

PROJET ANR « EVALUFQ-VOL »: IMPACT DE L'EPANDAGE DE FUMIER DE VOLAILLES SUR LES TRANSFERTS DE BACTERIES ET D'ANTIBIOTIQUES VERS LE MILIEU AQUATIQUE

Cotinet Patrice¹, Heddadj Djilali¹, Pourcher Anne-Marie², Dabert Patrick², Communal Pierre-Yves³, Jadas-Hecart Alain³, Maurice Robert⁴, Kempf Isabelle⁴

¹Chambre Régionale d'Agriculture de Bretagne - ZAC Atalante Champeaux - 35042 RENNES

²Cemagref - 17 avenue de Cucillé - 35044 RENNES

³Université d'Angers / LEESA - 2 boulevard Lavoisier - 49045 ANGERS

⁴Anses - Zoopole les croix - 22440 PLOUFRAGAN

patrice.cotinet@morbihan.chambagri.fr

RÉSUMÉ

Après un épandage, les bactéries fécales et les antibiotiques contenus dans le fumier de volaille peuvent être retenus dans le sol, ou entraînés par les eaux de ruissellement. L'objectif de cette étude est de comprendre leurs mécanismes de transferts ainsi que leurs niveaux de concentration afin de mieux évaluer les risques de contamination du milieu. Le fumier utilisé provient d'un lot de volaille traité avec des fluoroquinolones. L'épandage a été réalisé sur céréales à la sortie de l'hiver à la dose de 8 Tonnes/ha. Trois simulations de pluie (correspondant à trois répétitions) ont été réalisées juste après l'épandage du fumier. Sur chaque placette expérimentale (1m²) nous avons obtenu une lame ruisselée de 13 mm. Les germes recherchés (*E.coli* et entérobactéries) sont présents dans les eaux de ruissellement. Leurs niveaux de concentrations ne diminuent que très légèrement au cours du ruissellement induit. Pour une lame ruisselée de 10 mm, le flux exporté est respectivement pour *E. coli* et entérobactéries de 1,8 % et 4 % de la quantité apportée avec le fumier. Les concentrations d'enrofloxacin mesurées dans les eaux de ruissellement, se situent dans la fourchette de 2 à 31 µg/l, ce qui correspond pour une lame ruisselée de 10 mm à une exportation de 1% de la dose apportée. Pour les sols en fin de simulation de pluie, les concentrations d'enrofloxacin sont de 0,165 à 0,696 mg/kg. Bien que faibles par rapport aux apports, les quantités de bactéries fécales et d'antibiotiques exportées par les eaux de ruissellement sont susceptibles de perturber les sols et le milieu aquatique.

ABSTRACT

THE IMPACT OF POULTRY MANURE SPREADING ON THE TRANSFERAL OF BACTERIA AND ANTIBIOTICS TO AQUATIC ENVIRONMENTS

After poultry manure spreading, faecal bacteria and antibiotics contained in the manure can be retained in the soil or carried away by runoff water. The objective of this study is to understand how the transfers occur as well as their level of concentration in order to better evaluate the risk of contaminating the environment. The manure used comes from a batch of poultry treated with fluoroquinolones. Spreading was carried out on cereals at the end of winter at a dose of 8 tons/ha. Three rainfall simulations (the equivalent of three iterations) were carried out just after the manure spreading. On each experimental plot (1m²) we obtained a runoff layer of 13mm. The germs checked for (*E. coli* and enterobacteria) are present in the runoff water. Their levels of concentration decrease only slightly during the resulting runoff. For a runoff layer of 10mm, the flow removed 1,8% of the *E. coli* and 4% of the enterobacteria added by the manure. The concentrations of enrofloxacin measured in the runoff water are between 2 and 31 µg/l, which for a runoff layer of 10mm, corresponds to the removal of 1% of the total amount of enrofloxacin added by the poultry manure. At the end of rainfall simulation, the concentrations of enrofloxacin in the soil are between 0,165 and 0,696 mg/kg. Although low compared to the original amount added, the quantities of faecal bacteria and antibiotics carried by runoff water are likely to disturb the aquatic environment.

INTRODUCTION

Le fumier de volailles est généralement valorisé pour la fertilisation des cultures, soit directement à la sortie du bâtiment d'élevage ou soit après stockage et éventuellement compostage. Les litières des animaux peuvent contenir des microorganismes pathogènes pour la santé humaine, des résidus de médicaments vétérinaires ainsi que des bactéries antibio-résistantes. Les épandages de litières sont donc une source potentielle de contamination pour le réseau hydrographique. En effet, les micro-organismes du fumier sont susceptibles de contaminer les eaux de surface après épandage via le ruissellement (Brooks et al., 2009; Gerba et Smith, 2005; Jenkins et al., 2008 ; Mishra et al., 2008 ; Soupir et al., 2006).

Actuellement un certain nombre d'élevages font l'objet de traitements antibiotiques à base de fluoroquinolones (FQ) afin de traiter la pathologie dominante en aviculture, à savoir la colibacillose aviaire. Certains pays ont interdit les FQ en aviculture en raison du risque de sélection de souches de *Campylobacter* résistantes. Les antibiotiques de la famille des FQ sont également utilisés en médecine humaine et leur détection dans les cours d'eaux soulève un certain nombre d'inquiétudes chez les scientifiques (Lévi, 2006). Leur devenir et leurs impacts sur les écosystèmes sont mal connus (Virlovet, 2006). Même si la majeure partie des résidus médicamenteux retrouvés dans les eaux semble provenir de l'activité humaine via les stations d'épuration, des apports liés au ruissellement en zone de culture et d'élevage sont mentionnés dans la littérature (Boxall et al., 2003 ; Tamtam et al., 2009). Il est difficile de faire la part relative de ces deux sources de contamination.

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une évaluation globale des bénéfices et des risques liés à l'utilisation des FQ en élevage avicole. Son objectif est d'apporter des premiers éléments de quantification de l'éventuelle contribution des fumiers de volailles à la contamination des eaux de surface.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Site d'étude

Cette étude a été conduite en février 2009, à la station de recherche de Kerguehennec gérée par la Chambre Régionale d'Agriculture de Bretagne. La parcelle expérimentale, présentant une pente de 3%, a été labourée et semée en blé en octobre 2008. Trois placettes (1 m² chacune) isolées par des bordures et situées à proximité les unes des autres ont servi de répliquas. Le sol est un Brunisol limoneux moyennement profond sur micaschiste. La texture du sol est limoneuse et présente la composition suivante : 169 g.kg⁻¹ d'argile, respectivement 249 et 211 g.kg⁻¹

de limon fin et grossier ainsi que 213 et 160 g.kg⁻¹ de sable fin et grossier.

1.2. Le fumier de volaille

Le fumier utilisé provient d'un lot de poulets de chair traités avec des fluoroquinolones (enrofloxacin) à la dose thérapeutique. Le lot a été conduit du 17 janvier au 23 février 2009 avec des poulets à croissance rapide (Ross jaune PM3) obtenus auprès d'un couvoir local. Ils sont vaccinés contre la bronchite infectieuse aviaire, la maladie de Gumboro et l'infection à pneumovirus. La litière, composée de copeaux de bois non traité est déposée à raison d'environ 5 kg/m² correspondant à un chargement de 20,5 poulets au m². Le traitement des poulets à l'enrofloxacin débute le 12 février 2009. A cette date, ils ont 24 jours d'âge et pèsent en moyenne 1,120 kg. L'enrofloxacin est donnée dans l'eau de boisson pendant 4 jours. Le poids des oiseaux est évalué chaque jour de manière à obtenir une posologie de 10 mg.kg⁻¹.

L'épandage du fumier, effectué 2 à 3 jours après la vidange du bâtiment, est réalisée manuellement à la dose de 800 g.m⁻² (8 T.ha⁻¹) sur une culture de blé au stade fin tallage. Cette dose a été déterminée par la méthode des bilans prenant en compte les besoins de la culture, la teneur en azote du fumier, et les fournitures du sol.

1.3. Le simulateur de pluie

La méthode sous pluie simulée, fréquemment utilisée dans le domaine de la recherche, est pertinente pour évaluer les risques de transferts de contaminants hors des parcelles agricoles (Jenkins et al., 2008). Le simulateur de pluie utilisé a une structure pyramidale de 3,50 m de hauteur (Asseline et Valentin, 1978). La tête électronique du simulateur et le gicleur sont positionnés sur un bras oscillant. Ce bras est fixé dans la partie supérieure de la structure. Le gicleur, alimenté sous pression constante par une pompe, produit un filet d'eau plat en forme d'éventail. La pluie produite a des caractéristiques proches de celles des gouttes de pluie naturelle (Salles et al, 2000). Elle arrose une micro-parcelle de 1 m² délimitée par un cadre enfoncé dans le sol, percé d'une gouttière pour la collecte des eaux de ruissellement. L'eau utilisée provient d'un forage profond (80 mètres) ne présentant aucune contamination bactérienne d'origine fécale. Trois simulations de pluie (correspondant à trois répétitions) ont été réalisées juste après l'épandage du fumier. Nous avons pris le parti de nous positionner dans le scénario qui nous semblait le plus à risque pour l'environnement.

Les simulations se sont déroulées les 26 et 27 février 2009. Chaque parcelle expérimentale a reçu une averse d'intensité égale à 24 mm.h⁻¹ pendant une durée variant de 78 à 103 minutes afin d'obtenir une lame ruisselée de 13 litres.m⁻² (volume nécessaire pour les analyses effectuées).

1.4. Paramètres mesurés

Au cours des simulations de pluies, plusieurs paramètres sont mesurés dans le but de caractériser le ruissellement et de calculer des flux de polluants ainsi que les matières érodées. Ces mesures ont été relevées à la fois sur le sol et sur les eaux.

Les eaux de ruissellement sont collectées manuellement et à différents pas de temps durant toute la durée de la simulation (12 échantillons par simulation). La totalité du ruissellement induit est ainsi récupérée dans des flacons stériles. Ces prélèvements permettent de mesurer l'intensité du ruissellement (mm.h^{-1}), les teneurs en bactéries, antibiotiques et charges solides de l'eau ruisselée. La concentration en particules solides du ruissellement a été mesurée sur tous les prélèvements, après passage à l'étuve à 105°C pendant 48 heures. Les teneurs en *E. coli* et en entérobactéries ont été déterminées sur 3 échantillons pour chacune des pluies et la concentration en antibiotiques sur 9 échantillons. Les échantillons destinés au dénombrement des bactéries ont été analysés dans les 24 heures suivant le prélèvement. Ceux destinés à l'analyse des antibiotiques ont été congelés. Au début de l'expérimentation, une description visuelle de l'état de surface du sol de chaque placette est réalisée avant et après l'épandage du fumier de volailles. Le ruissellement étant lié aux caractéristiques du sol, des échantillons de sol sont prélevés à proximité immédiate de la placette afin de déterminer son humidité et sa porosité avant chaque simulation. Des prélèvements en fin de simulation sont effectués sur la placette afin d'évaluer les stocks de bactéries et d'antibiotiques.

1.5 Recherche de *E. coli* et des entérobactéries

Les dénombrements des *E. coli* et des entérobactéries ont été réalisés après dilution des fumiers, des sols et des eaux de ruissellement dans de l'eau peptonée. Les bactéries *E. coli* ont été dénombrées sur le milieu TBX et les entérobactéries sur le milieu VRBG après une incubation de 24h à 44°C et 37°C , respectivement. Les résultats sont exprimés en Unité Formant une Colonie (UFC) par g ou par ml.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Le ruissellement

Les dynamiques de ruissellement des trois placettes sont assez proches les unes des autres bien que la pluie 3 présente une plus faible intensité de ruissellement (Fig.1). La pluie d'imbibition, quantité de pluie tombée avant le début du ruissellement, est en moyenne de 6 mm. Le ruissellement en régime permanent est de $12,6 \text{ mm.h}^{-1}$ et le coefficient de ruissellement de 39 % (ratio entre ruissellement et pluie). Les charges solides ont une concentration moyenne dans les eaux de $2,1 \text{ g.l}^{-1}$. Elles sont plus importantes en début de ruissellement puis se

stabilisent avec l'établissement d'un écoulement régulier.

Avant l'averse, le sol présente une humidité moyenne de 249 g.Kg^{-1} et une porosité de 56,6 %. La surface du sol est typique d'une céréale en sortie d'hiver : végétation faiblement couvrante (1/3 de la surface du sol) et un faciès évolué relativement fermé avec la présence d'une croûte de battance. Les états de surface sont très proches entre eux avec néanmoins une rugosité légèrement plus élevée sur la troisième placette expliquant son ruissellement moins important. L'apport de fumier de volailles génère un fort recouvrement du sol (57%) qui peut retarder le ruissellement en protégeant le sol de la dégradation par la pluie et en créant de la rugosité.

2.2. Les bactéries

Aucun *E. coli* n'a été détecté dans le sol avant l'épandage, les entérobactéries sont à des concentrations de l'ordre de 10^2 bactéries. g^{-1} de sol. Dans le fumier, les teneurs en *E. coli* et en entérobactéries sont respectivement de $1,2.10^6$ UFC. g^{-1} et de $1,5.10^6$ UFC. g^{-1} . Parmi les entérobactéries, 2% sont résistantes à une concentration de 32 mg/L de ciprofloxacine (Dabert et al, JRA 2011).

Les germes recherchés sont présents dans les eaux de ruissellement. Leurs concentrations diminuent légèrement au cours de l'évènement (Fig.2). Elles passent pour *E. coli* de 2900 à 700 UFC. ml^{-1} et pour les entérobactéries de 6000 à 1500 UFC. ml^{-1} . Ces variations semblent s'expliquer par la dilution liée au ruissellement et sont corrélées avec l'érosion. Ces diminutions de concentrations associées à l'augmentation du ruissellement ont déjà été observées (Soupir et al., 2006) mais ne sont pas systématiques car elles sont dépendantes des conditions d'humidité du sol, de la nature de l'effluent et des bactéries. Les concentrations et les intensités de ruissellement permettent de quantifier les flux exportés hors de la placette. Ces flux peuvent être exprimés en % de la dose apportée par le fumier. Pour une lame ruisselée de 10 mm les flux sont de 1,8 % pour *E. coli* et de 4 % pour les entérobactéries. Les analyses de sol effectuées en fin de simulations sur la couche 0-5 cm de profondeur montrent des concentrations en *E. coli* variant de 800 à 1600 UFC. g^{-1} et en entérobactéries de 2000 à 4400 UFC. g^{-1} . Ces concentrations, représentent pour *E. coli* et les entérobactéries respectivement 10 et 20 % des apports. Une quantité importante de bactéries semble donc avoir été entraînée en profondeur.

2.3. Les fluoroquinolones

Les concentrations dans les eaux de ruissellement sont de 2 à 8 fois plus élevées en enrofloxacin par rapport à celle en ciprofloxacine. Les niveaux de concentrations varient pour l'enrofloxacin de 31,4 à $2,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ et de 5,3 à $0,3 \mu\text{g.l}^{-1}$ pour la ciprofloxacine. Les teneurs les plus importantes sont observées au début du ruissellement (Fig.3) et sont corrélées avec

l'érosion. Pour une lame ruisselée de 10 mm l'exportation est respectivement de 1 et 1,3 % des apports pour l'enrofloxacin et la ciprofloxacine. Les concentrations mesurées au niveau du sol en fin d'expérimentation sont de 0,165 à 0,696 mg.kg⁻¹ pour l'enrofloxacin et de 0,048 à 0,106 mg.kg⁻¹ pour la ciprofloxacine. La très grande majorité des FQ sont restées dans les 5 premiers centimètres du sol. Ces résultats sont en cohérence avec les caractéristiques des molécules qui les classent comme peu mobiles dans le sol (Picó et Andreu, 2007). Les valeurs maximales de FQ généralement observées dans les rivières sont de l'ordre de quelques dizaines de nanogrammes. Nos mesures réalisées à l'échelle du m² et situées à la source même de la pollution sont difficilement comparables à celles acquises à l'échelle d'un bassin versant.

Dans le fumier, les concentrations en enrofloxacin et ciprofloxacine sont respectivement de 16,57 mg.Kg⁻¹ et de 2,17 mg.Kg⁻¹. Ces quantités de FQ présentes dans le fumier au moment de l'épandage représentent environ le tiers de la dose administrée au niveau de l'élevage. Les pertes de produit actif et métabolites entre les quantités appliquées aux animaux et celles retrouvées dans le fumier peuvent être imputées au métabolisme des poulets ou à la destruction des FQ dans la litière, du fait de la montée en température lors du transport, de la photo-dégradation ou de la lyse par les micro-organismes. Le niveau de concentration d'enrofloxacin mesurée dans le fumier (16,57 mg.Kg⁻¹) est susceptible d'inhiber in vitro des populations sensibles d'entérobactéries ou de *Campylobacter*, et risquerait ainsi de sélectionner des bactéries résistantes. Dans le sol, les concentrations (0,7 mg.kg⁻¹) bien que plus faibles pourraient générer les mêmes conséquences. Toutefois on ne peut affirmer que cet effet de sélection soit effectif dans les conditions d'un sol qui diffèrent nettement de celles in vitro. Dans les eaux de ruissellement, les teneurs de

FQ ne seraient pas susceptibles de générer des apparitions de résistances et les impacts écotoxicologiques de telles concentrations sont peu connus.

CONCLUSION

Ces premiers résultats, obtenus sous pluies simulées, nous montrent qu'en cas de ruissellement intervenant rapidement après l'épandage, des fuites de bactéries et de résidus d'antibiotiques peuvent rejoindre les cours d'eau. Ces travaux doivent être approfondis pour prendre en compte une plus grande diversité de pratiques.

Afin de limiter les risques de transferts, tout en continuant à valoriser les apports organiques pour la fertilisation des cultures, différents leviers peuvent être utilisés pour limiter le ruissellement et l'érosion. Le stockage du fumier, par la montée en température du tas permet un abattement important des bactéries. Lors de l'épandage, la maîtrise de la dose d'apport, l'homogénéité dans la répartition et la préservation d'un bon état structural du sol peuvent également contribuer à la diminution du risque de transfert. Le système de cultures doit permettre d'augmenter au maximum le délai entre l'apport d'effluent et un risque de ruissellement.

Même à faible dose, les résidus d'antibiotiques potentiellement transférables méritent que l'on s'y intéresse. Ces résultats conduisent à recommander une utilisation raisonnée des fluoroquinolones en élevage.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche dans le cadre du projet PNRA-007 : « Evaluation de l'utilisation des fluoroquinolones chez la volaille ».

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Asseline J., Valentin C., 1978. Cah. ORSTOM XV(4): 321-349.
- Boxall A., Kolpin W., Halling-Sørensen B., Tolls J., 2003. Environ. Sci. Technol., 37:286A-294A
- Brooks P.B., Adeli A., Read J.J., McLaughlin M.R., 2009. J.Environ. Qual. 38:218-229.
- Gerba C.P., Smith J.E., 2005. J. Environ. Qual. 34:42-48.
- Jenkins MB, Truman CC, Siragusa G, Line E, Bailey JS, Frye J, Endale DM, Franklin DH, Schomberg HH, Fisher DS, Sharpe RR., 2008. Sci Total Environ. 403, 154-163
- Lévi Y., 2006. Environnement, Risques & Santé. Vol. 5, N°4
- Mishra A., Benham B.L., Mostaghimi S., 2008. Water Air Soil Pollut. 189:127-134.
- Picó Y., Andreu V., (2007). Anal. Bioanal. Chem., 387, 1287-1299
- Salles C., Andrieux P., Asseline J., Cohard P., 2000. Actes du colloque PNRH 2000: pp. 27-31
- Soupir M.L., Mostaghimi S., Yagow E.R, Hagedorn C., Vaughan D.H., 2006. Water Air Soil Pollut. 169:125-136.
- Tamtam F., Lebot B., Eurin J., Mercier F., Desportes A., Chevreuril M., 2009. Eur. J. water qual. 00 (2009) 1-12
- Virlouvet G., 2006. Environnement, Risques & Santé. Vol. 5, N°4

Figure 1. Dynamique des ruissellements de chacune des simulations de pluie : intensité de ruissellement (I) et charges solides exportées (M.S.) au cours de la durée de l'averse (24 mm.h⁻¹).

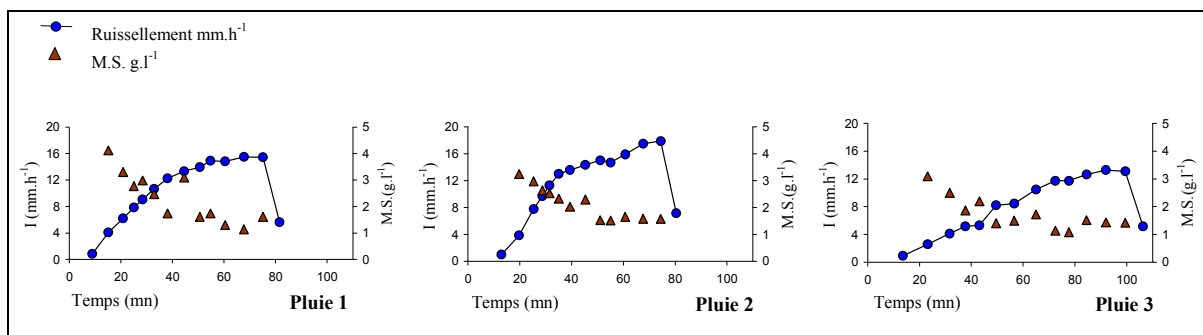


Figure 2. Evolution des concentrations en bactéries au cours du ruissellement

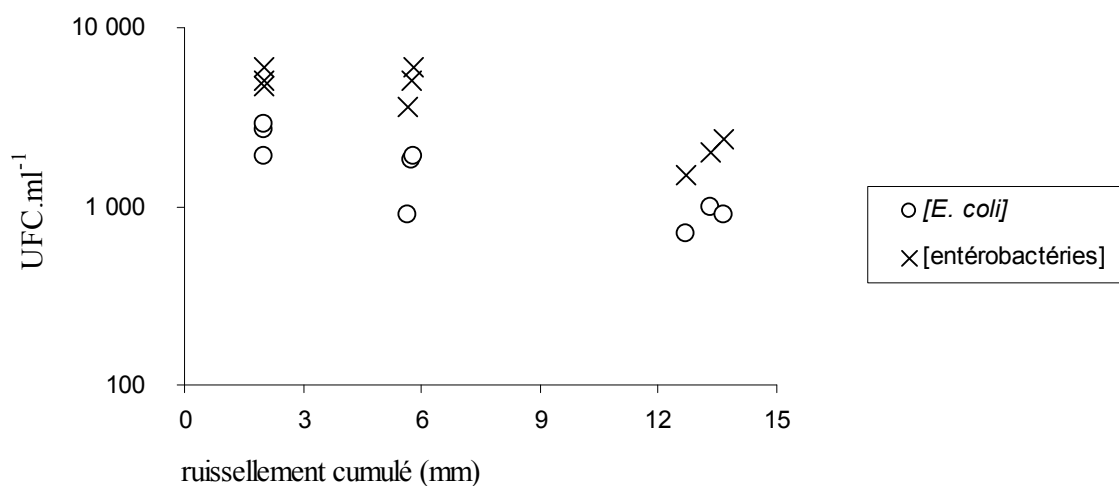


Figure 3. Evolution des concentrations de fluoroquinolones (FQ) au cours du ruissellement

