on the LAS removal rate with an optimum at 40°C. This may explain that LAS degradation was mainly observed during maturing-storage (mesophilic condition) in our composting system in comparison with fermentation (thermophilic condition). The NPE fate during composting was consistent with previous results. Indeed, the most aerobic biodegradable compounds (NP1EO and NP2EO) were removed during the biological steps of the process with a simultaneous production of NP. However, the mass balance showed a 20-50% removal when calculated on NP equivalent, suggesting a partial NP degradation. These results confirm those of Moeller and Reeh (2003b) who proposed that the composting process should be proceed through an extended mesophilic stage in order to ensure maximum NP degradation. No PAH nor PCB removal was observed. Indeed, it was found that the average values for all PAH in SM/EF group or BM/EM/FC group were similar (t-test,  $p < 0.05$ ). Statistical tests for average PCB values showed also no difference between SM/EF group or BM/EM group (t-test,  $p < 0.05$ ). However, the average quantities measured in FC were statistically different to those measured in EM, implying either higher bioavailability or problem of samples homogeneity. These results underlined that PCB and PAH were not significantly degraded and tend to concentrate in the final compost, due to the degradation of organic mater during composting (Table 2). Similar results were also obtained by Lazzari *et al.* (1999) for PCB and high molecular weight PAH.

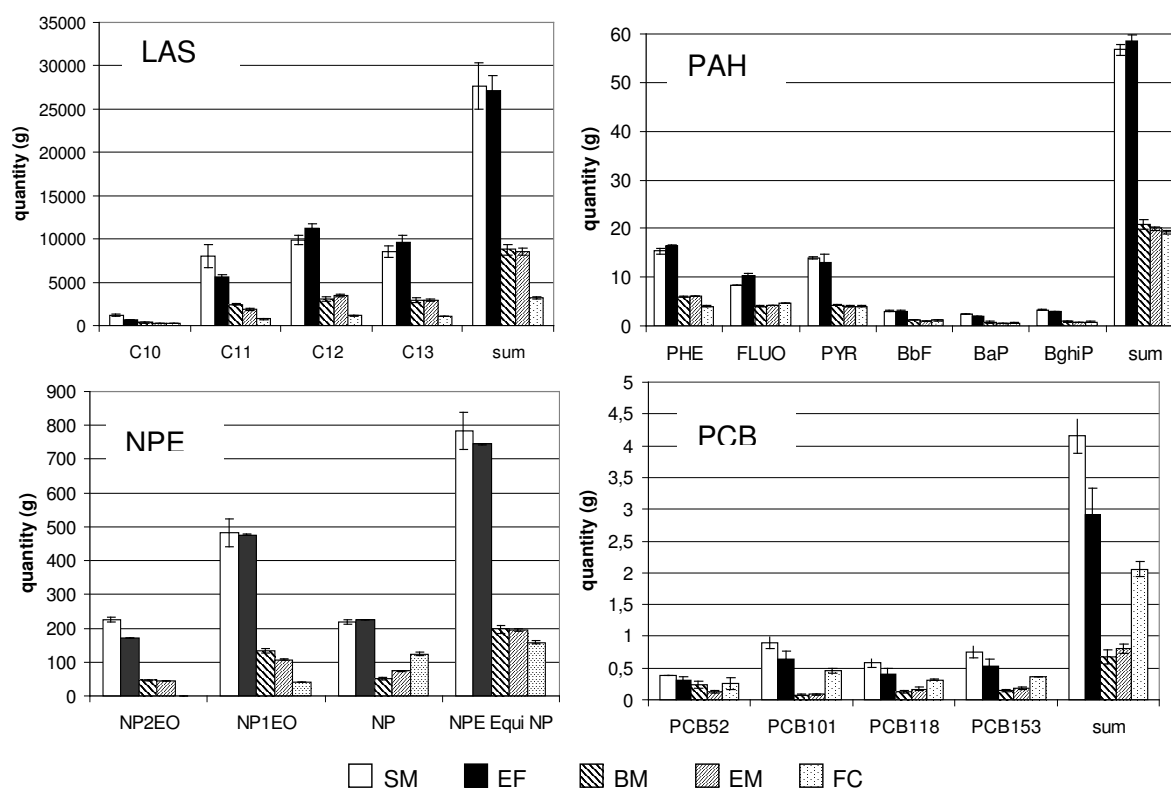


Figure 1. Pollutant quantities evolutions during composting process in fall. SM, starting mixture, EF, end of fermentation, BM, beginning of maturing, EM, end of maturing, FC, final compost after storage.

## Toxicity assessment

Table 3 shows the endocrine disrupting activities on ER $\alpha$ , AhR and PXR for the dehydrated sludge and others co-substrates, as well as, for starting mixture. Results are expressed in Eq E2  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{DM}}$ , Eq Dioxine  $\text{mg}/\text{kg}_{\text{DM}}$  and Eq SR12813  $\text{mg}/\text{kg}_{\text{DM}}$ . No estrogenic activity (ER $\alpha$ ) was found in DS due to cytotoxic effects of sludge extracts on cell lines, probably caused by some co-extracted compounds. However, the estrogens concentrations reported in sewage sludge should theoretically provide an estrogenic activity estimated at 15-30 Eq E2  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{DM}}$  (based on relative estrogenic potency and concentration of each molecules). In starting mixture, no cytotoxic effect was noticed, however, no estrogenic activity was detected. Amazingly, this activity was measured in co-substrates that constituted 75% of the SM (determined in spring only). So estrogenic activity should be at least around 15-20 Eq E2  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{DM}}$  in SM. The absence of estrogenic activity in SM may be explained either by a non-regular mixing, with more sludge inputs than expected (weak cytotoxicity), or a non-homogeneous sampling. Nevertheless, the results for co-substrates underlined the importance to consider their impact on the final compost quality.

Endocrine disrupting activities were measured at each stages of the process in spring (table 3). During fermentation, estrogenic activity increased, if considering measured values for SM, or decreased if considering theoretical values (about 20 Eq E2  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{DM}}$ ). No impact of the sifting, the maturation and the storage step was observed. The final compost was active in the MELN test with a higher level in fall (56 Eq E2  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{DM}}$ ) than in spring (10 Eq E2  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{DM}}$ ). This activity may be due either to the one measured in co-substrates that was not removed through the process or to the production of estrogenic metabolites during fermentation and maturing phase. In previous works, it was shown that, in sediments and sewage, estrogenic activity was strongly correlated to the presence of alkylphenol and estrogens, respectively (Fenet *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2008). Excepted in DS, where estrogenic activity was not detected, estrogens were always below LOD. In our samples, alkylphenol (NPE) and others anthropogenic chemicals concentrations were too low to imply significant estrogenic activity. Based on their relative estrogenic potencies (Matsui *et al.* 2000; Svenson *et al.* 2003; Cespedes *et al.* 2004; Pillon *et al.* 2005; Noguerol *et al.* 2006) and concentrations, activities from these compounds were expected below 0.5 Eq E2  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{DM}}$ . In this estimation, potency of AOX where assumed to be equivalent to the pesticide and PCB ones ( $10^{-6}$  versus E2). This matched with the absence of activity in SM but explained less than 4% of the detected activity in final compost. The differences may be due to unmeasured anthropogenic chemicals as bisphenol A (BPA), polybrominated biphenyl (PBB), pesticides (others than AOX group members) and octylphenol (OP). Moreover, natural phytoestrogens supplied by green waste also showed estrogenic activity (Pillon *et al.*, 2005). Content of phytoestrogens, as lignan or isoflavone, was essentially investigated for crop plant and vegetable food. Concentrations in such samples, ranging from 20 to 45000  $\text{mg}/\text{kg}_{\text{DM}}$ , were homogeneous among all part of the

plant (Sivesind and Seguin, 2005; Penalvo et al. 2008). Assuming roughly that phytoestrogens content in green waste was 1000 mg/kg<sub>DM</sub>, associated estrogenic activity was estimated around 100 Eq E2 µg/kg<sub>DM</sub> (relative estrogenic potency of 10<sup>-4</sup> versus E2). According to the dilution of green waste with others co-substrates (25%), it should resulted in a value around 25 Eq E2 µg/kg<sub>DM</sub> in SM. Such activity level was not detected in SM but it reached in FC (10-56 µg/kg<sub>DM</sub>). So phytoestrogens present in green waste may be sufficient to explain estrogenic activity of positive tested samples. Moreover, because estrogenic activity was constant from end of fermentation to final compost, it suggested that phytoestrogens were removed similarly than dry matter during composting (55%).

**Table 3. Endocrine disrupting activities (ER $\alpha$ , AhR and PXR) of dehydrated sludge (DS), green waste (GW), sifting refuse (SR), end of fermentation (EF), beginning of maturation (BM), end of maturation (EM) and final compost (FC). Fall values are highlighted in italic type while spring ones, in bold type. Process train is reminded below the values.**

Assays	DS		GW	SR	SM		EF	BM	EM	FC	
	<i>fall</i>	<b>spring</b>	<b>spring</b>		<i>fall</i>	<b>spring</b>		<b>spring</b>		<i>fall</i>	<b>spring</b>
ER (Eq E2 µg/kg <sub>DM</sub> )	<i>None</i>	<b>None</b>	<b>31</b>	<b>24</b>	<i>None</i>	<b>None</b>	<b>11 ± 1.2</b>	<b>10 ± 0.1</b>	<b>10 ± 0.8</b>	<i>56 ± 37</i>	<b>10 ± 3</b>
AhR (Eq Dioxine mg/kg <sub>DM</sub> )	<i>5 ± 1</i>	<b>4 ± 2.4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<i>7 ± 0.7</i>	<b>7 ± 2.3</b>	<b>3.5 ± 0.3</b>	<b>7 ± 0.3</b>	<b>6 ± 0.5</b>	<i>7 ± 0.4</i>	<b>4.5 ± 0.5</b>
PXR (Eq SR12813 mg/kg <sub>DM</sub> )	<i>89 ± 73</i>	<b>550 ± 210</b>	<b>440</b>	<b>320</b>	<i>1130 ± 380</i>	<b>680 ± 100</b>	<b>530 ± 50</b>	<b>310 ± 10</b>	<b>330 ± 10</b>	<i>180 ± 10</i>	<b>360 ± 50</b>
	← Co-substrates →		Grinding ↓ Mixing		← Thermophilic stage →		Sifting ↓	← Storage →		← Mesophilic stage →	

Dioxin-like or AhR activity was observed at similar levels in DS and other co-substrates, indicating that ligands were widespread in sludge as in green waste (Table 3). Level in SM was slightly higher than in co-substrates. Mechanical action of grinding stage, that lead to higher extractability of compounds, or larger proportion of sludge, which shown the strongest activity, in initial mix may explain such difference. This may result also of synergy effect from organic pollutants association when mixing co-substrates. Fermentation appeared to reduce dioxin-like activity but sifting increased it to initial levels. A slightly decreased was observed through maturation and storage in spring, but in fall, similar levels were found for both SM and FC. Behaviour of dioxin-like activity suggested that AhR ligands were not markedly affected by composting. This activity could be linked to PAH, PCB, PCDD and AOX levels. These pollutants were common pollutants of wastewater and atmosphere and could be expected in sludge, as well as, in green waste, mainly bound to thin particles. Taking into accounts their concentrations and relative dioxin-like potencies, they found to explain most of this toxicity (2-4 Eq Dioxin mg/kg<sub>DM</sub>). Similar potency of 1 was assumed for PAH, PCB and PCDD/PCDF to achieve this estimation, while potency of AOX was equated with one of pesticides (10<sup>-4</sup>). Moreover, the persistence of these pollutants along the composting converged with the persistence of dioxin-like activity.

PXR activity was detected in sewage sludge and co-substrates at the same order of magnitude (300-500 Eq SR12813 mg/kg<sub>DM</sub>) excepted in DS fall sample (Table 3). As for dioxin-like activity, PXR activity was slightly higher in SM with value closer than sludge one than co-substrates ones. Amazingly, in fall, activity of SM is higher than in spring while sludge showed the lowest activity among both seasons. Similar assumption than for dioxin-like activity could be made to explain increase of activity when mixing the co-substrates. Fermentation stage did not modify the PXR activity conversely to sifting that decreased level of activity. No influence of the maturation-storage steps was found. Finally, the PXR activity in FC was lower than in SM in both sampling periods. So the compounds involved in this activity may be degraded during the process. Alkylphenols and PCB have been described as PXR ligands (Mnif *et al.*, in press; Tabb *et al.*, 2004). Estrogens, PAE and AOX were also able to activate PXR (Moore *et al.*, 2000; Hurst and Waxman 2004; Lemaire *et al.*, 2006). However, their concentrations did not markedly decreased during the composting process; they have found to be responsible of less than 10% of the measured activity. However, AOX potency was roughly equated with pesticides ones, moreover, NPE and PCB relative potency for PXR activation were lacking. Thus, PXR activity may be linked to NPE or other compounds not measured in this study as BPA or pharmaceuticals.

## CONCLUSIONS

These results give an overview about the fate of several pollutants during the stabilisation of sludge by composting. They underline the importance to consider the co-substrates as possible source of pollutants, as was confirmed by bioassays. This study also demonstrates that the most degradable compounds could be removed by the different phases of the composting but due to dry matter reduction, their concentrations generally increased through the process. Such behaviour led to the persistence, or minor variations, of endocrine disrupting activities during composting. However, the difficulties to correlate chemical and toxicological results, highlights the importance of combining both chemical and biological approaches in order to improve the assessment of process performances and compost quality. Roughly assumption has to be made to interpret the endocrine disrupting activities, that may led to bias. Consequently, future works are needed to better correlate the toxic activities and pollutant concentrations measured by chemical analysis. Biological activities could result from compounds binding the three receptors ER $\alpha$ , AhR or PXR or from a mixture of compounds binding one of the three receptors. A bio-specific extraction method of compounds binding to ER $\alpha$ , AhR or PXR, as already developed for ER $\alpha$  (Pillon *et al.* 2005), will be a useful tool to answer this question. Furthermore, the purification of contaminants through this procedure may improve the quantification of known endocrine disrupters, and, in conjunction with MS techniques, may lead to the identification of unknown active molecules.

## REFERENCES

- Abad E., Martinez K., Planas C., Palacios O., Caixach J. and Rivera J. (2005). Priority organic pollutant assessment of sludges for agricultural purposes. *Chemosphere*, 61(9), 1358-1369.
- Ahel M., W. Giger E. Molnar and S. Ibric. (2000). Determination of nonylphenol polyethoxylates and their lipophilic metabolites in sewage effluents by normal-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Croatica Chemica Acta*, 73, 209-227.
- Balaguer P., Francois F., Comunale F., Fenet H., Boussioux A. M., Pons M., Nicolas J. C. and Casellas C. (1999). Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *The Science of the Total Environment*, 233, 47-56.
- Bennie D.T., Sullivan C.A., Lee H.-B., Maguire R.J. (1998). Alkylphenol polyethoxylate metabolites in Canadian sewage treatment plant waste streams. *Water Quality Research Journal of Canada*, 33, 231-252.
- Bennie, D.T (1999) Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada*, 34(1), 79-122.
- Berti W.R., Jacobs L.W. (1996) Chemistry and phytotoxicity of soil trace elements from repeated sewage sludge applications. *Journal of Environmental Quality*, 25, 1025-1032.
- Bøgh I.B., Christensen P., Datntzer V., Groot M., Thøfner I.C.N., Rasmussen R.K., Schmidt M. and Greve T. (2001) Endocrine disrupting compounds: Effect of octylphenol on reproduction over three generations. *Theriogenology*, 55(1), 131-150.
- Buyuksonmez F., Rynk R., Hess T. F., and Bechinski E. (1999). Occurrence, degradation and fate of pesticides during composting - Part I: Composting, pesticides, and pesticide degradation. *Compost Science & Utilization*, 7, 66-82.
- Brunner P.H., Capri S., Marcomini A. and Giger W. (1988) Occurrence and behaviour of linear alkylbenzene sulphonate, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. *Water Research*, 22(12), 1465-1472.
- Cespedes R., Petrovic M., Raldua D., Saura U., Pina B., Lacorte S., Viana P. and Barcelo D. (2004). Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 697-708.
- Denison M.S., Nagy S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43, 309-334.
- Fenet H., Gomez E., Pillon A., Rosain D., Nicolas J.C., Casellas C. and Balaguer P., (2003). Estrogenic activity in water and sediments of a French river: contribution of alkylphenols. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 44, 1-6.
- Giger W., Brunner P.H. and Schaffner C. (1984) 4-nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from non-ionic surfactants. *Science*, 225, 623-625.
- Hall, J.E. (1995) Sewage Sludge Production, Treatment and Disposal in the European Union. *Journal of the Institution of Water and Environmental Management*, 9, 335-343.
- Hurst CH and Waxman DJ (2004) Environmental phthalate monoesters activate pregnane X receptor-mediated transcription. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199:266-274.
- Katsoyiannis A. and Samara C. (2005) Persistent organic pollutants (POPs) in the conventional activated sludge treatment process: fate and mass balance. *Environmental Research*, 97, 245-257.
- Jacobsen A. M., Mortensen G. K. and Hansen C. B. (2004). Degradation and mobility of linear alkylbenzene sulfonate and nonylphenol in sludge-amended soil. *Journal of Environmental Quality*, 33, 232-240.



- Jones F.W. and Westmoreland D.J. (1998) Degradation of nonylphenol ethoxylates during the composting of sludge from wool scour effluents. *Environmental Sciences and Technology*, 32, 2623-2627.
- Kretschmer X.C., Baldwin W.S., (2005). CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters? *Chemico-biological interactions*, 155, 111-28.
- Labadie P. and Budzinski H. (2005). Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environmental Science and Technology*, 39, 5113-5120.
- Lazzari I., Spermi L., Salizzato M. and Pavoni B. (1999). Gas chromatographic determination of organic micropollutants in samples of sewage sludge and compost: behaviour of PCB and PAH during composting. *Chemosphere*, 38(8), 1925-1935.
- Lemaire G., de Sousa G. and Rahmani R. (2004). A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. *Biochemical Pharmacology*, 68(12), 2347-2358.
- Lemaire G., Mnif W., Pascussi J. M., Pillon A., Rabenoelina F., Fenet H., Gomez E., Casellas C., Nicolas J. C., Cavailles V., Duchesne M. J. and Balaguer P. (2006). Identification of New Human Pregnane X Receptor Ligands among Pesticides Using a Stable Reporter Cell System. *Toxicological Sciences*, 91(2), 501-509.
- Matsui S, Takigami H, Matsuda T, Taniguchi N, Adachi J, Kawami H and Shimizu Y (2000) Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment. *Water Science and Technology*, 42:173-179.
- Mnif W., Pascussi J.M., Pillon A., Escande A., Nicolas J.C., Bartegi A., Cavailles V., Duchesne M.J. and Balaguer P. (2007). Estrogens and antiestrogens activate hPXR. *Toxicology Letters*, In Press
- Moeller J. and Reeh U. (2003a). Degradation of DEHP, PAHs and LAS in source separated MSW and sewage sludge during composting. *Compost Science & Utilization*, 11(4), 370-378.
- Moeller J. and Reeh U. (2003b). Degradation of nonylphenol ethoxylates (NPE) in sewage sludge and source separated municipal solid waste under bench-scale composting conditions. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 70, 248-254.
- Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Liddle C, Blanchard SG, Willson TM, Collins JL and Kliewer SA (2000) Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 275:15122-15127.
- Noguerol TN, Boronat S, Casado M, Raldua D, Barcelo D and Pina B (2006) Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385:1012-1019.
- Patureau D., Delgenès N. and Delgenès JP. (2007). Impact of sewage sludge processes on the removal of endocrine disrupters like NPE (Nonylphenol Ethoxylates). *Water Practice and Technology*, In press.
- Penalvo JL, Adlercreutz H, Uehara M, Ristimaki A and Watanabe S (2008) Lignan content of selected foods from Japan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:401-409.
- Petrovic, M. and Barcelo, D. (2000). Determination of Anionic and Nonionic surfactants, their degradation products, and Endocrine-Disrupting compounds in sewage sludge by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72, 45-60.
- Pillon A., Boussioux A.M., Escande A., Ait-Aissa S., Gomez E., Fenet H., Ruff M., Moras D., Vignon F., Duchesne M. J., Casellas C., Nicolas J. C. and Balaguer P. (2005). Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor-alpha: application to environmental analysis. *Environmental Health Perspectives*, 113, 278-284.

- Potter C.L., Glaser J.A., Chang L.W., Meier J.R., Dosani M.A. and Herrmann R.F. (1999). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons under bench-scale compost conditions. *Environmental Science and Technology*, 33(10), 1717-1725
- Prats D., Rodrigues M., Muela M.A., Llamas J.M., Moreno A., DeFerrer J. and Berna J.L. (1999) Elimination of xenobiotics during composting. *Tenside Surfactants Detergents*, 36(5), 294-298.
- Sanz E., Prats D, Rodriguez M. and Camacho A. (2006). Effect of temperature and organic nutrients on the biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) during the composting of anaerobically digested sludge from a wastewater treatment plant. *Waste Management*, 26(11), 1237-1245.
- Sivesind E and Seguin P (2005) Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:6397-6402.
- Svenson A, Allard AS and Ek M (2003) Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Research*, 37:4433-4443.
- Tabb M.M., Kholodovych V., Grun F., Zhou C., Welsh W.J., Blumberg B. (2004). Highly chlorinated PCBs inhibit the human xenobiotic response mediated by the steroid and xenobiotic receptor (SXR). *Environmental Health Perspectives*, 112, 163-9.
- Ternes T. A., Andersen H., Gilberg D., Bonerz M. (2002). Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry*, 74, 3498-3504.
- Trably E., N. Delgenes D. Patureau and J.P. Delgenes. (2004) Statistical tools for the optimization of a highly reproducible method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 84, 995-1008.
- Webber M.D., Lesage S. (1989) Organic contaminants in Canadian municipal sludges. *Waste Management & Research*, 7, 63-82.
- Wild, S.R. and Jones, K.C. (1992) Organic chemicals entering agricultural soils in sewage sludges: screening for their potential to transfer to crop plants and livestock. *The science of Total Environment*, 119, 85-119.
- Zurmühl, T. (1990). Development of a method for the determination of phthalate esters in sewage sludge including chromatographic separation from polychlorinated biphenyls. *The Analyst*, 115, 1171-1175.

## II. Mécanisme de biodégradation des œstrogènes et identification des bactéries impliquées

*Le bilan complet effectué sur la STEP, qui a fait l'objet de la première publication, ainsi que d'autres études de la littérature, convergent vers le même constat : le mécanisme de biodégradation est globalement largement majoritaire dans l'élimination des œstrogènes en comparaison du mécanisme d'adsorption. L'objet du dernier volet de ma thèse cherche donc à approfondir les connaissances sur le mécanisme de biodégradation. L'étude de ce mécanisme a été considérée dans le cadre de boues activées de STEP enrichies en présence d'une hormone, E2 ou EE2, et d'une source de carbone additionnelle, l'acétonitrile (ACN). La boue activée de la STEP étudiée dans la première partie, présentant un fort potentiel de biodégradation, a été choisie comme inoculum initial. Outre les cinétiques et les schémas de dégradation, un regard particulier a été apporté à l'identification des espèces impliquées. Pour cela, une double approche, combinant des techniques culturales et moléculaires, a été choisie. Une publication portant sur l'ensemble de ces travaux est en cours de préparation en vue d'une soumission dans **Applied Microbiology and Biotechnology**.*

---

Les cultures d'enrichissement ont été conduites en mode discontinu sur milieu minimum additionné de E2- ou EE2-ACN puis complété avec des oligo-éléments et des vitamines. Lorsque la dégradation de l'hormone est achevée, un nouvel apport de celle-ci est réalisé. Tous les trois ajouts, les cultures sont repiquées sur un milieu neuf. Les cultures d'enrichissement obtenues ont ensuite été testées, dans les mêmes conditions que précédemment, pour déterminer les cinétiques de dégradation de E2, E1 et EE2. En plus de la concentration en hormones (HPLC-FLD) et en biomasse (DO, protéines), la structure de la communauté bactérienne a été évaluée par isolement sur milieu solide et analyse moléculaire en PCR-SSCP. L'identification des isolats et des pics majoritaires est obtenue par séquençage de l'ADNr 16S.

Les œstrogènes testés ont été complètement dégradés par les cultures d'enrichissement. La dégradation de E2 consiste, dans un premier temps, en une oxydation en E1. Elle est achevée en 3 jours de culture et suit un ordre zéro avec une vitesse de 3,05 mg/g Eq-SAB/h. L'estrone produit a été dégradé en 14 jours, selon trois phases. Au cours des premières 24h, E1 est uniquement produit ; entre 24 et 72 h, il est simultanément produit et dégradé ; et enfin après 72 h, lorsqu'il n'y a plus de E2, il est uniquement dégradé. Directement ajouté dans le milieu, la dégradation de E1 débute après un temps de latence d'environ 3 jours, puis il est complètement dégradé en 2 jours. La cinétique suit un ordre zéro, avec une vitesse de 0,09 mg/g Eq-SAB/h. Pour EE2, afin de maintenir sa capacité dégradante, la culture nécessite l'ajout d'une faible quantité de surnageant de boue stérile. La dégradation de EE2 ne débute qu'après une phase de latence de 24 jours. La dégradation complète de EE2 nécessite 11 jours et suit un ordre zéro, à une vitesse de 0,03 mg/g Eq-SAB/h. Au cours des expériences

précédentes, qui ont eu lieu en présence d'ACN, une croissance est mesurée avec ou sans hormones. Les bactéries impliquées dans cette croissance utiliseraient donc l'ACN ou un sous-produit de l'ACN. Pour E1 et EE2, des cultures ont été réalisées avec le même inoculum mais sans ACN. Les deux molécules sont alors dégradées sans qu'aucune croissance ne soit mesurée, confirmant ainsi l'hypothèse précédente. Les vitesses spécifiques de dégradation sont plus rapides sans ACN. Toutefois, en comparant les vitesses non spécifiques, l'ajout d'une source additionnelle de carbone semble favoriser indirectement la dégradation de E1. Dans le cas de EE2, à l'inverse, des effets de compétitions et inhibitions semblent s'installer. Ainsi, un temps de latence plus long (24 jours) est obtenu avec ACN que sans ACN (7 jours).

Les analyses PCR-SSCP révèlent des structures de communautés bactériennes simples de 2 à 6 pics majoritaires. Les cultures d'isolement sur milieu solide ont permis d'obtenir 4 à 7 isolats morphologiquement différents. Par ailleurs, la SSCP permet de distinguer des espèces non isolées et, inversement, l'isolement permet d'obtenir des espèces, minoritaires en SSCP. L'identification des espèces majoritaires et des isolats a abouti aux espèces *Brevundimonas diminuta*, *Alcalignes faecalis*, *Defluviobacter lusatieae*, *Aquamicrobium defluvium*, *D. permanens*, *Pusilimonas* sp, ainsi qu'à plusieurs bactéries non cultivées dont les plus proches espèces connues appartiennent à la famille des *Comamonadaceae*. Certaines de ces espèces sont déjà reconnues comme dégradant les œstrogènes et/ou l'ACN ou proches d'espèces les dégradant. La majeure partie de ces espèces dégradent d'autres composés organiques complexes. Lorsqu'ils ont été testés individuellement les isolats n'ont pas montré d'aptitude à dégrader E1, E2 ou EE2, sauf *B. diminuta*. Cette espèce est impliquée dans la conversion de E2 en E1. Cela suggère que soit les bactéries dégradantes ne sont pas cultivables sur milieu solide, soit leur métabolisme est perturbé par le passage sur milieu solide riche, soit plusieurs espèces participent à la dégradation des œstrogènes.

Tous les œstrogènes testés ont été complètement dégradés par les cultures enrichies. Jusqu'ici, aucune culture d'enrichissement dégradant EE2 n'avait été obtenue. L'identification du nutriment, contenu dans le surnageant de boue, indispensable à cette culture serait intéressante. La nature de l'inoculum initial pourrait également être impliquée dans ce succès. La source de carbone organique supplémentaire semble, selon la molécule, favoriser ou défavoriser la dégradation des œstrogènes. Des expériences complémentaires devraient être planifiées pour déterminer si les œstrogènes sont dégradés en tant que source de carbone ou par co-métabolisme. La caractérisation des communautés grâce à des outils classiques et des outils moléculaires apparaît pertinente et complémentaire. Cette double approche pourrait être transposée pour étudier le métabolisme des œstrogènes. Enfin, les isolats obtenus devront être testés en combinaison afin d'avoir des indications sur le rôle respectif de chacun d'eux au sein du consortium, mais probablement aussi, sur les voies métaboliques impliquées.

# BIODEGRADATION OF NATURAL AND SYNTHETIC ESTROGENS BY ENRICHED MIXED CULTURES OBTAINED FROM AN EFFECTIVE POLLUTANT-REMOVING ACTIVATED SLUDGE PROCESS

Mathieu Muller, Dominique Patureau, Jean-Jacques Godon, Jean-Philippe Delgenès and Guillermina Hernandez-Raquet (✉)

INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France

e-mail: [hernandg@supagro.inra.fr](mailto:hernandg@supagro.inra.fr)

Tel.: +33-4 68 42 51 70

Fax: +33-4 68 42 51 60

(En préparation)

---

## Abstract

The biodegradation of estradiol (E2), estrone (E1) and ethinylestradiol (EE2) was investigated using bacterial enrichment cultures. The original inoculum was an activated sludge sampled from an effective pollutant-removing sewage treatment plant. Enrichments were carried out under discontinuous culture conditions, on E2 or EE2, with an additional carbon source. The hormones were completely degraded by the enriched mixed cultures. Estradiol was rapidly converted to E1 within 72 h, following a zero order kinetic, at a specific degradation rate of 3.05 mg.g<sup>-1</sup>Eq-SAB (equivalent serum albumin bovine).h<sup>-1</sup>. The degradation of E1 and EE2 occurred after lag phases ranging from 3 to 24 days. Estrone was then degraded in less than 48 h while more than 7 days were needed for EE2. Assuming zero order kinetics, the specific degradation rates, in presence of an additional carbon source, were 0.09 mg.g<sup>-1</sup>Eq-SAB.h<sup>-1</sup> for E1 and 0.03 mg.g<sup>-1</sup>Eq-SAB.h<sup>-1</sup> for EE2. Without an additional carbon source, the values were 0.70 and 0.61 mg.g<sup>-1</sup>Eq-SAB.h<sup>-1</sup> for E1 and EE2, respectively. The bacterial community structure of each culture was characterized through molecular and classic isolation methods. The enriched mixed cultures were constituted of about five different species, either uncultured until now or belonging to *Alcaligenes faecalis*, *Pusillimonas* sp., *Denitrobacter permanens*, *Defluviobacter lusatiae*, *Aquamicrobium defluvium* and *Brevundimonas diminuta*. A strain of *B. diminuta*, isolated on a rich solid agar medium, was shown to achieve the E2 to E1 conversion.

## Introduction

The natural and synthetic estrogens, which are excreted by humans and animals, are the compounds of sewage showing the highest estrogenic activity (Routledge et al. 1998). These compounds disturb the endocrine system of various organisms leading, for instance, to vitellogenin production in male fish or to oocytes development in testes (Purdom et al. 1994; Jobling et al. 1998). The ability of the sewage treatment plant (STP) to efficiently remove estrogens is thus of growing concern.

A lot of studies have revealed high variability between STP for the removal of estrogens. The removal efficiencies ranged from 0 to 100% for estrone (E1) and ethinylestradiol (EE2), from 40 to 100% for estradiol (E2) while for estriol (E3), they were above 95% (Ternes et al. 1999b; Baronti et al. 2000; Johnson et al. 2000; Servos et al. 2005; Nakada et al. 2006). Various parameters can affect this efficiency as hydraulic and sludge retention times (HRT and SRT, respectively), the presence of a biological nitrogen treatment step or the ambient temperature (Ternes et al. 1999b; Andersen et al. 2003; Clara et al. 2005; Johnson et al. 2005; Servos et al. 2005). Consequently, estrogens concentrations in effluents strongly varied from the limit of detection (LOD) to significant disrupting levels (10-100 ng/L) depending on the considered STP and compounds (Ternes et al. 1999b; Baronti et al. 2000; Nakada et al. 2006). Otherwise, studies have revealed sorption of estrogen to sludge with concentrations up to 40 ng/g dry weight (Ternes et al. 2002; Andersen et al. 2003; Muller et al. in press). However, sorption mechanism did not accounted for more than 10% of the total removal suggesting that biological activity explains most of the estrogens removal by activated sludge systems (Ternes et al. 2004; Andersen et al. 2005; Braga et al. 2005; Muller et al. in press).

Lab-scale experiments have effectively assessed the ability of activated sludge to degrade natural estrogens (Ternes *et al.* 1999a; Lee and Liu 2002). Conversely, EE2 appears to be more recalcitrant with no or poor degradation (Ternes et al. 1999a; Layton et al. 2000; Weber et al. 2005). However, nitrifying activated sludge and ammonium-oxidizing bacteria seems particularly adapted to metabolized EE2. In this conditions, the ammonium monooxygenase (AMO) enzyme seems to be involved in EE2 elimination (Vader et al. 2000; Shi et al. 2004). Several estrogen-degrading bacteria were identified in urban activated sludge. They belonged the novel species *Novosphingobium tardaugens* and *Denitratisoma oestradiolicum*; the known species *Rhodococcus zopfii*, *Rhodococcus equi* and *Achromobacter xyloxidans*; and the known genus *Ralstonia* and *Brevundimonas* (Fujii et al. 2003; Yoshimoto et al. 2004; Weber et al. 2005; Fahrbach et al. 2006; Yu et al. 2007). Obtained using solid agar medium isolation, these strains were able to degrade natural estrogens and sometimes EE2, mainly, as sole source of carbon and energy, with no further accumulation of estrogenic metabolites. Estrogen-degrading bacteria were also found in others ecosystems as industrial activated sludge (Haiyan et al. 2006).

In summary, previous studies have isolated bacterial strains involved in the degradation of estrogens through culture dependent methods, using solid agar medium. These isolated strains were essentially able to degrade natural estrogens but little information is available about synthetic estrogen-degrading bacteria. Similarly, the characterization of estrogen-degrading consortia was practically not reported.

Hence, the objectives of this research were to obtain enriched E2- and EE2-degrading mixed cultures from activated sludge of an efficient estrogen-removing STP. An additional carbon source was supplied during enrichments to favour the growth of the largest diversity of estrogen-degrading species. However, the degradation kinetics were determined with and without the additional carbon source. Finally, the bacterial community structure of the enriched cultures was characterized through both culture dependent and culture independent dependent methods, using solid agar medium isolation and 16s rDNA analysis, respectively.

## Materials and methods

### Chemicals

The steroids E1, E2 and EE2 (purity > 98%); the hydrochloric acid (37%, reagent grade); the N-lauroyl sarcosine and the red*Taq* DNA polymerase were supplied by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Guanidine thiocyanate was purchased from Interchim (Montluçon, France). The *Pfu* Turbo DNA polymerase was provided by Stratagene (Amsterdam, The Netherlands). The DNA primers W49, W104, W18, W31 and W02, precisely described elsewhere (Peu et al. 2006), were supplied by Eurogentec (Liège, Belgium). All organic solvents were HPLC grade and purchased from Atlantic Labo (Floirac, France). Deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France).

### Enrichment cultures

The inoculum consisted of aerobic activated sludge sampled from a STP located on the Mediterranean basin in southern France. A previous work (Muller et al. in press) has accurately described this plant and shown that high estrogen biodegradation potential are available, with a biological removal from 93 to 97% of the initial load.

Minimum medium (MM), trace elements and vitamins solutions (TES and VS) were prepared as described elsewhere (John and White, 1998; Piveteau et al., 2001; Pfening and Trüper, 1992). MM and TES were autoclaved (120°C, 20 min) while VS was sterilized through glass fiber filters syringe (0.2µm, Nalgene, VWR, Strasbourg, France). TES and VS were added to MM at 0.1 and 0.05% (v/v) just before inoculation at 4% (v/v). Abiotic controls were obtained by acidification at pH 2 using hydrochloric acid (10%, v/v). E2 or EE2 were spiked in culture medium around 6 and 4 mg/L, respectively. Stock solutions of hormones (stored at -20°C) were prepared in acetonitrile (ACN) at concentrations of 5 g/L for E2 and 2 g/L for EE2. Thus, acetonitrile was simultaneously added with hormones, at concentration of

1.5 g/L, to constitute an additional organic carbon source.

Enrichments were carried out in duplicate with a single abiotic control. Aerobic batch incubation was achieved in glass erlenmeyer, at 30°C, under rotary shaking. Growth of bacteria was followed by the optical density (OD) at 600 nm (DU 640 Beckman, Villepinte, France) and hormone concentration, by HPLC-FLD analysis. Estrogen spikes were renewed after each complete degradation. Every three estrogen spikes, the culture was transferred into a fresh medium. This procedure was conducted until obtaining sufficiently enriched E2 and EE2-degrading mixed cultures.

#### Estrogens degradation kinetics

The degradation kinetics of E2, E1 and EE2 were performed in triplicate by inoculating the previously obtained enriched mixed cultures in similar medium and culture conditions than enrichments. Inoculation ratio, ranging from 1 to 4% (v/v), was set to always obtain similar initial biomass density. Estrone was spiked in culture medium around 2 mg/L from stock solution prepared in acetone at 5 g/L (low solubility of E1 in ACN). Consequently, a sufficient ACN volume was separately added to provide similar carbon sources conditions than in the others cultures. The capacity of enriched mixed cultures to degrade E1 and EE2 without an additional source of carbon was also tested. In this case, the hormones were directly dissolving in MM using sonication bath at 40°C. In addition of abiotic acidified controls, non-inoculated contamination controls and non-spiked estrogens but ACN-containing growth controls, were carried out in triplicate. The monitoring parameters were similar than enrichments ones excepted that bacterial growth was also assessed through the protein content according to the Lowry method (Lowry et al. 1951). Results were expressed in equivalent serum albumin bovine (Eq-SAB). Moreover, the bacterial community structure was established through the 16s rDNA analysis using polymerase chain reaction coupled with single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP).

#### Isolation on solid agar medium

Isolates from the enriched mixed cultures were obtained by plating out 100 µL of different dilutions ( $10^{-2}$  to  $10^{-9}$ , v/v) of the considered culture onto rich solid agar medium (Standard Count Agar, Merck, Fontenay sous Bois, France). The plates were incubated at 30°C during 48h. Morphologically distinct colonies were isolated by transferring to new plates, containing a fresh medium, until to obtain axenic cultures. These colonies were finally suspended in 4 mL of MM for further 16s rDNA analysis and estrogen-degrading potential testing. The estrogen-degrading ability of the isolates was achieved, in duplicate, in the same culture conditions than previously described. Only abiotic acidified control was carried out with no replicate. Monitoring consisted of OD and estrogen concentration measurements.



### Hormones analysis

Culture aliquots (1 mL) were centrifuged (12000 g, 10 min) and 10  $\mu$ L of supernatant were injected on a high performance liquid chromatography (HPLC; Alliance 2695, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Separation was performed at 30°C on a reverse phase column (LiChroCART 250 mm  $\times$  4 mm/LiChrospher 100 RP-18 5 $\mu$ m, Merck). Flow was set at 1 mL/min and elution gradient consisted of acetonitrile/water (40:60, v/v) at 0 min, (80:20, v/v) at 20 min for 2 min and (40:60, v/v) at 24 min for 6 min. Detection used a fluorimeter (Multi  $\lambda$  FD 2475, Waters) with excitation and emission wavelength of 220 and 315 nm, respectively. The range of quantification used was between 0.1 mg/L and 10 mg/L.

### Molecular analysis

Culture aliquots or isolates suspension (1ml) were centrifuged (12000 g, 10min). The pellets were resuspended in 500  $\mu$ L of guanidine thiocyanate (4 M in 0.1 M Tris-HCl) and 150  $\mu$ L of N-lauroyl sarcosine (10%, v/v) and stored at -20°C. Further extractions and purification of total DNA were achieved using a rapid method kit (QIAamp DNA Mini kit, Quiagen, Courtaboeuf, France). The V3 region of the 16s rDNA was amplified by an 25 cycles PCR (Mastercycler, egradient S, Eppendorf, Le Pecq, France) using the W49-W104 primers pair with the *Pfu* Turbo DNA polymerase (Zumstein et al. 2000). The PCR products were subsequently analyzed in SSCP (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems-Hitachi, Courtaboeuf, France).

For species identification, the total 16s rDNA (1500 base pairs) was amplified by 25 cycles PCR using the W18-W02 primer pair with the red*Taq* polymerase. When the amplification yield of the total region was insufficient, 500 base pairs, containing the V3 region, were amplified (W18-W31 primer pair). For the isolates, the amplified region was directly sent for gene sequencing (MilleGen Biotechnologies, Labège, France). For the mixed cultures, the PCR products was purified (QIAquick PCR Purification kit, Quiagen) and cloned into *E. coli* (TopoTa cloning kit for sequencing, Invitrogen, Cergy Pontoise). From 20 to 50 clones were randomly selected and their insert analyzed in PCR-SSCP. The insert that comigrated with major peaks of the mixed culture SSCP fingerprint was sequenced. The 16s rDNA gene sequences were compared to previously reported sequences using the Blast database program (Stephen *et al.* 1997) to achieved identification.

## Results

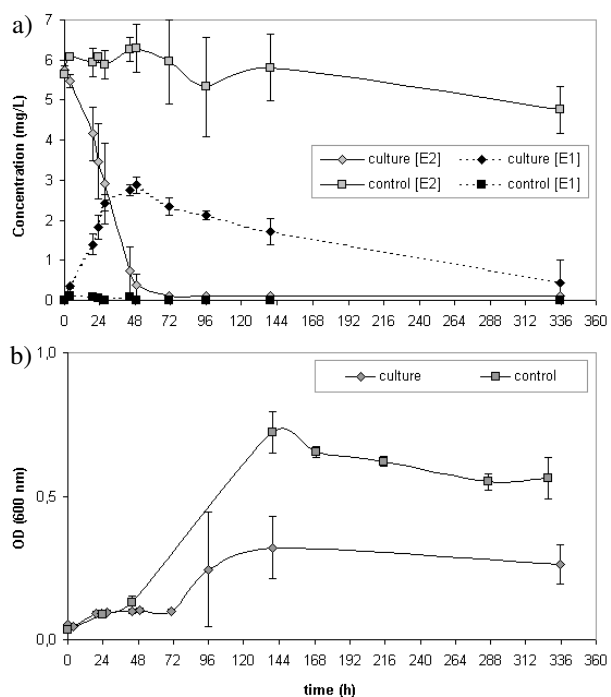
### Degradation kinetics

The enriched E2-degrading mixed culture was able to completely degrade this hormone within 72 h (fig. 1a). Assuming a zero order kinetic from the linear degradation phase ( $r^2 = 0.983$ ) a specific degradation rate of 3.05 mg.g<sup>-1</sup>Eq-SAB.h<sup>-1</sup> was calculated. Three phases can be distinguished in this degradation experiment. During the first 27 h, E1 was produced in

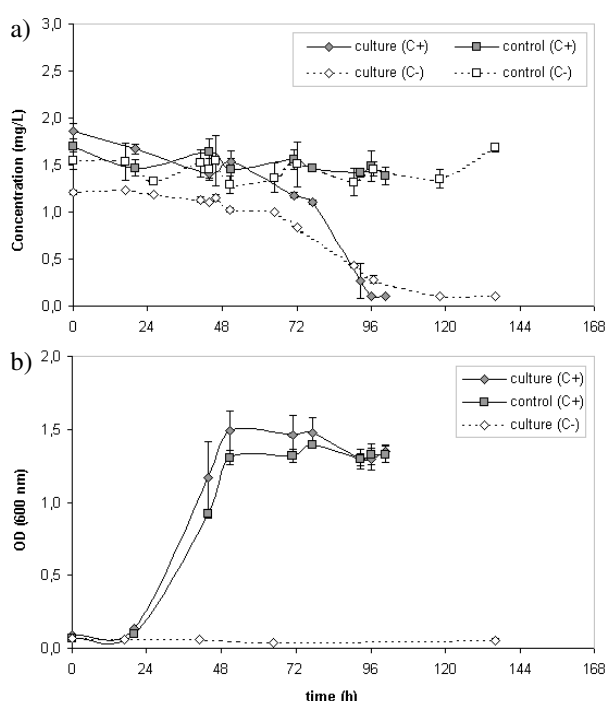
equimolar proportion than the E2 decrease. This observation suggests that E2 was, as the first step, oxidized to E1. From 27 to 72 h, the E1 concentration remained relatively constant because it was simultaneously produced, from the E2 oxidation, and degraded. The concentration of E1 markedly decreased after 72 h when E2 was completely transformed. After 336 h of incubation, E1 was almost completely removed from the medium.

The enriched E2-degrading mixed culture was also directly tested on E1 (fig. 2a). The bacterial culture appeared to remove efficiently E1 with or without an additional carbon source (C+ and C-, respectively). However, degradation started after lag phases of about 72 h. Then, the removal of E1 occurred rapidly within 24 to 48 h. The estimated degradation rates, assuming zero order kinetics ( $r^2 = 0.999$ ), were 0.09 and 0.70  $\text{mg.g}^{-1}\text{Eq-SAB.h}^{-1}$ , for the C+ and C- condition, respectively.

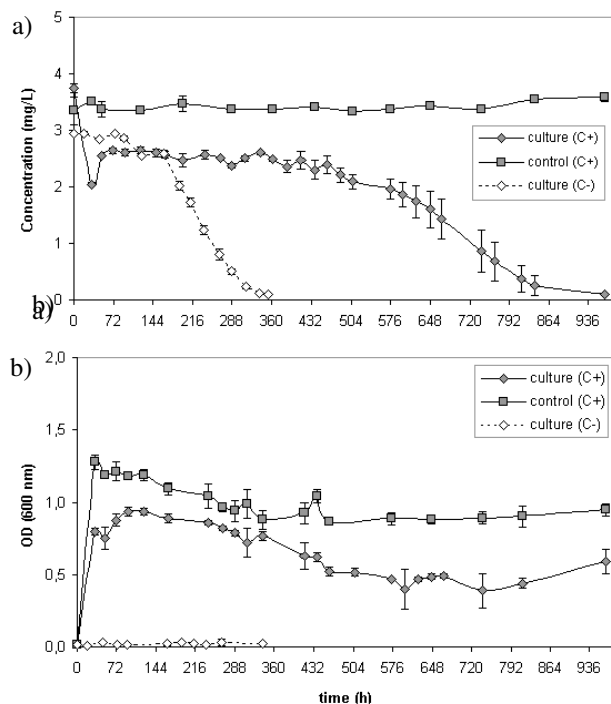
After lag phases from 7 to 24 days, the enriched EE2-degrading mixed culture completely degraded the synthetic compounds within 8 to 11 days, independently of carbon sources conditions (fig. 3a). The curves satisfactory fitted zero order kinetics, considering the linear degradation phase, with  $r^2$  of 0.995. The calculated degradation rates were 0.03 and 0.61  $\text{mg.g}^{-1}\text{Eq-SAB.h}^{-1}$  for the C+ and C- condition, respectively. However, addition of sterilized activated sludge (0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter) at 1% (v/v) in the medium was needed. Otherwise, after several transfers, the culture lost its ability to degrade EE2 or presented high divergences between the replicates with longer degradation times (not shown).



**Fig. 1** Transformation of estradiol (E2) in estrone (E1) by the E2-enriched mixed culture (a) and the associated bacterial growth (b). Experiments were confronted to abiotic controls. Average values and standard deviations on triplicates.



**Fig. 2** Transformation of estrone (E1) by the E2-enriched mixed culture (a) and the associated bacterial growth (b). Experiments were confronted to abiotic controls. Average values and standard deviations on triplicates. C+ and C- : with and without acetonitrile.



**Fig. 3** Transformation of ethinylestradiol (EE2) by the EE2-enriched mixed culture (a) and the associated bacterial growth (b). Experiments were confronted to abiotic controls. Average values and standard deviations on triplicates. C+ and C- : with and without acetonitrile.

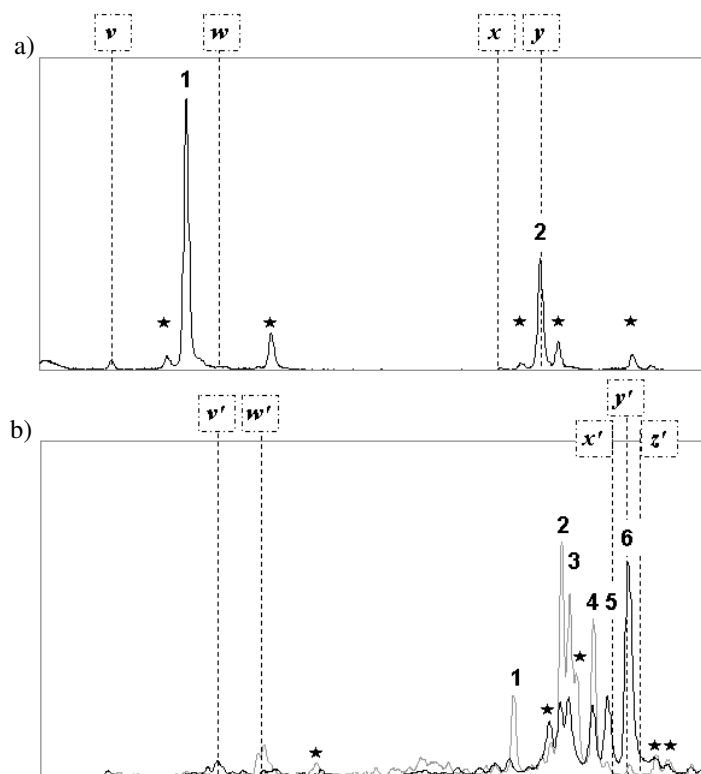
### Bacterial growth

During the degradation batches, bacterial growth was observed only when an additional carbon source was present (fig. 1-3b). When the hormones constituted the sole source of carbon, no increase of the biomass was measurable (fig. 2 and 3b). Given that in control containing ACN but no estrogens, biomass increases were also detected (fig. 1-3b), the growth could be attributed to the consumption of ACN by heterotrophic bacteria. Moreover, the growth was not concomitant to the estrogens degradation since maximums were reached within the first 48 h, during E1 and EE2 degradation cultures (fig. 2b and 3b). By contrast, for E2, the growth started after 72 h when no E2 left, and stabilised after 144h (fig. 1b). Since lower OD values were measured at the end of the growth phase, compared to the E1 and EE2 degradation batches, a possible inhibition effect of E2 on the metabolism of ACN could be assumed.

### Bacterial community structure

The molecular analysis of the enriched E2-degrading mixed culture showed a very simple SSCP fingerprint constituted of two major peaks (Fig. 4a). By comparison of the insert sequence of corresponding clones with the Blast database, the peaks 1 was found to match numerous species as *Defluviobacter lusatiae* (100%), *Aquamicrobium defluvium* (100%), *Rhizobium gallicum* (99%) and *Pseudaminobacter* sp (99%). The peak 2 belonged to the species *Alcaligenes faecalis* (99-100%). Moreover, a minor peak, migrating at the position  $\nu$ , was also cloned and identified as *Brevundimonas diminuta* (99-100%). The solid agar medium isolation has led to seven morphologically different isolates (table 1, fig. 4a). The

types I and V, migrating at the position  $v$ , were identified as *Brevundimonas diminuta* (99%). The types II to IV, migrating at the position  $y$  as the major peak 2, were identified as *Alcaligenes faecalis* (99%). The type VI, migrating at the position  $w$ , was not identified, while the type VII, migrating at the position  $x$ , was close to the genus *Pusillimonas* (98%) and *Alcaligenes* (97%).



**Fig. 4** SSCP fingerprint of E2- (a) and EE2-degrading (b) mixed cultures. The major 16S rDNA peaks are numbered. Stars indicate minor conformation isomers replicas of the major 16S rDNA peaks. The letters indicate migration position of the solid agar medium isolates.

The SSCP fingerprint of the EE2-degrading mixed culture appeared to be more complex with six major peaks, which showed abundance variability between the two different carbon conditions (fig. 4b). Gene sequences of the corresponding clone insert showed that peaks 1, 2, 3 and 5 were related to unknown environmental clones. The peak 1 was close to an uncultured bacteria (99%) previously found in a microbial fuel cell ecosystem inoculated with river sediment (accession numbers AY491625/14/17.1). The peaks 2, 3 and 5 were close to an uncultured bacteroidetes (99%) and an uncultured bacterium (98%). The first one was detected in an industrial biofilter treating gas waste (accession number AJ318191.1) and the second one, in a sludge composting process (accession number AB241580.1). With 93% of similarity, *Comamonas* sp. and *Delftia* sp., both from the *Comamonadaceae* family, constituted the closest known species for these peaks. For the EE2-degrading mixed culture, four different morphological types of isolates have been isolated on solid agar medium (table 1, fig 4b). Their migration position ranged from  $v'$  to  $z'$  and all were close to the genus *Alcaligenes* with similarity varying from 79 to 98%. Moreover, the isolate migrating at the position  $x'$  matched also *Denitrobacter* sp., in the same similarity range than *Alcaligenes* (98%). The isolates migrating at the position  $v'$  and  $w'$  (types I and II) corresponded to minor

peaks of the mixed culture molecular fingerprint. The isolates migrating at the position  $x'$ ,  $y'$  and  $z'$  (type II and IV) were close to the peaks 5 and 6.

#### Estrogen-degrading potential of isolates

When tested individually, compared to abiotic controls, the isolates obtained from the E2-degrading mixed culture were unable to degrade E2 or E1. Only *B. diminuta* was able to convert E2 to E1 since the relative concentration of E2 ( $[E2]_t/[E2]_0$  in M), after 168 h of incubation, was close to  $38 \pm 1\%$  (not illustrated). Simultaneously, E1 was produced at a relative concentration ( $[E1]_t/[E2]_0$  in M) of  $61 \pm 2\%$ . Further complete degradation of E1 was not achieved because after 504 h, the E1 relative concentration stabilised at  $50 \pm 0.5\%$ . None of the isolates from the EE2-degrading mixed culture has shown the capacity to degrade EE2 individually, compared to abiotic controls. Overall the isolates, growth has only been detected once, with an *A. faecalis* strain (type III) during E1 estrogen-degrading potential test.

**Table 1 Characteristics of the morphologically different isolates obtained from E2- and EE2-degrading mixed cultures : migration position of its 16sDNA V3 region in reference to fig. 4; ability (+) or non-ability (-) of the isolates to degrade E1, E2 or EE2; identification by similarity of its 16s rDNA sequence to know species or genus using the Blast database program (Stephen et al. 1997).**

	Morphological type of colony	Migration position	Degradation capacity	Specie identification (similarity in %)
E2-degrading mixed culture	I	v	E2+, E1-	<i>Brevundimonas diminuta</i> (99%)
	II	y	E2-, E1-	<i>Alcaligenes faecalis</i> (99%)
	III	y	E2-, E1-	<i>Alcaligenes faecalis</i> (99%)
	IV	y	E2-, E1-	<i>Alcaligenes faecalis</i> (99%)
	V	v	E2-, E1-	<i>Brevundimonas diminuta</i> (99%)
	VI	w	E2-, E1-	n.i.
	VII	x	E2-, E1-	<i>Pusillimonas sp</i> (98%), <i>Alcali. sp</i> (97%)
EE2-degrading mixed culture	I'	v', w'	EE2-	n.i.
	II'	x', z'	EE2-	<i>Denitrobacter sp</i> (98%), <i>Alcali. sp</i> (98%)
	III'	v'	EE2-	<i>Alcaligenes sp</i> (97%)
	IV'	y'	EE2-	<i>Alcaligenes sp</i> (87%)

#### Discussion

In this work, enriched degrading mixed cultures were obtained for the natural estrogens E2 and E1, but also for the recalcitrant synthetic hormone EE2. Some studies have already reported the degradation of E2 and E1 by urban activated sludge (Ternes et al. 1999a; Layton et al. 2000), enriched mixed cultures (Lee and Liu 2002; Weber *et al.* 2005) or isolated strains from activated sludge (Fujii et al. 2002; Yoshimoto et al. 2004; Fahrbach et al. 2006; Yu et al. 2007). However, the degradation of EE2 has been less frequently described excepted for nitrifying activated sludge (Vader et al. 2000; Shi et al. 2004) and once for an isolate from urban activated sludge (Yoshimoto et al. 2004). The degradation of EE2 by enriched mixed cultures has never been described previously.

## Degradation kinetics

The E2-degrading mixed culture obtained, converted E2 to E1 by oxidation of the C-17 at ring D, afterwards, E1 was completely degraded (fig. 1a and 2a). Ternes et al. (1999a) and Lee and Liu (2002) have previously observed such degradation pathway with activated sludge and E2-degrading enriched mixed culture, respectively. However, E2 was not systematically degraded with E1 as intermediate suggesting that other metabolic pathways may exist (Fujii *et al.* 2002; Yoshimoto *et al.* 2004; Fahrbach *et al.* 2006). We obtained a very similar degradation pattern (fig. 1a) than the one reported by Lee and Liu (2002). However, their initial E2 level was lower with 0.2 mg/L, versus 6 mg/L in our experiment. In the case of Weber et al. (2005), the degradation kinetics followed by their enriched mixed culture and defined culture (a two bacteria consortium) were faster (less than 48 h). Moreover, E1 accumulated at 100% and 15% of the initially spiked E2 for the enriched mixed culture ( $[E2]_0 = 2 \text{ mg/L}$ ) and the defined culture ( $[E2]_0 = 4 \text{ mg/L}$ ), respectively. The degradation of initially added E1 (not produced from E2) was only investigated by Ternes et al. (1999a) with activated sludge as inoculum. Estrone was degraded within 2 days without lag phase. However, comparison between enriched mixed culture and sludge inoculated degradation experiments is not convenient due to biomass quantitative and qualitative differences. A lag phase of about 15 hours was observed by Weber *et al.* (2005) with their enriched mixed culture, between the end of the E2 degradation and the beginning of the E1 one. The comparison of degradation rates between the studies is difficult because of divergences between culture conditions, biomass concentration, calculation methods and units used. For instance, no indication of biomass concentration was done by Lee and Liu (2002). Weber et al. (2005) obtained an enriched mixed culture with a E2 degradation rate of  $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (estimated graphically). Based on their OD measurement and our OD to Eq-SAB conversion factor, estimated E2 specific degradation rate was about  $7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{Eq-SAB}\cdot\text{h}^{-1}$ . The estimated E2 specific degradation rate for their defined culture was about  $5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{Eq-SAB}\cdot\text{h}^{-1}$ , assuming that an OD of 0.04 was equivalent to  $3.3 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$  as reported for *Bacillus cereus* (Olmez and Aran 2005). Similarly, the degradation rates of E1 were estimated at 2 and  $0.45 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{Eq-SAB}\cdot\text{h}^{-1}$  for the enriched mixed culture and the defined culture, respectively. The degradation rates found in our study were in the same range or slightly lower with 3.05 and 0.09 to  $0.70 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{Eq-SAB}\cdot\text{h}^{-1}$  for E2 and E1, respectively.

Despite we obtained an enriched mixed culture from urban activated sludge able to degrade EE2, this compound was confirmed to be more recalcitrant than the natural estrogens. Longer lag phases, up to 24 days, and lower degradation rates, ranging from 0.03 to  $0.61 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{Eq-SAB}\cdot\text{h}^{-1}$  have been found (fig. 3a). Moreover, the degrading bacteria seemed to be very sensitive to the lack of a non-identified component contained in the sterilized liquid phase of activate sludge. Our results are coherent with findings of numerous studies in which EE2 was badly or no degraded (Ternes et al. 1999a; Layton et al. 2000; Weber et al. 2005). Successful

EE2 degradations were generally obtained using nitrifying activated sludge (Vader et al. 2000; Shi et al. 2004). In these studies, at initial EE2 concentrations from 0.5 to 1 mg/L, complete degradation occurred within 4 to 6 days without lag phase. Degradation rates could be estimated from 0.002 to 0.017 mg.g<sup>-1</sup>Eq-SAB.h<sup>-1</sup>, considering that proteins constituted about 55% of the dry weight. However, as previously mentioned, direct comparison with sludge inoculated experiments is not adequate. In our work, the activated sludge used as inoculum was sampled in an advanced STP which efficiently achieved the biological removal of nitrogen (> 94%) using alternating anoxic and anaerobic steps with high hydraulic and sludge retention times (Muller et al. in press). Such applied conditions may explain our success to obtain an enriched EE2-degrading mixed culture. The degradation pathway for EE2 was studied by Haiyan et al. (2006) using a *Sphingobacterium* sp. isolated from the STP of a contraceptive-producing factory. They found that EE2 was also converted into E1 before further complete degradation. However, the production of E1 was not observed in our experiments suggesting that others degradation pathways may exist or that it is, in the same time, rapidly consumed.

#### Influence of the additional organic carbon source

In the literature, growth of bacteria was rarely followed during estrogen degradation by enriched mixed cultures excepted in the paper of Weber et al. (2005). As in our case, they measured an increase of OD starting when E2 was completely degraded and E1 degradation just started. They explained this growth by the use of E1 as substrate by bacteria. However, in this study and our, the OD increases were high (0.15-0.20) compared to the metabolized concentration of E1 (2-3 mg/L). In our case, the biomass increase, estimated from protein or quantified through dry matter measurement of 0.2 µm filtered suspended solid, corresponded to about 210-230 mg dw/L. This increase could not be explained by the estrogens consumption. Thus, it is clear that bacteria probably used a part of acetonitrile initially added with hormones for growth. For Weber et al. (2005), hormones were dissolved in acetone, which was evaporated before the adjunction of mineral medium. Nevertheless, ammonia and carbonate were added for the autotrophic bacteria, which may explain the growth observed. The E1 and EE2 specific degradation rates obtained in our study with an additional carbon source were lower than without one. Consequently, we could assume that the bacteria growing on ACN were not directly involved in the degradation of hormones. However, by comparing E1 non-specific degradation rate with and without additional carbon source, we found that the presence of ACN favor the degradation of this hormone (fig. 2a). Thus, the E1-degrading bacteria may indirectly used ACN, a metabolite of ACN or other advantages provide by the growing species. Conversely, for EE2 (fig. 3a), the addition of ACN seems to inhibit the degradation of EE2, as illustrated by longer lag phase and lower non-specific degradation rate. Competition for nutrients between EE2- and ACN-degrading species could

explain our results, notably the lower growth of biomass measured when EE2 and ACN were simultaneously present than when ACN was the sole carbon source (fig. 3b)

#### Estrogen degrading bacteria

The bacteria found in our E2-degrading mixed cultures, through both culture dependent and culture independent methods, were *A. feacalis*, *B. diminuta*, *Pusillimonas* sp. and a not clearly defined bacterium that constituted the peak 1 (fig 4a and table 1). The two approaches can lead to common species (*A. feacalis*, *B. diminuta*) but also to exclusively identified species by molecular method (*Deffluvibacter lusatae* or *Aquamicrobium defluvium*) or solid agar isolation method (*Pusillimonas* sp.). This result suggests that these two approaches are complementary. *Brevundimonas* sp., isolated from activated sludge, was already reported to convert E2 to E1 but not to degrade E1, as in our case (Yu et al. 2007). Moreover, the defined mixed culture obtained by Weber *et al.* (2005) was notably constituted of *Achromobacter xylosoxidans*, which is a member of the *Alcaligenaceae* family and formerly listed in the genus *Alcaligenes*. Moreover, the denitrifying species *A. feacalis* and others *Alcaligenes* were already known to degrade phenol, polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides (Bastos *et al.* 2000; Juhasz and Naidu 2000; Gupta *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2004; Rehfuß and Urban 2005). This genus possesses the highest active bacterial 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases, which may be involved in the E2 to E1 conversion (Donova *et al.* 2005). However, in our case, it appeared that this step was rather achieved by *B. diminuta*. This species and other members of this genus degrade pesticide and PAH (Juhasz and Naidu 2000; Bellinaso *et al.* 2003; Smejkal *et al.* 2003; Chang *et al.* 2007). *Pusillimonas* sp. was not previously described to metabolize organic pollutants conversely to *Deffluvibacter lusatae*, which degrades chlorophenol and *Aquamicrobium defluvium*, which degrades polycyclic aromatic hydrocarbons in combination with *Alcaligenes* sp. (Fritsche *et al.* 1999; Ackermann *et al.* 2002).

Concerning the bacteria constituting the EE2-degrading mixed culture, several uncultured bacteria were found by the molecular method in addition to the cultivable *Alcaligenes* sp. and *Denitrobacter permanens* (fig 4b and table 1). This finding confirmed the relevance to use non-culture dependent methods to characterize pollutants degrading mixed cultures. No information is available about the potential of *D. permanens* to degrade organic pollutants. The uncultured bacteria identified in our culture were previously detected in waste treatment processes. This is in accordance with the inoculum origin used in our work. Their relatively link with the *Comamonadaceae* family, degrading organic complex compounds and ACN, suggested that they may be involved in the degradation of estrogens or of ACN (Manolov *et al.* 2005). *B. diminuta* was also described as an ACN-degrading species (Kohyama *et al.* 2006).

In our work, among all the isolates, when tested separately, only *B. diminuta* shown the



ability to convert E2 to E1. All the *Alcaligenes* strains and others isolate have not shown degrading activity towards estrogens or ACN. Consequently, it could be assume that degrading bacteria was not isolated because they are not cultivable or need other culture conditions. The loss of the degrading activity could be also explained by the transient solid medium culture; so higher enzymatic induction times are needed to initiate again degradation in liquid medium. It was finally possible that degradation activities result from several isolates or from isolates with uncultivable bacteria through syntrophism relationships. This assumption may explain why numerous studies have obtained strains converting E2 to E1 and EE2 to unknown by products, but not degraded E1 or these by-products conversely to original mixed cultures (Shi et al. 2004; Weber et al. 2005; Yu et al. 2007).

Hence, further investigations, as testing isolates in combination, are needed to better understand the role of each species in the original consortia. Moreover, such experiments will probably supply information about the metabolic pathways of degradation. Experiments are also needed to appreciate if bacteria used hormones as sole carbon source or through co-metabolism and to identify the component necessary for the EE2-degrading culture. The relevance of combining culture dependent and culture independent methods to characterize bacterial community structure was shown and should be used, similarly, to investigate the metabolism of consortia.

### Acknowledgements

This research was funded by the French national program ECCO – ECODYN from the National Institute of the Universe Sciences (INSU) and the French National Agency for the Environment and Energy (ADEME).

### Literature Cited

- Ackermann GE, Brombacher E and Fent K (2002) Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:1864-1875.
- Andersen H, Siegrist H, Halling-Sorensen B and Ternes TA (2003) Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environmental Science & Technology* 37:4021-4026.
- Andersen HR, Hansen M, Kjolholt J, Stuer-Lauridsen F, Ternes T and Halling-Sorensen B (2005) Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere* 61:139-146.
- Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A and Samperi R (2000) Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology* 34:5059-5066.
- Bastos AER, Tomisielo VL, Nozawa SR, Trevors JT and Rossi A (2000) Phenol metabolism by two microorganisms isolated from Amazonian forest soil samples. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24:403-409.
- Bellinaso MD, Greer CW, Peralba MD, Henriques JAP and Gaylarde CC (2003) Biodegradation of the herbicide trifluralin by bacteria isolated from soil. *Fems Microbiology Ecology* 43:191-194.
- Braga O, Smythe GA, Schafer AI and Feitz AJ (2005) Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology* 39:3351-3358.

- Chang YT, Lee JF and Chao HP (2007) Variability of communities and physiological characteristics between free-living bacteria and attached bacteria during the PAH biodegradation in a soil/water system. *European Journal of Soil Biology* 43:283-296.
- Clara M, Kreuzinger N, Strenn B, Gans O and Kroiss H (2005) The solids retention time : a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research* 39:97-106.
- Donova MV, Egorova OV and Nikolayeva VM (2005) Steroid 17 beta-reduction by microorganisms - a review. *Process Biochemistry* 40:2253-2262.
- Fahrbach M, Kuever J, Meinke R, Kampfer P and Hollender J (2006) *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp nov., a 17 beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1547-1552.
- Fritsche K, Auling G, Andreesen JR and Lechner U (1999) *Defluviobacter lusatae* gen. nov., sp nov., a new chlorophenol-degrading member of the alpha-2 subgroup of proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 22:197-204.
- Fujii K, Kikuchi S, Satomi M, Ushio-Sata N and Morita N (2002) Degradation of 17 beta-estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2057-2060.
- Fujii K, Satomi M, Morita N, Motomura T, Tanaka T and Kikuchi S (2003) *Novosphingobium tardaugens* sp nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:47-52.
- Gupta A, Kaushik CP and Kaushik A (2001) Degradation of hexachlorocyclohexane isomers by two strains of *Alcaligenes faecalis* isolated from a contaminated site. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66:794-800.
- Haiyan R, Shulan J, Dao W and Naeem u (2006) Degradation characteristics and metabolic pathway of 17a-ethynylestradiol by *sphingobacterium* sp. JCR5. *Chemosphere*
- Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G and Sumpter JP (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology*. **32**: 2498-2506.
- Johnson AC, Aerni HR, Gerritsen A, Gibert M, Giger W, Hylland K, Jurgens M, Nakari T, Pickering A, Suter MJF, Svenson A and Wettstein FE (2005) Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research* 39:47-58.
- Johnson AC, Belfroid A and Di Corcia A (2000) Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of the Total Environment* 256:163-173.
- Juhász AL and Naidu R (2000) Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo a pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation* 45:57-88.
- Ke JX, Zhuang WQ, Gin KYH, Reinhard M, Hoon LT and Tay JH (2007) Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:1163-1171.
- Kohyama E, Yoshimura A, Aoshima D, Yoshida T, Kawamoto H and Nagasawa T (2006) Convenient treatment of acetonitrile-containing wastes using the tandem combination of nitrile hydratase and amidase-producing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72:600-606.
- Layton AC, Gregory BW, Seward JR, Schultz TW and Sayler GS (2000) Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA. *Environmental Science & Technology* 34:3925-3931.
- Lee HB and Liu D (2002) Degradation of 17 beta-estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water Air and Soil Pollution* 134:353-368.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. 265-275.

- Manolov T, Kristina H and Benoit G (2005) Continuous acetonitrile degradation in a packed-bed bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:567-574.
- Muller M, Rabenoelina F, Balaguer P, Patureau D, Lemenach K, Budzinski H, Barcelo D, Lopez de Alda M, Kuster M, Delgenès JP and Hernandez-Raquet G (in press) Chemical and biological analysis of endocrine disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environmental Toxicology and Chemistry*
- Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K and Takada H (2006) Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research* 40:3297-3303.
- Olmez HK and Aran N (2005) Modeling the growth kinetics of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations. *International Journal of Food Microbiology* 98:135-143.
- Peu P, Brugere H, Pourcher AM, Kerouredan M, Godon JJ, Delgenes JP and Dabert P (2006) Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3578-3585.
- Purdum CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR and Sumpter JP (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology*. **8**: 275-285.
- Rehfuss M and Urban J (2005) *Alcaligenes faecalis* subsp *phenolicus* subsp nov a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Systematic and Applied Microbiology* 28:421-429.
- Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M and Sumpter JP (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science & Technology* 32:1559-1565.
- Servos MR, Bennie DT, Burnison BK, Jurkovic R, McInnis R, Neheli T, Schnell A, Seto P, Smyth SA and Ternes TA (2005) Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment* 336:155-170.
- Shi J, Fujisawa S, Nakai S and Hosomi M (2004) Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research* 38:2323-2330.
- Smejkal CW, Seymour FA, Burton SK and Lappin-Scott HM (2003) Characterisation of bacterial cultures enriched on the chlorophenoxyalkanoic acid herbicides 4-(2,4-dichlorophenoxy) butyric acid and 4-(4-chloro-2-methylphenoxy) butyric acid. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30:561-567.
- Ternes TA, Andersen H, Gilberg D and Bonerz M (2002) Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry* 74:3498-3504.
- Ternes TA, Herrmann N, Bonerz M, Knacker T, Siegrist H and Joss A (2004) A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K<sub>d</sub>) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research* 38:4075-4084.
- Ternes TA, Kreckel P and Mueller J (1999a) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of the Total Environment* 225:91-99.
- Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD and Servos M (1999b) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment* 225:81-90.
- Vader JS, van Ginkel CG, Sperling F, de Jong J, de Boer W, de Graaf JS, van der Most M and Stokman PGW (2000) Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere* 41:1239-1243.
- Weber S, Leuschner P, Kampfer P, Dott W and Hollender J (2005) Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:106-112.

- Yoshimoto T, Nagai F, Fujimoto J, Watanabe K, Mizukoshi H, Makino T, Kimura K, Saino H, Sawada H and Omura H (2004) Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology* 70:5283-5289.
- Yu CP, Roh H and Chu KH (2007) 17 beta-estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge. *Environmental Science & Technology* 41:486-492.
- Zhang XL, Gao PP, Chao QF, Wang LH, Senior E and Zhao LP (2004) Microdiversity of phenol hydroxylase genes among phenol-degrading isolates of *Alcaligenes* sp from an activated sludge system. *Fems Microbiology Letters* 237:369-375.
- Zumstein E, Moletta R and Godon JJ (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* 2:69-78.

---

---

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

---

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le devenir des œstrogènes et de l'activité œstrogénique au cours du traitement des eaux avait déjà été bien étudié antérieurement. Toutefois, des insuffisances et questionnements subsistaient. Des informations existaient mais avaient été obtenues sur des sites divers, ce qui rendaient difficiles les comparaisons et la synthèse des résultats. Dans cette thèse, pour la première fois, un bilan complet a été réalisé sur un seul site en prenant en compte les formes libres et conjuguées, les aspects chimiques et toxicologiques, ainsi que les compartiments aqueux et solides. Les résultats sur le devenir des œstrogènes conjugués viennent compléter des travaux précédemment réalisés mais qui portaient davantage sur le devenir des œstrogènes conjugués en amont de la STEP. Les principales conclusions sont que les formes sulfates et glucuronates constituent une part importante de la charge en œstrogènes des eaux usées. Leur mesure et prise en compte dans les bilans est donc primordiale puisque ces derniers sont facilement hydrolysés et convertis en formes libres, davantage toxiques, au cours du traitement. Dans le cas de la STEP étudiée, l'hydrolyse des œstrogènes conjugués n'induit pas d'accumulation de formes libres. Ces dernières sont, en effet, efficacement éliminées. En conséquence, dans les effluents de la STEP les formes conjuguées sont très peu présentes et la somme des formes libres est inférieure à la dizaine de ng/L. Le traitement biologique secondaire est responsable de la majeure partie de l'élimination des œstrogènes. Les mesures réalisées également dans les boues ont révélé des teneurs de l'ordre de la dizaine de ng/g ms. La prise en compte des compartiments eaux et boues a permis de réaliser un bilan complet suggérant que moins de 4% des œstrogènes est éliminé par adsorption alors que 93 à 97% est réellement biodégradé. Peu de bilan de masse tel que celui-ci n'avait été réalisé à ce jour. La double approche méthodologique opérée a permis de suivre parallèlement à la dynamique des œstrogènes, l'évolution de l'activité œstrogénique. L'abattement des œstrogènes corrélé à la diminution de l'activité œstrogénique, ainsi que la comparaison des activités théoriques et mesurées indiquent que, dans le cas d'une STEP recevant majoritairement des effluents domestiques, la majeure partie de l'activité œstrogénique est due aux œstrogènes. L'influence des xénoœstrogènes n'est cependant pas à exclure dans certain cas, notamment en entrée de STEP. En définitive, la STEP étudiée ici, offre de très bonnes performances d'élimination des œstrogènes et de l'activité œstrogénique. Cette aptitude serait à relier à la configuration de la STEP et aux paramètres opératoires appliqués. Ainsi, comme suggéré dans la littérature, la présence de traitements biologiques de l'azote et du phosphore, des temps de séjour hydraulique et des boues longs sont autant d'éléments qui favoriseraient la biodégradation des œstrogènes par les STEP. Néanmoins, malgré cela, les concentrations relevées dans les effluents et les boues ne sont pas négligeables sur le plan toxicologique, même s'il faut encore tenir compte de leur dilution dans les eaux naturelles et les sols. Est-ce qu'il serait possible



alors d'améliorer davantage les traitements biologiques secondaires ou est-ce que la solution passe par l'implémentation de traitements tertiaires physico-chimiques ou biologiques ? Dans les deux cas, la maximisation de la fraction biodégradée semble intéressante d'où la nécessité d'en connaître plus sur ce mécanisme. Parallèlement, l'étude du devenir de la fraction adsorbée, et de l'activité œstrogénique qui en découle, au cours du traitement des boues apparaît tout à fait essentielle. Elle permettra d'évaluer les flux d'œstrogènes transférés aux sols via l'épandage et, par conséquent, aux eaux (ruissellement, percolation).

Afin, de mesurer les teneurs en œstrogènes de matrices solides telles que les boues ou les compostes, la méthode validée dans le cadre cette thèse apparaît tout à fait adaptée. La récupération et la quantification des œstrogènes sont satisfaisantes avec des fractions non-extractibles minoritaires. Cette méthode a permis de mettre en évidence des différences de teneurs entre des boues de nature différente, primaires, secondaires et mixtes, provenant d'un même site. Jusqu'ici, seule la présence des œstrogènes dans des boues secondaires avait été considérée. Par ailleurs, la configuration de la STEP et les paramètres opératoires pourraient également influencer sur la fraction d'œstrogènes éliminée par adsorption au cours du traitement biologique secondaire. Les deux principaux traitements utilisés en France et plus largement dans le monde pour traiter les boues d'épuration sont la digestion anaérobie et le compostage. L'un comme l'autre ne semble pas adapté pour dégrader les œstrogènes ou l'activité œstrogénique. Les concentrations et activités relevées en aval de ces processus sont soit similaires, soit supérieures à celles mesurées en amont. Ceci, suggère que même si la charge en œstrogènes éliminée par adsorption est faible, leur incidence toxicologique n'est pas négligeable, d'autant plus si l'on considère leur persistance dans les boues. L'adsorption serait donc un mécanisme à minimiser au cours du traitement secondaire des eaux à moins de disposer de traitement des boues capables de dégrader ces fractions adsorbées. Par ailleurs, la double approche combinant évaluation chimique et biologique trouve ici toute sa pertinence. En effet, contrairement aux eaux, dans les boues et le compost, l'activité œstrogénique et d'autres activités endocriniennes semblent majoritairement dues aux xœstrogènes ou à d'autres composés tels que les phytoœstrogènes. De plus, dans le cas du compostage, les boues n'apparaissent pas comme la seule source de contamination du compost, les co-déchets doivent également être pris en compte au même titre que les boues.

La boue activée de la STEP étudiée présente un potentiel de biodégradation élevé. Les cultures d'enrichissement obtenues sont, en effet, capables de dégrader les œstrogènes naturels E1 et E2 mais aussi la molécule synthétique EE2. La dégradation de EE2 par une culture d'enrichissement n'avait jamais été rapportée précédemment. La dégradation de E2 passe par son oxydation préliminaire en E1. La transformation de E2 en E1 semble une étape assez rapide dans laquelle peut être impliquée l'espèce *Brevumdimonas dimituta*. Les cinétiques de dégradation de E1 et EE2 apparaissent plus lentes avec des temps de latence importants et des vitesses plus faibles, notamment pour EE2. Le consortium dégradant EE2

est, par ailleurs, sensible à un nutriment que contiendrait le surnageant d'une boue et pas le milieu minimum, vitaminé, utilisé. La présence d'une source additionnelle de carbone organique favoriserait la dégradation de E1, alors qu'elle serait défavorable pour celle de EE2. Les consortia dégradants ont été caractérisés via deux méthodes : l'isolement sur milieu solide et l'analyse de l'ADNr 16S en PCR-SSCP. Ces méthodes, respectivement, culture dépendante et indépendante, se révèlent complémentaires ; certaines espèces n'étant détectées que par l'une ou l'autre des approches. Un certain nombre d'espèces, surtout connues pour dégrader d'autres composés récalcitrants, constitue ces consortia. Les bactéries impliquées dans la dégradation des œstrogènes ne seraient donc pas spécifiques à ce substrat. Dans le cas du consortium dégradant EE2, des bactéries non cultivées jusqu'ici ont également été identifiées. Toutefois, les isolats, testés individuellement, n'étaient pas capables de dégrader les hormones. Il est possible que les isolats nécessitent alors des temps de latence plus longs dus à une initiation enzymatique plus lente résultant du passage sur milieu solide. Il se peut aussi que les bactéries impliquées dans la dégradation des œstrogènes ne soient pas cultivables, tout du moins sur milieu solide ou dans les conditions appliquées. La dégradation des œstrogènes pourrait également nécessiter l'implication de plusieurs espèces, cultivables ou non, qui agiraient en syntrophisme.

L'ensemble de ces travaux a contribué à plusieurs avancées intéressantes. Tout d'abord, sur le plan national, il a permis d'obtenir des données sur le devenir des œstrogènes dans des systèmes de traitement réels, représentatifs de ce que l'on peut trouver en France. Très peu d'études menées sur le territoire français ont été publiées à ce jour. Ce travail pourrait apporter des éléments de réflexion pertinents alors qu'aujourd'hui, simultanément, la législation européenne sur les micropolluants tend à se renforcer et le parc de STEP française, à se renouveler.

Des résultats qui avaient été obtenus en Europe et ailleurs dans le monde sur le devenir des œstrogènes dans les STEP ont pu être confirmés. Des lacunes qui persistaient sur le devenir des formes conjuguées des œstrogènes ont pu être en partie comblées. Ces travaux ont beaucoup apporté concernant la mesure des œstrogènes adsorbés dans les matrices solides complexes, l'évaluation des teneurs dans les boues et de l'importance du mécanisme d'adsorption. Des informations intéressantes ont été obtenues sur le devenir des œstrogènes au cours du traitement des boues, mais aussi sur les micro-organismes impliqués dans le mécanisme de biodégradation, aspects très peu traités à ce jour. Enfin, ces travaux ont mis en exergue la pertinence de certaines approches méthodologiques combinant des techniques complémentaires. C'est le cas de la double approche évaluation chimique et toxicologique de la dynamique des micropolluants au sein des systèmes de traitement. C'est le cas, également, de la double approche culture dépendante et indépendante utilisée pour caractériser les consortia dégradant les œstrogènes.

Ces travaux de thèse ont de surcroît permis de mettre en évidence plusieurs axes de recherches futures. Premièrement, il apparaît tout à fait intéressant dans le but d'optimiser l'élimination des œstrogènes par les STEP de maximiser la biodégradation, qui permet d'éliminer réellement les œstrogènes et leur activité, en minimisant l'adsorption, qui ne constitue qu'un transfert de molécules et de toxicité. Pour cela, deux approches sont envisageables :

- La première est de déterminer, sur les installations réelles, les paramètres opératoires et les procédés influençant l'efficacité de la biodégradation et le degré d'adsorption des œstrogènes. Pour cela, il faudrait envisager une campagne de grande envergure sur un nombre important d'installations de manière à réaliser des bilans complets. Ces bilans permettraient de déterminer les fractions biodégradées et adsorbées en fonctions des caractéristiques du site étudié et devront faire l'objet d'un traitement statistique.
- La seconde approche est indirecte et consisterait à déterminer les micro-organismes impliqués dans le mécanisme de biodégradation observé sur les STEP. La connaissance des espèces ou consortia dégradant permettrait d'en savoir plus sur leur physiologie et les voies métaboliques mises en jeu pour dégrader les œstrogènes. Ces connaissances pourraient alors être extrapolées aux STEP afin de favoriser ces espèces dans les traitements biologiques secondaires ou au sein de traitements biologiques tertiaires. Les isolats obtenus dans le cadre de cette thèse pourraient servir de départ pour ces travaux. Ainsi il serait nécessaire, par exemple, de comprendre comment ces isolats interviennent dans les cultures initiales. De plus, la détermination des éléments contenus dans le surnageant de boues et, à priori, nécessaires au consortium dégradant EE2 serait intéressante. Elle pourrait permettre de comprendre pourquoi dans de nombreux cas, EE2 n'est pas dégradé ni à l'échelle du laboratoire, ni à l'échelle d'installations réelles. Comme dans le cas de la première approche, il serait également envisageable, via une campagne d'envergure, de mettre en corrélation l'identification et les caractéristiques des espèces dégradantes présentes dans les enrichissements de boues activées de différentes STEP en fonction des caractéristiques techniques de ces dernières.

Le deuxième point qui susciterait de plus amples investigations est le devenir des œstrogènes et des xœstrogènes, ainsi que de leurs activités endocriniennes au cours du traitement des boues. Les premiers résultats indiquant une persistance des PE et des activités au cours de procédés tels que la digestion anaérobie ou le compostage conduisent à des interrogations quant aux transferts de ce type de pollution vers les sols. L'évaluation du risque de contamination des sols et des risques toxicologiques engendrés par l'épandage de boues d'épuration sur des sols agricoles apparaît donc primordiale. Deux approches de recherches seraient alors envisageables :

- La première approche consisterait à déterminer la capacité d'unités réelles de digestion ou de compostage à dégrader les œstrogènes et autres composés œstrogéniques. Cette capacité serait alors par la suite à mettre en corrélation avec les caractéristiques des sites étudiés. Parallèlement, une évaluation toxicologique des performances du procédé devra systématiquement être réalisée afin de rapprocher l'abattement des activités toxiques de celui des composés. Cette perspective pourrait d'ailleurs être conduite en parallèle de la perspective précédente lors de campagnes communes de prélèvement. Néanmoins, comme l'ont montré ces travaux de thèse, pour interpréter de manière pertinente l'évolution parallèle des activités et des composés au sein de systèmes de traitement, il serait nécessaire de disposer d'information supplémentaire sur les propriétés toxicologiques de chacune des classes de PE individuellement.
- La seconde approche consisterait à étudier le devenir des composés œstrogéniques et des activités endocriniennes au sein de systèmes contrôlés, à l'échelle du laboratoire. Trop peu de travaux existent dans ces conditions. De futurs travaux de ce type sont donc nécessaires afin d'expliquer, par exemple, les différences observées, à l'échelle réelle et à l'échelle pilote, sur la capacité de la digestion anaérobie à l'éliminer les œstrogènes. Par ailleurs, aucune approche pilote n'existe concernant le devenir des œstrogènes ou de l'activité œstrogénique au cours du compostage de boues. Ces travaux permettraient d'identifier les mécanismes et les paramètres impliqués dans l'élimination de la toxicité au cours de ces procédés de traitement.

Les quelques axes de travaux de recherches proposés ci-dessus permettront de comprendre précisément les mécanismes impliqués dans l'élimination des œstrogènes et de l'activité œstrogénique au cours du traitement des eaux usées et des boues urbaines. Ils permettront également de déterminer les paramètres influençant ces mécanismes afin de proposer des solutions technologiques destinées à optimiser la biodégradation de ces composés au sein des systèmes de traitement. Enfin ils permettront d'évaluer les conséquences toxicologiques des installations actuelles et d'installations optimisées. Ces travaux à l'interface de la chimie, du génie des procédés et de la biologie demandent des compétences multiples et nécessiteraient éventuellement la mise en place de notions et techniques nouvelles. Ainsi, en plus de leur concentration et activités toxiques, la biodisponibilité des composés devrait être évaluée puisque celles-ci entre en jeu dans les mécanismes de biodégradation mais aussi de toxicité. Cette biodisponibilité peut être évaluée indirectement via la spéciation des CTO mais aussi directement en utilisant des techniques d'extraction douces et des méthodes passives intégratives de type membranes semi-perméables (SPMD). Ces notions et techniques permettront d'aller plus loin dans l'évaluation de l'impact des systèmes de traitements sur l'élimination des CTO et de leur toxicité, et donc dans l'évaluation de leur impact sur les milieux naturels et les organismes vivants.

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackermann, G.E., Brombacher, E. and Fent, K. (2002). "Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents". *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 1864-1875.
- Aerni, H.R., Kobler, B., Rutishauser, B.V., Wettstein, F.E., Fischer, R., Giger, W., Hungerbühler, A., Marazuela, M.D., Peter, A., Schonenberger, R., Vogeli, A.C., Suter, M.J.F. and Eggen, R.I.L. (2004). "Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(3): 688-696.
- Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sorensen, B. and Ternes, T.A. (2003). "Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant". *Environmental Science & Technology* 37(18): 4021-4026.
- Andersen, H.R., Hansen, M., Kjølholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Ternes, T. and Halling-Sorensen, B. (2005). "Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment". *Chemosphere* 61(1): 139-146.
- Applanat, M. (2002). Documents pour le médecin du travail. Perturbateurs endocriniens et effets toxiques, Paris, INRS.
- Arnold, S.F., Robinson, M.K., Notides, A.C., Guillette, L.J. and McLachlan, J.A. (1996). "A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens". *Environ. Health Perspect.* 104: 544-548.
- Balaguer, P., François, F., Communal, F., Frenet, H., Boussioux, A.-M., Pons, N., Nicolas, J. and Casellas, C. (1999). "Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens". *Science of the Total Environment* 233: 47-56.
- Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A. and Samperi, R. (2000). "Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water". *Environmental Science & Technology* 34(24): 5059-5066.
- Birkett, J.W. (2003a). "Scope of the problem". *Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. J. W. Birkett and J. N. Lester. Boca Raton (Florida), Lewis publishers/IWA publishing: 1-34.
- Birkett, J.W. (2003b). "Sources of endocrine disruptors". *Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. J. W. Birkett and J. N. Lester. Boca Raton (Florida), Lewis publishers/IWA publishing: 35-58.
- Braga, O., Smythe, G.A., Schafer, A.I. and Feitz, A.J. (2005). "Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants". *Environmental Science & Technology* 39(9): 3351-3358.
- Carballa, M., Omil, F., Alder, A.C. and Lema, J.M. (2006). "Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products". *Water Science and Technology* 53(8): 109-117.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llompарт, M., Garcia-Jares, C., Rodriguez, I., Gomez, M. and Ternes, T. (2004). "Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant". *Water Research* 38(12): 2918-2926.

- Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S. and Levi, Y. (2004). "Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France)". *Science of the Total Environment* 324(1-3): 55-66.
- Cespedes, R., Petrovic, M., Raldua, D., Saura, U., Pina, B., Lacorte, S., Viana, P. and Barcelo, D. (2004). "Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(3): 697-708.
- Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O. and Kroiss, H. (2005). "The solids retention time : a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants". *Water Research* 39: 97-106.
- Clara, M., Strenn, B., Saracevic, E. and Kreuzinger, N. (2004). "Adsorption of bisphenol-A, 17 beta-estradiol and 17 alpha-ethinylestradiol to sewage sludge". *Chemosphere* 56(9): 843-851.
- D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M. and Samperi, R. (2003). "Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities". *Science of the Total Environment* 302(1-3): 199-209.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P. and Waldock, M. (1998). "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening". *Environmental Science & Technology* 32(11): 1549-1558.
- Donova, M.V., Egorova, O.V. and Nikolayeva, V.M. (2005). "Steroid 17 beta-reduction by microorganisms - a review". *Process Biochemistry* 40(7): 2253-2262.
- Fahrbach, M., Kuever, J., Meinke, R., Kampfer, P. and Hollender, J. (2006). "Denitratisoma oestradiolicum gen. nov., sp nov., a 17 beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1547-1552.
- Folmar, L.C., Hemmer, M.J., Denslow, N.D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., Richman, H., Meredith, H. and Grau, E.G. (2002). "A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethinylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro". *Aquatic Toxicology* 60(1-2): 101-110.
- Fujii, K., Kikuchi, S., Satomi, M., Ushio-Sata, N. and Morita, N. (2002). "Degradation of 17 beta-estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan". *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 2057-2060.
- Fujii, K., Satomi, M., Morita, N., Motomura, T., Tanaka, T. and Kikuchi, S. (2003). "Novosphingobium tardaogens sp nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 47-52.
- Ganmaa, D., Wang, P.Y., Qin, L.Q., Hoshi, K. and Sato, A. (2001). "Is milk responsible for male reproductive disorders?" *Medical Hypotheses* 57(4): 510-514.
- Gayet-Ageron, A., Amamra, N., Ringa, V., Tainturier, V., Berr, C., Clavel-Chapelon, F., Delcourt, C., Delmas, P.D., Ducirnetiere, P. and Schott, A.M. (2005). "Estimated numbers of postmenopausal women treated by hormone therapy in France". *Maturitas* 52(3-4): 296-305.
- Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M.A., Batt, A.M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P. and Souidi, M. (2006). "Les cytochromes P450 :

métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique". *Annales de Biologie Clinique* 64(6): 535-548.

Haiyan, R., Shulan, J., Dao, W. and Naeem, u. (2006). "Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by *sphingobacterium* sp. JCR5". *Chemosphere*.

Hense, B.A., Severin, G.F., Welzl, G. and Schramm, K.W. (2004). "Effects of 17  $\alpha$ -ethynylestradiol on zoo- and phytoplankton in lentic microcosms". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(3): 716-724.

Holbrook, R.D., Novak, J.T., Grizzard, T.J. and Love, N.G. (2002). "Estrogen receptor agonist fate during wastewater and biosolids treatment processes: A mass balance analysis". *Environmental Science & Technology* 36(21): 4533-4539.

Honkakoski, P. and Negishi, M. (2000). "Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors". *Biochemical Journal* 347: 321-337.

Hurst, C.H. and Waxman, D.J. (2004). "Environmental phthalate monoesters activate pregnane X receptor-mediated transcription". *Toxicology and Applied Pharmacology* 199(3): 266-274.

Inhoffen, H.H. and Hohlweg, W. (1938). "Neue per os-wirksame weibliche Keimdrüsenhormon-Derivate: 17-Aethinyl-oestradiol und Pregnen-in-on-3-ol-17". *Naturwissenschaften* 26(6): 96.

Ivashechkin, P., Corvini, P.F.X. and Dohmann, M. (2004). "Behaviour of endocrine disrupting chemicals during the treatment of municipal sewage sludge". *Water Science and Technology* 50(5): 133-140.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P. and Tyler, C.R. (2003). "Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent". *Aquatic Toxicology* 65(2): 205-220.

Johnson, A.C., Aerni, H.R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jurgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M.J.F., Svenson, A. and Wettstein, F.E. (2005). "Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices". *Water Research* 39: 47-58.

Johnson, A.C., Belfroid, A. and Di Corcia, A. (2000). "Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent". *Science of the Total Environment* 256(2-3): 163-173.

Johnson, A.C. and Sumpter, J.P. (2001). "Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works". *Environmental Science & Technology* 35(24): 4697-4703.

Johnson, A.C. and Williams, R.J. (2004). "A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethynylestradiol at sewage treatment works". *Environmental Science & Technology* 38(13): 3649-3658.

Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P.R. and Siegrist, H. (2004). "Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization". *Environmental Science & Technology* 38(11): 3047-3055.

Jurgens, M.D., Holthaus, K.I.E., Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Hetheridge, M. and Williams, R.J. (2002). "The potential for estradiol and ethynylestradiol degradation in English rivers". *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(3): 480-488.



- Ke, J.X., Zhuang, W.Q., Gin, K.Y.H., Reinhard, M., Hoon, L.T. and Tay, J.H. (2007). "Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium". *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(5): 1163-1171.
- Kliwer, S.A., Goodwin, B. and Willson, T.M. (2002). "The nuclear pregnane X receptor: A key regulator of xenobiotic metabolism". *Endocrine Reviews* 23(5): 687-702.
- Koplin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. and Buxton, H.T. (2002). "Response to comment on "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance"". *Environmental Science & Technology* 36(18): 4004-4004.
- Korner, W., Bolz, U., Sussmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V. and Hagenmaier, H. (2000). "Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany". *Chemosphere* 40(9-11): 1131-1142.
- Korner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J. and Hagenmaier, H. (1999). "Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents". *Science of the Total Environment* 225(1-2): 33-48.
- Kuster, M., Lopez, M.J., de Alda, M.J.L. and Barcelo, D. (2004). "Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments". *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 23(10-11): 790-798.
- Labadie, P. and Budzinski, H. (2005). "Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381: 1199-1205.
- Lai, K.M., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N. (2002). "Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*". *Applied and Environmental Microbiology* 68(2): 859-864.
- Lange, I.G., Daxenberger, A., Schiffer, B., Witters, H., Ibarreta, D. and Meyer, H.H.D. (2002). "Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment". *Analytica Chimica Acta* 473(1-2): 27-37.
- Layton, A.C., Gregory, B.W., Seward, J.R., Schultz, T.W. and Sayler, G.S. (2000). "Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA". *Environmental Science & Technology* 34(18): 3925-3931.
- Lee, H.B. and Liu, D. (2002). "Degradation of 17 beta-estradiol and its metabolites by sewage bacteria". *Water Air and Soil Pollution* 134(1-4): 353-368.
- Lee, H.B., Peart, T.E., Chan, J. and Gris, G. (2004). "Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in sewage and sludge samples in Toronto, Canada". *Water Quality Research Journal of Canada* 39(1): 57-63.
- Lemaire, G., Mnif, W., Pascussi, J.M., Pillon, A., Rabenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J.C., Cavailles, V., Duchesne, M.J. and Balaguer, P. (2006). "Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system". *Toxicological Sciences* 91(2): 501-509.
- Leusch, F.D.L., Chapman, H.F., Korner, W., Gooneratne, S.R. and Tremblay, L.A. (2005). "Efficacy of an advanced sewage treatment plant in southeast Queensland, Australia, to remove estrogenic chemicals". *Environmental Science & Technology* 39(15): 5781-5786.

- Leusch, F.D.L., Chapman, H.F., Van den Heuvel, M.R., Tan, B.L.L., Gooneratne, S.R. and Tremblay, L.A. (2006). "Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65(3): 403-411.
- Li, F.S., Yuasa, A., Obara, A. and Mathews, A.P. (2005). "Aerobic batch degradation of 17-beta estradiol (E2) by activated sludge: Effects of spiking E2 concentrations, MLVSS, and temperatures". *Water Research* 39(10): 2065-2075.
- Matsui, S., Takigami, H., Matsuda, T., Taniguchi, N., Adachi, J., Kawami, H. and Shimizu, Y. (2000). "Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment". *Water Science and Technology* 42(12): 173-179.
- Moore, L.B., Parks, D.J., Jones, S.A., Bledsoe, R.K., Consler, T.G., Stimmel, J.B., Goodwin, B., Liddle, C., Blanchard, S.G., Willson, T.M., Collins, J.L. and Kliewer, S.A. (2000). "Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands". *Journal of Biological Chemistry* 275(20): 15122-15127.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K. and Takada, H. (2006). "Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment". *Water Research* 40(17): 3297-3303.
- Nasu, M., Goto, M., Kato, H., Oshima, Y. and Tanaka, H. (2001). "Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants". *Water Science and Technology* 43(2): 101-108.
- Noguerol, T.N., Boronat, S., Casado, M., Raldua, D., Barcelo, D. and Pina, B. (2006). "Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385(6): 1012-1019.
- Pflieger-Bruss, S., Schuppe, H.C. and Schill, W.B. (2004). "The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals". *Andrologia*(36): 337-345.
- Pillon, A., Boussioux, A.M., Escande, A., Ait-Aissa, S., Gomez, E., Fenet, H., Ruff, M., Moras, D., Vignon, F., Duchesne, M.J., Casellas, C., Nicolas, J.C. and Balaguer, P. (2005). "Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor-alpha: Application to environmental analysis". *Environmental Health Perspectives* 113(3): 278-284.
- Rivas, A., Olea, N. and Olea-Serrano, F. (1997). "Human exposure to endocrine-disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden". *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 16(10): 613-619.
- Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. (1996). "Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen". *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 241-248.
- Rutishauser, B.V., Pesonen, M., Escher, B.I., Ackermann, G.E., Aerni, H.R., Suter, M.J.F. and Eggen, R.I.L. (2004). "Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids". *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4): 857-864.
- Schiliro, T., Pignata, C., Fea, E. and Gilli, G. (2004). "Toxicity and estrogenic activity of a wastewater treatment plant in Northern Italy". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47(4): 456-462.
- Servos, M.R., Bennie, D.T., Burnison, B.K., Jurkovic, R., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S.A. and Ternes, T.A. (2005). "Distribution of estrogens, 17beta-estradiol

- and estrone, in canadian municipal wastewater treatment plants". *Science of the Total Environment* 336: 155-170.
- Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S. and Hosomi, M. (2004). "Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*". *Water Research* 38(9): 2323-2330.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N. and Serrano, F.O. (1995). "The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens : an update on estrogenic environmental pollutants". *Environ. Health Perspect.* 103: 113-122.
- Suzuki, Y. and Maruyama, T. (2006). "Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge". *Water Research* 40(5): 1061-1069.
- Svenson, A., Allard, A.S. and Ek, M. (2003). "Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants". *Water Research* 37(18): 4433-4443.
- Ternes, T.A., Andersen, H., Gilberg, D. and Bonerz, M. (2002). "Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS". *Analytical Chemistry* 74(14): 3498-3504.
- Ternes, T.A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H. and Joss, A. (2004). "A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K<sub>d</sub>) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge". *Water Research* 38(19): 4075-4084.
- Ternes, T.A., Kreckel, P. and Mueller, J. (1999a). "Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge". *Science of the Total Environment* 225(1-2): 91-99.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D. and Servos, M. (1999b). "Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil". *Science of the Total Environment* 225(1-2): 81-90.
- Vader, J.S., van Ginkel, C.G., Sperling, F., de Jong, J., de Boer, W., de Graaf, J.S., van der Most, M. and Stokman, P.G.W. (2000). "Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge". *Chemosphere* 41(8): 1239-1243.
- Weber, S., Leuschner, P., Kampfer, P., Dott, W. and Hollender, J. (2005). "Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture". *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(1): 106-112.
- Ying, G.G., Kookana, R.S. and Dillon, P. (2003). "Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material". *Water Research* 37(15): 3785-3791.
- Ying, G.G., Kookana, R.S. and Ru, Y.J. (2002). "Occurrence and fate of hormone steroids in the environment". *Environment International* 28(6): 545-551.
- Yoshimoto, T., Nagai, F., Fujimoto, J., Watanabe, K., Mizukoshi, H., Makino, T., Kimura, K., Saino, H., Sawada, H. and Omura, H. (2004). "Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants". *Applied and Environmental Microbiology* 70(9): 5283-5289.
- Yu, C.P., Roh, H. and Chu, K.H. (2007). "17 beta-estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge". *Environmental Science & Technology* 41(2): 486-492.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique du noyau cyclopentanophenanthrene et de différents œstrogènes.....	21
Figure 2 : Structure chimique de différentes formes conjuguées de l'œstradiol avec un glucuronate et/ou un sulfate. ....	22
Figure 3 : Les différents éléments du système endocrinien chez l'humain.....	23
Figure 4 : Mécanisme d'action des œstrogènes au niveau des cellules cibles contenant des récepteurs $\alpha$ (cellule 1) ou $\beta$ (cellule 2). ....	24
Figure 5 : Schéma du cycle menstruel sur lequel agit l'éthinylestradiol (a) et diversité des pratiques contraceptives à travers le monde selon l'Organisation des Nations Unies (b).....	25
Figure 6 : Effets agonistes et antagonistes de perturbateurs endocriniens suite à leur fixation au récepteur hormonal. ....	27
Figure 7 : Courbe dose-réponse d'une substance ayant un effet biologique.....	28
Figure 8 : Cas d'activité œstrogénique induite par un œstrogène ou un pesticide via ER (a), par une dioxine via le complexe AhR-ER-Arnt (b) ou par des xénobiotiques via PXR ① ou AhR ②, induisant la transcription de gènes ③ impliquée dans le métabolisme des œstrogènes et de ER (c).....	29
Figure 9 : Schéma de principe d'un bio-test <i>in vitro</i> récepteur-gène reporter : cas du récepteur PXR avec une cellule qui ne l'exprime pas naturellement d'où la présence d'un gène d'expression de PXR et d'un gène reporter. ....	30
Figure 10 : Voies métaboliques proposées pour l'œstrogène naturel E2 (a) et l'œstrogène synthétique EE2 (b) par Lee and Liu (2001) et Haiyan <i>et al.</i> (2006), respectivement.....	45
Figure 11: Protocole d'analyse des œstrogènes utilisé dans le cas des suivis de procédés ; MeOH = méthanol ; H2O = eau milliQ ; TEA = triéthylamine ; EtAC = éthyle acétate ; DCM = dichlorométhane.....	59
Figure 12 : Principe du modèle cellulaire MELN utilisé pour mesurer l'activité œstrogénique.....	62
Figure 13 : Procédure analytique de caractérisation des communautés microbiennes par des méthodes de biologie moléculaire. ....	66

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Valeurs de EC50 pour E2 (en pM) et potentiel œstrogène relatif par rapport à E2 d'œstrogènes naturels, synthétiques et de xœstrogènes pour différents tests <i>in vitro</i> .....	31
Tableau 2 : Valeurs de EC50 des molécules de références sur AhR et PXR (pM à $\mu$ M) et potentiel endocrinien relatif par rapport à ces molécules de quelques xénobiotiques pour différents test <i>in vitro</i> . ....	32
Tableau 3 : Concentrations des œstrogènes naturels (E1, E2 et E3) et synthétiques (EE2) en entrée de STEP dans différents pays à travers le monde (ng/L).....	35
Tableau 4 : Activité œstrogénique des ERU (ngEEQ/L), part estimée des xénobiotiques dans cette activité mesurée (%) et part des apports industriels aux ERU (%). ....	37
Tableau 5 : Abattements des œstrogènes naturels (E1, E2 et E3) et synthétiques (EE2) par les STEP dans différents pays à travers le monde (%). ....	40
Tableau 6 : Abattement de l'activité œstrogénique par les STEP dans différents pays à travers le monde (%) et impacts respectifs des traitements primaires (I) et secondaires (II). ....	41
Tableau 7 : HRT global, HRT dans le bassin d'aération (en heures) et SRT (en jours) pour différents types de procédés d'épuration biologique.....	43
Tableau 8 : Concentrations des œstrogènes naturels (E1 et E2) et synthétiques (EE2) dans des boues de STEP (ng/g ms).....	46
Tableau 9 : Concentrations des œstrogènes naturels (E1, E2 et E3) et synthétiques (EE2) en sortie de STEP dans différents pays à travers le monde (ng/L).....	50
Tableau 10 : Activité œstrogénique des effluents de STEP (ngEEQ/L), part estimée des xénobiotiques dans cette activité mesurée (%) et part des apports industriels aux ERU (%). ....	52
Tableau 11 : Paramètres de réglage pour l'analyse des œstrogènes en chromatographie liquide-spectrométrie de masse tandem. ....	61
Tableau 12 : Composition et proportion des différentes solutions constituant le milieu de culture.....	63