

Université du Québec
INRS-Institut Armand-frappier

**ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE BACTÉRIES CAPABLES DE
MÉTABOLISER LES ESTROGÈNES DANS LE LISIER DE PORCS**

**Par
Martine Isabelle**

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade Maître ès Sciences (M. Sc.)
en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Réjean Beaudet
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Edward Topp, Ph.D.
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Directeur de recherche

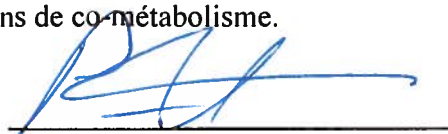
Pierre Juteau
INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était d'isoler et de caractériser des bactéries capables de métaboliser les estrogènes présents dans le lisier de porcs. Ces hormones, excrétées par le porc, peuvent agir comme perturbateurs endocriniens et causer différents effets biologiques néfastes chez plusieurs espèces animales. Il est donc pertinent d'investiguer plus en profondeur leur biodégradation et les microorganismes qui en sont responsables. Au cours de ce projet, une méthode sensible et reproductible de détection des estrogènes a été mise au point grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem. Un consortium bactérien a été enrichi, à partir de la biomasse tirée d'un biotraitement du lisier de porcs, en présence d'une faible concentration (1 mg/L) de β -estradiol (β E2), d'estrone (E1) et d'équol (EQO), les trois estrogènes les plus abondants dans le lisier de porcs. Le consortium obtenu est capable de dégrader efficacement ces trois composés et nous avons montré que ce n'est pas la monooxygénase de l'ammoniac des bactéries nitrifiantes qui est responsable de cette dégradation. Nos travaux ont mis en évidence cinq souches bactériennes capables de métaboliser les estrogènes, affiliées à quatre genres bactériens, soit *Methylobacterium* (MI6.1R), *Ochrobactrum* (MI6.1B et MI9.3), *Pseudomonas* (MI14.1) et *Mycobacterium* (MI21.2). Les souches MI9.3, MI14.1 et MI21.2 dégradent le β E2 et l'E1, alors que MI6.1B transforme seulement le β E2. Une réaction inhabituelle par l'isolat MI6.1R a été observée, soit la réduction de l'E1 en β E2 en conditions aérobies. Normalement, c'est la réaction inverse qui survient, soit l'oxydation du β E2 en E1. Une expérience avec des analogues de l'E1 a montré que la réduction de la fonction cétone par cette souche est relativement spécifique. Finalement, les résultats obtenus montrent que l'activité de transformation de β E2 et de E1 par toutes les souches isolées est constitutive et suggèrent qu'elle serait le résultat de réactions de co-métabolisme.



Martine Isabelle, étudiante



Pierre Juteau, directeur de recherche

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Pierre Juteau, de m'avoir permis de réaliser ce projet de recherche en m'accordant à la fois tout le soutien nécessaire de même qu'une grande liberté. Je souhaite aussi sincèrement remercier les chimistes du Groupe de recherche en microbiologie de l'environnement, François Lépine et Sylvain Milot, qui m'ont aidé à mieux comprendre et surtout, à apprécier l'infiniment petit. Au-delà de la science, ces deux années de maîtrise au sein de ce groupe auront été le théâtre de belles rencontres humaines. Un merci tout spécial à ceux qui ont partagés avec moi des moments de pur plaisir; Anne-Pascale, Sébastien, Marie-Christine, Philippe et Julien. Pour ses sourires, ses encouragements et sa joie de vivre, je tiens à remercier ma chère collègue et amie Julie. Merci également à Edward Topp et Réjean Beaudet, qui ont accepté de prendre le temps pour évaluer mon mémoire. Finalement, je remercie la Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et la Fédération des producteurs de porcs du Québec (FPPQ) qui m'ont supporté financièrement durant ces deux années.

Merci à tous,

Martine Isabelle

Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations	x
Introduction.....	1
Chapitre 1. Revue de littérature.....	4
1.1 Estrogènes naturels : libres et conjugués.....	4
1.2 Phyto-estrogènes	5
1.3 Principales fonctions biologiques des estrogènes	7
1.4 Caractéristiques physico-chimiques.....	7
1.4.1 Structure	7
1.4.2 Solubilité dans l'eau.....	10
1.4.3 Résistance à la chaleur	10
1.5 Mode d'action des estrogènes	10
1.6 Estrogènes dans le lisier de porcs	11
1.6.1 Excrétion des estrogènes par le porc (<i>Sus scrofa</i>)	11
1.6.2 Concentrations des estrogènes dans le lisier de porcs	11
1.7 Estrogènes et perturbation endocrinienne.....	13
1.7.1 Perturbation endocrinienne	13
1.7.2 Potentiel estrogénique	13
1.7.2.1 Méthodes d'évaluation du potentiel estrogénique	14
1.7.2.2 Potentiel estrogénique des estrogènes à l'étude.....	15
1.7.3 Effets néfastes des estrogènes sur la faune et sur l'humain	15
1.7.3.1 Féminisation des poissons.....	16
1.7.3.2 β E2 et cancers	17
1.7.3.3 Désordres au niveau de l'appareil reproducteur de l'homme	17
1.7.4 Concentrations effectives.....	18
1.8 Biodégradation des estrogènes.....	18
1.8.1 Traitements d'eaux usées municipales et dégradation des estrogènes.....	18
1.8.1.1 Types de traitements des eaux usées.....	18
1.8.1.2 Efficacité des traitements d'eaux usées	19
1.8.1.3 Adsorption des estrogènes aux solides	20
1.8.1.4 Dégradation des estrogènes conjugués	21

1.8.1.5	Dégradation des estrogènes libres.....	23
1.8.2	Traitements du lisier de porcs et dégradation des estrogènes.....	25
1.8.2.1	Devenir des estrogènes dans les sols agricoles.....	25
1.8.2.2	Persistance des estrogènes dans le lisier entreposé.....	26
1.8.2.3	Efficacité des étangs anaérobies et des marais artificiels.....	26
1.8.2.4	Efficacité des lits de boues expansées anaérobies « up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) » en série avec des filtres biologiques « trickling filter ».....	26
1.8.3	Microorganismes capables de dégrader les estrogènes.....	29
1.8.3.1	Bactéries associées au genre <i>Novosphingobium</i>	29
1.8.3.2	Bactéries associées au genre <i>Rhodococcus</i>	29
1.8.3.3	Bactéries associées aux genres <i>Achromobacter</i> et <i>Ralstonia</i>	30
1.8.3.4	Bactérie <i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	30
1.8.3.5	Champignon <i>Fusarium proliferatum</i> HNS-1.....	31
1.8.3.6	Champignons responsables de la pourriture blanche (« White rot fungi »).....	31
1.8.3.7	Bactéries nitrifiantes.....	31
1.8.3.8	Bactéries associées aux genres <i>Acinetobacter</i> , <i>Agromyces</i> et <i>Sphingomonas</i>	33
1.8.3.9	Bactéries associées aux genres <i>Aminobacter</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphingomonas</i>	33
Chapitre 2. Article scientifique.....		36
2.1	Contribution des auteurs à l'article.....	36
2.2.1	Attestation des co-auteurs.....	36
2.2	Accusé de réception.....	38
2.3	Note sur la présentation de l'article.....	39
2.4	Isolation of estrogen-degrading bacteria from an activated sludge bioreactor treating swine waste, including a strain that converts estrone to β-estradiol.....	40
2.4.1	Abstract.....	41
2.4.2	Introduction.....	42
2.4.3	Materials and methods.....	44
2.4.4	Results.....	51
2.4.5	Discussion.....	54
2.4.6	Acknowledgements.....	57
2.4.7	References.....	58
2.4.8	Figures and tables.....	58
Chapitre 3. Méthodologie et résultats supplémentaires.....		63
3.1	Méthode de dosage des estrogènes par SPE-LC-MS/MS.....	63
3.1.1	Conditions d'opération du spectromètre de masse (MS/MS).....	63
3.1.2	Paramètres de chromatographie liquide à haute performance.....	64
3.1.3	Calculs pour l'analyse quantitative des estrogènes.....	65

3.2 Mise au point de la méthode d'extraction des estrogènes	67
3.2.1 Optimisation du protocole.....	67
3.2.2 Pourcentage de récupération des estrogènes.....	71
3.2.3 Reproductibilité de la méthode SPE-LC-MS/MS.....	73
3.2.4 Réutilisation des cartouches Oasis HLB.....	73
3.3 Effet de la stérilisation à l'autoclave sur les estrogènes.....	77
3.4 Mise au point du protocole pour le bioessai YES.....	78
3.5 Efficacité du traitement aérobie mésophile déphosphatant.....	81
Chapitre 4. Discussion de l'ensemble des résultats.....	82
4.1 Dosage des estrogènes par spectrométrie de masse	82
4.2 Efficacité d'un biotraitement du lisier de porcs.....	83
4.3 Souches isolées capables de métaboliser les estrogènes	84
4.3.1 Diversité bactérienne	84
4.3.2 Réduction de l'E1 en β E2	87
4.3.3 Co-métabolisme	88
Chapitre 5. Conclusions et perspectives.....	90
Annexe 1. Milieux de culture pour la croissance des levures BJ 3505.....	91
Annexe 2. Composition du milieu minéral supplémenté avec des estrogènes (« estrogen-supplemented mineral medium », ESM medium).....	93
Références.....	95

Liste des figures

Figure 1. Métabolisme réductif de la daidzéine par les bactéries intestinales.....	6
Figure 2. Structure des estrogènes libres à l'étude.....	8
Figure 3. Structure des estrogènes conjugués à l'étude.....	9
Figure 4. Devenir des estrogènes conjugués dans un traitement d'eaux usées.....	22
Figure 5. Voie métabolique de la dégradation du β E2 par des bactéries provenant d'eaux usées.....	24
Figure 6. Contribution de chaque estrogène au potentiel estrogénique global, exprimée en équivalents d'estradiol.....	28
Figure 7. Arbre phylogénétique incluant des souches qui dégradent le β E2	34
Figure 8. Dégradation du β E2 et de l'E1 par l'isolat KC8.....	35
Figure 9. Structure of estrogens.	58
Figure 10 Structure of E1 analogues.	58
Figure 11 Phylogenetic distribution of the bacteria isolated from an enrichment with estrogens as sole carbon source.	59
Figure 12. Reduction of E1 to β -E2 in TSB medium inoculated with a MI6.1R.....	60
Figure 13. Droite de calibration type pour l'équol.....	65
Figure 14. Chromatogrammes des transitions MRM de l'EQUO-D4 et de l'EQUO.....	66
Figure 15. Protocole d'extraction des estrogènes libres et conjugués.....	67
Figure 16. Problème de solubilité rencontré lors de la suspension des résidus dans l'eau : acétonitrile (50% v/v), 20 mM TEA, suite à l'évaporation complète de la phase d'acétate d'éthyle.	68
Figure 17. Récupération des estrogènes de la cartouche Oasis HLB suite au passage de 6 mL de trois différents solvants.....	69

Figure 18. Concentration des estrogènes dans les différentes fractions de méthanol 5 mM TEA suivant le passage d'un échantillon de lisier et d'effluent thermophile sur une cartouche Oasis HLB.	70
Figure 19. Aire sous la courbe (ASC) au LC-MS/MS dans les surnageants suite au lavage de culots lors de la centrifugation du lisier.	72
Figure 20. Reproductibilité de la méthode SPE-LC-MS/MS développée.....	73
Figure 21. Concentrations des différents estrogènes suite à une extraction sur des cartouches Oasis HLB neuves et sur des cartouches Oasis HLB usagées lavées.	74
Figure 22. Protocole d'extraction en phase solide des estrogènes dans le lisier de porcs ou dans les effluents de traitements (thermophile ou mésophile).	75
Figure 23. Protocole d'extraction en phase solide des estrogènes dans des échantillons de milieu de culture.	76
Figure 24. Résistance des estrogènes durant une stérilisation à l'autoclave.	77
Figure 25. Courbe dose-réponse classique du β E2 suite au bioessai YES.....	79
Figure 26. Courbes dose-réponse obtenues lors d'un bioessai YES sur des échantillons d'un test de dégradation des estrogènes par deux isolats.	80
Figure 27. Courbes dose-réponse obtenues lors du bioessai YES sur les échantillons avant et après traitement par le réacteur biologique séquentiel mésophile déphosphatant.....	81

Liste des tableaux

Tableau 1. Concentrations d'estrogènes libres dans le lisier de porcs brut et dans les eaux usées municipales (avant traitement).....	12
Table 2. MRM settings.....	60
Table 3. Estrogen transformation by the isolated strains.	61
Table 4. Constitutivity of the estrogen transformation activities.	62
Tableau 5. Conditions d'opération du spectromètre de masse.	63
Tableau 6. Paramètres de MRM pour les différents estrogènes dosés.	64
Tableau 7. Programme utilisé pour la séparation des estrogènes par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	64
Tableau 8. Pourcentage de récupération des estrogènes libres et conjugués.....	71

Liste des abréviations

AMO	Monooxygénase de l'ammoniac
αE2	17 α -estradiol
βE2	17 β -estradiol
E1	Estrone
E1-D4	Estrone-D4
E3	Estriol
EQO	Équol
EQO-D4	Équol-D4
EE2	Éthynyl estradiol
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
LC	« Liquid Chromatography »
MS	« Mass Spectrometry »
MRM	« Multiple Reaction Monitoring »
SPE	« Solid Phase Extraction »
TEA	Triéthylamine
VTG	Vitellogénine plasmatique
YES	« Yeast Estrogens Screen test »

Introduction

Le lisier de porcs contient des concentrations relativement importantes, de l'ordre du $\mu\text{g/L}$, d'estrogènes naturels tels que le β -estradiol (βE2) et l'estrone (E1) (Burnison *et al.*, 2003; Fine *et al.*, 2003; Furuichi *et al.*, 2006). L'équol (EQO), un phyto-estrogène issu du soya donné aux porcs pour leur alimentation, s'y trouve quant à lui à des concentrations dépassant le mg/L (Burnison *et al.*, 2003; Kiparissis *et al.*, 2003; Furuichi *et al.*, 2006). Or, les estrogènes peuvent agir comme perturbateurs endocriniens et affecter, entre autres, la reproduction et le développement de plusieurs espèces animales (Tyler *et al.*, 1998; Bhatt, 2000; O'Connor et Chapin, 2003). Les inquiétudes concernant ces hormones proviennent du fait qu'elles peuvent exercer des effets biologiques néfastes à des concentrations très faibles, soit de l'ordre du ng/L (Routledge *et al.*, 1998; Metcalfe *et al.*, 2001; Hanselman *et al.*, 2006).

Dans les laboratoires du Groupe de recherche en microbiologie de l'environnement, des biotraitements ont été mis au point au cours des dernières années et permettent de réduire la charge polluante (azote, phosphore, matière organique, pathogènes, odeurs) du lisier de porcs. Le devenir des estrogènes, au sein de ces traitements, n'est toutefois pas connu. Les rares études portant sur ce sujet ont montré que les estrogènes sont en partie dégradés par les traitements du lisier (Furuichi *et al.*, 2006; Shappell *et al.*, 2007). Toutefois, les concentrations résiduelles dans les effluents sont supérieures à celles connues pour exercer des effets néfastes sur les poissons (Shappell *et al.*, 2007).

À notre connaissance, aucune étude portant sur les microorganismes responsables de la biodégradation des estrogènes dans le lisier de porcs n'a été menée à ce jour. Toutefois, des bactéries capables de dégrader les estrogènes ont été isolées de biotraitements d'eaux usées municipales. Parmi ces bactéries, *Rhodococcus* sp. (*Actinobacteria*) est capable de dégrader plusieurs estrogènes, tels que le βE2 , l'E1, l'estriol (E3) et l'éthinyl estradiol (EE2) (Yoshimoto *et al.*,

2004). *Novosphingobium tardaugen* (α -Proteobacteria) dégrade pour sa part près de 10 mg/30 mL de β E2 en 20 jours (Fujii *et al.*, 2003). Récemment, une bactérie capable de croître en utilisant le β E2 comme seule source de carbone et d'énergie en conditions dénitrifiantes a été isolée. Il s'agit de *Denitratisoma oestradiolicum* (β -Proteobacteria) (Fahrbach *et al.*, 2006). Yu *et al.* (2007) ont isolé, à partir des boues activées d'un biotraitement d'eaux usées, 14 souches bactériennes capables de dégrader le β E2. Elles sont affiliées à huit genres bactériens différents; *Aminobacter* (α -Proteobacteria), *Brevundimonas* (α -Proteobacteria), *Escherichia* (γ -Proteobacteria), *Flavobacterium* (Bacteroidetes), *Microbacterium* (Actinobacteria), *Nocardioides* (Actinobacteria), *Rhodococcus* (Actinobacteria) et *Sphingomonas* (α -Proteobacteria). L'ensemble de ces études montre la grande diversité phylogénétique des bactéries capables de dégrader les estrogènes. Une étude de Ke *et al.* (2007) montre également que les bactéries capables de métaboliser les estrogènes sont répandues dans l'environnement. En effet, ils ont isolé trois souches bactériennes à partir de sable marin, affiliées aux genres *Acinetobacter* (γ -Proteobacteria), *Agromyces* (Actinobacteria) et *Sphingomonas* (α -Proteobacteria). Les boues activées nitrifiantes (Vader *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2003; Servos *et al.*, 2005) de même que les bactéries nitrifiantes, comme *Nitrosomonas europaea* (β -Proteobacteria) (Shi *et al.*, 2004), seraient aussi capables de dégrader certains estrogènes, grâce à une réaction de co-métabolisme impliquant la monooxygénase de l'ammoniac (Ren *et al.*, 2007). Plusieurs des bactéries énumérées précédemment sont capables d'oxyder le β E2 en E1, parfois avec une dégradation subséquente de ce dernier. Cette réaction est aussi communément observée au sein des biotraitements d'eaux usées municipales (Ternes *et al.*, 1999b; Lee et Liu, 2002; Andersen *et al.*, 2003; Servos *et al.*, 2005). Cette transformation est bénéfique puisqu'elle a pour effet de réduire le potentiel estrogénique global, considérant que le β E2 est de deux à trois fois plus estrogénique que l'E1 (Thorpe *et al.*, 2003).

Lors de ce projet, l'objectif principal était d'isoler et de caractériser des bactéries capables de dégrader les estrogènes présents dans le lisier de porcs au sein de biotraitements. Pour ce faire, un enrichissement de la biomasse présente dans un des bioréacteurs mis au point dans notre laboratoire, soit le réacteur biologique séquentiel mésophile déphosphatant, a été effectué. Nous avons réalisé l'enrichissement en milieu liquide de même que l'isolement en milieu solide en utilisant les estrogènes (β E2, E1, EQO) comme seule source de carbone à une concentration de 1 mg/L. Cette stratégie a été favorisée dans le but d'isoler des bactéries capables de dégrader les estrogènes à des concentrations avoisinant celles retrouvées dans le lisier. Il est à noter que dans la littérature, la plupart des bactéries connues pour dégrader les estrogènes le font à forte concentration, dépassant parfois 100 mg/L (Fujii *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2004). La capacité de dégradation des estrogènes par les souches isolées a été vérifiée à l'aide de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), qui permet le dosage quantitatif de ces molécules. L'utilisation de cette technologie de pointe permet de travailler à de faibles concentrations, ce qui était nécessaire compte tenu de la stratégie employée.

Nos travaux ont permis d'isoler et de caractériser cinq souches bactériennes capables de co-métaboliser les estrogènes, dont une souche qui réduit l'E1 en β E2, une réaction inhabituelle qui, à notre connaissance, n'a jamais été rapportée dans la littérature.

Chapitre 1. Revue de littérature

Le présent projet de maîtrise a porté sur la biodégradation des estrogènes, des molécules présentes dans le lisier de porcs. Une brève description de ces hormones et de leur biodégradation est donc réalisée avant d'entrer dans le vif du sujet.

1.1 Estrogènes naturels : libres et conjugués

Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes synthétisées par la plupart des vertébrés, tels que les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les amphibiens, les téléostéens, les élasmobranches et les protochordés (Simpson, 2003). Ces molécules sont principalement produites au niveau des cellules de la granulosa des follicules ovariens, du placenta et des testicules (Lange *et al.*, 2002b). Elles sont aussi synthétisées par des tissus non endocriniens, tels que le cerveau, les tissus adipeux, le foie ainsi que par les fibroblastes (Zhu et Conney, 1998). La biosynthèse des estrogènes, à partir des stéroïdes à 19 carbones, comme la testostérone et l'androstènedione, est catalysée par l'enzyme cytochrome P450 aromatasase (Simpson, 2003). Le β -estradiol (β E2) et l'estrone (E1) ainsi synthétisés sont qualifiés d'estrogènes libres. Ces derniers, une fois leurs rôles biologiques accomplis, se voient ajouter un groupement glucuronide ou sulfate, qui les rend plus hydrophiles et faciles à excréter via la voie urinaire ou la voie intestinale. Ces molécules sont alors qualifiées d'estrogènes conjugués. Ces derniers sont beaucoup moins actifs sur le plan biologique que les estrogènes libres. Toutefois, les estrogènes conjugués, suite à l'excrétion, peuvent rapidement être déconjugués en estrogènes libres et ainsi voir leur potentiel estrogénique augmenté (Panter *et al.*, 1999; Baronti *et al.*, 2000; D'Ascenzo *et al.*, 2003).

1.2 Phyto-estrogènes

En plus des estrogènes libres et conjugués, l'attention a été portée au cours de ce projet sur les phyto-estrogènes. Ces molécules, synthétisées par les plantes, s'apparentent aux estrogènes naturels et peuvent mimer l'effet de ces derniers. L'équol (EQO), un phyto-estrogène, est présent en concentrations importantes dans les déjections animales, de l'ordre du mg/L (Burnison *et al.*, 2003; Furuichi *et al.*, 2006), d'où l'attention portée à cette molécule au cours de ces travaux. L'EQO est un métabolite de la daidzéine (voir figure 1), une des principales isoflavones présentes dans le soya. Cette dernière constitue plus de 1% du poids sec des graines de soya (Decroos *et al.*, 2005). Comme le soya occupe une place importante de l'alimentation du porc, l'EQO est détecté dans le lisier. De plus, comme il est formé en conditions anaérobies, ce phyto-estrogène peut persister lors de l'entreposage du lisier durant plusieurs mois (Burnison *et al.*, 2003). La présence d'un groupement phénol sur les phyto-estrogènes serait la caractéristique leur permettant de se lier aux récepteurs à estrogènes (Setchell, 1998). L'EQO a une plus grande capacité de liaison aux récepteurs à estrogènes humains α et β que la daidzéine, dont il est issu (10 et 80 fois, respectivement). De plus, il induit la transcription plus que tout autre isoflavone (Decroos *et al.*, 2005).

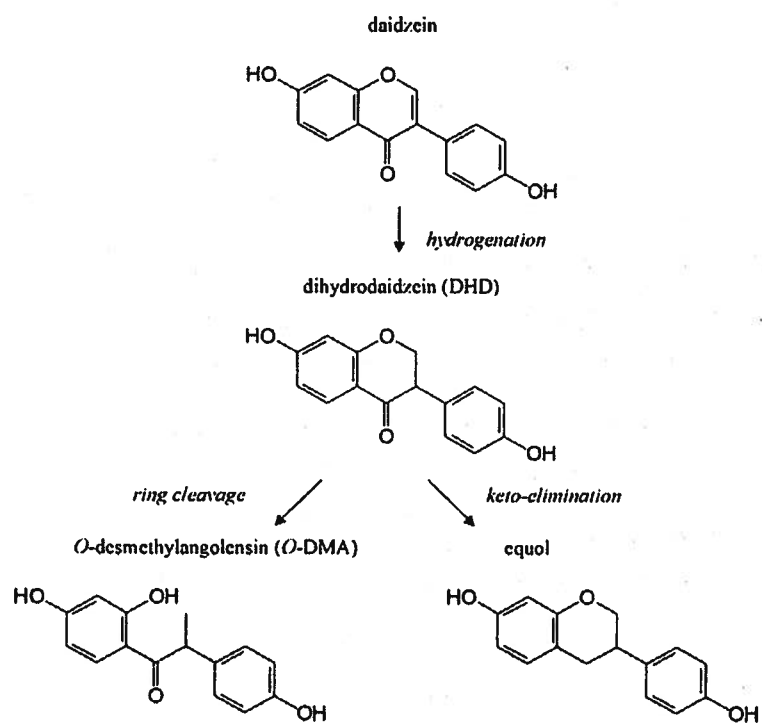


Figure 1. Métabolisme réductif de la daidzéine par les bactéries intestinales (tiré de Decroos *et al.*, 2005).

1.3 Principales fonctions biologiques des estrogènes

Les fonctions principales des estrogènes se situent au niveau de la détermination du sexe (reptiles), de la différenciation sexuelle (humains, poissons et oiseaux) et du développement sexuel (tous les vertébrés). En ce qui concerne le développement sexuel, les estrogènes ont un rôle indéniable au niveau du développement des caractères secondaires femelles ainsi qu'au niveau du contrôle du cycle reproducteur et de la fertilité (Tyler *et al.*, 1998).

Les concentrations d'estrogènes naturels dans le sang sont finement régulées par le système endocrinien. Une exposition inappropriée à des hormones ou à des molécules imitant les hormones, à un certain stade du développement, peut causer des effets néfastes (Tyler *et al.*, 1998).

1.4 Caractéristiques physico-chimiques

1.4.1 Structure

Les estrogènes naturels, comme le β E2 et l'E1, possèdent un cycle aromatique au sein de leur structure tétracyclique. Le β E2 possède une fonction alcool en position C17 alors que l'E1 a un groupement cétone à cette position. La figure 2 présente la structure chimique des estrogènes libres à l'étude et de l'EQO.

Les estrogènes conjugués, quant à eux, possèdent un groupement sulfate ou glucuronide sur le groupement hydroxyle ou phenoxy de chaque épimère (Hutchins *et al.*, 2007), en position C-17 ou C-3 (Hanselman *et al.*, 2003). De nombreux estrogènes conjugués peuvent donc être formés à partir des estrogènes libres. La figure 3 présente les estrogènes conjugués qui ont été dosés lors du présent projet.

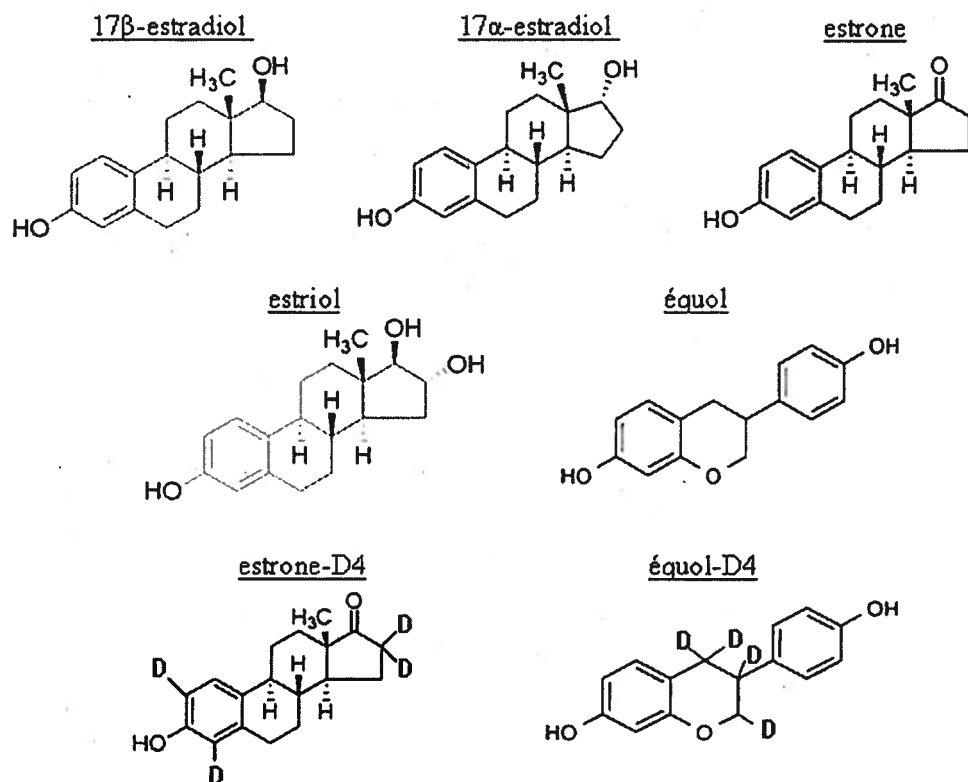
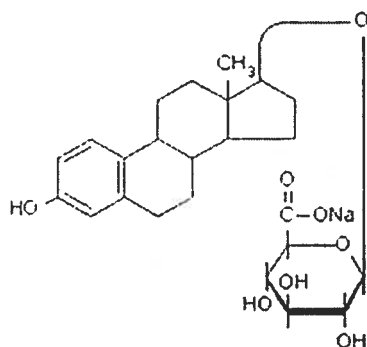
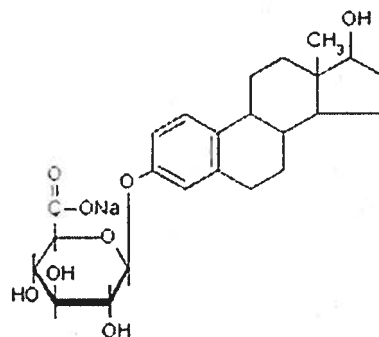


Figure 2. Structure des estrogènes libres à l'étude. Les positions marquées au deutérium sont indiquées par un D.

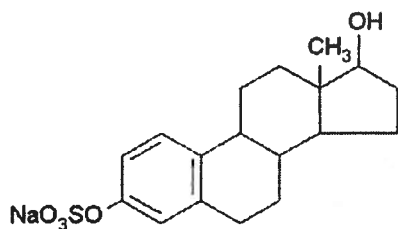
β -estradiol 17-(β -D-glucuronide)



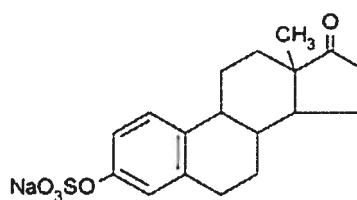
β -estradiol 3-(β -D-glucuronide)



β -estradiol 3-sulfate



estrone 3-sulfate



estrone-D4 sulfate

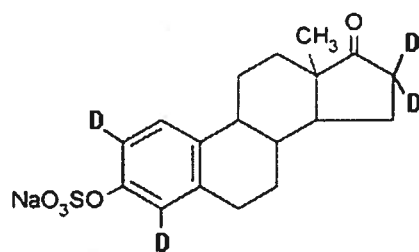


Figure 3. Structure des estrogènes conjugués à l'étude. Les positions marquées au deutérium sont indiquées par un D.

1.4.2 Solubilité dans l'eau

La solubilité du β E2 à 25°C est de 1.51 ± 0.04 mg/L alors que celle de l'E1 est de 1.30 ± 0.08 mg/L. La solubilité, à pH 4 ou 7, reste inchangée alors qu'elle augmente à un pH basique de 10 (Shareef *et al.*, 2006). La solubilité des estrogènes conjugués n'est pas documentée dans la littérature. Toutefois, ils seraient plus solubles dans l'eau que les estrogènes libres en raison de leur groupement polaire (sulfate ou glucuronide) (Hanselman *et al.*, 2003).

1.4.3 Résistance à la chaleur

Le β E2 et l'E1 sont des composés stables à la chaleur, avec des points de fusion de 175°C et 252°C respectivement (Shore et Shemesh, 2003).

1.5 Mode d'action des estrogènes

Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes de nature lipophile qui traversent facilement les membranes cellulaires et plasmiques (Tyler *et al.*, 1998). Ces hormones exercent leurs effets principalement via une interaction directe avec le récepteur intracellulaire à estrogènes, qui active l'expression de gènes codant pour des protéines possédant des fonctions biologiques importantes (Zhu et Conney, 1998).

1.6 Estrogènes dans le lisier de porcs

Les estrogènes naturels, excrétés par l'humain et par les animaux, se retrouvent depuis longtemps dans l'environnement. Par contre, en raison de l'explosion démographique et des élevages intensifs, cet apport d'hormones dans l'environnement est en augmentation (Lange *et al.*, 2002a). L'élevage animal serait une source majeure des estrogènes mesurés dans l'environnement des milieux ruraux (Burnison *et al.*, 2003; Shore et Shemesh, 2003; Furuichi *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2006).

1.6.1 Excrétion des estrogènes par le porc (*Sus scrofa*)

Le porc est un animal monogastrique qui excrète les estrogènes principalement via l'urine, contrairement aux ruminants qui les excrètent majoritairement par les fèces. En fait, l'excrétion de ces molécules serait de 88 à 96% urinaire chez le porc (Lange *et al.*, 2002a; Hanselman *et al.*, 2003). Chez cette espèce, les principaux estrogènes excrétés seraient le E1, le β E2 et le E3, sous forme libre et conjuguée. Plus précisément, selon une étude de Velle (1976), l'E1 serait l'estrogène le plus abondant dans le sang et l'urine du porc. L' α E2 est une forme rarement excrétée par le porc comparativement à d'autres espèces comme le bœuf (*Bos taurus*) (Hanselman *et al.*, 2003).

1.6.2 Concentrations des estrogènes dans le lisier de porcs

Comparativement aux eaux usées municipales, le lisier de porcs contient des concentrations importantes d'estrogènes. Le tableau 1 montre les concentrations d'estrogènes mesurées, dans du lisier de porcs et dans des eaux usées municipales, lors de quelques études.

Tableau 1. Concentrations d'estrogènes libres dans le lisier de porcs brut et dans les eaux usées municipales (avant traitement).

Composé	Lisier de porcs	Références	Eaux usées	Références
βE2	2200-3000 ng/L	(Fine <i>et al.</i> , 2003)	15.6 ng/L	(Servos <i>et al.</i> , 2005)
	1000-1500 ng/L	(Furuichi <i>et al.</i> , 2006)	16 ng/L	(Baronti <i>et al.</i> , 2000)
E1	9600-24 900 ng/L	(Fine <i>et al.</i> , 2003)	15.8 ng/L	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)
			49 ng/L	(Servos <i>et al.</i> , 2005)
	5200-5400 ng/L	(Furuichi <i>et al.</i> , 2006)	71 ng/L	(Baronti <i>et al.</i> , 2000)
EQO	6-16 mg/L	(Burnison <i>et al.</i> , 2003), (Kiparissis <i>et al.</i> , 2003)	65.7 ng/L	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)
	0.94-1.1 mg/L	(Furuichi <i>et al.</i> , 2006)		

1.7 Estrogènes et perturbation endocrinienne

1.7.1 Perturbation endocrinienne

Depuis quelques années, l'attention des scientifiques est beaucoup portée sur une nouvelle classe de polluants, les perturbateurs endocriniens. Un perturbateur endocrinien peut se définir comme un produit qui possède la capacité d'augmenter, d'altérer ou d'interrompre les fonctions du système endocrinien. Pour ce faire, il peut agir comme un agoniste en mimant l'action des hormones, agir comme un antagoniste en réprimant leur action ou encore interférer au niveau de la biosynthèse ou du métabolisme des hormones endogènes. La plupart des perturbateurs endocriniens possèdent la capacité de se lier au récepteur à estrogènes (Tyler *et al.*, 1998). Parmi ceux-ci, il y a notamment les pesticides organochlorés dont un des représentants le plus connu est le dichloro-diphényl-trichloroethane (DDT), les biphényles polychlorés (BPC), le bisphénol A (BPA), les dioxines et l'éthynyl estradiol (EE2). Ce dernier, comparativement aux produits nommés précédemment, aurait un potentiel estrogénique plus grand que le β E2, soit le composé naturel le plus biologiquement actif (Tyler *et al.*, 1998; Van den Belt *et al.*, 2004). Cet estrogène synthétique est le principal constituant des contraceptifs oraux (Shi *et al.*, 2002). Récemment, les estrogènes naturels, comme l'E1 et le β E2, ont particulièrement attiré l'attention car ce sont des hormones ayant une forte activité biologique à de très faibles doses, de l'ordre du ng/L, chez plusieurs espèces de mammifères (Tyler *et al.*, 1998).

1.7.2 Potentiel estrogénique

On peut définir le potentiel estrogénique d'une molécule comme la propriété qu'elle a à produire des réponses biologiques similaires à celle engendrées par le β E2, l'hormone endogène. Pour ce faire, la molécule peut interagir directement avec le récepteur à estrogènes, ce qui mène à l'expression de gènes. Elle peut aussi produire une réponse estrogénique par d'autres

mécanismes, comme par exemple en induisant l'activité de l'aromatase, augmentant ainsi la concentration des estrogènes endogènes (Daston *et al.*, 1997).

1.7.2.1 Méthodes d'évaluation du potentiel estrogénique

Il existe différentes méthodes, tant *in vivo* qu'*in vitro*, pour évaluer le potentiel estrogénique d'une substance pure ou d'un échantillon environnemental complexe (Shappell *et al.*, 2007). Parmi les bioessais *in vivo*, le plus répandu est sans doute l'exposition de poissons à des échantillons environnementaux suivi du dosage de la vitellogénine plasmatique (VTG), une protéine normalement spécifique aux femelles (Tilton *et al.*, 2002; Shappell *et al.*, 2007).

Comparativement aux bioessais *in vivo*, les tests *in vitro* se réalisent sur une période de temps beaucoup plus courte et sont moins laborieux. Ils peuvent utiliser des cellules transfectées ou non. Le plus connu des bioessais *in vitro* est le « Yeast Estrogen Screen test (YES) », qui utilise des levures transfectées avec le gène du récepteur à estrogènes humain. Voici une description plus détaillée du principe du bioessai YES (Gaido *et al.*, 1997; Servos *et al.*, 2005). Il utilise une levure recombinante (*Saccharomyces cerevisiae*) contenant deux plasmides. Un premier plasmide contient le promoteur de la méthallothionéine CUP1 et le récepteur humain à estrogènes inductible en présence de cuivre. Le deuxième plasmide contient deux éléments de réponse à estrogènes couplés au gène *lacZ*, responsable de l'expression de l'enzyme β -galactosidase. Les estrogènes ou les composés ayant un potentiel estrogénique, une fois mis en contact avec une suspension de levures recombinantes, stimulent le récepteur. Plus précisément, le composé se fixe au récepteur et entraîne sa dimérisation. Le dimère se lie alors à l'élément de réponse des estrogènes couplé au gène *lacZ*. Son activation stimulera la synthèse de l'enzyme β -galactosidase. La quantité de β -galactosidase synthétisée est mesurée suite à la perméabilisation des levures permettant à l'enzyme d'entrer en contact avec son substrat, l'*o*-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG). Ce dernier est transformé en *o*-nitrophénol, un

composé de couleur jaune. L'intensité de la couleur jaune, mesurée par spectrophotométrie, est donc proportionnelle à la stimulation des récepteurs. Le bioessai YES est la méthode qui fut utilisée lors de ce projet pour déterminer le potentiel estrogénique global de certains échantillons.

Deux autres bioessais utilisent des cellules transfectées avec le gène du récepteur à estrogènes humain. Par contre, dans ces deux cas, les cellules employées sont issues de lignées cellulaires humaines (MVLN et HGELN). Un autre test utilise les cellules épithéliales mammaires humaines MCF-7 non-transfectées.

1.7.2.2 Potentiel estrogénique des estrogènes à l'étude

L'estrogène naturel possédant le plus fort potentiel estrogénique est le β E2. L'E1 a un potentiel estrogénique de 38 à 50% celui du β E2, selon des résultats de bioessai YES (Johnson et Sumpter, 2001; Aerni *et al.*, 2004). Pour ce qui est de l'EQO, son potentiel serait environ 1000 fois moindre que le β E2 (Coldham *et al.*, 1997). Les estrogènes conjugués, avec un groupement glucuronide ou sulfate, seraient quant à eux biologiquement inactifs (Panter *et al.*, 1999; D'Ascenzo *et al.*, 2003; Hutchins *et al.*, 2007).

1.7.3 Effets néfastes des estrogènes sur la faune et sur l'humain

L'exposition environnementale à des estrogènes naturels, qu'elle soit épisodique ou chronique, peut causer différents problèmes de santé tant chez la faune que chez l'humain. Elle pourrait entre autre causer des problèmes de développement, de fertilité de même qu'augmenter l'incidence de certains types de cancers (Daston *et al.*, 1997). Voici les exemples les plus documentés dans la littérature des effets adverses causés par les estrogènes.

I.7.3.1 Féminisation des poissons

Le ratio androgènes versus estrogènes est responsable, chez les vertébrés, du développement de certains caractères mâles et femelles. Certaines molécules, telles que les estrogènes, briseraient l'équilibre hormonal et seraient en partie responsables du phénomène de féminisation largement observé chez les poissons dans certains cours d'eau contaminés, notamment en aval des grandes agglomérations urbaines. Parmi les effets phénotypiques associés à la féminisation, il y a entre autres l'augmentation du niveau d'estrogènes dans le sang des poissons, la diminution de la taille des testicules et un retard dans la spermatogenèse (Filby *et al.*, 2007). Des analyses histologiques ont également révélées la présence de follicules ovariens dans les testicules de poissons exposés aux estrogènes, une condition nommée intersexe (Aravindakshan *et al.*, 2004). Un autre effet relié à la féminisation des poissons est l'induction de la vitellogénine plasmatique (VTG), une protéine normalement synthétisée au niveau du foie chez les poissons femelles. Cette protéine est d'ailleurs souvent utilisée comme biomarqueur pour détecter les contaminations estrogéniques (Sumpter et Jobling, 1995). En présence d'estrogènes, la VTG peut être surexprimée chez les femelles et anormalement synthétisée chez les mâles et les juvéniles (Lange *et al.*, 2002a; Aravindakshan *et al.*, 2004; Van den Belt *et al.*, 2004; Dorabawila et Gupta, 2005). Une concentration de β E2 aussi faible que 1 ng/L serait suffisante pour induire la synthèse de cette protéine chez les poissons mâles (Dorabawila et Gupta, 2005). Une étude a montré que les phyto-estrogènes, comme l'EQO et la daidzéine, induisent également la synthèse de cette protéine. Par contre, l'équol et la daidzéine doivent se trouver à des concentrations plus importantes que le β E2, soit de l'ordre de 500 et 2000 fois supérieures, respectivement (Pelissero *et al.*, 1991). Cette synthèse de VTG aurait plusieurs effets néfastes comme une diminution de la croissance des testicules et des ovaires, de même qu'une diminution de la production des œufs. De plus, des dommages au foie ainsi qu'aux reins y serait associé (Lange *et al.*, 2002a).

1.7.3.2 β E2 et cancers

Le β E2, une hormone naturelle, a longtemps été considéré par les scientifiques comme une molécule non carcinogène et non génotoxique (Joosten *et al.*, 2004). Il y a maintenant suffisamment d'évidences scientifiques pour que le β E2 soit considéré comme un carcinogène complet, du groupe I, puisqu'il agirait comme initiateur ainsi que comme promoteur de tumeurs (Lange *et al.*, 2002a; Joosten *et al.*, 2004). La promotion de tumeurs par le β E2, par un mécanisme hormonal non génotoxique, a été observée chez plusieurs espèces de rongeurs, dans des organes sous l'influence des estrogènes (Joosten *et al.*, 2004). Chez la femme, les estrogènes auraient un effet permissif favorisant le développement et la croissance du cancer du col de l'utérus (Wang *et al.*, 2004). L'induction de tumeurs par le β E2, par des mécanismes de génotoxicité, a été observée entre autres chez la souris (tumeurs lymphoïdes) et chez le hamster (tumeurs rénales) (Joosten *et al.*, 2004). La génotoxicité des phyto-estrogènes, tels que l'EQU, la génistéine et de la daidzéine, a quant à elle été démontrée *in vitro* à l'aide du test des micronoyaux (Di Virgilio *et al.*, 2004).

1.7.3.3 Désordres au niveau de l'appareil reproducteur de l'homme

Au cours des cinquante dernières années, de nombreux désordres au niveau de l'appareil reproducteur de l'homme ont été remarqués et attribués, en partie, à la présence d'estrogènes naturels et de xéno-estrogènes dans l'environnement. Parmi les troubles recensés, il y a l'augmentation de l'infertilité, de la cryptorchidie et du cancer des testicules (Daston *et al.*, 1997; Lange *et al.*, 2002a). Aussi, une réduction de la qualité du sperme et du compte de spermatozoïdes serait reliée à la présence d'estrogènes dans l'environnement (Fisch et Golden, 2003). L'analyse des nombreuses études épidémiologiques a permis de poser l'hypothèse d'une corrélation entre ces problématiques et la présence d'estrogènes environnementaux. Cependant, en raison des différences de méthodologies et de certaines incohérences entre les études, il n'est pas possible

de prouver la causalité entre les désordres physiques observés chez l'homme et les estrogènes (Daston *et al.*, 1997; Sharpe et Skakkebaek, 2003).

1.7.4 Concentrations effectives

Les inquiétudes concernant la présence d'estrogènes naturels dans l'environnement sont en partie dues à la forte activité biologique de ces molécules à faible dose, de l'ordre du ng/L (Routledge *et al.*, 1998; Metcalfe *et al.*, 2001; Hanselman *et al.*, 2006).

1.8 Biodégradation des estrogènes

Les eaux usées municipales et les déjections animales constituent des sources majeures d'estrogènes naturels et synthétiques susceptibles de rejoindre les milieux naturels et d'y affecter la faune. Le traitement de ces eaux usées pourrait permettre d'abaisser les concentrations en estrogènes, de même que celles de d'autres polluants ou fertilisants en excès. Il est possible de penser que les microorganismes, au sein de biotraitements, pourraient utiliser ces molécules comme source de carbone ou encore les co-métaboliser, menant ainsi à leur dégradation. D'ailleurs, le devenir des estrogènes au sein des traitements d'eaux usées municipales a fait l'objet de plusieurs études. Les principaux constats et tendances sont décrits dans la section qui suit.

1.8.1 Traitements d'eaux usées municipales et dégradation des estrogènes

1.8.1.1 Types de traitements des eaux usées

Les eaux usées sont traitées afin de réduire l'impact de leur rejet dans l'environnement. Cependant, les standards ne sont pas aussi élevés au niveau des traitements d'eaux usées qu'ils le sont pour l'eau potable (Johnson et Sumpter, 2001). Ainsi, il existe environ sept niveaux de traitement des eaux usées (Metcalf & Eddy, 2003). Le premier niveau est le traitement préliminaire, qui consiste en

l'enlèvement des grosses particules. Ensuite, il y a le traitement primaire, qui permet d'éliminer une partie des solides en suspensions et de la matière organique. Le troisième niveau est le traitement primaire avancé, qui permet un enlèvement plus efficace des solides en suspensions et de la matière organique, souvent à l'aide d'ajout de produits chimiques ou d'une filtration. Certaines municipalités optent pour un quatrième niveau de traitement, soit le traitement secondaire, qui réduit la matière organique biodégradable et les solides en suspension. La désinfection est aussi normalement incluse lors des traitements secondaires. Le traitement secondaire avec enlèvement des nutriments est le cinquième niveau de traitement existant. En plus de permettre une diminution de la matière organique biodégradable et des solides en suspension, il diminue la charge en azote et en phosphore. Le sixième niveau de traitement est le traitement tertiaire, qui élimine les solides en suspension persistants après le traitement secondaire. Finalement, un dernier niveau de traitement peut-être atteint par l'enlèvement de la matière dissoute et en suspension résiduelle, lorsque l'eau doit être réutilisée à des fins diverses.

1.8.1.2 Efficacité des traitements d'eaux usées

Les performances des traitements d'eaux usées pour l'enlèvement des estrogènes varient beaucoup selon le niveau et le type de traitement employé (Li *et al.*, 2005). Quelques faits sont intéressants à soulever afin de dresser un portrait des tendances observées au sujet de l'enlèvement des estrogènes au sein des traitements d'eaux usées.

Il semble que les traitements primaires avancés, dépourvus d'étapes successives de traitement (secondaire et tertiaire), ne permettent pas d'éliminer de façon significative les estrogènes, avec des pourcentages de diminution de l'E1 et du β E2 de 7 et 0 %, respectivement (Braga *et al.*, 2005).

Pour ce qui a trait aux procédés de traitements secondaires biologiques, les systèmes à boues activées seraient plus efficaces que les autres types de traitements tel que les biofiltres à percolation (Svenson *et al.*, 2003). Selon une étude de Servos *et al.* (2005), recensant les performances de 18 usines de traitement d'eaux usées canadiennes, les traitements secondaires avancés où se déroule une activité de nitrification sont environ deux fois plus efficaces au niveau de la dégradation de l'E1 et du β E2 que les traitements sans étape de nitrification. D'autres études rapportent également une plus grande diminution de la concentration des estrogènes naturels dans les biotraitements qui incluent des étapes de nitrification et de dénitrification (Andersen *et al.*, 2003; Joss *et al.*, 2004; Lorenzen *et al.*, 2004).

En somme, les systèmes de traitement d'eaux usées municipales permettent d'éliminer de 50 à 90% des estrogènes totaux (Fujii *et al.*, 2002). Quoiqu'il en soit, peu importe le type de traitement employé pour le traitement des eaux usées, les estrogènes naturels tels que le β E2 et l'E1, de même que l'estrogène synthétique l'EE2, sont fréquemment détectés dans les effluents des stations de traitement, dans des pays comme le Canada, l'Allemagne et le Brésil (Ternes *et al.*, 1999b).

1.8.1.3 Adsorption des estrogènes aux solides

En raison des propriétés physico-chimiques du β E2, on pourrait s'attendre à ce qu'il adsorbe aux particules des boues au sein des traitements. D'ailleurs, certains chercheurs suggèrent qu'une part importante des estrogènes serait adsorbée aux boues et qu'un tel phénomène serait en partie responsable de la diminution des estrogènes observée dans la phase aqueuse après les traitements (Johnson et Sumpter, 2001; Fujii *et al.*, 2002). Pourtant, à des concentrations de 0.5 à 50 ng/L (représentatives des eaux usées municipales), le β E2 resterait en majorité dans la phase aqueuse, selon des essais menés en laboratoire (Furhacker *et al.*, 1999). Les résultats de cette étude laissent donc croire que l'adsorption des estrogènes aux solides, dans les traitements, serait négligeable. Une autre étude

arrive à la même conclusion (Svenson *et al.*, 2003). Bien qu'il y ait des avis contraires dans la littérature disponible, il semblerait que la diminution des concentrations d'estrogènes mesurée après les traitements d'eaux municipales serait principalement due à l'action de microorganismes (Baronti *et al.*, 2000).

1.8.1.4 Dégradation des estrogènes conjugués

Les estrogènes sont principalement excrétés sous forme conjuguée avec un groupement glucuronide ou sulfate. La détection d'estrogènes libres dans les effluents de traitements d'eaux usées municipales laisse croire que ces molécules seraient déconjuguées en cours de traitement (Desbrow *et al.*, 1998; Jobling *et al.*, 1998; Routledge *et al.*, 1998; Tyler *et al.*, 1998; Panter *et al.*, 1999). En fait, les estrogènes conjugués seraient transformés en estrogènes libres dès leur passage dans le réseau d'égout menant à la station de traitement d'eaux usées. L'hypothèse de l'enlèvement du groupement glucuronide par la bactérie *Escherichia coli*, abondante dans les fèces et qui synthétise des quantités importantes de l'enzyme β -glucuronidase, a donc été émise (Baronti *et al.*, 2000; D'Ascenzo *et al.*, 2003). Toutefois, cette hypothèse n'a jamais été démontrée expérimentalement.

Une étude de Panter *et al.* (1999) a toutefois montré, grâce à un test d'induction de la VTG, que le β E2-3-glucuronide est facilement transformé en un composé plus estrogénique suite à l'action de microorganismes provenant d'eaux usées. Des essais en laboratoire ont également montré que les estrogènes conjugués avec un groupement glucuronide sont rapidement transformés en estrogènes libres (D'Ascenzo *et al.*, 2003). Cette même étude a montré qu'à l'entrée des traitements d'eaux usées, les estrogènes se trouvent surtout sous forme libre ainsi que sous forme conjuguée avec un groupement sulfate. Ces derniers sont plus récalcitrants que les estrogènes conjugués avec un groupement glucuronide (voir figure 4). Shackelton (1986) a d'ailleurs rapporté que la bactérie *Escherichia coli* présentait une très faible activité arylsulfatase. Une autre étude

confirme l'absence d'estrogènes conjugués avec un groupement glucuronide dans des effluents de traitements (Belfroid *et al.*, 1999). Les échantillons ont été traités avec l'enzyme β -glucuronidase et aucune augmentation au niveau de la concentration de l'E1 ou du β E2 n'a été mesurée.

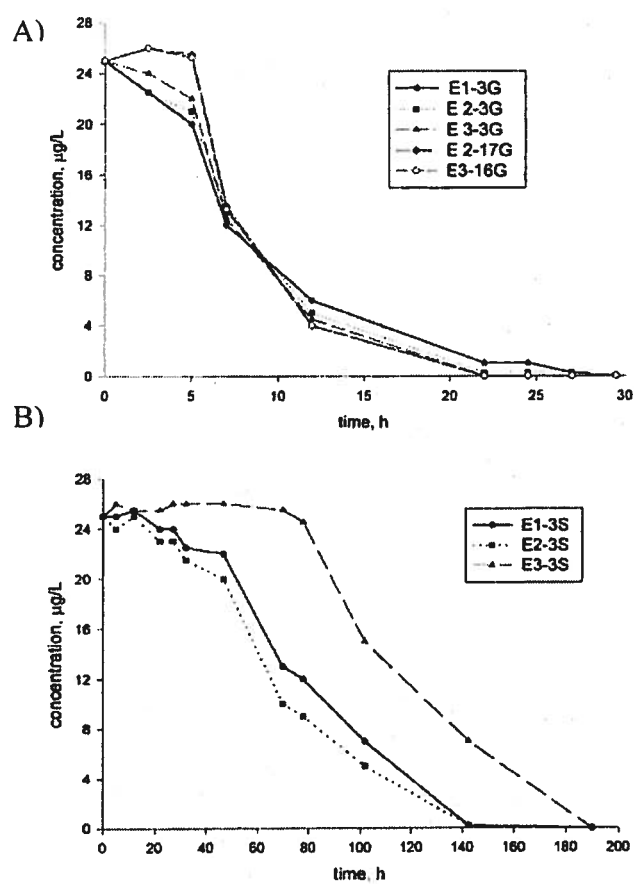


Figure 4. Devenir des estrogènes conjugués dans un traitement d'eaux usées. A) Estrogènes conjugués avec un groupement glucuronide. B) Estrogènes conjugués avec un groupement sulfate dans un traitement d'eaux usées (tiré de D'Ascenzo *et al.*, 2003).

1.8.1.5 Dégradation des estrogènes libres

Il est fréquent d'observer une transformation du β E2 en E1 en cours de traitement (Ternes *et al.*, 1999a; Lee et Liu, 2002; Andersen *et al.*, 2003). La réaction inverse, soit la réduction de l'E1 en β E2, pourrait théoriquement survenir en conditions anaérobies (Andersen *et al.*, 2003) mais n'a jamais été observée à notre connaissance. Pour l'E1, le degré d'enlèvement varie de 19 à 94% alors que pour le β E2, il varie de 76 à 92% (Baronti *et al.*, 2000). L'E1 s'avère être l'estrogène le plus récalcitrant. Il arrive même que des concentrations supérieures d'E1 soient mesurées dans les effluents de traitement (Baronti *et al.*, 2000; D'Ascenzo *et al.*, 2003). Deux raisons peuvent expliquer l'augmentation d'E1 ou du moins, sa plus faible diminution. Tout d'abord, la déconjugaison de l'E1-3-sulfate et de l'E1-3-glucuronide en E1, en cours de traitement, peut fournir une partie de l'explication. Aussi, l'oxydation du β E2 en E1 peut contribuer à ce phénomène (Baronti *et al.*, 2000; D'Ascenzo *et al.*, 2003). Selon les résultats obtenus par D'Ascenzo *et al.* (2003), tout en considérant le potentiel estrogénique de l'E1 et les concentrations qui persistent après les traitements d'eaux usées, les concentrations d'E1 rejetées dans les eaux recevant les effluents de traitements d'eaux usées équivaldraient à environ 10 fois plus d'E1 que de β E2. L'E1 serait donc le plus important perturbateur endocrinien en milieu aquatique (Johnson et Sumpter, 2001; D'Ascenzo *et al.*, 2003).

Une étude réalisée par Lee et Liu (2002) montre également que le β E2 n'est pas un composé très persistant. Cette étude montre également que le β E2 est dégradé plus rapidement en conditions aérobies. Les auteurs ont suggéré un modèle de voie métabolique de dégradation du β E2 par les bactéries provenant des eaux usées (voir figure 5). L'E1 serait le premier intermédiaire à apparaître lors de la dégradation du β E2.

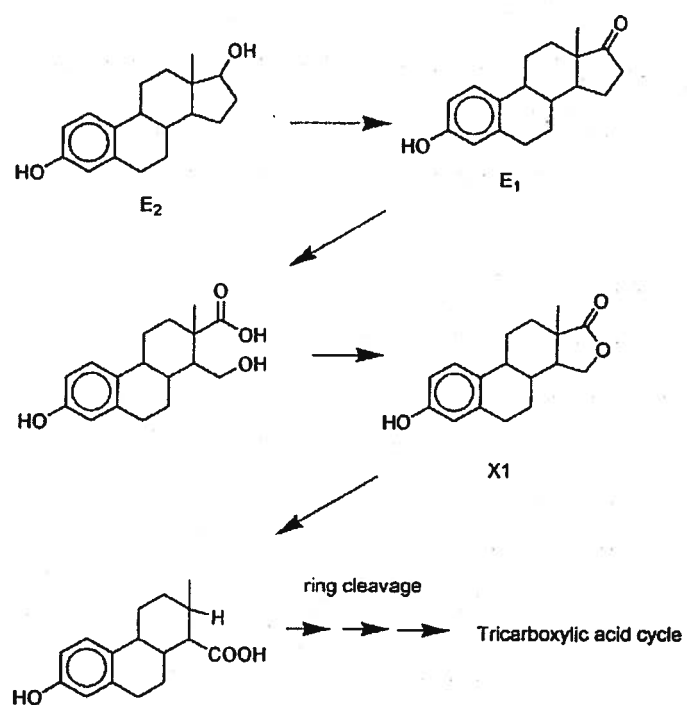


Figure 5. Voie métabolique de la dégradation du β E2 par des bactéries provenant d'eaux usées (tirée de Lee et Liu, 2002).

1.8.2 Traitements du lisier de porcs et dégradation des estrogènes

Le traitement du lisier de porcs, afin de réduire sa charge polluante, est moins fréquent que celui des eaux municipales. En raison de l'expansion de l'industrie porcine et des problèmes environnementaux qui y sont associés, il est probable que les traitements du lisier deviennent un outil de gestion de plus en plus utilisé. À ce jour, peu de données sont disponibles concernant le devenir des estrogènes, et autres perturbateurs endocriniens, au sein des traitements du lisier. Les quelques études qui abordent cette question sont brièvement décrites ci-dessous.

1.8.2.1 Devenir des estrogènes dans les sols agricoles

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le traitement du lisier de porcs est, à l'heure actuelle, une pratique plutôt marginale. Les pratiques courantes incluent plutôt un entreposage du lisier suivi de son épandage comme source de fertilisants sur les terres agricoles. Le devenir des estrogènes, dans des microcosmes de laboratoire simulant des sols agricoles, a d'ailleurs fait l'objet d'études de Colucci *et al.* (2001; 2002). Ces travaux ont montré que le β E2 et l'E1 sont rapidement biodégradés dans les sols sous différentes conditions de température et d'humidité. Les estrogènes se dissiperaient également via la formation de résidus non extractibles liés au sol. Les auteurs suggèrent que l'utilisation de pratiques d'application adéquates, qui favorisent le contact du lisier avec le sol et qui réduisent l'écoulement du lisier vers les cours d'eau, devrait permettre de limiter les effets des hormones sur la faune aquatique. D'autres travaux, réalisés par Jacobsen *et al.* (2005), ont par ailleurs montré que la dégradation du β E2 était augmentée dans un sol agricole amendé avec du lisier. Ceci pourrait indiquer que le lisier contient des microorganismes capables de dégrader cette hormone.

1.8.2.2 Persistance des estrogènes dans le lisier entreposé

Une étude a permis de détecter, sans toutefois les quantifier, de l'E1 et du β E2 dans du lisier entreposé depuis plus de sept mois (Burnison *et al.*, 2003). D'autres travaux ont également détecté la présence d'E1 et de β E2 dans du lisier de porcs provenant de différentes installations d'entreposage (Raman *et al.*, 2004). Dans tous les cas recensés, les concentrations d'E1 dépassaient celles de β E2.

1.8.2.3 Efficacité des étangs anaérobies et des marais artificiels

Une étude a porté sur l'enlèvement des estrogènes par les étangs anaérobies et marais artificiels, des installations largement utilisées à l'échelle mondiale pour le traitement des eaux usées issues des élevages d'envergure (Shappell *et al.*, 2007). Ces travaux montrent que dans 70% des échantillons analysés, l'E1 est le composé dont les concentrations sont les plus élevées. Ainsi, il apparaît que cet estrogène soit la principale source de l'activité estrogénique dans les effluents traités. Selon cette étude, ce type d'installations permet de réduire le potentiel estrogénique (mesuré par un test *in vitro* utilisant les cellules épithéliales mammaires MCF-7) de 83 à 93%. Les effluents de ces traitements ont un potentiel estrogénique de l'ordre de 10 ng/L en équivalents d'estradiol.

1.8.2.4 Efficacité des lits de boues expansées anaérobies « up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) » en série avec des filtres biologiques « trickling filter »

Une étude de Furuichi *et al.* (2006) a porté sur l'enlèvement des estrogènes au cours d'un traitement du lisier de porcs combinant deux technologies, soit celle des lits de boues expansées anaérobies suivi de filtres biologiques. L'utilisation d'un bioessai *in vitro* (cellules MVLN) a montré que le potentiel estrogénique est réduit de plus de 97% au niveau de l'effluent. Plus précisément, ce sont les filtres biologiques qui sont majoritairement responsables de cette diminution. Les lits de boues expansées anaérobies permettent quant à

eux de réduire le potentiel estrogénique de 19 à 50%, ce qui indique que les conditions anaérobies sont peu favorables à l'abaissement de l'estrogénicité. Les résultats obtenus par LC-MS/MS montrent également la plus grande efficacité des filtres biologiques, comparativement aux lits de boues expansées anaérobies, pour réduire la concentration des différents estrogènes. Les pourcentages de diminution des estrogènes naturels, comme l'E1, le β E2, l' α E2, l'E3 et l'EEO, varient de 96 à plus de 99%. Toutefois, l'enlèvement des estrogènes synthétiques, tels que le 4-nonylphenol, le 4-tert-octylphenol et le bisphenol A, est moins efficace, variant de 46 à 85%. Les résultats de cette étude tendent à montrer que la contribution de l'EEO au potentiel estrogénique global du lisier serait faible, soit de l'ordre de 2-3%, contrairement à ce qui avait précédemment été rapporté par Burnison et ses collaborateurs (2003). Il faut dire que les concentrations d'EEO initiales, dans l'affluent, sont environ 10 fois inférieures à celles mesurées par Burnison (voir tableau 1). Il est à noter que la concentration des phyto-estrogènes dans le lisier et donc leur contribution au potentiel estrogénique global peut être grandement influencée par la nourriture donnée aux animaux. Il peut donc être difficile de comparer entre elles les différentes études. La figure 6 montre que l'E1 est l'estrogène qui contribue le plus au potentiel estrogénique global de l'effluent de traitement. Somme toute, l'ensemble des résultats tend à montrer l'efficacité des filtres biologiques pour réduire considérablement la concentration des estrogènes présents dans le lisier de porcs.

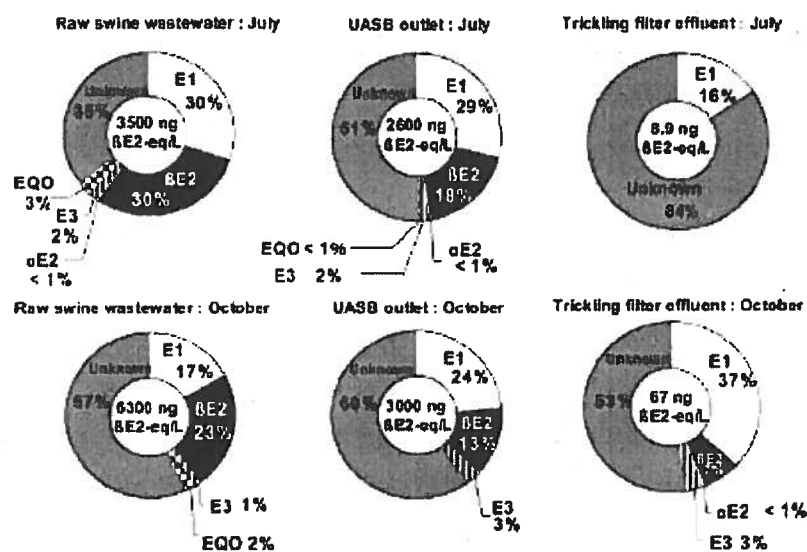


Figure 6. Contribution de chaque estrogène au potentiel estrogénique global, exprimée en équivalents d'estradiol (β E2-EQB) (Furuichi *et al.*, 2006).

1.8.3 Microorganismes capables de dégrader les estrogènes

Au cours des dernières années, l'attention des scientifiques s'est portée sur les estrogènes en tant que polluants environnementaux. Ainsi, l'étude de la biodégradation de ces molécules est une préoccupation relativement nouvelle. Peu de microorganismes capables de métaboliser les estrogènes sont donc connus à ce jour et la plupart ont été isolés à partir de biotraitements d'eaux usées. À notre connaissance, aucune bactérie dégradant les estrogènes n'a été isolée d'un biotraitement du lisier de porcs.

1.8.3.1 Bactéries associées au genre *Novosphingobium*

Une bactérie a été isolée à partir de boues activées d'une station d'épuration des eaux usées de Tokyo, au Japon (Fujii *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2003). *Novosphingobium tardaugens* dégraderait de façon efficace le β E2 (10 mg/30 mL, en 20 jours) sans provoquer l'accumulation de métabolites toxiques. Toutefois, les auteurs n'ont pas pu vérifier la capacité de la souche de dégrader le β E2 à des concentrations environnementales, en raison de contraintes analytiques.

1.8.3.2 Bactéries associées au genre *Rhodococcus*

Des souches de *Rhodococcus* ont été isolées de boues activées de traitements d'eaux usées suite à un enrichissement en présence de β E2. Il s'agit de *Rhodococcus zopfii* Y 50158 et de *Rhodococcus equi* Y 50155, Y 50156 et Y 50157 (Yoshimoto *et al.*, 2004). Les auteurs ont rapporté une dégradation complète de 100 mg/L de β E2, d'E1, d'E3 et d'EE2 par *Rhodococcus zopfii* Y 50158, la souche la plus performante des quatre. De plus, cette souche dégraderait sélectivement le β E2 même en présence de glucose, une source de carbone rapidement utilisable. Des mesures de potentiel estrogénique à l'aide d'un essai avec des cellules MVLN laissent croire que le β E2 est métabolisé en des molécules sans activité estrogénique. Les bactéries associées au genre *Rhodococcus* possèderaient un système enzymatique capable de dégrader le

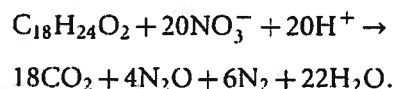
squelette stéroïdien et pourrait dégrader, en plus des estrogènes, des polluants environnementaux comme le 2,4-dinitrophénol (Yoon *et al.*, 2000).

1.8.3.3 Bactéries associées aux genres *Achromobacter* et *Ralstonia*

Des essais de dégradation du β E2 et de l'EE2, en mode cuvée, ont été menés avec des boues activées (Weber *et al.*, 2005). Une transformation du β E2 en E1 a été observée, suivi d'une lente transformation de ce dernier. L'EE2 n'est pas dégradé par la biomasse. La première étape, soit l'oxydation du β E2 en E1, ne procure par beaucoup d'énergie pour la croissance des bactéries. Cependant, l'oxydation de l'E1 mène à une augmentation de la croissance bactérienne. Deux souches bactériennes ont été isolées suite à un enrichissement en présence de β E2. Elles seraient responsables de la dégradation du β E2 et de l'E1 observée. Il s'agit de *Achromobacter xylosoxidans* et de *Ralstonia picketii*. Ces deux genres bactériens comportent également certaines espèces connues pour leur capacité de dégradation de différents polluants. Plus particulièrement, le genre *Ralstonia* est bien connu pour dégrader les composés phénoliques (Bhushan *et al.*, 2000; Baggi *et al.*, 2002).

1.8.3.4 Bactérie *Denitratisoma oestradiolicum*

Une bactérie capable d'utiliser le β E2 comme seule source de carbone a été isolée d'un enrichissement de biomasse provenant de boues activées municipales. *Denitratisoma oestradiolicum* oxyderait complètement le β E2 en dioxyde de carbone et en eau et ce, en conditions dénitrifiantes (Fahrbach *et al.*, 2006). L'équation de dégradation est présentée ci-dessous :



Cette étude a également montré que la souche ne peut croître en conditions aérobies en utilisant le β E2 ou l'E1. Par contre, elle peut le faire en utilisant comme accepteur d'électrons des substrats tels que l'acétate, le pyruvate ou le fumarate.

1.8.3.5 Champignon *Fusarium proliferatum* HNS-1

Une étude a mis en évidence la capacité de *Fusarium proliferatum* HNS-1 à dégrader 25 mg/L d'EE2 en 15 jours (Shi *et al.*, 2002). Des produits de dégradation ont été observés sans toutefois avoir subi d'évaluation de leur activité estrogénique. Il s'agit du premier microorganisme chez qui la capacité de dégradation de cet estrogène synthétique, hautement estrogénique, a été démontrée.

1.8.3.6 Champignons responsables de la pourriture blanche (« White rot fungi »)

Des essais de dégradation du β E2 et de l'EE2 ont été réalisés à l'aide d'enzymes extraites des champignons responsables de la pourriture blanche (*Phanerochaete chrysosporium* ME-446 et *Trametes versicolor* IFO-6482), connues pour leur capacité de dégradation de la lignine du bois. Les enzymes manganèse peroxidase (MnP) et laccase sont également connues pour leur potentiel de dégradation de différents polluants tels que les dioxines, les chlorophénols et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces enzymes, partiellement purifiées, semblent capables de métaboliser le β E2 et l'EE2 comme le montrent les résultats d'un bioessai *in vitro* (« yeast two-hybrid estrogenic assay system »). En effet, une diminution de 80% du potentiel estrogénique est mesurée après seulement une heure de traitement alors que la diminution atteint 100% après huit heures de traitement (Suzuki *et al.*, 2003).

1.8.3.7 Bactéries nitrifiantes

Une étude a montré que la bactérie nitrifiante *Nitrosomonas europaea* de même que les boues activées nitrifiantes de façon générale ont la capacité de dégrader significativement l'EE2, l'E1, l'E3 et le β E2 (Shi *et al.*, 2004). Parmi ces quatre composés, le β E2 est le plus rapidement dégradé par les boues nitrifiantes. En fait, 98% du β E2 (1 mg/L) est dégradé en 2 heures. Il est transformé en E1, qui est ensuite dégradé en 72 heures. La dégradation des estrogènes par *Nitrosomonas europaea* en culture pure a aussi lieu mais elle requiert plus de temps, soit environ 200 heures. Des essais en présence d'un inhibiteur de nitrification ont révélé que

d'autres bactéries, présentes dans les boues nitrifiantes, seraient impliquées dans la dégradation des estrogènes, qui survient même en présence de l'inhibiteur. En ce qui concerne la dégradation du β E2 par *Nitrosomonas europaea*, elle n'a pas lieu en présence de l'inhibiteur de nitrification, ce qui suggère fortement un rôle de la monooxygénase de l'ammoniac (AMO) dans cette activité.

Une étude de Vader *et al.* (2000) a démontré la capacité de dégradation de l'EE2 (50 μ g/L en 6 jours) par les boues nitrifiantes. De plus, les résultats de cette étude montrent que les bactéries nitrifiantes sont capables de dégrader l'EE2 même en absence d'ammonium lorsqu'un donneur d'électrons externe, comme l'hydrazine, est ajouté. Les résultats montrent que la dégradation de l'EE2 est réalisée par l'enzyme AMO, qui est connue pour sa capacité à co-métaboliser plusieurs composés organiques de faible poids moléculaire. Cette étude montre donc que les bactéries nitrifiantes ont la capacité d'agir non seulement sur des composés de faible poids moléculaire mais également sur un stéroïde synthétique. L'activité de ces bactéries serait probablement une hydroxylation, qui convertirait l'EE2 en métabolites hydrophiles. Ces métabolites hydroxylés seraient presque dépourvus d'activité estrogénique.

L'équipe de Ren *et al.* (2007) a investigué plus en profondeur la dégradation des estrogènes par des boues nitrifiantes. Plus particulièrement, ils ont testé l'influence du substrat ainsi que celle de la charge en matière organique et de la température. Une des observations de cette étude est que, plus la charge en matière organique est grande et donc, plus la transformation de la matière organique est importante, moins il y a de nitrification et de dégradation des estrogènes tels que le β E2, l'E1 et l'EE2. Toutefois, la dégradation de l'E3 semble être largement due à l'action des microorganismes hétérotrophes, favorisés en présence d'une forte charge en matière organique. Les résultats de ces recherches tendent à montrer qu'un mécanisme de co-métabolisme serait responsable de la dégradation des estrogènes par les boues nitrifiantes.

1.8.3.8 Bactéries associées aux genres *Acinetobacter*, *Agromyces* et *Sphingomonas*

Trois isolats capables de dégrader les estrogènes, associés aux genres *Acinetobacter*, *Agromyces* et *Sphingomonas*, ont été isolés d'un microcosme contenant du sable marin, dans lequel les estrogènes (β E2, E1, E3 et EE2 ; 1 mg/L de chacun) constituaient la seule source de carbone (Ke *et al.*, 2007). En conditions aérobies, les trois isolats sont capables d'oxyder le β E2 en E1 mais seulement un isolat, soit celui associé au genre *Sphingomonas*, dégrade l'E1. L'isolat associé au genre *Agromyces* est quant à lui capable de dégrader l'E3 en présence d'oxygène dans le milieu. En conditions anoxiques, une souche peut métaboliser le β E2 et une autre l'E1, moins efficacement par contre qu'en conditions aérobies. Certaines espèces d'*Acinetobacter* sont connues pour leur capacité à dégrader différents polluants tels que le phénol (Adav *et al.*, 2007; Mazzoli *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007) et le toluène (Mutafov *et al.*, 2004).

1.8.3.9 Bactéries associées aux genres *Aminobacter*, *Brevundimonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*

Une étude a permis d'isoler 14 souches bactériennes capables de dégrader le β E2 à partir des boues activées d'une usine de traitement d'eaux usées municipales (Yu *et al.*, 2007). Ces 14 isolats appartiennent à huit genres bactériens différents, affiliés à trois phyla, soit les *Proteobacteria*, les *Actinobacteria* et les *Bacteroidetes*. La figure 7 présente un arbre phylogénétique montrant la répartition des isolats de cette étude. Les 14 souches isolées sont capables de transformer le β E2 en E1. La vitesse de dégradation diffère selon les souches. Par contre, elles transforment toutes complètement le β E2 en E1 (3 mg/L) dans les sept jours suivant le début de l'essai. Seulement trois isolats montrent une capacité de dégrader l'E1. Parmi ceux-ci, il y en a deux qui dégradent faiblement l'estrone, avec des pourcentages de dégradation de $21 \pm 5\%$ et $27 \pm 4\%$ après sept jours. Une souche parmi les 14 se démarque particulièrement (voir figure 8).

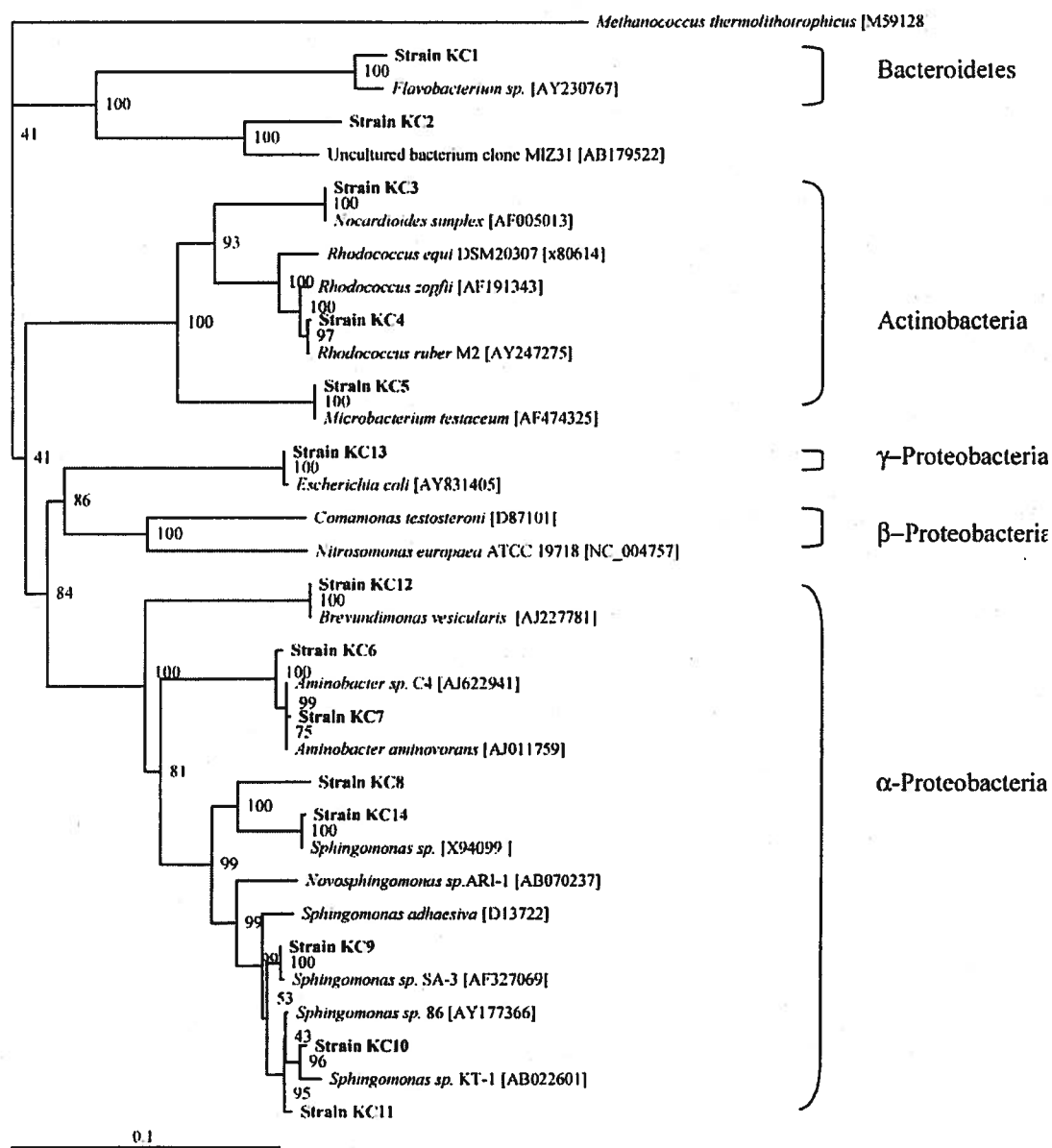


Figure 7. Arbre phylogénétique incluant des souches qui dégradent le β E2 (tiré de Yu *et al.*, 2007).

La souche KC8 dégrade en moins de 24 heures la totalité du β E2. Après trois jours, seulement des traces d'E1 sont détectées alors qu'après cinq jours, ni le β E2, ni l'E1 ne sont détectés. Des mesures du potentiel estrogénique par bioessai YES ont révélé qu'après 5 ou 7 jours, aucune activité estrogénique n'est détectée. Cette étude a aussi montré que la souche KC8 utilise le β E2 comme source de carbone. L'activité de dégradation des autres souches semble plus liée à du co-métabolisme, probablement suite à l'action de monooxygénases non-spécifiques. De plus, les résultats de cette étude permettent de croire que la dégradation de l'E1 est sans doute l'étape limitante au niveau de la biodégradation des estrogènes.

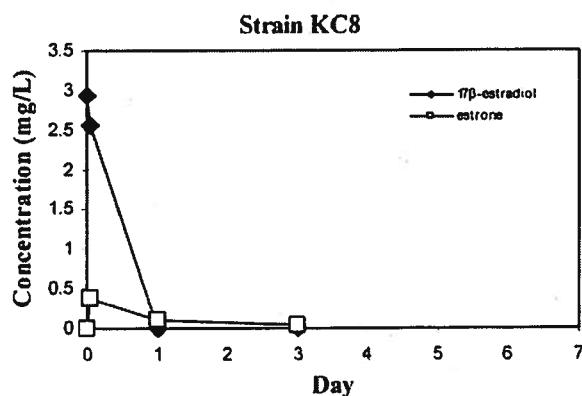


Figure 8. Dégradation du β E2 et de l'E1 par l'isolat KC8 (tirée de Yu *et al.*, 2007).

Chapitre 2. Article scientifique

2.1 Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été effectués par Martine Isabelle sous la supervision de Pierre Juteau, Ph.D. François Lépine, Ph.D., a contribué aux travaux particulièrement en ce qui concerne les volets chimie et spectrométrie de masse du projet de recherche. L'article a été rédigé par Martine Isabelle et révisé par Pierre Juteau de même que par François Lépine.

2.2.1 Attestation des co-auteurs

De : Lepine, Francois
Date : 1 novembre 2007 13:43
À: Isabelle, Martine
Objet : RE : Attestation des co-auteurs

J'atteste que j'ai participé aux travaux de Mde Martine, plus particulièrement au niveau des volets chimie et spectrométrie de masse.

François Lépine

-----Message d'origine-----
De : Isabelle, Martine
Envoyé : 1 novembre 2007 13:28
À : Juteau, Pierre; Lepine, Francois
Objet : Attestation des co-auteurs

2.1 Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été effectués par Martine Isabelle sous la supervision de Pierre Juteau, Ph.D. François Lépine, Ph.D., a contribué aux travaux particulièrement en ce qui concerne les volets chimie et spectrométrie de masse du projet de recherche. L'article a été rédigé par Martine Isabelle et révisé par Pierre Juteau de même que par François Lépine.

Merci beaucoup, Martine Isabelle

De : Juteau, Pierre
Date : 1 novembre 2007 14:22
À: Isabelle, Martine
Objet : RE : Attestation des co-auteurs

Je confirme que ma participation à l'article de madame Martine Isabelle a bel et bien été celle qui est décrite ci-dessous.
Pierre Juteau

-----Message d'origine-----
De : Isabelle, Martine
Envoyé : 1 novembre 2007 13:28
À : Juteau, Pierre; Lepine, Francois
Objet : Attestation des co-auteurs

2.1 Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été effectués par Martine Isabelle sous la supervision de Pierre Juteau, Ph.D. François Lépine, Ph.D., a contribué aux travaux particulièrement en ce qui concerne les volets chimie et spectrométrie de masse du projet de recherche. L'article a été rédigé par Martine Isabelle et révisé par Pierre Juteau de même que par François Lépine.

Merci beaucoup, Martine Isabelle

2.2 Accusé de réception

De: journalsrr@asmusa.org
Envoyé: 26 octobre 2007 07:19
À: Juteau, Pierre
Objet: Manuscript submission (AEM02416-07 Version 1)

Prof. Pierre Juteau
INRS - Institut Armand-Frappier
531, boulevard des Prairies
Laval, QC H7V 1B7
Canada

Re: Isolation of estrogen-degrading bacteria from an activated sludge bioreactor treating swine waste, including a strain that converts estrone to β -estradiol (AEM02416-07 Version 1)

Dear Dr. Juteau:

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. The control number of your manuscript is AEM02416-07 Version 1. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>, and your user name is pierrejuteau. To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL: <http://www.asm.org/journals/editors.asp>

In submitting your manuscript to Applied and Environmental Microbiology (AEM), the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere and that all of the authors are aware of and agree to the submission.

By publishing in the journal, the authors agree that any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer

agreement is sent with each letter of acceptance after the manuscript has been scheduled for publication. If your manuscript is accepted for publication in a 2008 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$65 per printed page for the first eight pages and \$200 for each page in excess of eight for a corresponding author who is an ASM member or \$75 per printed page for the first eight pages and \$250 for each page in excess of eight for a nonmember corresponding author. A corresponding author who is not a member may join ASM to obtain the member rate. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals. For more details, including type of articles not charged, see the Instructions to Authors.

IMPORTANT NOTICE: For its primary-research journals, ASM posts online PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. This feature is called "AEM Accepts" and is accessible from the Journals website. The manuscripts are published online as soon as possible after acceptance, on a weekly basis, before the copyedited, typeset versions are published. They are posted "As Is" (i.e., as submitted by the authors at the modification stage), and corrections/changes are NOT accepted. Accordingly, there may be differences between the AEM Accepts version and the final, typeset version. The manuscripts remain listed on the AEM Accepts page until the final, typeset versions are posted, at which point they are removed from the AEM. Accepts page and become available only through links from the final, typeset version. They are under subscription access control until 4 months after the typeset versions are posted, when access to all forms becomes free to everyone. Any supplemental material intended, and accepted, for publication is not posted until publication of the final, typeset article.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Barbara Slinker
Production Editor
Applied and Environmental Microbiology (AEM)

2.3 Note sur la présentation de l'article

Les pages qui suivent présentent le manuscrit tel qu'il a été soumis au journal *Applied and Environmental Microbiology*. Toutefois, dans un souci de maintien de l'uniformité de style dans le présent mémoire, certaines modifications ont été apportées. Tout d'abord, la liste de références a été intégrée avec celle de l'ensemble du mémoire. De même, les citations sont présentées dans le format utilisé dans le mémoire alors que le texte soumis au journal utilisait plutôt le style exigé par les éditeurs. Finalement, les titres ont été numérotés en continuité avec ceux du présent document.

2.4 Isolation of estrogen-degrading bacteria from an activated sludge bioreactor treating swine waste, including a strain that converts estrone to β -estradiol

Martine Isabelle, François Lépine and Pierre Juteau*

INRS-Armand-Frappier Institute, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7.

* : Corresponding author. Email : pierre.juteau@iaf.inrs.ca, phone 450-687-5010, fax 450-686-5501.

Submitted to Applied and Environmental Microbiology

Section : Environmental Microbiology

2.4.1 Abstract

An estrogen-degrading bacterial consortium was enriched from a swine waste biotreatment in presence of low concentration (1 mg/L) of estrone (E1), 17 β -estradiol (β E2) and equol (EQO) as sole carbon sources. The consortium consumed 99 ± 1 % of these three estrogens in 48 hours. Estrogens degradation occurred even in presence of an ammonia monooxygenase inhibitor, suggesting that nitrifiers are not involved. Among nine bacterial strains isolated from the consortium, five showed an estrogen-metabolizing activity. They are related to four genera, *Methylobacterium* (MI6.1R), *Ochrobactrum* (MI6.1B and MI9.3), *Pseudomonas* (MI14.1) and *Mycobacterium* (MI21.2), distributed among three classes, α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* and *Actinobacteria*. MI9.3, MI14.1 and MI21.2 degrade β E2 and E1, whereas MI6.1B only transforms β E2. Another strain, *Methylobacterium* sp. MI6.1R, reduces E1 into β E2 in aerobic condition, contrary to the normally observed conversion of β E2 into E1. Since β E2 is more potent than E1, it means that the presence of *Methylobacterium* sp. MI6.1R (or other bacteria with the same E1 reducing activity) in a treatment could increase the estrogenicity of the effluent, or at least reduce the efficiency of the process by working in an opposite direction of estrogen degraders. Experiments with E1 analogues showed that the reduction of the ketone function was specific to compounds containing a steroid skeleton. All β E2 and E1 transformation activities were constitutive, and many of them are favoured in a rich TSB medium compare to a medium containing no other carbon source, which suggests that estrogens transformation by these strains is due to a cometabolism.

2.4.2 Introduction

Various estrogens, like estrone (E1) and β -estradiol (β E2), are naturally excreted by pigs (Fine *et al.*, 2003; Raman *et al.*, 2004). Equol (EQO), a phyto-estrogen metabolite derived from soybean which is largely used as pig feed, is also excreted by those animals (Burnison *et al.*, 2003; Kiparissis *et al.*, 2003). Although environmental pollution with estrogens contained in municipal wastewater is well documented, animal wastes could be an important source of estrogenic pollution in rural area (Raman *et al.*, 2001; Hanselman *et al.*, 2003; Furuichi *et al.*, 2006). Estrogens in the environment are of great concern as these compounds can modulate the endocrine system of different animal species and alter many biological functions such as their reproduction and growth (Tyler *et al.*, 1998; Bhatt, 2000; O'Connor et Chapin, 2003). Numerous studies have reported that estrogens can cause sexual disruption in aquatic organisms and male fish feminization (Metcalf *et al.*, 2001; Jobling *et al.*, 2006). In addition to its estrogenic properties, equol can also induce chromosomal genotoxicity (Di Virgilio *et al.*, 2004). In water, estrogens can have biological effects even at ng/L concentration levels (Panter *et al.*, 1998; Metcalfe *et al.*, 2001; Thorpe *et al.*, 2003). In addition to estrogenic compounds, pig manure contains nutrients, pathogens and malodorous compounds, which cause environmental problems.

Various biotreatments have been developed to manage these wastes and reduce pollution. Some of them are designed to produce an effluent clean enough to be directly rejected in rivers or reused in farm as washing water. Currently, the fate of estrogens in various swine waste biotreatments has received little attention and deserves to be study in greater depths. Some studies showed that treatment of swine waste can reduce estrogenic compounds (Furuichi *et al.*, 2006; Shappell *et al.*, 2007) but the residual concentrations in these effluents are still high enough to cause adverse biological effects on fishes (Shappell *et al.*, 2007).

Many microorganisms isolated from wastewater treatments could degrade some estrogenic compounds. Among these bacteria, *Rhodococcus* sp. (*Actinobacteria*) can degrade β E2, E1, estriol (E3) and ethinyl estradiol (EE2) (Yoshimoto *et al.*, 2004). *Novosphingobium tardaugens* (α -*Proteobacteria*) degrades 10 mg/30 mL of E2 in 20 days (Fujii *et al.*, 2003). *Denitratisoma oestradiolicum* (β -*Proteobacteria*) was able to grow with E2 as sole source of carbon and energy (Fahrbach *et al.*, 2006). In another study, fourteen different β E2-degrading bacteria were isolated from the activated sludge of a wastewater treatment. They were distributed among eight genera; *Aminobacter* (α -*Proteobacteria*), *Brevundimonas* (α -*Proteobacteria*), *Escherichia* (γ -*Proteobacteria*), *Flavobacterium* (*Bacteroidetes*), *Microbacterium* (*Actinobacteria*), *Nocardioides* (*Actinobacteria*), *Rhodococcus* (*Actinobacteria*) and *Sphingomonas* (α -*Proteobacteria*) (Yu *et al.*, 2007). Three estrogen-degrading strains, related to *Acinetobacter* (γ -*Proteobacteria*), *Agromyces* (*Actinobacteria*) and *Sphingomonas* (α -*Proteobacteria*) genera, were isolated from microcosms constructed with marine sand and ultrafiltered secondary effluent with estrogens as sole carbon source at the mg/L level (Ke *et al.*, 2007). Aerobically, all three isolates oxidized β E2 into E1 but only one degraded E1. Under anoxic conditions, one strain metabolized β E2 whereas another degraded E1, but at lower rates. In aerobic wastewater biotreatments, it is common to observe the oxidation of β E2 into E1, sometimes followed by subsequent degradation of E1 (Servos *et al.*, 2005). This transformation decreases estrogenic potency, because β E2 is about two to three times more estrogenic than E1 *in vivo* (Thorpe *et al.*, 2003). Ammonia-oxidizing bacteria, like *Nitrosomonas europaea* (β -*Proteobacteria*), are also capable to degrade some estrogens (Shi *et al.*, 2004), and cometabolism involving the ammonia monooxygenase (*amoA*) seems to be an important mechanism for estrogen biodegradation in nitrifying activated sludges (Ren *et al.*, 2007).

Until now, no microorganism responsible for the removal of estrogenic compounds in a swine waste biotreatment has been identified. Based on these

recent studies dealing with estrogen-degrading bacteria in wastewater, we hypothesized that some bacteria in swine waste biotreatments could metabolize estrogens. The objectives of the present work were to isolate and characterize bacteria that degrade endocrine disruptors present in a laboratory scale Sequencing Batch Reactor operated for Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR-SBR). It represents a second step in a swine waste treatment that began with an Aerobic Thermophilic Sequencing Batch Reactor (AT-SBR) (Juteau *et al.*, 2004a). We report the isolation of five estrogen-metabolizing bacteria, including a strain that performs an unusual reduction of E1 into β E2.

2.4.3 Materials and methods

Chemicals. Estrone, β -estradiol, α -estradiol, estriol, 16 α -hydroxyestrone, 17-epiestriol, 16-epiestriol, 3- α -hydroxy-5- α -androstane-17-one, 5 α -androstane-3 α ,17 α -diol, camphor, isoborneol, borneol, 5 α -cholestan-3-one, dihydrocholesterol and 5- α -cholestan-3- α -ol were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). 16 α -hydroxyestrone and 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol were purchased from Research Plus Inc. (Manasquan, NJ). Equol and daidzein were obtained from LC Laboratories (Woburn, MA,). Estrone-D4 was purchased from C/D/N Isotopes Inc. (Pointe-Claire, QC, Canada). Equol-D4 was synthesized in our laboratory by catalytic hydrogenation of daidzein. Briefly, 20 mg of daidzein and 50 mg of palladium on charcoal (5%) were added to 10 mL of isopropanol. The suspension was stirred under a deuterium pressure of 125 psi for 10 days. Water, methanol and acetonitrile were HPLC grade and obtained from Fischer Scientific Company (Ottawa, ON, Canada). Triethylamine and *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Sigma-Aldrich. The 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine was purchased as "Formula 2533™" from Hach (Loveland, CO). Sodium borohydride (NaBH₄) was purchased from Anachemia (Lachine, QC, Canada).

Analytical method for estrogens quantification. A SPE-LC-MS/MS protocol was developed based on the method described by Isobe *et al.* (2003). A volume of 25 μ L of internal standards (E1-D4 and EQO-D4, stock solution 1000 mg/L and 300 mg/L in methanol) was added into 10-mL samples. Each of them was centrifuged and decanted, and the pellet was resuspended in 1 mL methanol. After a second centrifugation, the methanol supernatant was added to the first supernatant and the combined solution was acidified (pH<5) with HCl 6N. The samples underwent solid phase extraction (SPE) using a 6 mL OASIS HLB cartridge (Waters, Milford, MA) placed on a 20-port SPE manifold (Waters) connected to vacuum. The cartridge was conditioned with 10 mL of methanol and 10 mL of water and the sample was passed through it at a flow rate of 5 mL/min. The cartridge was washed with 6 mL of milli-Q water. To remove excess water, air was drawn through the cartridge for one hour. Estrogens were eluted with 4 $\times$ 6 mL of methanol containing 5 mM of triethylamine. The collected fractions were combined and evaporated completely with a Rotavapor-R (BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland). The residue was suspended in 500 μ L of acetonitrile/water (50% v/v) containing 20 mM of triethylamine and analyzed by LC-MS/MS. The mass spectrometer was a Micromass Quattro II (Micromass Canada, Pointe-Claire, QC, Canada) interfaced to an Agilent HP1100 HPLC (Agilent Canada, Pointe-Claire, QC, Canada) equipped with a 150 x 2.1 mm Agilent C18 reverse phase Zorbax Extend column. A volume of 25 μ L of sample was injected and separated using a linear gradient going from 5 to 50% acetonitrile in water containing 20 mM of triethylamine in 18 min, then from 50% to 100% in 2 min, then kept at 100% acetonitrile for 4 min and returned to 5% acetonitrile in 2 min and stabilized for another 5 min. The flow rate was 0.4 mL/min, which was split through a Valco Tee splitter (Chromatographic Specialities, Brockville, ON, Canada) to 40 μ L/min. The analysis was performed using negative electrospray ionization, with a capillary voltage of 3.5 kV and a source temperature of 120°C. Estrogens were quantified in Multiple Reaction Monitoring (MRM) using the transitions described in Table 2 and corrected with an internal standard.

Bioreactor. The lab-scale bioreactor from which an activated sludge sample was taken as a source of estrogen-degrading bacteria was constituted of a 5-cm diameter clear PVC cylinder containing 1 L of liquid. This was a Sequencing-Batch Reactor operated for Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR-SBR). It was fed with a centrifuged ($4000 \times g$), diluted (1:20 with tap water) and acetate-supplemented (0.355 mg/L) effluent taken from a 34-L Aerobic Thermophilic Sequencing Batch Reactor (AT-SBR) that treated swine waste (Juteau *et al.*, 2004a). Hydraulic residence time (HRT) and sludge residence time (SRT) of the EBPR-SBR was 12 hours and 14 days, respectively. Each batch lasted 360 min and was subdivided as follow: anaerobic (135 min, including filling), aerobic (135 min), anoxic (30 min), settle (60 min, including effluent withdrawing at the end). Pumping tasks (influent feeding, effluent withdrawing, excess sludge wasting, water recirculation for mixing during non-aerated periods, addition of base or acid) were performed by Masterflex peristaltic pumps (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL). The pH was kept between 7.4 to 7.8 by a pH controller model PHCN37 (Omega, Stamford, CT). The bioreactor was interfaced with a computer using a multifunction data acquisition and control module model OMB-DAQ-56 (Omega). Data acquisition and control program was written in LabView 7.1 (National Instruments, Austin, TX).

Enrichment and isolation of bacteria. Estrogen degraders were enriched by subculturing activated sludge samples from the EBPR-SBR in an estrogen-supplemented mineral medium (ESM medium), which consist of a mineral medium (Holt J.G., 1994) to which E1, β E2 and EQO (1 mg/L each) were added as sole carbon sources (FIG. 9). They were added as methanolic solution (1 mL/L of 1000 mg/L stock solutions). The subsequent heat sterilization of the medium allowed complete evaporation of methanol without affecting estrogens concentration (data not showed). The enrichment was performed aerobically in 0.5 L shake flasks incubated at 25°C under agitation (300 rpm). After 35 days and five subcultures, serial 10-fold dilutions were performed in mineral medium and

100- μ L samples of the 10^1 to 10^8 dilutions were plated on ESM solid medium (1.5% purified agar, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Plates were then incubated aerobically at 25°C. After five to seven days of growth, morphologically distinct colonies were picked and streaked on other ESM plates. This was repeated two times. Then, overnight cultures in TSB medium were prepared and used for the cryogenic (-70°C) conservation of isolated strains in presence of 15% of glycerol (v/v).

DNA sequencing and phylogeny. Total DNA of each isolate was extracted using a bead beating method with a FastPrep FP120 homogenizer (Thermo Scientific, Waltham, MA) followed by purification with phenol-chloroform-isoamyl alcohol and precipitation with ethanol (Juteau *et al.*, 2004b). The extracted DNA was utilised as template for PCR amplification of the 16S rRNA (~ 1500 bp) gene using bacterial universal primers pA and pH (Edwards *et al.*, 1989). PCR reaction was performed in a total volume of 50 μ L containing 0.75 μ mol l⁻¹ of each primer, 200 μ mol l⁻¹ of each dNTP (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ), 1.25 U Taq polymerase (Amersham), 0.4 g l⁻¹ of bovine serum albumin (BSA) and the PCR buffer supplied with the enzyme (10 mmol l⁻¹ Tris-HCl pH 9, 50 mmol l⁻¹ KCl, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂). The PCR conditions were 5 min at 94°C, 5 min at 55°C, then 30 cycles at 72°C for 2 min, 94°C for 40 s, 55°C for 1 min, and finally, 10 min at 72°C. PCR products were sequenced with pA and pH primers by an external service provider (Génome Québec, Montréal, QC, Canada), which used a 3730XL DNA Analyzer system from Applied Biosystems (Foster City, CA). After assembling, contigs were compared with data stored in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in order to find closely related 16S rDNA sequences. All the sequences of interest were aligned with Clustal W 1.4, and a phylogenetic tree was constructed by the Fitch-Margoliash method using a DNA distance matrix, itself based on the Kimura 2-parameter model, with Phylip 3.66 package programs.

Nucleotide sequence accession numbers. The 16S rDNA sequences obtained in this study have been deposited in GenBank/EMBL/DDBJ databases under accession numbers EU165527 to EU165535.

Determination of estrogen-degrading activity. The consortium obtained after enrichment was tested for its estrogen-degrading activity. A 5 mL-aliquot of the consortium was added to 50 mL of ESM medium, containing 1 mg/L of each estrogen (E1, E2 and EQO). An abiotic control was prepared in the same way, but was heat-sterilized twice for 40 minutes. Samples were taken at the beginning and after 48 hours of aerobic incubation at 25°C. Estrogens were quantified by SPE-LC-MS/MS, as described above. The ability of nine isolated strains to degrade a mixture of estrogens was also evaluated. These experiments were performed in ESM and TSB medium (BD, Oakville, ON, Canada) containing 1 mg/L of each three estrogens. In test tubes, strains (single colony) were inoculated into 12 mL of each medium. Abiotic controls were also prepared. Cultures were incubated for 96 hours, at 25°C, with a 300 rpm agitation. Samples were taken at time 0 and 96 hours and analyzed by SPE-LC-MS/MS. All of these experiments were performed in duplicate.

Influence of nitrifying bacteria on estrogens degradation. The ability of the nitrifying bacteria from the consortium to degrade estrogens was evaluated. A volume of 100 mL of ESM medium, that contained 1 g/L of NH_4Cl , was inoculated with 10 mL of the consortium. Two conditions were tested, with and without 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine (a nitrification inhibitor) at a concentration of 10 mg/L. The cultures were incubated aerobically at 25°C for 7 days. Samples were taken at 0, 2 and 7 days. NO_2^- -N and NO_3^- -N concentrations were measured using Waters 600 liquid chromatograph interfaced to a Waters 486 tunable absorbance detector (214 nm) with a lithium borate/gluconate eluent and a 4.6×50 mm IC-Pak A column (Waters). Estrogens were extracted and quantified by SPE-LC-MS/MS.

Reduction of E1 to β -E2 by MI6.1R isolate. To confirm the E1 reduction into β -E2 by isolate MI6.1R, the strain was inoculated in TSB medium containing 1 mg/L of E1-D4. After 96 hours incubation, samples were extracted by SPE and analyzed by LC-MS/MS. Apparition of deuterated β -E2 was monitored in MRM mode (transitions 275>147 and 275>185). The kinetic of E1 reduction to β -E2 during MI6.1R growth was then studied. The strain was inoculated (single colony) in 200 mL of TSB medium containing 1 mg/L of E1. Cultures were incubated aerobically at 200 rpm. Samples were collected at 0, 20, 28, 47, 73, 96 and 192 hours after the beginning of experiment. On each sample, cell density (600 nm) was measured and estrogens were extracted by SPE and quantified by LC-MS/MS.

Reduction of others compounds by MI6.1R isolate. The capacity of MI6.1R isolate to reduce a ketone function on compounds having various structural features was investigated. The structure of the five tested analogs is presented in FIG. 10. Extraction procedures and analytical methods for the detection of these compounds and their respective reduced analogs were developed. 16-hydroxyestrone and 16-ketoestradiol were analyzed by LC-MS/MS by the same method as for E1, β -E2 and EQO without preliminary extraction. Camphor was extracted from a 10 mL sample with ethyl acetate. Briefly, the sample was centrifuged (15 min, 7000 rpm) and 2 mL of ethyl acetate was added to the supernatant and mixed gently by inversion. After decantation, the ethyl acetate phase was recuperated. Analysis was performed by the injection of a 1 μ L aliquot with an HP 185968 autosampler (Agilent) into a HP 5890A gas chromatograph (Agilent) equipped with a G1223A flame ionization detector (Agilent). The column was a HP-5 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m (Agilent) and the linear temperature gradient started at 90°C for 5 min, went to 110°C in 7 min, then to 230°C in 4 min and stabilized at this temperature for 2 min. α -hydroxy-5 α -androstan-17-one and 5-cholestanone were extracted by the same method and analyzed by GC-FID, but samples were first derivatized with 50 μ L of BSTFA plus 35 μ L of methyl paraben (stock solution 1000 ppm) as internal standard and

265 μ l of acetonitrile. The derivatization reaction was performed at 70°C for a minimum of 15 min before the GC-FID analysis.

To test the reduction of these compounds by strain MI6.1R, it was first grown in TSB medium containing only E1 (1 mg/L). Log-phase cultures were centrifuged during 15 minutes at 7000 rpm. The supernatant was decanted and the pellet was resuspended in 50 mL of TSB medium containing only one of the tested analogues (5 mg/L). Abiotic controls were prepared by autoclaving the culture before its centrifugation. This procedure was repeated for each compound. Cultures were incubated aerobically at 200 rpm. Samples were collected at 0, 24, 48, 72 and 96 hours and analyzed. At each time point, cell density (600 nm) was also measured. This experiment was performed in duplicate.

Chemical reduction of E1. In order to verify the stereospecificity of the enzymatic E1 reduction, a chemical reduction of E1 was performed by the addition of 10 mg of NaBH₄ into 1 mL of E1 solution (10 mg/L in acetonitrile/water (50% v/v) containing 20 mM of triethylamine). After 30 minutes of reaction at 25°C, the apparition of estradiol isomers (α and β) was monitored by LC-MS/MS.

Chloramphenicol assay. An assay with chloramphenicol was achieved with estrogen-degrading bacteria to determine if this activity was constitutive or inducible. For each strain, the minimum inhibitory concentration (MIC) of chloramphenicol was first determined by monitoring growth in a series of inoculated culture tubes containing TSB medium and 50, 100, 150, 250, or 300 mg/L of the antibiotic. For the assay, two 50 mL precultures of each strain were prepared in TSB medium, one with three estrogens (E1, E2 and EQO, 1 mg/L each) and another without estrogen. Precultures in log phase were centrifuged during 15 minutes at 7000 rpm. The supernatants were decanted and the pellets were washed with fresh TSB medium. Pellets were resuspended into 50 mL of fresh medium containing the three estrogens. Chloramphenicol at a concentration

corresponding to 125% of predetermined MICs, (100 mg/L for strains MI6.1R, MI6.1B, MI14.1, MI21.1 and 200 mg/L for strain MI9.3) was added to the medium. Samples were taken at the beginning and after 96 hours of aerobic incubation at 25°C. Cell density (600 nm) was monitored to confirm the absence of growth and of protein synthesis. Estrogens were extracted by SPE and quantified by LC-MS/MS. All chloramphenicol experiments were performed in duplicate.

2.4.4 Results

Determination of the estrogen-degrading activity of the consortium.

After a 35-day enrichment period with β E2, E1 and EQO as sole carbon sources, the ability of the consortium to degrade 1 mg/L of those molecules in ESM medium was evaluated by SPE-LC-MS/MS. After 48 hours of incubation, 99 ± 1 % of β E2, E1 and EQO disappeared while no degradation was observed in the controls. This result confirms the presence of estrogen-degrading bacteria in the consortium.

Influence of nitrifying bacteria on estrogens degradation by consortium. As previous studies showed that ammonia-oxidizing bacteria can metabolize estrogens, the role of those bacteria in the degradation of estrogens by the consortium was investigated. The capacity of the consortium to degrade 1 mg/L of each estrogen (β E2, E1 and EQO) in ESM medium, with and without an inhibitor of nitrification, was evaluated. To verify the efficiency of the nitrification inhibitor, the NO_2^- -N and NO_3^- -N concentrations were monitored during the assay. In the culture with the inhibitor, no significant amounts of NO_2^- -N and NO_3^- -N (7 mg/L and 6 mg/L, respectively) were detected at day 7, compared to the culture without inhibitor (33 mg/L and 150 mg/L, respectively), confirming the inhibition of nitrification. The SPE-LC-MS/MS analysis of all these cultures showed that, after 48 hours of incubation, more than 99% of β E2,

E1 and EQO had disappeared, which strongly suggests that nitrifying bacteria were not responsible for the estrogens degradation observed with the consortium.

Isolation of strains with estrogens as sole carbon sources. From the enrichment culture, nine different colonies were observed on ESM agar. The analysis of 16S rDNA sequences showed that these isolates were phylogenetically diverse (FIG. 11). Nine isolates were distributed among eight different genera: *Pseudomonas*, *Hyphomicrobium*, *Crabtreeella*, *Ochrobactrum* (two isolates), *Afipia*, *Methylobacterium* and *Mycobacterium* of four phyla; α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria* and *Actinobacteria*.

Determination of the estrogen-degrading activity of isolated strains. The ability of the isolated strains to metabolize a mixture of the three estrogens was investigated in two different media, ESM medium and TSB medium. Five isolates showed an estrogen-metabolizing activity. These bacteria were related to four genera; *Methylobacterium* (MI6.1R), *Ochrobactrum* (MI6.1B and MI9.3), *Pseudomonas* (MI14.1) and *Mycobacterium* (MI21.2). From the results shown in Table 3, different patterns can be highlighted. Firstly, E1 is converted into β E2 by the MI6.1R isolate. This unexpected reaction, which increases the estrogenic potency of the molecule, occurred in both poor (ESM) and rich (TSB) media. All the other transformations that were observed involve the oxidation of β E2 into E1, which lowers the estrogenicity. In two cases (MI21.2 in ESM medium and MI6.1B in TSB), there was no further significant transformation, whereas in the others, E1 decreased. The TSB rich medium favoured transformation activities for MI6.1B, MI9.3B and MI14.1. In the case of MI21.2 however, TSB was detrimental for the conversion of β E2 into E1 (36% reduction of β E2 compared to 94% in ESM medium) but was beneficial for the further transformation of E1 (55% net reduction compared to 3% in ESM medium). Finally, none of the strains was capable to degrade EQO, although it was efficiently removed by the consortium from which the bacteria were isolated.

Reduction of E1 to β -E2 by MI6.1R isolate. The MI6.1R isolate (*Methylobacterium* sp.) transforms E1 into β E2 by reduction of the ketone into an alcohol function, which is the reverse of the normal pathway reported in the literature. In order to confirm that the appearance of the alcohol was not due to some unknown metabolic production of this compound by the bacteria, the strain was incubated with E1-D4 during 96 hours. As expected, the SPE-LC-MS/MS analysis showed the apparition of deuterated β E2-D4 in the culture inoculated with the strain but not in abiotic control culture. There was formation of only one isomer of estradiol, the β E2, suggesting a stereospecific enzymatic activity. However, chemical reduction of the ketone of E1 with NaBH₄ also resulted in the formation of β E2 only. This indicates that the reduction of the ketone, even with such a small reducing species as an hydride, can only occur from one side of the steroid skeleton, probably due to steric hindrance by the rest of the molecule, and disproves the hypothesis of stereospecific enzymatic activity.

FIG. 12 shows a kinetic of E1 transformation to β E2 in TSB medium inoculated with a MI6.1R. The conversion occurred in the first 24 hours, during the log phase of bacterial growth. Interestingly, the E1 concentration remained constant for the last 240 hours of incubation while β E2 decreased, which suggests that the reverse reaction is not taking place and that β E2 is either transformed into another compound or mineralized.

Reduction of the ketone function of other compounds by MI6.1R isolate. The capacity of MI6.1R strain to reduce a ketone function of compounds having various structural features was also investigated because it could present an industrial or pharmaceutical interest. Moreover, it could provide an indication of the specificity on the enzymatic reaction. Among five tested compounds (FIG. 10), there was just the 16-ketoestradiol that was reduced by the strain MI6.1R. This result shows that reduction by MI6.1R is relatively specific. The LC-MS/MS analysis revealed that only one of the two possible isomers was obtained, the 16-epiestriol. Chemical reduction of 16-ketoestradiol with NaBH₄ was performed and

only 16-epiestriol was detected, indicating again that it is the steric hindrance of the rest of the molecule that governs the regiospecificity of the reaction.

Chloramphenicol assay. An assay with chloramphenicol was performed in order to determine if the different estrogen-transformation activities that have been observed were inducible or constitutive. Table 4 shows that there were no major differences in estrogen degradation in presence of chloramphenicol with cultures that were grown with or without estrogens, which shows that the estrogen-degrading activity of all five strains (MI6.1R, MI6.1B, MI9.3, MI14.1 and MI21.2) is constitutive.

2.4.5 Discussion

To our knowledge, this is the first time that estrogen-degrading bacteria are isolated from a swine waste biotreatment. They are quite diversified since they belong to three classes (*α-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria* and *Actinobacteria*) and five genera. Two of them are affiliated to *Methylobacterium* (MI6.1R) and *Pseudomonas* (MI14.1) genera, which have never been reported for E1, βE2 and EQO degradation. MI21.2 belong to *Mycobacterium*, a genus that includes strains known to transform some steroids compounds (Donova, 2007). Finally, MI6.1B and MI9.3 are affiliated to *Ochrobactrum*. This genus has not been associated to the degradation of estrogens in the scientific literature but is cited in an European patent for such an activity (Morita *et al.*, 2004). This diversity of strains among different classes is in agreement with the study of Yu *et al.* (2007) who isolated, from activated sludge of a wastewater treatment plant, 14 estrogen-transforming bacteria belonging to four classes (*α-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria*, *Flavobacteria* and *Actinobacteria*).

Among the five isolated strains, four (MI6.1B, MI9.3, MI14.1 and MI21.2) transformed βE2 into E1. This oxidation of the alcohol function at the C-17 position into a ketone is well known and is considered an asset in terms of a

biotreatment because it reduces the estrogenicity of the molecule. However, subsequent degradation of E1 is desirable in order to further decrease the estrogenic potency. The same four strains did remove some E1, but only partially, after 96 hours in pure cultures. This is in agreement with the situation that is often observed in wastewater treatment plants in which β E2 can be partially or completely transforms into E1, but this one is more recalcitrant to further biodegradation (Baronti *et al.*, 2000; Lee et Liu, 2002; Andersen *et al.*, 2003; D'Ascenzo *et al.*, 2003).

Biodegradation of estrogens by the consortium was not a fortuitous reaction catalyzed by the ammonia monooxygenase (*amoA*) from nitrifying bacteria, as shown by the assay with 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine, an *amoA* inhibitor (McCarty, 1999). However, other types of cometabolism has to be involved in the case of MI6.1R, MI6.1B and MI21.2 that showed only stoichiometric transformation (β E2 $\rightarrow$ E1 or E1 $\rightarrow$ β E2). Also, the constitutive nature of the transformation of estrogens and the fact that a rich medium like TSB had a favourable effect on these reactions suggest that all the five isolates transform estrogens by cometabolism. This results in a relatively slow and incomplete transformation of estrogens by our isolates compared to others that have been reported to completely and quickly degrade estrogens in absence of other carbon sources and use them for growth, which does not suggest a cometabolism (Fujii *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2004). However, they have been enriched and isolated with estrogens at levels up to 100 mg/L, which is clearly over the concentrations found in municipal wastewaters (few ng/L) and in livestock wastes (μ g/L). Since we used a much lower hormone concentration (1 mg/L) for enrichment and isolation, estrogens degraders that have been isolated under these conditions are more likely to represent those really involved in estrogen degradation in real life bioprocesses. Yu *et al.* (2007), who used a low estrogen concentration for enrichment (3 mg/L), have already suggested that cometabolism not involving *amoA* could be important for estrogens removal in activated sludge processes treating municipal wastewater since they found only

one strain, out of 14 estrogen-degrading isolates, that can use β E2 as a carbon source. However, there is a possibility that their findings were influenced by the method used for isolation. Although their enrichment was done in liquid media containing only estrogens as carbon sources, their strains were isolated on R2A agars, which contains other carbon sources. In our case, only estrogens were added as carbon sources in solid media. Apparently, isolates grew on impurities present in the ingredients (even if we used purified agar and MilliQ water) or on volatile organic compounds present in the air. However, if estrogens degraders harbouring a specific enzymatic system for these molecules would have been present in large amount, they should have better grown on these plates, and we would have picked them. Another possibility is that such specific estrogen degraders were present but were not cultivable under our experimental conditions. Nevertheless, our results, combined with those of Yu *et al.* (2007), strongly suggest that degradation of estrogens by a cometabolism that does not involve the ammonia monooxygenase could be an important mechanism in the removal of these hormones by activated sludge bioprocesses.

None of the isolated strains used EQO, even though the enriched consortium was capable of EQO biodegradation. The estrogenic potency of EQO, measured by a yeast estrogen screen test, is about 1000 times less than β E2 (Coldham *et al.*, 1997) but it is present in relatively large amounts in hog manure (6 to 16 mg/L) and can significantly contribute to the total estrogenicity of this waste (Burnison *et al.*, 2003). For this reason, it would be interesting to isolate equol-degrading bacteria to better understand the biodegradation mechanism of this molecule. However, from a practical point of view, equol appears to be easily degraded (Burnison *et al.*, 2003; Furuichi *et al.*, 2006) and it is less likely to contribute to the residual estrogenicity after a biological treatment of the waste.

In the present study, a novel estrogen transformation pathway by an aerobic bacteria strain was observed. *Methylobacterium* sp. MI6.1R transformed E1 into β E2, contrary to the normally observed conversion of β E2 into E1. This

reaction increases the estrogenic potency, an undesired effect in a biotreatment perspective. However, since other strains that oxidize β E2 into E1 are present in an activated sludge, we can hypothesize that there is a competition between the two divergent pathways, and the result will depend on the relative abundance of each type of estrogen-transforming bacteria. Increase of β E2 from E1 in a wastewater biological treatment has never been reported, but there are important variations in the efficiency of β E2 removal between different plants, and such E1-reducing bacteria could play a role in these differences. Joss *et al.* (2004) have already included a term for E1 reduction to β E2 in their mathematical model, but they assume that it occurs only under anaerobic conditions. Further studies are needed to verify if aerobic E1-reducing bacteria are sufficiently abundant in activated sludge processes operated under different conditions to have a significant effect on the net estrogen-removal efficiency. For example, since *Methylobacterium* MI6.1R is methylotroph, it could be favoured in denitrification bioprocesses that use methanol as an external carbon source. It would also be interesting to further investigate the biochemical mechanism of the reduction. The experiment with five E1 analogues showed that the reduction of the ketone function was specific to compounds containing a steroid skeleton. This narrow specificity is somewhat surprising for an activity that is believed to be a cometabolism.

2.4.6 Acknowledgements

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (research grant to Dr Juteau and scholarship to Martine Isabelle) and the Fédération des producteurs de porcs du Québec (FPPQ) (scholarship to Martine Isabelle). We also thank Sylvain Milot for technical assistance in analytical chemistry.

2.4.7 References

Consulter les références générales du présent mémoire.

2.4.8 Figures and tables

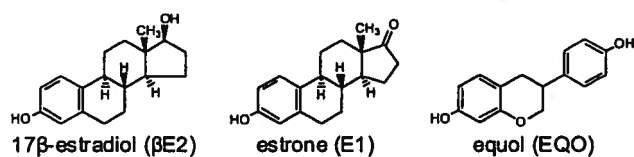


Figure 9. Structure of estrogens.

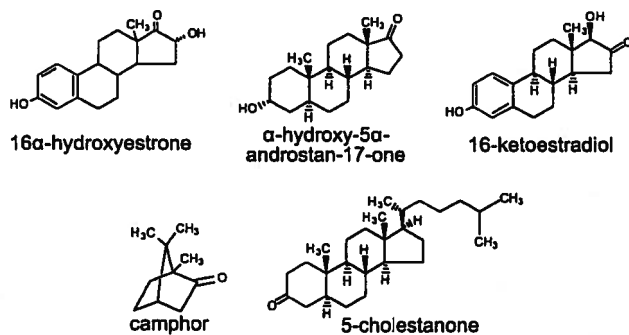


Figure 10. Structure of E1 analogues.

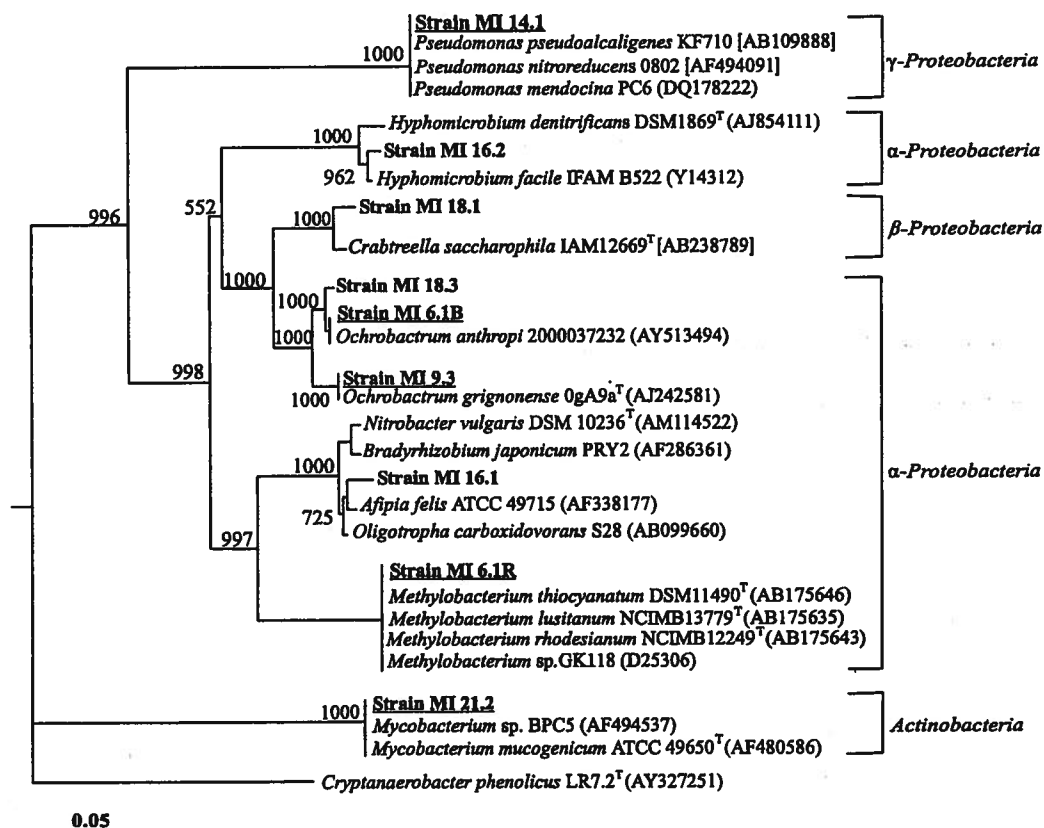


Figure 11. Phylogenetic distribution of the bacteria isolated from an enrichment with estrogens as sole carbon source. The analysis is based on 16S rDNA sequences. The tree was rooted with *Cryptanaerobacter phenolicus* as the outgroup. Bootstrap confidence values obtained with 1000 replicates are given at the branch point. The scale bar corresponds to five substitutions per 100 nucleotides positions. Accession numbers in brackets correspond to unpublished sequences. Strains for which an estrogen transformation capacity has been confirmed in the present study are underlined.

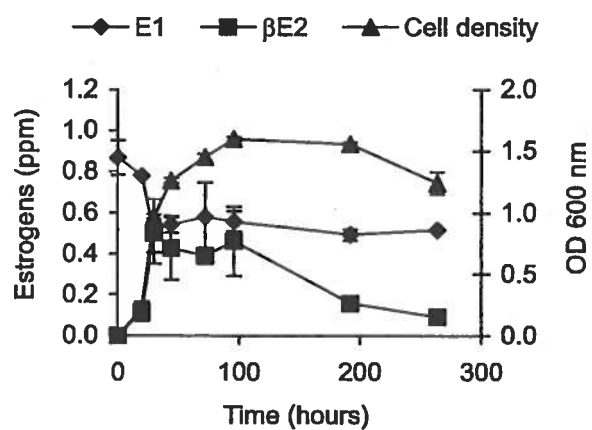


Figure 12. Reduction of E1 to β-E2 in TSB medium inoculated with a MI6.1R.

Table 2. MRM settings.

Compound	Abbreviation	MRM transitions	Cone (V)	Collision (V)
Estrone	E1	269>145	40	40
17β-estradiol	βE2	271>183	40	45
17α-estradiol	αE2	271>183	40	45
Equol	EQO	241>119	40	30
Estrone-D4	E1-D4	273>147	40	40
Equol-D4	EQO-D4	245>121	40	30

Table 3. Estrogen transformation by the isolated strains. The table shows the variation (%) of three estrogens after a 96-hour incubation period of nine isolates in presence of a mixture of each estrogen (1 mg/L), the summation (Σ) of E1 and β E2 variations (%) and the variation (%) of estrogenic potency in β E2 equivalents (β E2-Eq) calculated with a relative factor of 0.4 for E1. Variations equal or lower to 15% were considered as non-significant (N/S).

Strains	ESM medium				TSB medium			
	β E2	E1	EQO	Σ	β E2	E1	EQO	Σ
M16.1R	67 $\pm$ 4	-71 $\pm$ 10	N/S	-4 $\pm$ 11	62 $\pm$ 1	-63 $\pm$ 1	N/S	-1 $\pm$ 1
M16.1B	N/S	N/S	N/S	N/S	-39 $\pm$ 3	30 $\pm$ 9	N/S	-9 $\pm$ 9
M19.3	-24 $\pm$ 11	N/S	N/S	-24 $\pm$ 11	-86 $\pm$ 15	43 $\pm$ 10	N/S	-43 $\pm$ 18
M114.1	-21 $\pm$ 9	N/S	N/S	-21 $\pm$ 9	-70 $\pm$ 12	38 $\pm$ 3	N/S	-32 $\pm$ 12
M116.1	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
M116.2	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
M118.1	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
M118.3	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
M121.2	-94 $\pm$ 2	91 $\pm$ 12	N/S	-3 $\pm$ 12	-36 $\pm$ 12	-19 $\pm$ 5	N/S	-55 $\pm$ 13
								-44 $\pm$ 14

Table 4. Constitutivity of the estrogen transformation activities. The table shows the variation (%) of three estrogens (initial concentration = 1 mg/L each) after a 96-hour incubation period of five isolates in presence of chloramphenicol in TSB medium. Variations equal or lower to 15% were considered as non-significant (N/S).

Strains	Cultures without pre-incubation with estrogens			Cultures pre-incubated with estrogens		
	β E2	E1	EQO	β E2	E1	EQO
MI 6.1R	77 $\pm$ 4	- 69 $\pm$ 6	N/S	73 $\pm$ 3	- 75 $\pm$ 4	N/S
MI 6.1B	- 99 $\pm$ 1	60 $\pm$ 3	N/S	- 96 $\pm$ 1	80 $\pm$ 3	N/S
MI 9.3	- 99 $\pm$ 1	63 $\pm$ 17	N/S	- 99 $\pm$ 1	83 $\pm$ 4	N/S
MI 14.1	- 99 $\pm$ 1	53 $\pm$ 2	N/S	- 98 $\pm$ 1	76 $\pm$ 2	N/S
MI 21.2	- 98 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	N/S	- 96 $\pm$ 2	70 $\pm$ 8	N/S

Chapitre 3. Méthodologie et résultats supplémentaires

3.1 Méthode de dosage des estrogènes par SPE-LC-MS/MS

3.1.1 Conditions d'opération du spectromètre de masse (MS/MS)

Avant de débiter la mise au point du processus d'extraction des estrogènes, la méthode analytique de dosage par spectrométrie de masse en tandem a été réalisée à l'aide de solutions d'estrogènes. Les conditions optimales d'opération du spectromètre de masse ont été déterminées (voir tableau 5). Ensuite, pour chacun des estrogènes, l'énergie de collision optimale, afin de bien fragmenter l'ion pseudomoléculaire, a été évaluée. Du même coup, le choix de l'ion fille a été fait, donnant pour chaque estrogène une transition spécifique (voir tableau 6).

Tableau 5. Conditions d'opération du spectromètre de masse.

Gaz de séchage	100 ml/min
Gaz de nébulisation	20 ml/min
Capillaire	3.5 kVolts
Cône	40 Volts
Extracteur	5 Volts
Température de la source	120°C
Température de désolvatation	150°C
Multiplicateur	650 Volts
Résolution LM	MS1 :10 MS2 :12
Résolution HM	MS1 :10 MS2 :12
Pression cellule de collision	$\approx 1.6 \times 10^{-3}$ mBar
Débit à l'entrée du MS	40 μ L/min

Tableau 6. Paramètres de MRM pour les différents estrogènes dosés.

Composés	Transitions MRM	Énergie de collision (V)
17 β -estradiol	271>145	45
17 α -estradiol	271>145	45
estrone	269>145	40
estriol	287>171	40
équol	241>119	30
17 β -estradiol 17-(β -D-glucoronide sodium)	447>271	35
17 β -estradiol 3-(β -D-glucoronide sodium)	447>271	35
17 β -estradiol 3-sulfate sodium	351>147	35
estrone-2,4,16,16-D4	273>147	40
sodium estrone-2,4,16,16-D4 sulfate	352>183	55
équol-D4	245>121	30

3.1.2 Paramètres de chromatographie liquide à haute performance

La méthode de séparation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a ensuite été mise au point, toujours avec l'aide de solutions d'estrogènes. L'acétonitrile et l'eau, contenant 20 mM de triéthylamine, étaient employées comme phases mobiles. Un échantillon de 25 μ L était injecté et poursuivait sa route à un débit de 400 μ L/min (débit réduit à 40 μ L/min à la sortie de la colonne). Le programme final (voir tableau 7), d'une durée de 31 minutes, permet de séparer les onze estrogènes, y compris les deux isomères de l'estradiol.

Tableau 7. Programme utilisé pour la séparation des estrogènes par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Temps (minutes)	Eau, 20 mM triéthylamine (%)	Acétonitrile, 20 mM triéthylamine (%)
0	95	5
18	50	50
20	0	100
24	0	100
26	95	5
31	95	5

3.1.3 Calculs pour l'analyse quantitative des estrogènes

Des droites de calibration ont été réalisées à chaque fois que le LC-MS/MS a été utilisé. Des solutions comprenant des concentrations croissantes (de 0.01 à 5 mg/L) des différents estrogènes ainsi qu'une concentration constante, de 5 mg/L, des deux standards internes, étaient préparées dans de l'eau : acétonitrile (50% v/v), 20 mM TEA. La figure 13 est un exemple de droite de calibration pour l'EQUO. Pour le β E2, l' α E2, l'E1 et l'E3, le standard interne deutéré qui a été utilisé est l'E1-D4. Pour, le β E2-17-glucuronide, le β E2-3-glucuronide et le β E2-3-sulfate, l'E1 sulfate-D4 a été employé. En ce qui concerne l'EQUO, un standard interne (EQUO-D4), non disponible commercialement, a été synthétisé par hydrogénation catalytique de la daidzéine puisque le comportement de l'EQUO différait trop de celui des deux autres standards internes disponibles (voir l'article pour les détails de la réaction de synthèse).

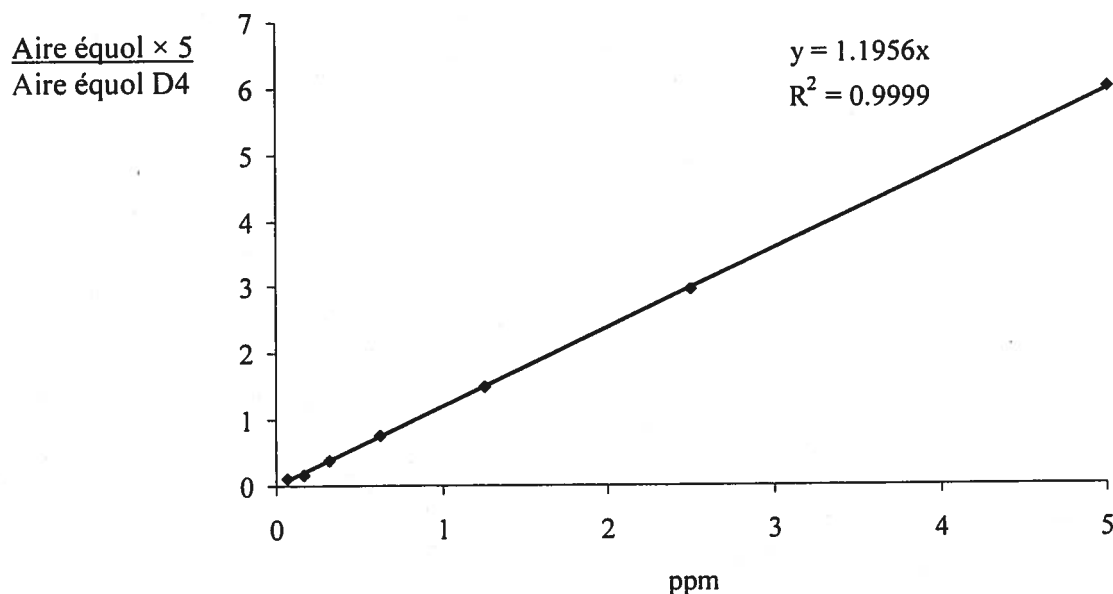


Figure 13. Droite de calibration type pour l'équol.

Les calculs effectués afin d'obtenir une concentration d'estrogènes dans un échantillon sont les suivants :

1) Ratio :
$$\frac{\text{Aire sous la courbe analyte}^* \times \text{concentration standard interne}}{\text{Aire sous la courbe standard interne}^*}$$

2) Concentration en mg/L :
$$\frac{\text{Ratio} \div \text{pente de la droite de calibration}}{\text{Facteur de concentration finale dû à l'extraction}}$$

* Voir la figure 14

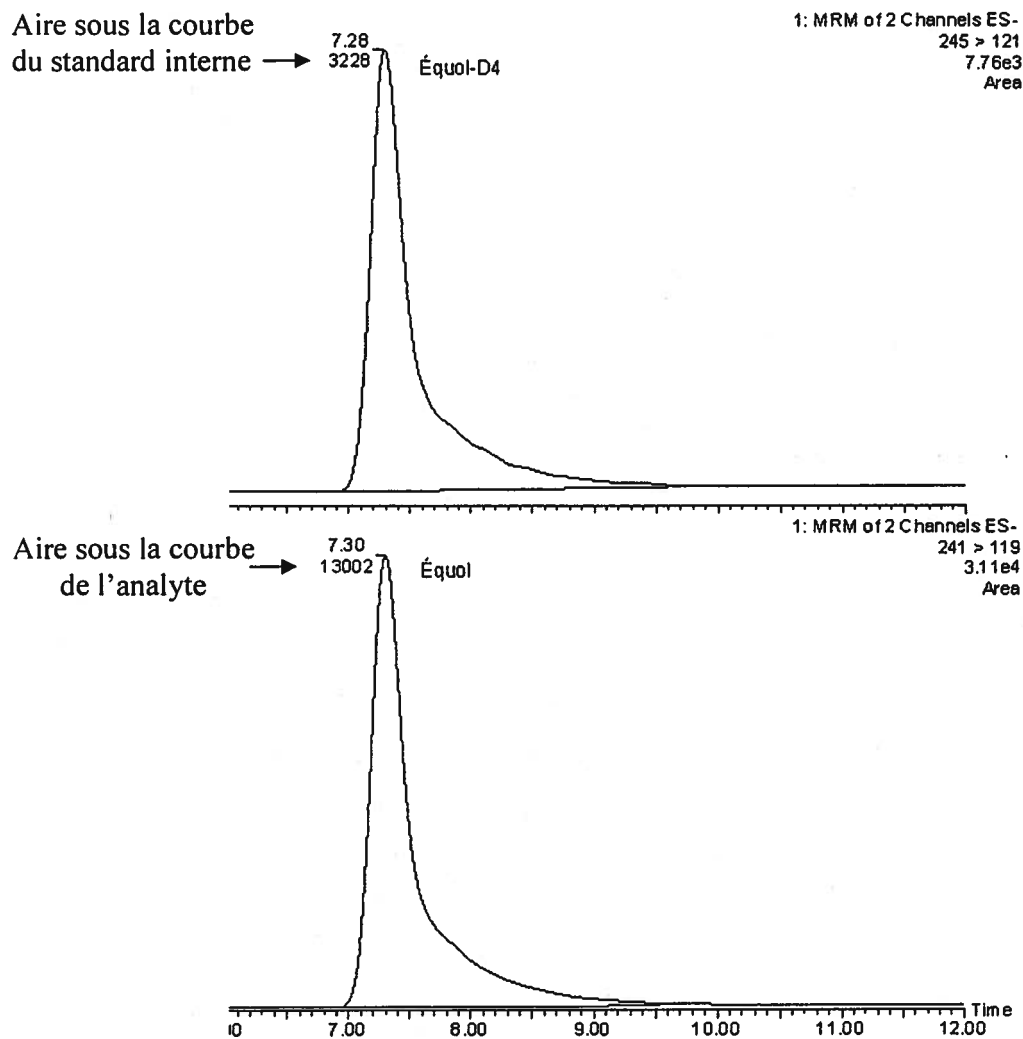


Figure 14. Chromatogrammes des transitions MRM de l'EQUO-D4 et de l'EQUO.

3.2 Mise au point de la méthode d'extraction des estrogènes libres et conjugués par extraction en phase solide (SPE « Solid Phase Extraction »).

3.2.1 Optimisation du protocole

La méthode d'extraction en phase solide développée est inspirée de celle d'Isobe *et al.* (2003), présentée à la figure 15. L'intérêt de cette méthode est qu'elle permet d'extraire les deux types d'estrogènes, soit les estrogènes conjugués, plus hydrophiles, ainsi que les estrogènes libres, plus hydrophobes.

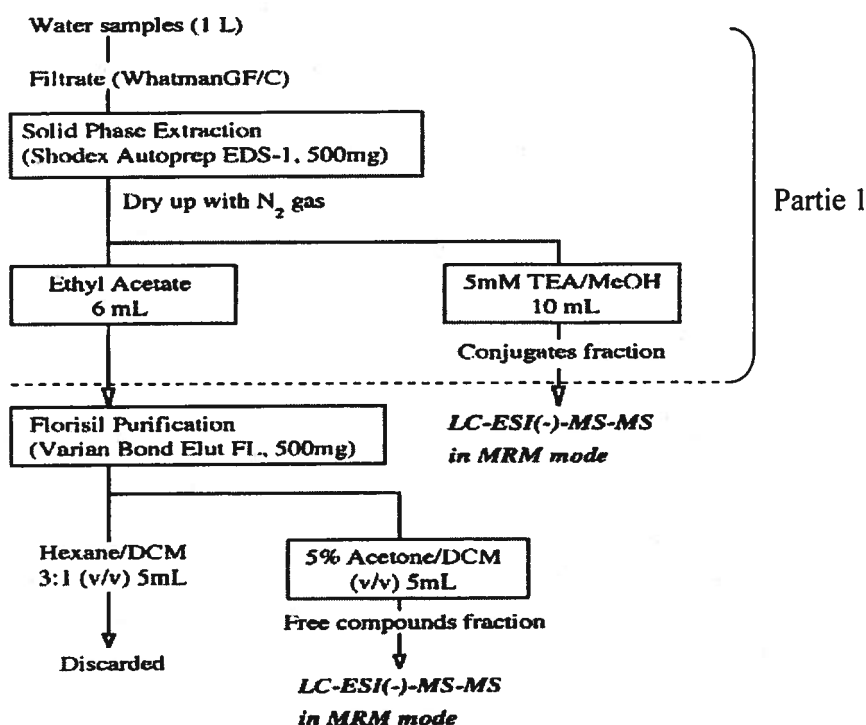


Figure 15. Protocole d'extraction des estrogènes libres et conjugués (proposé par Isobe *et al.*, 2003).

Dans un premier temps, le protocole d'extraction a été simplifié et seulement la première partie a été tentée. Les essais d'optimisation du protocole ont été réalisés à l'aide d'eau milli-Q contenant des concentrations connues des différents estrogènes à l'étude ainsi qu'à l'aide de lisier de porcs. Au lieu des cartouches Shodex, des cartouches Oasis HLB de Waters ont été employées. L'élution des estrogènes a été réalisée en deux étapes; une première en passant 6 mL d'acétate d'éthyle et la deuxième en passant 6 mL méthanol, 5 mM triéthylamine (TEA). Les deux fractions ont ensuite été évaporées à sec et les résidus ont été suspendus dans 0.5 mL d'eau : acétonitrile (50% v/v), 20 mM TEA. Un problème de solubilité s'est alors posé lors de l'extraction des estrogènes libres d'un échantillon de lisier. En effet, la fraction d'acétate d'éthyle, une fois évaporée, n'a pu être solubilisée complètement (figure 16). L'acétate d'éthyle, peu polaire, a dû décrocher des molécules non polaires, en plus des estrogènes libres, ce qui a rendu difficile la solubilisation.



Figure 16. Problème de solubilité rencontré lors de la suspension des résidus dans l'eau : acétonitrile (50% v/v), 20 mM TEA, suite à l'évaporation complète de la phase d'acétate d'éthyle.

Une modification a donc été apportée au protocole précédant. Dans cette variante de la méthode, une élution des estrogènes à l'aide de trois solvants, de moins en moins polaires, a été tentée. Tout d'abord, 6 mL de méthanol 5 mM TEA a été passé sur la cartouche, suivi d'un volume équivalent d'éthyl éther : méthanol (50% v/v). Finalement, 6 mL d'éthyl éther : méthanol (90% v/v) a été passé sur la cartouche. Les trois fractions ont été évaporées à sec et les résidus ont été suspendus dans 0.5 mL d'eau : acétonitrile (50% v/v), 20 mM TEA. Les estrogènes ont ensuite été dosés par LC-MS/MS. Les résultats obtenus, présentés à la figure 17, montrent que la plupart des estrogènes éluent dès le passage du premier solvant, soit le méthanol 5 mM TEA. Ces résultats suggèrent qu'en augmentant le volume de méthanol 5 mM TEA utilisé pour l'élution, il serait possible de récupérer davantage d'estrogènes.

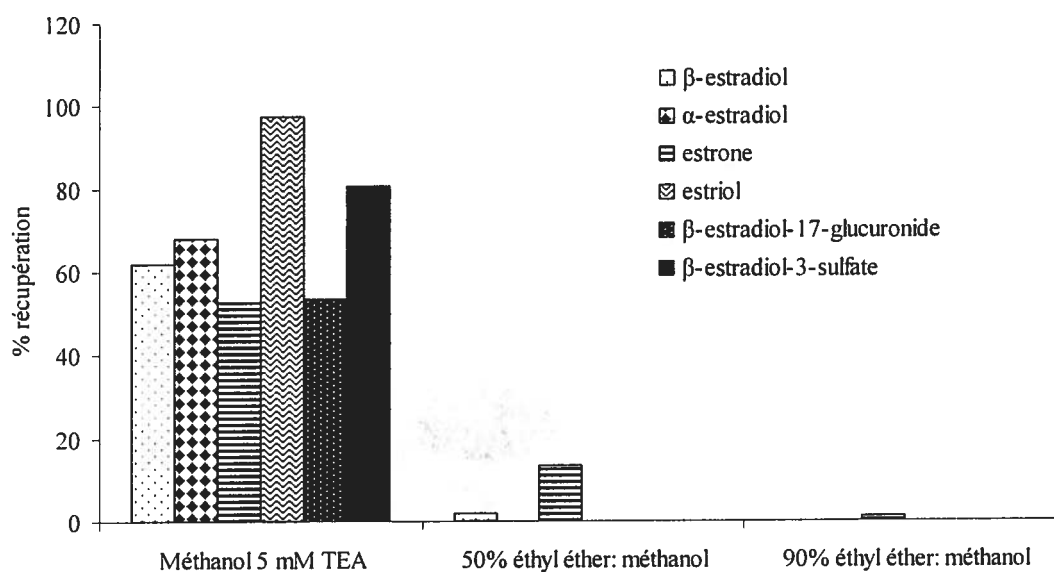


Figure 17. Récupération des estrogènes de la cartouche Oasis HLB suite au passage de 6 mL de trois différents solvants.

Un essai a été réalisé afin de vérifier le volume requis de méthanol 5 mM TEA pour éluer la majeure partie des estrogènes. Ce test a été fait avec le lisier et l'effluent thermophile en guise d'échantillons. Seulement l'EQUO et l'E1 ont été détectés dans ces échantillons. La figure 18 montre qu'un volume de 24 mL suffit pour récupérer la majorité des estrogènes présents.

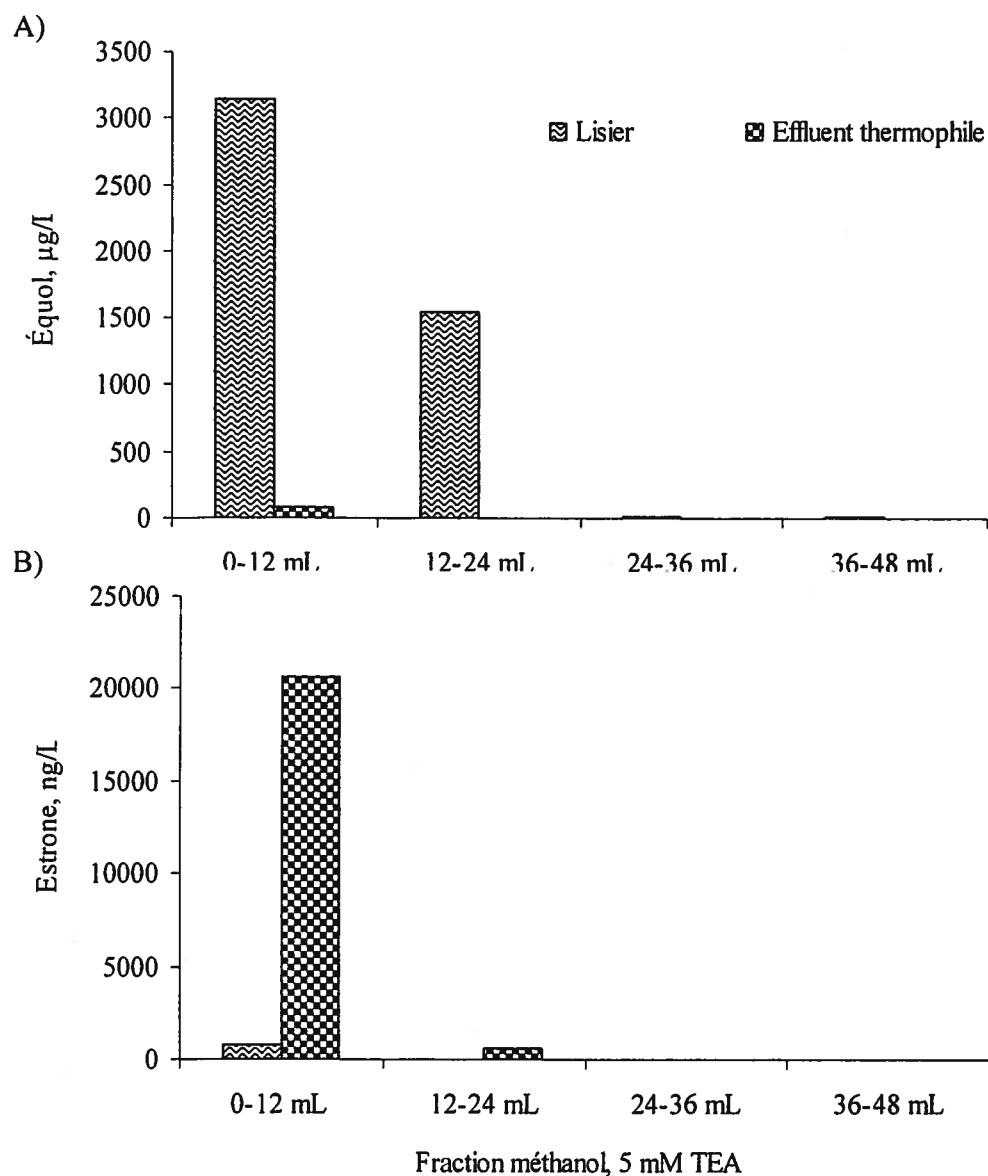


Figure 18. Concentration des estrogènes dans les différentes fractions de méthanol 5 mM TEA suivant le passage d'un échantillon de lisier et d'effluent thermophile sur une cartouche Oasis HLB. A) Équol, B) Estrone

3.2.2 Pourcentage de récupération des estrogènes

Le pourcentage de récupération des estrogènes a été déterminé en utilisant le protocole d'extraction mis au point. Il a été évalué avec un échantillon d'eau milli-Q contenant des estrogènes ainsi qu'avec un échantillon de lisier. Le tableau 8 montre que la récupération dans le lisier est faible, soit de 27 % pour les estrogènes libres et de 38 % pour les conjugués. Dans l'eau, les taux de récupération pour ces deux groupes d'estrogènes sont respectivement de 111 et 104 %. L'hypothèse d'une perte des estrogènes au niveau du culot, lors de la centrifugation initiale des échantillons de lisier, a été émise. Des tests ont donc été effectués et ont montré qu'il y avait en effet une perte significative des estrogènes lors de la centrifugation initiale de l'échantillon. Des étapes de lavage du culot à l'aide de méthanol ont donc été ajoutées au protocole d'extraction afin d'améliorer la récupération des estrogènes. La figure 19 montre bien l'importance de ces étapes de lavage des culots. Suite à l'optimisation de la méthode par l'ajout des étapes de lavage de culots, il est possible de remarquer une nette augmentation du pourcentage de récupération (tableau 8).

Tableau 8. Pourcentage de récupération des estrogènes libres et conjugués.

Échantillons	Estrogènes	
	libres	conjugués
Eau milli-Q avec estrogènes	111	104
Lisier (méthode SPE sans lavages du culot)	27	38
Lisier (méthode SPE avec lavages de culot)	53	74
Effluent thermophile (méthode SPE avec lavage de culots)	77	83

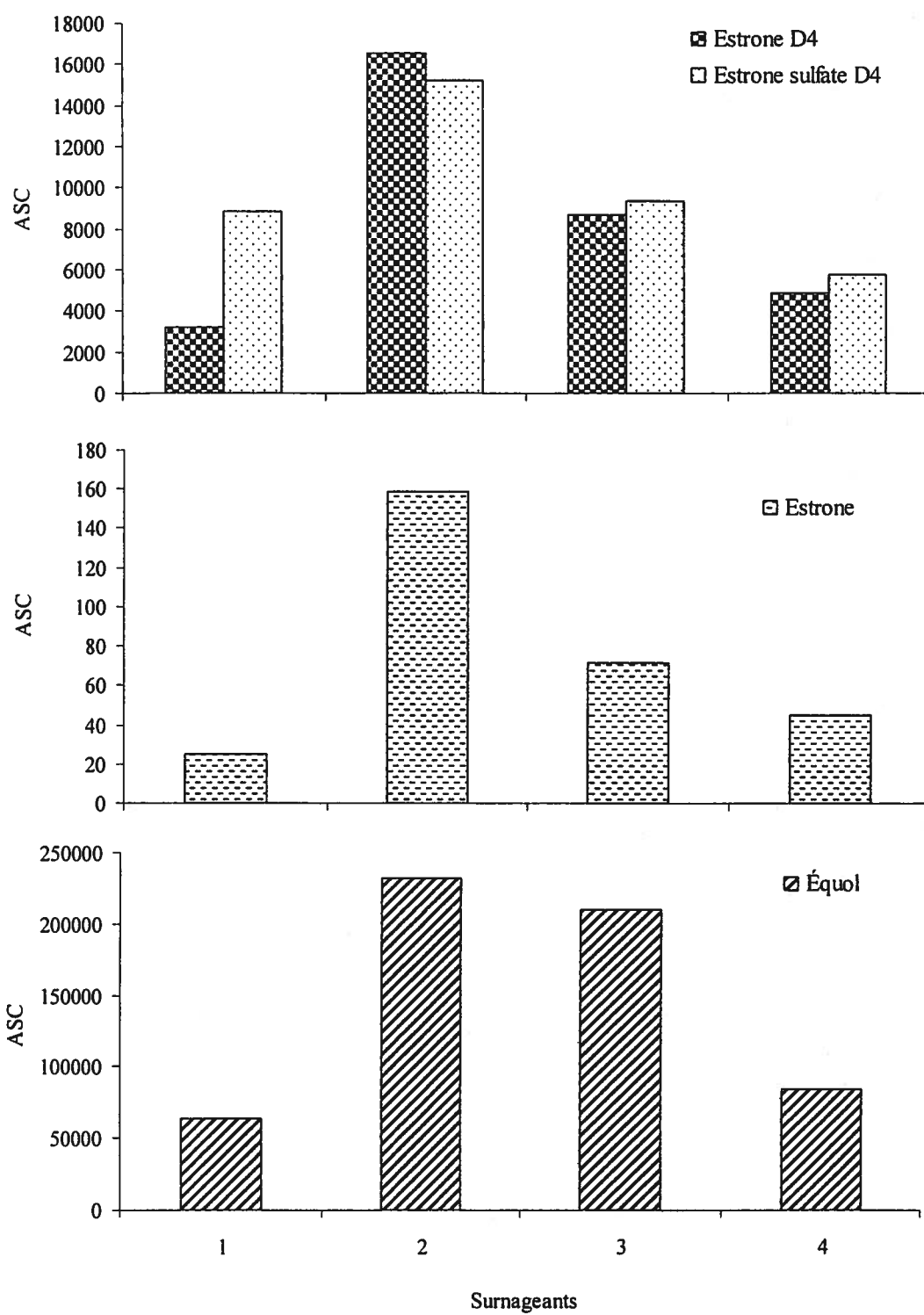


Figure 19. Aire sous la courbe (ASC) au LC-MS/MS dans les surnageants suite au lavage de culots lors de la centrifugation du lisier.

3.2.3 Reproductibilité de la méthode SPE-LC-MS/MS

La reproductibilité de la méthode d'extraction et de dosage des estrogènes, par SPE-LC-MS/MS, a aussi été vérifiée en triplicata et s'avère satisfaisante, comme le montre la figure 20.

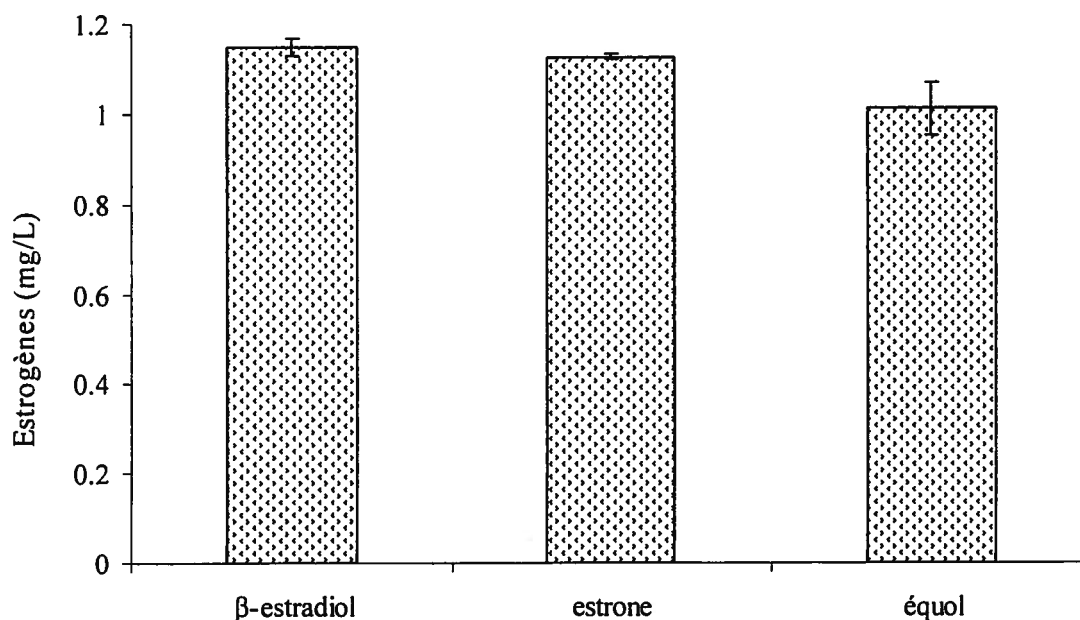


Figure 20. Reproductibilité de la méthode SPE-LC-MS/MS développée.

3.2.4 Réutilisation des cartouches Oasis HLB

Dans un but d'économie de matériel, un test a été réalisé afin de vérifier s'il était possible de réutiliser les cartouches d'extraction. Ce test avait comme objectifs de s'assurer qu'il n'y ait pas de traces significatives d'estrogènes suite au lavage et à la réutilisation des cartouches et bien entendu, que les cartouches soient encore efficaces pour extraire les estrogènes. Selon la procédure habituelle, des estrogènes en solution dans de l'eau milli-Q ont été passés sur des cartouches neuves et des cartouches usagées (préalablement lavées avec 10 mL d'acétonitrile

et été séchées durant 30 minutes). Aussi, des cartouches usagées ont été éluées avec le méthanol 5 mM TEA sans passage préalable d'un échantillon contenant des estrogènes. Comme le montre la figure 21, aux concentrations de l'ordre du mg/L, il est possible de réutiliser les cartouches d'extraction Oasis HLB.

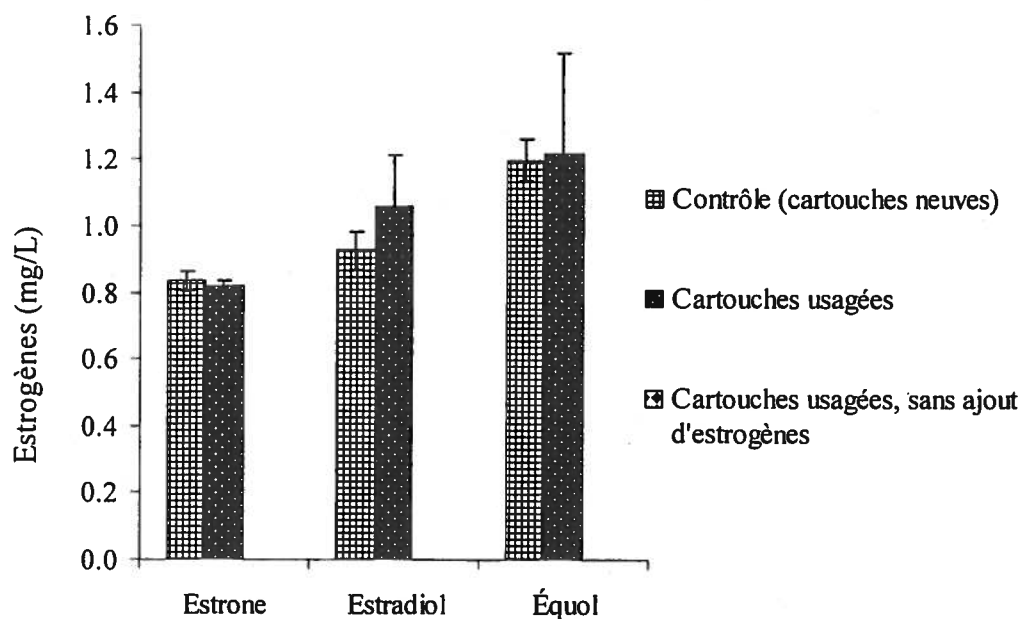


Figure 21. Concentrations des différents estrogènes suite à une extraction sur des cartouches Oasis HLB neuves et sur des cartouches Oasis HLB usagées lavées.

En somme, des modifications importantes ont été apportées au protocole d'Isobe *et al.* (2003), comme l'utilisation d'une seule cartouche et d'un seul solvant permettant l'élution simultanée des estrogènes libres et conjugués. Les méthodes d'extraction finales mises au point, pour extraire les estrogènes du lisier/effluent ou de milieu de culture, sont présentées dans les figures 22 et 23.

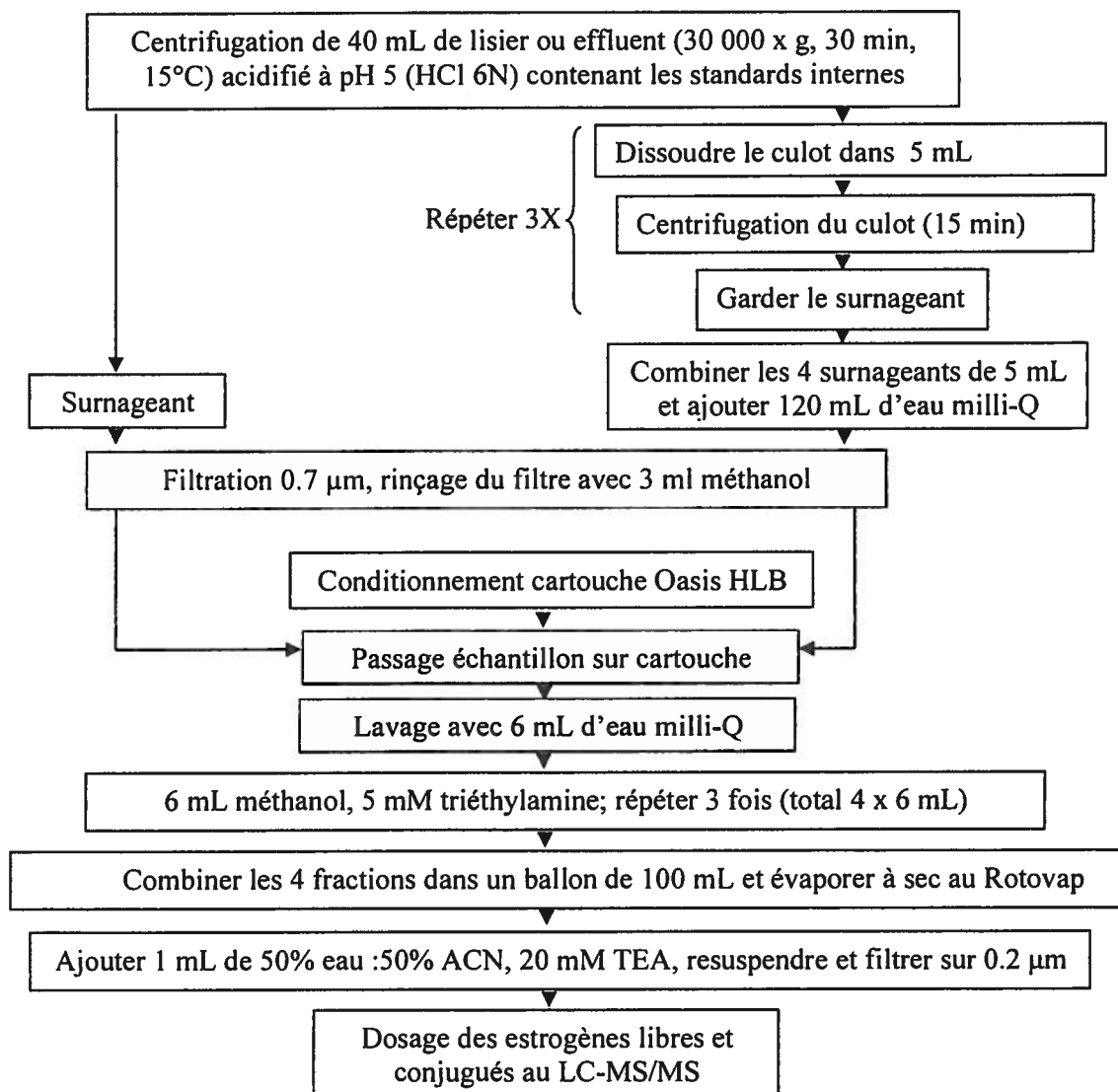


Figure 22. Protocole d'extraction en phase solide des estrogènes dans le lisier de porcs ou dans les effluents de traitements (thermophile ou mésophile).

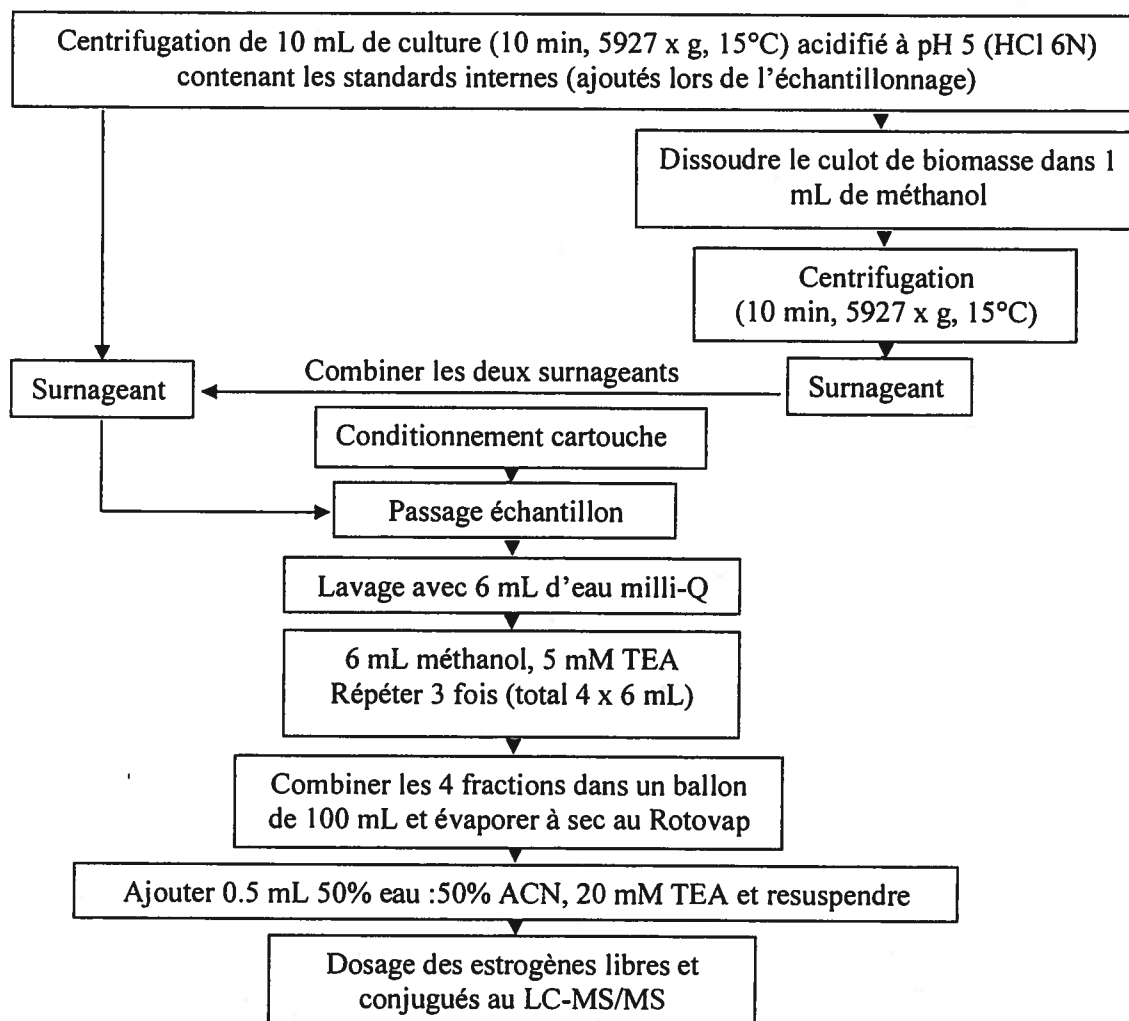


Figure 23. Protocole d'extraction en phase solide des estrogènes dans des échantillons de milieu de culture.

3.3 Effet de la stérilisation à l'autoclave sur les estrogènes

Lors de l'enrichissement de la biomasse en présence d'estrogènes comme seule source de carbone, le méthanol dans lequel était solubilisé les composés a du être évaporé afin d'assurer l'absence de ce dernier dans le milieu minéral. Le milieu était ensuite ajouté et stérilisé. La résistance des estrogènes durant la stérilisation à l'autoclave a donc été vérifiée. Pour ce faire, 50 μ L de β E2, d'E1 et d'EQO (solution 1000 ppm dans du méthanol) a été placé dans un erlenmeyer. Suite à l'évaporation du méthanol, 50 mL de milieu minéral a été ajouté. Un premier échantillon de 10 mL, avant stérilisation à l'autoclave, a été prélevé. Le milieu a ensuite été stérilisé à l'autoclave durant 30 minutes à 121°C. Un deuxième échantillon de 10 mL a été prélevé après la stérilisation. Cette expérience a été réalisée en duplicata. L'extraction des estrogènes et leur dosage ont été faits par la méthode de SPE-LC-MS/MS développée. La figure 24 montre que les estrogènes à l'étude résistent bien à l'autoclave.

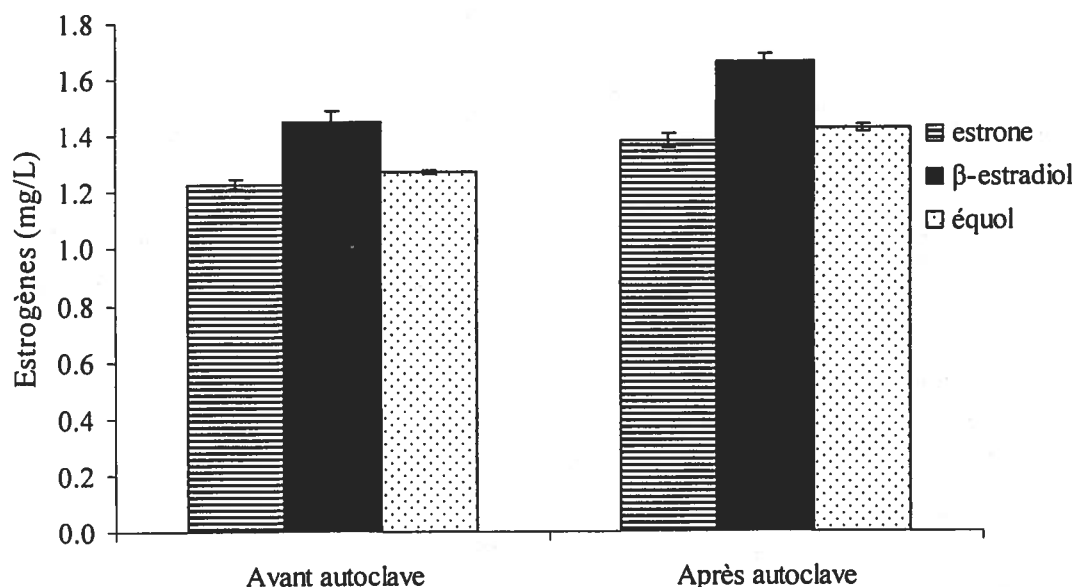


Figure 24. Résistance des estrogènes durant une stérilisation à l'autoclave.

3.4 Mise au point du protocole pour le bioessai YES

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* employée est la BJ3505 hER 2ERE qui a été transformée par le docteur K.W. Gaido et le docteur D.P. McDonnel (Gaido *et al.*, 1997). La souche a été gracieusement fournie par le docteur Ed Topp, d'Agriculture Canada. Le protocole utilisé, décrit ci-dessous, s'inspire de celui trouvé dans l'article de Lorenzen *et al.* (2004). Le bioessai s'échelonne sur trois jours. Le premier jour, 5 mL de milieu liquide pH 6.8 (Annexe 1) estensemencé à l'aide d'une colonie. La culture est incubée à 30°C avec agitation à 300 rpm durant environ 16 heures. Le deuxième jour, du milieu frais est ajouté à la culture de levures. Cette dernière est à nouveau incubée durant 4 à 6 heures. Elle est diluée afin d'obtenir une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.3-0.4. Dans une plaque de 96 puits, 10 μL d'échantillon (chaque dilution de standards, d'extrait d'échantillon ou d'eau pour les blancs $DO_{415\text{ nm}}$) est déposé dans le fond des puits. La plaque repose ensuite sous une hotte à flux laminaire jusqu'à ce que les puits soient secs. Ensuite, 200 μL d'une solution, composée de 50 mL milieu, 400 μL CuSO_4 1 mg/mL et de 1.1 mL de levures, est ajoutée dans chaque puit, excepté dans ceux utilisés pour les blancs pour la $DO_{595\text{ nm}}$, auxquels de l'eau milli-Q stérile est ajoutée à la place. La plaque est agitée à l'aide d'un agitateur à microplaque durant 2 minutes avant d'être incubée à 30°C durant la nuit, sans agitation. Le troisième jour, avant de débiter la réaction enzymatique proprement dite, des solutions de « dernière minute » sont préparées. La première contient le 2-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG) et la lyticase. Il s'agit de peser 20 mg d'ONPG (4 mg/mL) dans un ballon jaugé de 5 mL. Un volume de 500 μL de lyticase 10X (4 mg lyticase, 0.4 mL tampon phosphate de potassium 1M pH 7.5, 80 μL NaCl 5M, 2 mL glycérol, 1.52 mL eau milli-Q) est ajouté au ballon. L'ajout de tampon Z (4.26 g Na_2HPO_4 60 mM, 2.76 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, 0.3728 g KCl 10 mM, 0.0647 g MgSO_4 1 mM) permet de compléter la solution à 5 mL. La deuxième solution contient 18 mL de tampon Z, 0.9 mL de SDS 0.1% et 47 μL de mercaptoéthanol. Les deux solutions sont combinées et forment la solution d'essai. Les levures sont remises en suspension, après une incubation de

19-20 heures, à l'aide d'une pipette à canaux multiples. Un volume de 100 μL de chaque puit est transféré dans une seconde plaque de 96 puits. Une lecture de $\text{DO}_{415 \text{ nm}}$ est effectuée à l'aide d'un lecteur à microplaque BioRad 680 (BioRad, Mississauga, Ontario, Canada). Un volume de 100 μL de la solution d'essai est ajouté dans tous les puits et la plaque est agitée 2 minutes. La réaction enzymatique se produit à la température de la pièce durant 40 minutes. L'activité enzymatique est ensuite arrêtée par l'ajout de 50 μL de NaCO_3 1M. Une seconde lecture de $\text{DO}_{415 \text{ nm}}$ de même qu'une de $\text{DO}_{595 \text{ nm}}$ est effectuée.

Les calculs effectués afin de tracer une courbe dose-réponse (figure 25) sont les suivants :

- 1) $\text{DO}_{415 \text{ nm}}$ au temps 40 min – ($\text{D.O. } 415 \text{ nm au temps } 0 \div 2.5 \text{ facteur de dilution}$)
- 2) $\text{DO}_{595 \text{ nm}}$ au temps 40 minutes – moyenne blanc (sans levures)
- 3) Correction $\text{DO}_{415 \text{ nm}} \div \text{DO}_{595 \text{ nm}}$

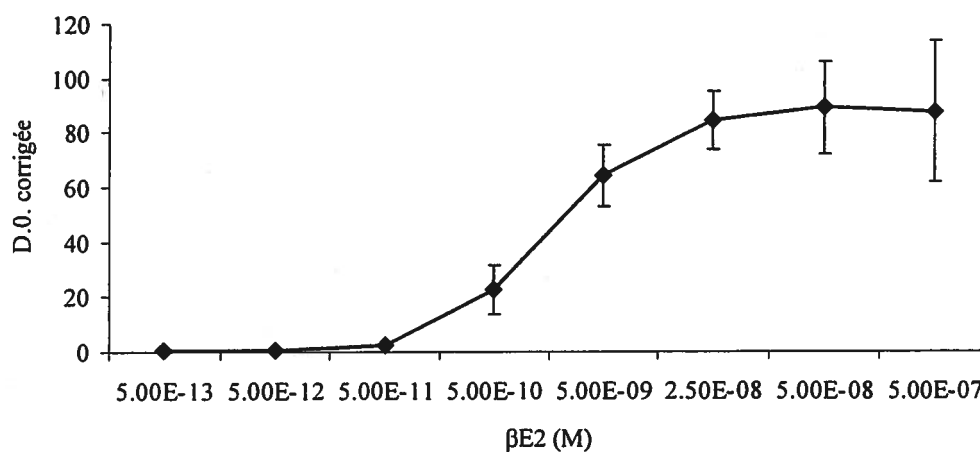


Figure 25. Courbe dose-réponse classique du βE2 suite au bioessai YES.

La figure 26 présente deux exemples de résultats du bioessai YES, obtenus lors d'un essai de dégradation des estrogènes par deux souches isolées. Il n'y a pas de différence au niveau du potentiel estrogénique après 20 heures de dégradation pour l'isolat MI9.3 alors qu'il y a une baisse de potentiel après 95 heures, pour l'isolat MI14.1.

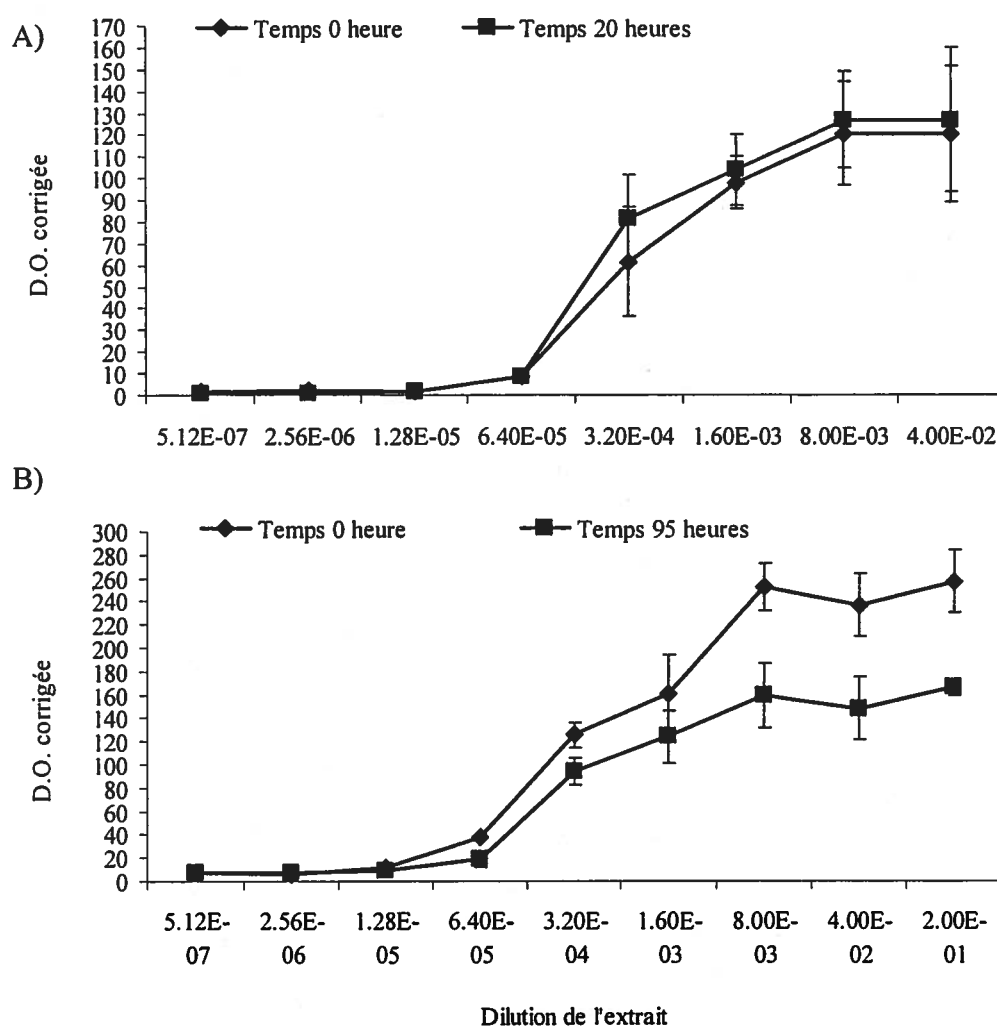


Figure 26. Courbes dose-réponse obtenues lors d'un bioessai YES sur des échantillons d'un test de dégradation des estrogènes par deux isolats. A) *Ochrobactrum* sp. MI9.3 et B) *Pseudomonas* sp. MI14.1.

3.5 Efficacité du traitement aérobie mésophile déphosphatant

L'efficacité d'enlèvement des estrogènes par le traitement aérobie mésophile déphosphatant a été évaluée avant de débiter le projet proprement dit, à savoir tenter d'isoler des bactéries qui métabolisent les estrogènes. Des échantillons avant et après traitement ont été recueillis et analysés par LC-MS/MS ainsi que par le bioessai YES. Les résultats du bioessai (figure 27) montrent qu'il y a une réduction significative du potentiel estrogénique global d'environ 77% après un cycle de traitement de 6 heures. Les analyses au LC-MS/MS ont révélé seulement la présence d'estrone dans l'affluent (1250 ng/L). Le traitement a permis de réduire la charge de ce composé d'au moins 68%.

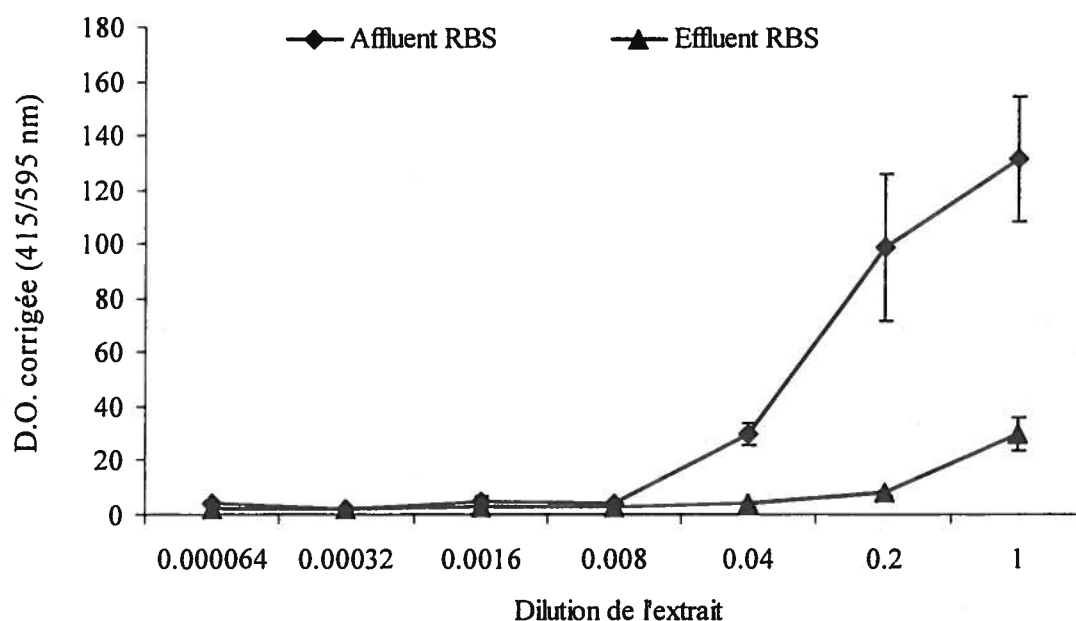


Figure 27. Courbes dose-réponse obtenues lors du bioessai YES sur les échantillons avant et après traitement par le réacteur biologique séquentiel mésophile déphosphatant.

Chapitre 4. Discussion de l'ensemble des résultats

4.1 Dosage des estrogènes par spectrométrie de masse

Dans un premier temps, une méthode de dosage quantitatif des estrogènes a été mise au point afin de pouvoir faire le suivi de ces molécules dans les biotraitements mais surtout, dans les milieux de culture lors des essais de dégradation des estrogènes avec les souches isolées. Le dosage des estrogènes, à faible concentration, dans une matrice complexe représente un défi (Jeannot *et al.*, 2002; D'Ascenzo *et al.*, 2003). Le lisier de porcs s'avère être une matrice très complexe pouvant rendre difficile la détection de ces molécules. L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est une méthode de dosage plus spécifique qui facilite la détection des estrogènes dans le lisier de porcs (Fine *et al.*, 2003). C'est la technologie qui a été privilégiée au cours de ce projet. Nous avons donc réussi à développer une méthode de SPE-LC-MS/MS avec une limite de détection de 400 ng/L, ce qui nous a permis de travailler à de faible concentration. La sensibilité de la méthode analytique est parfois évoquée pour justifier l'utilisation de concentrations plus élevées d'estrogènes, moins représentatives des concentrations environnementales (Fujii *et al.*, 2002). La méthode développée, en plus d'être sensible, s'avère être reproductible, comme le montre la figure 20.

Lors de la mise au point du protocole de SPE-LC-MS/MS pour l'extraction et le dosage des estrogènes, nous avons pu constater que ces molécules, aux concentrations présentes dans le lisier de porcs, adsorbent aux solides présents dans ce dernier (figure 19). En effet, il y a une perte des estrogènes lors de la centrifugation initiale de l'échantillon. L'ajout d'étapes de lavages du culot à l'aide de méthanol permet pratiquement de doubler le pourcentage de récupération des estrogènes. Cette observation faite dans le cadre de nos travaux est en accord avec celles effectuées lors d'expériences *in vitro*, qui ont montré que 56 et 59%, du β E2 et de l'E1 respectivement, ne peuvent être lavés d'un échantillon de sol par une solution aqueuse. Les auteurs de cette étude

ont fait un lien entre la présence du groupement phénol des estrogènes et leur affinité pour la matière organique du sol (Shore *et al.*, 1993). Certains auteurs ont d'ailleurs déjà suggéré qu'une part importante des estrogènes serait adsorbée aux boues et qu'un tel phénomène serait en partie responsable de la diminution des estrogènes observée dans la phase aqueuse après les traitements d'eaux usées (Johnson et Sumpter, 2001; Fujii *et al.*, 2002). D'autres croient par contre, qu'à faible concentration (ng/L), le β E2 resterait en majorité dans la phase aqueuse (Furhacker *et al.*, 1999). Les résultats obtenus lors du présent projet vont plutôt dans le sens de l'adsorption des estrogènes aux particules. Il est donc important de laver les culots lors des centrifugations afin de récupérer au maximum les estrogènes. Certains chercheurs ne conservent que le surnageant, sans traiter la partie solide résultant des centrifugations (Hutchins *et al.*, 2007). Les résultats obtenus mettent également en évidence l'importance d'ajouter les standards internes avant la centrifugation de l'échantillon, afin de compenser pour la perte des estrogènes. Plusieurs équipes ajoutent les standards internes après la centrifugation (Fine *et al.*, 2003; Sarmah *et al.*, 2006; Hutchins *et al.*, 2007), ou après la filtration (Hanselman *et al.*, 2006) précédant l'extraction, ce qui entraînerait une sous-estimation de la concentration réelle des estrogènes. De plus, l'ajout des standards internes à ces étapes causerait une surestimation du taux de récupération apparent de leur méthode.

4.2 Efficacité d'un biotraitement du lisier de porcs

Les travaux effectués ont également permis de vérifier l'efficacité du traitement aérobic mésophile déphosphatant, mis au point dans nos laboratoires pour traiter l'effluent du bioréacteur aérobic thermophile, pour diminuer la charge en estrogènes. Les résultats de bioessai YES (figure 27) et de LC-MS/MS montrent que ce traitement permet de réduire la charge en composés estrogéniques. Les résultats obtenus sont en accord avec plusieurs autres études qui montrent l'efficacité des traitements biologiques pour réduire la charge en

estrogènes (Andersen *et al.*, 2003; Svenson *et al.*, 2003; Joss *et al.*, 2004; Lorenzen *et al.*, 2004; Servos *et al.*, 2005; Furuichi *et al.*, 2006).

Il est à noter que seulement l'E1 a été détecté dans l'affluent du bioréacteur. Il est probable qu'en augmentant la sensibilité de la méthode, il aurait été possible de détecter d'autres estrogènes, comme le β E2 et l'EQO. Il serait possible d'augmenter la sensibilité de la méthode SPE-LC-MS/MS en concentrant d'avantage l'échantillon. Par exemple, on doublerait la sensibilité si un échantillon de 80 mL était passé sur la cartouche SPE au lieu d'un échantillon de 40 mL.

4.3 Souches isolées capables de métaboliser les estrogènes

L'article, « Isolation of estrogen-degrading bacteria from an activated sludge bioreactor treating swine waste, including a strain that converts estrone to β -estradiol. » présenté au chapitre 2, a déjà couvert en profondeur ce sujet. Les éléments de discussion traités dans l'article ne seront donc pas répétés dans la présente section. Toutefois, les éléments les plus importants seront rappelés. Quelques informations supplémentaires seront également ajoutées.

4.3.1 Diversité bactérienne

Lors du présent projet de maîtrise, cinq souches bactériennes capables de métaboliser les estrogènes ont été isolées. Parmi celles-ci, la plupart appartiennent à des espèces ou genres bactériens qui ne sont pas connus pour dégrader les estrogènes. Les souches isolées représentent une flore diversifiée, ce qui est en accord avec des études portant sur la microflore dégradant des estrogènes dans des traitements d'eaux usées municipales, dont celle de Yu *et al.* (2007). Voici quelques informations concernant les genres bactériens auxquels sont associés les souches isolées.

Deux des cinq souches isolées sont affiliées au genre bactérien *Ochrobactrum*, faisant partie de la classe des α -*Proteobacteria*. Il s'agit de bactéries Gram-négatives, en forme de bâtonnets, obligatoirement aérobies et qui peuvent croître à des températures optimales variant de 20 à 37°C (Bergey *et al.*, 2005). Les bactéries associées à ce genre bactérien sont ubiquitaires et se trouvent au niveau du sol, de la rhizosphère, de l'eau, des eaux usées, des animaux et des humains (Bathe *et al.*, 2006). Les espèces d'*Ochrobactrum* pourrait constituer une part substantielle de la communauté microbienne du sol (Lebuhn *et al.*, 2000). À notre connaissance, il n'y a pas, dans la littérature scientifique, d'articles rapportant des souches d'*Ochrobactrum* capables de dégrader les estrogènes. Toutefois, il existe un brevet sur une souche d'*Ochrobactrum* pour une telle activité de dégradation (Morita *et al.*, 2004). De plus, la souche *Ochrobactrum* sp. AS1 serait capable de croître avec le phénol comme seule source de carbone en conditions aérobies (El-Sayed *et al.*, 2003).

Une des souches isolées lors de ce projet est affiliée au genre bactérien *Pseudomonas*, qui fait partie de la classe des γ -*Proteobacteria*. Ce sont des bactéries Gram-négatives, aérobies et en forme de bâtonnets. Les bactéries associées au genre *Pseudomonas* se trouvent dans une multitude d'habitats et certaines espèces sont pathogènes pour l'homme, les animaux ou les plantes (Bergey *et al.*, 2005). Il n'y a pas dans la littérature d'études sur la dégradation des estrogènes par une souche de *Pseudomonas*. Toutefois, la capacité de dégradation d'hydrocarbures et de composés aromatiques, en conditions aérobies, que possèdent plusieurs espèces de *Pseudomonas* est bien connue (Bergey *et al.*, 2005).

Une des souches isolées fait partie du genre *Mycobacterium*, appartenant à la classe des *Actinobacteria*. Il s'agit de microorganismes aérobies, en forme de bâtonnets et acido-alcool-résistants. Ces bactéries se retrouvent dans de nombreux habitats. Certaines espèces sont des pathogènes humains bien connus, responsables entre autres de la tuberculose et de la lèpre. Il s'agit de bactéries très

versatiles d'un point de vue métabolique. Certaines souches, en plus de croître en présence des substrats de croissance communs (sucres, acides organiques etc.), peuvent utiliser des hydrocarbures, des composés aromatiques de même que des composés à un seul carbone, comme le méthanol. Certaines souches, considérées comme autotrophes, pourraient même croître en présence de dioxyde de carbone et d'hydrogène (Hartmans *et al.*, 2006). Bien qu'aucune souche de *Mycobacterium* sp. ne soit connue pour sa capacité à dégrader des estrogènes comme le β E2 et E1, il existe de nombreuses applications commerciales des *Mycobacterium* sp. dans le domaine de la biotransformation des stéroïdes (Hartmans *et al.*, 2006; Sripalakit *et al.*, 2006). De façon générale, la classe des *Actinobacteria* est reconnue pour ses capacités de transformation (oxydation, réduction, hydroxylation etc.) des composés stéroïdiens (Donova *et al.*, 2005; Donova, 2007).

La souche isolée, qui se distingue des autres puisqu'elle effectue la réduction de l'E1 en conditions aérobies, est affiliée au genre bactérien *Methylobacterium*, qui fait partie de la classe des α -*Proteobacteria*. Il s'agit de bactéries Gram-négatives, en forme de bâtonnets, obligatoirement aérobies et qui peuvent croître à des températures optimales variant de 25 à 30°C. Ce sont des bactéries méthylotrophes facultatives, qui peuvent utiliser pour leur croissance différents composés à un seul carbone, comme le méthanol, le formaldéhyde ou le formate. Toutes les souches de *Methylobacterium* produisent des caroténoïdes, des pigments qui confèrent aux colonies et cultures liquides une couleur rosée caractéristique (Bergey *et al.*, 2005). Les bactéries associées au genre *Methylobacterium* sont ubiquitaires et se trouvent entre autres au niveau du sol, de la poussière, de l'air, de l'eau douce et des sédiments aquatiques. Certaines souches, comme *M. nodulans*, pourraient vivre en symbiose avec des plantes et fixer l'azote atmosphérique (Sy *et al.*, 2001). Plusieurs souches de *Methylobacterium* sont résistantes au chlore, ce qui peut expliquer qu'on les retrouve souvent dans des environnements fréquentés par l'humain tels que les conduites d'eau potable, les salles de bain et les lavabos (Hiraishi *et al.*, 1995). À

notre connaissance, aucune souche de *Methylobacterium* n'a été rapportée comme pouvant métaboliser des estrogènes. Toutefois, certaines souches de *Methylobacterium*, comme *Methylobacterium organophilum* XX (méthanotrophe facultative), pourraient jouer un rôle écologique important, de par leur capacité à dégrader le méthane, un gaz à effet de serre majeur (Hanson et Hanson, 1996) ainsi que par leur capacité à dégrader divers polluants. Certaines souches pourraient croître en utilisant des hydrocarbures aromatiques polycycliques ainsi que des hydrocarbures à chaîne aliphatique alors que certaines souches, telles que *M. thiocyanatum*, pourraient dégrader des concentrations importantes de cyanate et de thiocyanate se trouvant dans des effluents industriels (Green, 2006). *Methylobacterium* sp. BJ001 pourraient également dégrader des explosifs tels que le 2,3,4-trinitrotoluène (TNT) (Van Aken *et al.*, 2004). Le TNT ne serait pas minéralisé mais seulement transformé en métabolites réduits. Selon les résultats de cette étude, ces réductions par *Methylobacterium* sp. BJ001 seraient dues à une réaction de co-métabolisme. Ceci est similaire à la conclusion à laquelle nous sommes arrivés pour *Methylobacterium* sp. MI6.1R, soit que celui-ci effectue la réduction de l'E1 en β E2 par co-métabolisme. Il n'est pas impossible qu'une même enzyme soit impliquée dans ces deux réactions, mais des travaux supplémentaires devraient être menés pour vérifier cette hypothèse.

4.3.2 Réduction de l'E1 en β E2

Tel que mentionné précédemment, *Methylobacterium* sp. MI6.1R transforme l'E1 en β E2, ce qui a pour conséquence d'augmenter le potentiel estrogénique de la molécule. C'est la première fois qu'une telle réaction est rapportée. Elle pourrait potentiellement avoir des conséquences sur les performances de réduction du potentiel estrogénique au sein des biotraitements. Toutefois, les résultats obtenus lors des essais de dégradation des estrogènes par la biomasse enrichie (culture mixte, p. 51) ainsi que les analyses des estrogènes et de l'estrogénicité globale de l'affluent et de l'effluent du bioréacteur mésophile (p. 81), montrent que la réduction de l'E1 en β E2 n'est pas le processus dominant dans le bioréacteur d'où

les souches ont été isolées. Le même raisonnement s'applique à la majorité des traitements biologiques d'eaux usées analysés à ce jour puisque la concentration de β E2 est normalement plus faible suite au traitement. Toutefois, on sait que les performances varient beaucoup d'une usine d'épuration à l'autre sans que l'on comprenne entièrement les causes de ces différences. Il est pertinent de se demander si la présence d'une bactérie comme *Methylobacterium* sp. MI6.1R pourrait influencer les performances en fonction de son abondance relative. Dans le cas où un procédé favoriserait une telle bactérie, la performance d'enlèvement des estrogènes pourrait ainsi être réduite. Par exemple, on peut émettre l'hypothèse qu'un bioprocédé incluant une étape de dénitrification avec ajout de méthanol (une pratique existante) pourrait favoriser *Methylobacterium* sp. puisque cette bactérie est méthylotrophe facultative. Il serait donc pertinent de vérifier cette possibilité dans le cadre d'études futures.

4.3.3 Co-métabolisme

Toutes les activités observées par les souches qui métabolisent les estrogènes semblent résulter de réactions de co-métabolisme. Cette observation va dans le même sens qu'une autre étude faite sur le traitement des eaux usées municipales, soit celle de Yu *et al.* (2007). Dans les deux cas, les bactéries ont été isolées en présence de faibles concentrations d'estrogènes, ce qui se rapproche plus de la réalité que d'autres études où les bactéries étaient isolées à des concentrations grandement supérieures aux concentrations environnementales. Ceci laisse croire que le co-métabolisme serait un phénomène important pour la réduction des concentrations d'estrogènes au sein des bioprocédés. Il faudrait donc tenir compte de cette réalité, entre autres dans les modèles mathématiques de prédiction de performance des traitements, ainsi que dans le développement de stratégies d'opération visant à améliorer les performances d'enlèvement des estrogènes par les usines de traitement des eaux usées.

Une question persiste suite à ce projet. Comment a-t-on pu isoler des bactéries avec les estrogènes comme seule source de carbone si elles ne font que co-métaboliser ces molécules? Comme il a été suggéré dans l'article, il est possible que des impuretés dans le milieu aient permis la croissance de ces bactéries. Cependant, il est important de mentionner le fait que la croissance sur les géloses avec ou sans (contrôle) estrogènes était faible et relativement semblable. Elle n'était pas significativement plus importante sur les géloses avec estrogènes. Il est donc possible de poser l'hypothèse que la capacité de co-métaboliser les estrogènes est répandue dans le monde microbien. Il est aussi possible de croire que l'on aurait pu isoler des bactéries ayant cette capacité sans procéder à l'enrichissement de la microflore en présence d'estrogènes comme seule source de carbone. Cette hypothèse sera vérifiée dans le cadre d'un autre projet de maîtrise. En effet, la capacité de dégradation des estrogènes par plusieurs souches isolées du traitement aérobic mésophile déphosphatant, sans enrichissement en présence d'estrogènes, sera évaluée et devrait permettre une meilleure compréhension du phénomène.

Chapitre 5. Conclusions et perspectives

Au cours de ce projet de maîtrise, une méthode de dosage des estrogènes par spectrométrie de masse en tandem a été mise au point. Elle a été utilisée pour faire le suivi des estrogènes dans le milieu de culture lors d'essais de dégradation de ces molécules par les différentes souches isolées d'un biotraitement du lisier de porcs. Cinq souches isolées sont capables de métaboliser les estrogènes. Quatre d'entre elles permettent de réduire le potentiel estrogénique global, ce qui est bénéfique en terme de biotraitement. Une autre souche, *Methylobacterium* sp. MI6.1R, effectue une réaction inhabituelle pour la première fois observée, soit une réduction de l'E1 en β E2, ce qui a pour effet d'augmenter le potentiel estrogénique global. Nos travaux ont par ailleurs montré que l'activité de transformation des estrogènes par les souches isolées est constitutive et semble être le résultat de co-métabolisme. Ceci nous laisse croire que le co-métabolisme est un phénomène important dans la biodégradation des estrogènes dans les procédés de boues activées.

Il pourrait être intéressant, comme suite de ces travaux, de vérifier l'importance réelle des microorganismes isolés dans le bioréacteur mésophile déphosphatant et de tenter de corréliser leur présence avec les performances du biotraitement pour la réduction du potentiel estrogénique. Pour ce faire, il faudrait développer des méthodes de quantification rapide, tel que le FISH (« Fluorescent *in situ* hybridization ») ou le PCR en temps réel. Une attention particulière pourrait être portée à *Methylobacterium* sp. MI6.1R qui effectue la réduction de l'E1 en β E2. De plus, il serait pertinent de réaliser des travaux portant sur la cinétique (K_m , V_{max} , seuil minimal) des réactions effectuées par les souches isolées. Il pourrait aussi être intéressant d'investiguer plus en profondeur les mécanismes biochimiques impliqués dans les réactions de transformation des estrogènes, particulièrement celui impliqué dans la réduction de l'E1 en β E2 par la bactérie *Methylobacterium* sp. MI6.1R.

**Annexe 1. Milieux de culture pour la croissance des levures
BJ 3505**

Milieu liquide

- 50 mL base azotée pour levures 10X (YNB-w/o amino acids Difco # 0919-15, 33.5 g dans 500 mL d'eau milli-Q, stériliser par filtration).
 - 50 mL dextrose 20% (200 g/ 1 L d'eau milli-Q)
 - 5 mL lysine (solution stock 3.6 g L-lysine-HCl/ 1 L d'eau milli-Q)
 - 5 mL histidine (solution stock 2.4 g L-histidine-HCl/ 1 L d'eau milli-Q)
 - 250 mL tampon phosphate de sodium 0.1 M pH 6.8
- Compléter à 500 mL avec de l'eau milli-Q.
- Stériliser par filtration.
- Conserver à 4°C.

Milieu solide

- | Dans un erlenmeyer de 100 mL; | | Dans un erlenmeyer de 100 mL; | |
|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|--------------|
| • 10 mL | base azotée 10X | • 1 mL | lysine |
| • 2 g | bactoagar | • 1 mL | histidine |
| • 40 mL | eau milli-Q | • 10 mL | 20% dextrose |
| | | • 38 mL | eau milli-Q |
- Autoclaver les solutions et laisser tiédir jusqu'à ce que les erlenmeyers puissent être manipulés avec les mains.
- Combiner les solutions et mélanger délicatement.
- Mettre 15-20 mL par pétri, attendre qu'ils figent et entreposer à 4°C à l'envers.

**Annexe 2. Composition du milieu minéral supplémenté avec des
estrogènes (« estrogen-supplemented mineral medium », ESM
medium)**

Mineral medium (tiré de Holt J.G., 1994)

Na ₂ HPO ₄ . H ₂ O	3.64 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.2 g
NH ₄ Cl	1 g
Ferric ammonium citrate	0.005 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O.....	0.010 g
Trace-elements solution	3 mL
Eau milli-Q	1000 mL

Trace-elements solution

ZnSO ₄ .7H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	3 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	20 mg
CuCl ₂ .6H ₂ O	0.79 mg
NiCl ₂ .6H ₂ O	2 mg
NaMoO ₄ .H ₂ O	3 mg
Eau milli-Q	1000 mL

- Ajusté le pH du milieu à 7.6.
- Dans un autre erlenmeyer, mettre la quantité requise des solutions stock d'estrogènes et laisser le méthanol évaporer complètement.
- Ajouter le volume requis de milieu.
- Autoclaver.
- Laisser tiédir et ajouter du NaHCO₃ en solution (stériliser par filtration) afin d'obtenir une concentration finale de 0.5 g par litre.

Références

- Adav, S. S., M. Y. Chen, D. J. Lee et N. Q. Ren. 2007. Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic granules. Chemosphere 67(8): 1566-1572.
- Aerni, H. R., B. Kobler, B. V. Rutishauser, F. E. Wettstein, R. Fischer, W. Giger, A. Hungerbühler, M. D. Marazuela, A. Peter, R. Schonenberger, A. C. Vogeli, M. J. F. Suter et R. I. L. Eggen. 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. Analytical and Bioanalytical Chemistry 378(7): 688-696.
- Andersen, H., H. Siegrist, B. Halling-Sørensen et T. A. Ternes. 2003. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. Environmental Science and Technology 37(18): 4021-4026.
- Aravindakshan, J., V. Paquet, M. Gregory, J. Dufresne, M. Fournier, D. J. Marcogliese et D. G. Cyr. 2004. Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). Toxicological Sciences 78(1): 156-165.
- Baggi, G., V. Andreoni, S. Bernasconi, L. Cavalca et M. Zangrossi. 2002. Co-metabolic degradation of mixtures of monochlorophenols by phenol-degrading microorganisms. Annals of Microbiology 52(2): 133-143.
- Baronti, C., R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili et R. Samperi. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. Environmental Science and Technology 34(24): 5059-5066.
- Bathe, S., W. Achouak, A. Hartmann, T. Heulin, M. Schlöter et M. Leubhn. 2006. Genetic and phenotypic microdiversity of *Ochrobactrum* spp. Fems Microbiology Ecology 56(2): 272-280.
- Belfroid, A. C., A. Van der Horst, A. D. Vethaak, A. J. Schafer, G. B. J. Rijs, J. Wegener et W. P. Cofino. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. Science of the Total Environment 225(1-2): 101-108.
- Bergey, D. H., J. G. Holt et N. R. Krieg (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Bhatt, R. V. 2000. Environmental influence on reproductive health. International Journal of Gynecology & Obstetrics 70(1): 69-75.

Bhushan, B., S. K. Samanta, A. Chauhan, A. K. Chakraborti et R. K. Jain. 2000. Chemotaxis and biodegradation of 3-methyl-4-nitrophenol by *Ralstonia* sp SJ98. Biochemical and Biophysical Research Communications **275**(1): 129-133.

Braga, O., G. A. Smythe, A. I. Schafer et A. J. Feitz. 2005. Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants. Environmental Science and Technology **39**(9): 3351-3358.

Burnison, B. K., A. Hartmann, A. Lister, M. R. Servos, T. Ternes et G. Van Der Kraak. 2003. A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural runoff. Environmental Toxicology and Chemistry **22**(10): 2243-2250.

Coldham, N. G., M. Dave, S. Sivapathasundaram, D. P. McDonnell, C. Connor et M. J. Sauer. 1997. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. Environmental Health Perspectives **105**(7): 734-742.

Colucci, M. S., H. Bork et E. Topp. 2001. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 β -estradiol and estrone. Journal of Environmental Quality **30**(6): 2070-2076.

Colucci, M. S. et E. Topp. 2002. Dissipation of part-per-trillion concentrations of estrogenic hormones from agricultural soils. Canadian Journal of Soil Science **82**(3): 335-340.

D'Ascenzo, G., A. Di Corcia, A. Gentili, R. Mancini, R. Mastropasqua, M. Nazzari et R. Samperi. 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. Science of The Total Environment **302**(1-3): 199-209.

Daston, G. P., J. W. Gooch, W. J. Breslin, D. L. Shuey, A. I. Nikiforov, T. A. Fico et J. W. Gorsuch. 1997. Environmental estrogens and reproductive health: A discussion of the human and environmental data. Reproductive Toxicology **11**(4): 465-481.

Decroos, K., S. Vanhemmens, S. Cattoir, N. Boon et W. Verstraete. 2005. Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. Archives of Microbiology **183**(1): 45-55.

Desbrow, C., E. J. Routledge, G. C. Brighty, J. P. Sumpter et M. Waldock. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. Environmental Science and Technology **32**(11): 1549-1558.

Di Virgilio, A. L., K. Iwami, W. Watjen, R. Kahl et G. H. Degen. 2004. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. Toxicology Letters **151**(1): 151-162.

Donova, M. V. 2007. Transformation of steroids by *Actinobacteria*: A review. Applied Biochemistry and Microbiology **43**(1): 1-14.

Donova, M. V., O. V. Egorova et V. M. Nikolayeva. 2005. Steroid 17 β -reduction by microorganisms - a review. Process Biochemistry **40**(7): 2253-2262.

Dorabawila, N. et G. Gupta. 2005. Endocrine disrupter - estradiol - in Chesapeake Bay tributaries. Journal of Hazardous Materials **120**(1-3): 67-71.

Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde et E. C. Bottger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes - Characterization of a gene coding for 16S-ribosomal RNA. Nucleic Acids Research **17**(19): 7843-7853.

El-Sayed, W. S., M. K. Ibrahim, M. Abu-Shady, F. El-Beih, N. Ohmura, H. Saiki et A. Ando. 2003. Isolation and identification of a novel strain of the genus *Ochrobactrum* with phenol-degrading activity. Journal of Bioscience and Bioengineering **96**(3): 310-312.

Fahrbach, M., J. Kuever, R. Meinke, P. Kampf et J. Hollender. 2006. *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17 β -oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**: 1547-1552.

Filby, A. L., K. L. Thorpe, G. Maack et C. R. Tyler. 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen-and estrogen-induced feminization in fish. Aquatic Toxicology **81**(2): 219-231.

Fine, D. D., G. P. Breidenbach, T. L. Price et S. R. Hutchins. 2003. Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A **1017**(1-2): 167-185.

Fisch, H. et R. Golden. 2003. Environmental estrogens and sperm counts. Pure and Applied Chemistry **75**(11-12): 2181-2193.

Fujii, K., S. Kikuchi, M. Satomi, N. Ushio-Sata et N. Morita. 2002. Degradation of 17 β -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., M. Satomi, N. Morita, T. Motomura, T. Tanaka et S. Kikuchi. 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.

Furhacker, M., A. Breithofer et A. Jungbauer. 1999. 17 β -estradiol: Behavior during waste water analyses. Chemosphere **39**(11): 1903-1909.

Furuichi, T., K. Kannan, K. Suzuki, S. Tanaka, J. P. Giesy et S. Masunaga. 2006. Occurrence of estrogenic compounds in and removal by a swine farm waste treatment plant. Environmental Science and Technology **40**(24): 7896-7902.

Gaido, K. W., L. S. Leonard, S. Lovell, J. C. Gould, D. Babai, C. J. Portier et D. P. McDonnell. 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. Toxicology and Applied Pharmacology **143**(1): 205-212.

Green, P. N. (2006). The genus *Methylobacterium*. The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt. New York, Springer New York. **5**: 257-265.

Hanselman, T. A., D. A. Graetz et A. C. Wilkie. 2003. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: A review. Environmental Science and Technology **37**(24): 5471-5478.

Hanselman, T. A., D. A. Graetz, A. C. Wilkie, N. J. Szabo et C. S. Diaz. 2006. Determination of steroidal estrogens in flushed dairy manure wastewater by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Environmental Quality **35**(3): 695-700.

Hanson, R. S. et T. E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. Microbiological reviews **60**(2): 439-471.

Hartmans, S., J. A. M. De Bont et E. Stackebrandt (2006). The genus *Mycobacterium*. In The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt. New York, Springer New York. **3**: 889-918.

Hiraishi, A., K. Furuhashi, A. Matsumoto, K. A. Koike, M. Fukuyama et K. Tabuchi. 1995. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. Applied and Environmental Microbiology **61**(6): 2099-2107.

Holt J.G., a. N. R. K. 1994. Enrichment and isolation, p. 205. *In* P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg (ed.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Hutchins, S. R., M. V. White, F. M. Hudson et D. D. Fine. 2007. Analysis of lagoon samples from different concentrated animal feeding operations for estrogens and estrogen conjugates. Environmental Science and Technology **41**(3): 738-744.

Isobe, T., H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki et M. Morita. 2003. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A **984**(2): 195-202.

Jacobsen, A. M., A. Lorenzen, R. Chapman et E. Topp. 2005. Persistence of testosterone and 17 β -estradiol in soils receiving swine manure or municipal biosolids. Journal of Environmental Quality **34**(3): 861-871.

Jeannot, R., H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac et K. Dohrendorf. 2002. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. Journal of Chromatography A **974**(1-2): 143-159.

Jobling, S., M. Nolan, C. R. Tyler, G. Brighty et J. P. Sumpter. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science and Technology **32**(17): 2498-2506.

Jobling, S., R. Williams, A. Johnson, A. Taylor, M. Gross-Sorokin, M. Nolan, C. R. Tyler, R. van Aerle, E. Santos et G. Brighty. 2006. Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. Environmental Health Perspectives **114**: 32-39.

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

Johnson, A. C., R. J. Williams et P. Matthiessen. 2006. The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. Science of the Total Environment **362**(1-3): 166-178.

Joosten, H. F. P., E. A. van Acker, D. J. van den Dobbelsteen, G. Horbach et E. I. Krajnc. 2004. Genotoxicity of hormonal steroids. Toxicology Letters **151**(1): 113-134.

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

Juteau, P., D. Tremblay, C. B. Ould-Moulaye, J. G. Bisailon et R. Beaudet. 2004a. Swine waste treatment by self-heating aerobic thermophilic bioreactors. Water Research **38**(3): 539-546.

Juteau, P., D. Tremblay, R. Villemur, J. G. Bisailon et R. Beaudet. 2004b. Analysis of the bacterial community inhabiting an aerobic thermophilic sequencing batch reactor (AT-SBR) treating swine waste. Applied Microbiology and Biotechnology **66**(1): 115-122.

Ke, J., W. Zhuang, K. Y. Gin, M. Reinhard, L. T. Hoon et J. H. Tay. 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.

Kiparissis, Y., G. C. Balch, T. L. Metcalfe et C. D. Metcalfe. 2003. Effects of the isoflavones genistein and equol on the gonadal development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Health Perspectives **111**(9): 1158-1163.

Lange, I. G., A. Daxenberger, B. Schiffer, H. Witters, D. Ibarreta et H. H. D. Meyer. 2002a. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. Analytica Chimica Acta **473**(1-2): 27-37.

Lange, I. G., A. Hartel et H. H. D. Meyer. 2002b. Evolution of oestrogen functions in vertebrates. Journal of Steroid Biochemistry And Molecular Biology **83**(1-5): 219-226.

Lebuhn, M., W. Achouak, M. Schloter, O. Berge, H. Meier, M. Barakat, A. Hartmann et T. Heulin. 2000. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp nov and *Ochrobactrum grignonense* sp nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**: 2207-2223.

Lee, H. B. et D. Liu. 2002. Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. Water, Air, and Soil Pollution **134**(1-4): 353-368.

Li, F. S., A. Yuasa, A. Obara et A. P. Mathews. 2005. Aerobic batch degradation of 17 β -estradiol (E2) by activated sludge: Effects of spiking E2 concentrations, MLVSS, and temperatures. Water Research **39**(10): 2065-2075.

Lorenzen, A., J. G. Hendel, K. L. Conn, S. Bittman, A. B. Kwabiah, G. Lazarovitz, D. Masse, T. A. McAllister et E. Topp. 2004. Survey of hormone activities in municipal biosolids and animal manures. Environmental Toxicology **19**(3): 216-225.

Mazzoli, R., E. Pessione, M. G. Giuffrida, P. Fattori, C. Barelo, C. Giunta et N. D. Lindley. 2007. Degradation of aromatic compounds by *Acinetobacter radioresistens* S13: growth characteristics on single substrates and mixtures. Archives of Microbiology **188**(1): 55-68.

McCarty, G. W. 1999. Modes of action of nitrification inhibitors. Biology and Fertility of Soils **29**(1): 1-9.

Metcalf & Eddy, I. 2003. Revised by G. Tchobanoglous, F.L. Burton and H.D. Stensel. Wastewater Engineering, treatment and reuse. Fourth Ed. McGraw-Hill, New York. .

Metcalf, C. D., T. L. Metcalfe, Y. Kiparissis, B. G. Koenig, C. Khan, R. J. Hughes, T. R. Croley, R. E. March et T. Potter. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry **20**(2): 297-308.

Morita, T., K. Onda, A. Miya, K. Tada, T. Hashimoto et F. Mishina (2004). Female sex hormone degrading bacteria and use thereof. Brevet européen. EP20040004958.

Mutafov, S., B. Angelova, H. P. Schmauder, T. Avramova et L. Boyadjieva. 2004. Stoichiometry of microbial continuous-flow purification of toluene-contaminated air. Applied Microbiology and Biotechnology **65**(2): 228-234.

O'Connor, J. C. et R. E. Chapin. 2003. Critical evaluation of observed adverse effects of endocrine active substances on reproduction and development, the immune system, and the nervous system. Pure and Applied Chemistry **75**(11-12): 2099-2123.

Panter, G. H., R. S. Thompson, N. Beresford et J. P. Sumpter. 1999. Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. Chemosphere **38**(15): 3579-3596.

Panter, G. H., R. S. Thompson et J. P. Sumpter. 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. Aquatic Toxicology **42**(4): 243-253.

Pelissero, C., B. Bennetau, P. Babin, F. Le Menn et J. Dunogues. 1991. The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **38**(3): 293-299.

Raman, D. R., A. C. Layton, L. B. Moody, J. P. Easter, G. S. Sayler, R. T. Burns et M. D. Mullen. 2001. Degradation of estrogens in dairy waste solids: Effects of acidification and temperature. Transactions of the ASAE **44**(6): 1881-1888.

Raman, D. R., E. L. Williams, A. C. Layton, R. T. Burns, J. P. Easter, A. S. Daugherty, M. D. Mullen et G. S. Sayler. 2004. Estrogen content of dairy and swine wastes. Environmental Science and Technology **38**(13): 3567-3573.

Ren, Y. X., K. Nakano, M. Nomura, N. Chiba et O. Nishimura. 2007. Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge. Water research **41**(14): 3089-3096.

Routledge, E. J., D. Sheahan, C. Desbrow, G. C. Brighty, M. Waldock et J. P. Sumpter. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. Environmental Science and Technology **32**(11): 1559-1565.

Sarmah, A. K., G. L. Northcott, F. D. L. Leusch et L. A. Tremblay. 2006. A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand. Science of the Total Environment **355**(1-3): 135-144.

Servos, M. R., D. T. Bennie, B. K. Burnison, A. Jurkovic, R. McInnis, T. Neheli, A. Schnell, P. Seto, S. A. Smyth et T. A. Ternes. 2005. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. Science of the Total Environment **336**(1-3): 155-170.

Setchell, K. D. R. 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. American Journal of Clinical Nutrition **68**(6): 1333S-1346S.

Shackleton, C. H. 1986. Profiling steroid hormones and urinary steroids. Journal of chromatography **379**: 91-156.

Shappell, N. W., L. O. Billey, D. Forbes, T. A. Matheny, M. E. Poach, G. B. Reddy et P. G. Hunt. 2007. Estrogenic activity and steroid hormones in swine wastewater through a lagoon constructed-wetland system. Environmental Science and Technology **41**(2): 444-450.

Shareef, A., M. J. Angove, J. D. Wells et B. B. Johnson. 2006. Aqueous solubilities of estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethynylestradiol, and bisphenol A. Journal of Chemical and Engineering Data **51**(3): 879-881.

Sharpe, R. M. et N. E. Skakkebaek. 2003. Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: Advances in understanding and identification of areas for future research. Pure and Applied Chemistry **75**(11-12): 2023-2038.

Shi, J., S. Fujisawa, S. Nakai et M. Hosomi. 2004. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Water Research **38**(9): 2323-2330.

Shi, J. H., Y. Suzuki, B. D. Lee, S. Nakai et M. Hosomi. 2002. Isolation and characterization of the ethynylestradiol-biodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1. Water Science and Technology **45**(12): 175-179.

Shore, L. S., M. Gurevitz et M. Shemesh. 1993. Estrogen as an environmental-pollutant. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **51**(3): 361-366.

Shore, L. S. et M. Shemesh. 2003. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. Pure and Applied Chemistry **75**(11-12): 1859-1871.

Simpson, E. R. 2003. Sources of estrogen and their importance. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **86**(3-5): 225-230.

Sripalakit, P., U. Wichai et A. Saraphanchotiwithaya. 2006. Biotransformation of various natural sterols to androsthenones by *Mycobacterium* sp and some steroid-converting, microbial strains. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic **41**(1-2): 49-54.

Sumpter, J. P. et S. Jobling. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environ Health Perspect **103 Suppl 7**: 173-178.

Suzuki, K., H. Hirai, H. Murata et T. Nishida. 2003. Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethynylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. Water Research **37**(8): 1972-1975.

Svenson, A., A. S. Allard et M. Ek. 2003. Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. Water Research **37**(18): 4433-4443.

Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willems, P. de Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson et B. Dreyfus. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. Journal of Bacteriology **183**(1): 214-220.

Ternes, T. A., P. Kreckel et J. Mueller. 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): 91-99.

Ternes, T. A., M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R. D. Wilken et M. Servos. 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): 81-90.

Thorpe, K. L., R. I. Cummings, T. H. Hutchinson, M. Scholze, G. Brighty, J. P. Sumpter et C. R. Tyler. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. Environmental Science and Technology **37**(6): 1142-1149.

Tilton, F., W. H. Benson et D. Schlenk. 2002. Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input. Aquatic Toxicology **61**(3-4): 211-224.

Tyler, C. R., S. Jobling et J. P. Sumpter. 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. Critical Reviews in Toxicology **28**(4): 319-361.

Vader, J. S., C. G. van Ginkel, F. Sperling, J. de Jong, W. de Boer, J. S. de Graaf, M. van der Most et P. G. W. Stokman. 2000. Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. Chemosphere **41**(8): 1239-1243.

Van Aken, B., J. M. Yoon et J. L. Schnoor. 2004. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, an octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). Applied and Environmental Microbiology **70**(1): 508-517.

Van den Belt, K., P. Berckmans, C. Vangenechten, R. Verheyen et H. Witters. 2004. Comparative study on the *in vitro in vivo* estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol. Aquatic Toxicology **66**(2): 183-195.

Velle, W. 1976. Endogenous anabolic agents in farm animals. Environmental quality and safety. Supplement(5): 159-170.

Wang, Q. F., X. Li, L. Q. Wang, Y. H. Feng, R. Zeng et G. Gorodeski. 2004. Antiapoptotic effects of estrogen in normal and cancer human cervical epithelial cells. Endocrinology **145**(12): 5568-5579.

Wang, Y., Y. Tian, B. Han, H. B. Zhao, J. N. Bi et B. L. Cai. 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp strain PD12. Journal of Environmental Sciences-China **19**(2): 222-225.

Weber, S., P. Leuschner, P. Kampfer, W. Dott et J. Hollender. 2005. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. Applied Microbiology and Biotechnology **67**(1): 106-112.

Yoon, J. H., Y. G. Cho, S. S. Kang, S. B. Kim, S. T. Lee et Y. H. Park. 2000. *Rhodococcus koreensis* sp nov., a 2,4-dinitrophenol-degrading bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**: 1193-1201.

Yoshimoto, T., F. Nagai, J. Fujimoto, K. Watanabe, H. Mizukoshi, T. Makino, K. Kimura, H. Saino, H. Sawada et H. Omura. 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., H. Roh et K. H. Chu. 2007. 17 β -estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge. Environmental Science and Technology **41**(2): 486-492.

Zhu, B. T. et A. H. Conney. 1998. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. Carcinogenesis **19**(1): 1-27.