

Journées ECOTECHNOLOGIES 2012

ECHIBIOTEB

**Outils innovants d'Echantillonnage, d'analyses
CHimiques et BIologiques pour le suivi de
Traitements avancés des Eaux usées et des Boues**



• Un consortium aux compétences variées

☛ L'Iristea (**Cemagref**), unité de recherche Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions (MAEP, Lyon)

☛ Le **CIRSEE**, **Suez-Environnement**

☛ Le laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (**LPTC**), Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et

Continentaux (**EPOC** – UMR 5805 CNRS), Université de Bordeaux 1

☛ Le groupe Santé Publique–Environnement, Université Paris Sud 11 (**UMR8079**)

☛ L'**INERIS**, Unités Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo* (ECOT) et Expertise et Essais en Ecotoxicologie (EXES)

☛ **ENVOLURE**

➔ Chimie analytique et environnementale, écotoxicologie, biologie, microbiologie, génie des procédés (épuration des eaux)

• **Début/fin du projet:** mars 2011 ➔ mars 2014



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



Objectifs et enjeux du projet

✦ **développer et mettre en œuvre des technologies innovantes d'échantillonnage et de mesures chimiques et biologiques pour le suivi de l'efficacité des procédés avancés de traitement des eaux usées urbaines et des boues**

☞ améliorer la représentativité de l'échantillonnage et la sensibilité des analyses chimiques et biologiques : échantillonneurs intégratifs

☞ évaluer la complémentarité d'outils d'analyse chimique et biologique, leurs domaines d'application, proposer des stratégies de déploiement et d'interprétation des données : tests in vitro (potentiel perturbateur endocrinien, "dioxin like" et génotoxique) ; tests in vivo (toxicité sur des organismes représentatifs des milieux récepteurs), analyses chromatographiques (quantification de molécules cibles)

☞ isoler et caractériser plus finement les fractions et les molécules bioactives, identifier des molécules non cibles et des produits de dégradation : démarche de type EDA (Effect Directed Analyses) couplée à des méthodologies de screening (GC-2D-MS(TOF), SPME/GC/HRMS(TOF) ou LC/HRMS(TOF))




☞ appréhender par des tests rapides in situ le caractère inhérent aux matières organiques dissoutes à moduler la qualité et la toxicité des eaux étudiées

Les campagnes réalisées / effluents liquides

Date Code campagne	Traitements Secondaires	Traitements Tertiaires étudiés
Mai 2011 ASE1-PA4 / BSM	Boue activée + Filtre à sable	Ozoneur + Charbon actif →
Septembre 2011 ASE-PA-ECH1 / BSM	Boue activée + Filtre à sable	Ozoneur + Charbon actif
Campagnes 1 mois (biotests <i>in vivo</i> / éch intégratifs)		
Mars 2012 ASE-PA-ECH2 / BSM	Boue activée + Filtre à sable	Ozoneur →
Octobre 2011 ASE3-PA2&3 / BSM	Boue activée + Filtre à sable	Pilote d'Oxydation avancée →
Novembre 2011 ASE2-PA2&3 / OLL	Bio-réacteur à membranes	Pilote d'Oxydation avancée
Juillet 2012 ACA4-PA7 / FEY	Boue activée	Pilote de matériaux adsorbants (CA, Argile, Zéolite) →
Septembre 2012 ACA-PA-ECH1 / MSL	Filtre planté de roseaux	Lagune →
Septembre 2012 ASE-PA-ECH3 / AMP	Boue activée	Filtre à membranes + ozoneur →



Les campagnes réalisées /boues

Date Code campagne	Traitements des boues étudiés	
Mai 2011 ASE3-boue / BC	Sécheur solaire	
Juin 2011 ASE5-boue / MST	Compostage	
Septembre 2012 ACA2-boue2 / ADC	Lit de séchage planté de roseaux	

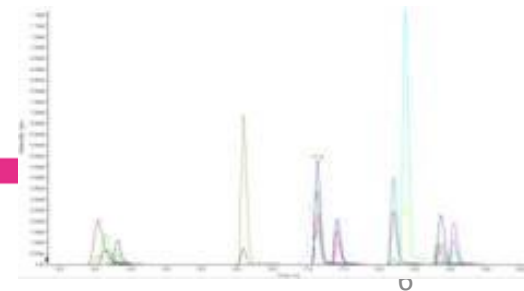
Analyses chimiques : 170 molécules ciblées

- * 14 métaux, 5 AKP, 4-t-BP, BPA, tetrabromo-BPA, 104 molécules pharmaceutiques (*10 bêtabloquants, 6 anti-inflammatoires, 9 antidépresseurs, 3 bronchodilatateurs, 2 hypolipémiants, 2 stimulants, 1 agent de contraste, 51 antibiotiques, 10 anti-cancéreux, 9 anti-viraux, 1 inhibiteurs de PDE5*), 5 estrogènes, 17 pesticides, 1 phtalate, 8 PCB, 16 HAP, 8 PBDE, HBCD, PBB153, benzothiazole

↪ molécules ciblées qui diffèrent en fonction des types d'échantillons (Eaux / Boues / POCIS / SPMD)

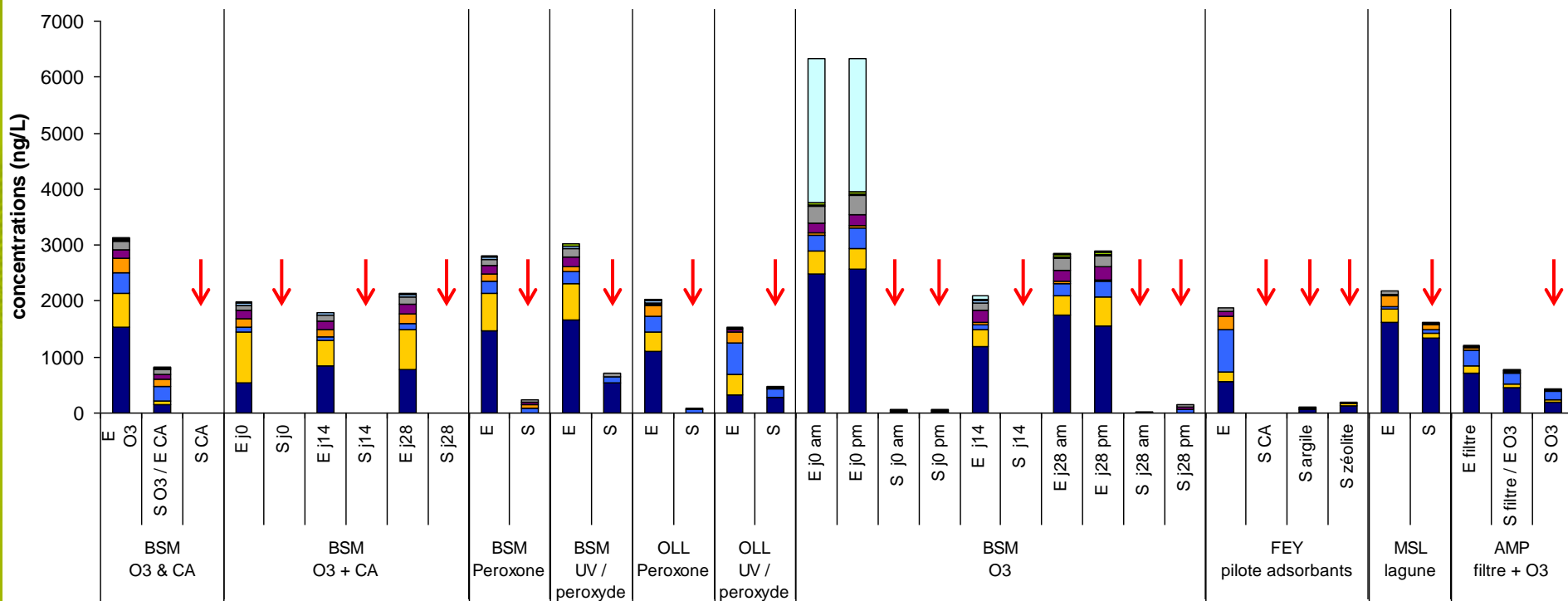
- * Dosées par des techniques chromatographiques

☛ par LPTC-EPOC, Irstea et CIRSEE-SE




Comparaison de l'efficacité des traitements tertiaires vis-à-vis de l'élimination des b-bloquants


■ Sotalol ■ Propranolol ■ Aténolol ■ Acebutolol ■ Métoprolol ■ Bisoprolol ■ Oxprénolol ■ Nadolol ■ Timolol ■ Bétaxolol




E : entrée S: sortie ↓ am : matin pm : après-midi CA : charbon actif

Analyses chimiques : du screening pour identifier de nouvelles molécules

 dans des eaux usées ou traitées représentatives, dans des boues et suite à la démarche EDA

 pour l'identification de nouvelles molécules et de produits de dégradation

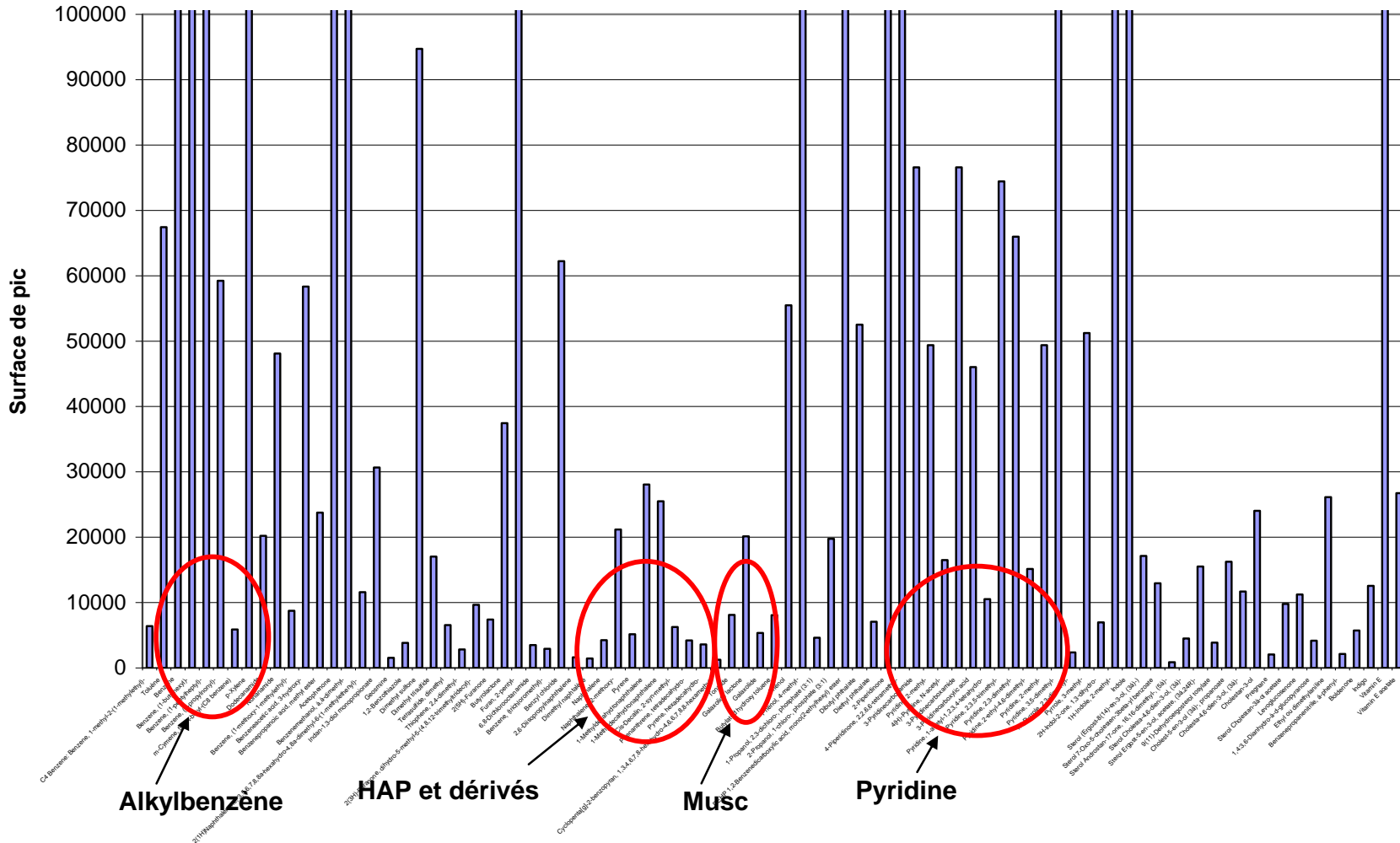
 pour proposer une liste de composés pertinents à suivre dans le futur.

① GC-2D-MS(TOF) (CIRSEE-SE)

② SPME/GC/HRMS(TOF) et LC/HRMS (TOF) (LPTC-EPOC)

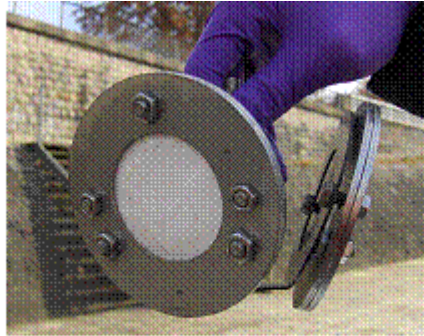
Le screening chimique

Screening GD2D-TOFMS d'une boue d'entrée de sécheur solaire

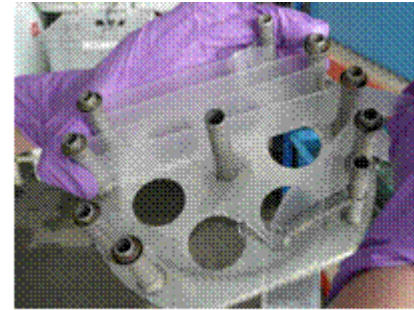


Les échantillonneurs intégratifs pour les eaux

- ☛ SPMD (Semi-Permeable membrane Device) pour les hydrophobes
- ☛ POCIS (Polar Organic Chemical integrative Samplers) pour les hydrophiles



POCIS



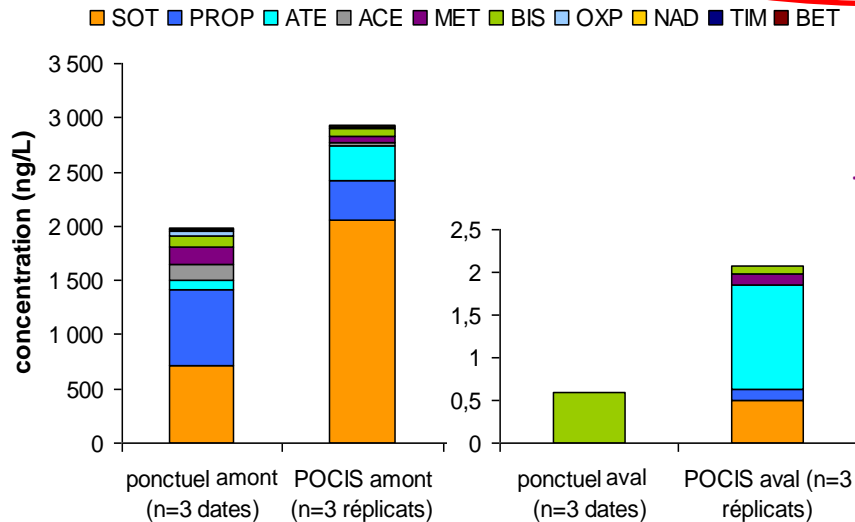
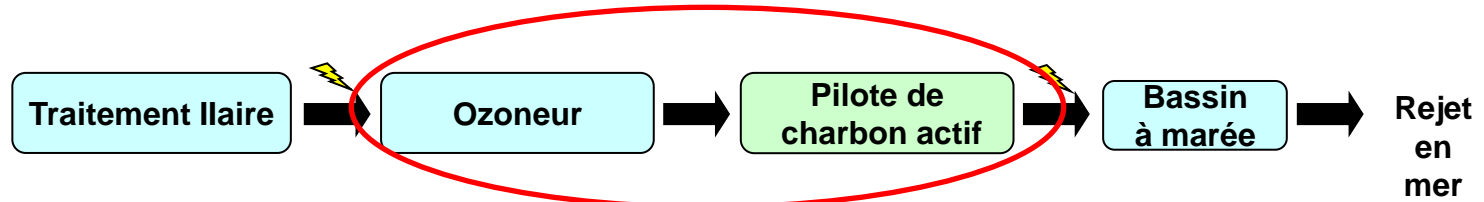
SPMD

- ✓ Prévus sur 4 sites, (3 procédés avancés intensif des eaux et le procédé extensif de type lagune), campagnes sur 1 mois
- ✓ Exposition en amont et en aval des traitements étudiés jusqu'à 28 jours (2 à 4 durées d'exposition différentes, au moins 1 triplicat)
- ✓ Couplés à i) des analyses chimiques des molécules ciblées, ii) des screening chimiques, iii) des biotests in vitro

☛ par **LPTC-EPOC, Irstea**

Echantillonneurs intégratifs (POCIS) vs. ponctuel

Ex. : les bêtabloquants (ASE-PA-ECH1)



➤ Baisse des concentrations après traitement quel que soit l'échantillonnage

➤ Quantité et nature des b-bloquants :
Ech ponct. (J0, J14, J28) < POCIS (14 j)

➤ Détection de composés supplémentaires

➤ aténolol, sotalol, propranolol, métoprolol, nordiazepam, amitryptiline et alprazolam en aval des traitements tertiaires

➤ clenbuterol, gemfibrozil, imipramine et doxépine en amont des traitements tertiaires

➤ Biodétection favorisée (tests in vitro) par concentration de la contamination

Biodétection *in vitro* pour les eaux et les boues

composés PE, dioxin-like et génotoxiques

Mécanismes ciblés	Essais <i>in vitro</i> (réf.)	Mesure finale du test	Exemples de polluants environnementaux détectés	Partenaire
Récepteur des œstrogènes (ER)	Cellules MELN (Pillon <i>et al.</i> , 2005)	Activité luciférase	Stéroïdes naturels (E1, E2, E3) et synthétiques (EE2), alkyphénols, bisphénol A, certains pesticides organochlorés...	Univ. Paris Sud
Récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR)	Cellules PC-DR-LUC (Jugan <i>et al.</i> , 2007)	Activité luciférase	TBBPA, halophénols, PBDE, HAP	
Récepteurs des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR)	Cellules MDA-kb2 (Wilson <i>et al.</i> , 2002, Kinani <i>et al.</i> 2010)	Activité luciférase	Androgènes : testostérone, trenbolone Anti-androgènes : pesticides, alkylphénols, bisphénol A glucocorticoïdes : pharmaceutiques de type corticostéroïdes (dexaméthasone, cortisone,...)	INERIS
Récepteur de la dioxine (AhR)	Cellules PLHC-1 (Louiz <i>et al.</i> , 2008, Kinani <i>et al.</i> 2010)	Activité EROD	Dioxines et dioxin-like, HAPs, PCBs coplanaires...	
Génotoxicité	SOS Chromotest (Quillardet <i>et al.</i> , 1982)	Induction du gène SfiA	Génotoxiques et pro-génotoxiques : HAP, HAP nitrés, amines aromatiques, nitrosamines, certains pesticides et solvants organochlorés, métaux lourds, anticancéreux	LPTC-EPOC

Résultats bioessais *in vitro* dans effluents liquides

Echantillons		Estrogènes	Androgènes	Anti-androgènes	Thyroïdiens	HAP-like	Dioxin-like	SOS (-S9)	SOS (+S9)	SOS (-S9)	SOS (+S9)
		E2-Eq	DHT-Eq	Flu-Eq	T3-Eq	BaP-Eq	TCDD-Eq	NQO-Eq	BaP-Eq	Cytotox	Cytotox
		ng/L	ng/L	µg/L	ng/L	µg/L	ng/L	µg/L	µg/L	-	-
Ozoneur ASE1-PA4	Blanc Evian	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	-	-
	Eau d'entrée ozoneur	< 0,42	14	n.d	n.d	< 0,4	n.d	2,8	28	+	+
	Eau sortie ozoneur/Entrée CA	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	11	-	-
	Eau sortie CA	n.d	18	n.d	n.d	< 0,4	n.d	1,3	15	+	-
	LD/LQ	0,17	2,3	3,2	12,9	0,1	2,1				
CA ASE3-PA2&3	Blanc	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	-	-
	Blanc	21,2*	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	-	-
	Eau d'entrée CA	3,2	n.d	n.d	n.d	0,88	n.d	2,6	n.d	+	+
	Eau de sortie CA	n.d	n.d	n.d	n.d	0,58	n.d	n.d	n.d	-	-
	LD	0,3	2,3	3,2	12,9	0,1	2,1				
Ozoneur + CA ASE-PA-ECH1	Blanc SPMD (amont)	n.d	n.d	n.d	n.d	0,57	n.d	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	Blanc SPMD (aval)	< 0,1	n.d	n.d	n.d	0,51	n.d	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	SPMD amont	1,03	n.d	3,596	n.d	1,24	n.d	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	SPMD aval	0,49	n.d	3,602	n.d	0,53	n.d	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	LD	0,04	0,3	0,41	3,4	0,02	0,27				
Peroxone UV ASE2-PA2&3	Blanc	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	-	-
	Entrée Peroxone 1/1	3,2	n.d	n.d	< 26,3	n.d	n.d	2,7	22	+	+
	Sortie Peroxone 1/1	n.d	n.d	n.d	< 26,3	n.d	n.d	n.d	n.d	+	-
	Entrée UV/Peroxyde 1 et 2	4,4	n.d	n.d	n.d	3,2	n.d	n.d	n.d	-	-
	Sortie UV/Peroxyde 1 et 2	n.d	n.d	n.d	n.d	0,6	n.d	n.d	n.d	+	-
LD	0,3	2,3	3,2	12,9	0,1	2,1					

⇒ Activité oestrogéno-mimétique faible en entrée

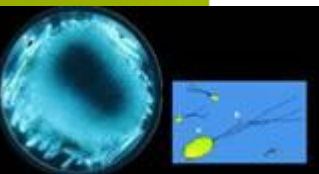
Faibles activités HAP-like ⇔ faibles [HAP]

+ génotoxicité et cytotoxicité en entrée
-génotoxicité -cytotoxicité en sortie

CA = charbon actif

Mesures de toxicité *in vivo* pour eaux et boues

✓ Prévu sur 4 sites, (3 procédés avancés intensif des eaux et le procédé extensif de type lagune), campagnes sur 1 mois



Bio-test	Laboratoire/ex situ	Compartiment	Référence	Durée	Réponses étudiées	Partenaire
<i>Bactérie Vibrio fischeri (Test Microtox)</i>	laboratoire	Effluent / Eluat de boue	NF EN ISO 11348-3	1h	Toxicité aiguë (réduction de la bioluminescence)	LPTC-EPOC
<i>Micro-algue Pseudokirchneriella subcapitata</i>	laboratoire	Effluent / Eluat de boue	NF EN ISO 8692	3j	Croissance de la population	INERIS
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	laboratoire	Effluent / Eluat de boue	NF ISO 20665	7j	Reproduction	INERIS
Avoine	laboratoire	Boue	ISO /DIS 11269-1	4j	Elongation racinaire	INERIS
Avoine / cresson	laboratoire	Boue	NF ISO 11269-2	18j	Emergence et croissance des parties aériennes	INERIS
Gammaré <i>G.fossarum</i>	<i>Ex situ</i>	Effluent	Gerrard et al. accepted Xuereb et al., 2009	30j	Survie Croissance Reproduction Taux d'alimentation	Irstea
Insecte <i>Chironomus riparius</i>	<i>Ex situ</i>	Effluent	AFNOR T90-339-1	30j	Survie Croissance Emergence	Irstea
Mollusque <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	<i>Ex situ</i>	Effluent	Duft et al., 2007	30j	Survie Croissance Reproduction	Irstea
Embryons et larves du Poisson <i>Oryzias latipes</i>	<i>Ex situ</i>	effluent	Cachot et al., 2007	20 à 30 j	Survie, croissance, taux d'éclosion, durée du développement, malformations, dommages à l'ADN	LPTC-EPOC

Campagne d'1 mois sur site

Résultats pour les effluents

* Tests *ex situ* (2 campagnes longues) :


Boues activées/Filtre à sable + Ozonation + Charbon actif

Gammarus fossarum
Potamopyrgus antipodarum
Chironomus riparius
Ozyrias latipes (œufs)

Très peu d'effet toxique sauf,

1/ Oeufs d'*O latipes* ⇒ taux et taille d'éclosion ▼ en amont, pas en aval (2011 et 2012)

2/ *G fossarum* ⇒ taux d'alimentation induit aux fortes conc. (2011/amont)

* Tests en laboratoire (campagnes courtes) : très peu d'effet toxique sauf,

3/ Induction reproduction *C. dubia* aux fortes conc. (2011/amont et 2012/amont + aval)

4/ Induction reproduction *B. calyciflorus* aux fortes conc. (2012/amont + aval)

5/ Toxicité sur *V fisheri* (Microtox) ↗ après ozonation (2012/aval)

Résultats pour les boues

Stratégie double:

Une approche directe

Croissance racinaire d'avoine (NF ISO 11269-1)

Emergence et de croissance d'avoine et de cresson (NF ISO 11269-2)

Une approche indirecte (lixiviation de la boue L/S = 10 (24 h))

Croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata*

Reproduction de *Ceriodaphnia dubia*

Mobilité de *Daphnia magna*

Reproduction de *Brachionus calyciflorus*

Tests mis en œuvre lors de **2 campagnes** (séchage solaire et compostage) :

- Test d'élongation racinaire : donne la même information que les autres tests
➔ pertinent pour une mise en place en routine (rapide et simple)
- Test de reproduction chez *B. calyciflorus* ➔ le plus sensible des tests aquatiques
- Aucune différence de toxicité avant et après séchage solaire
- Diminution significative de la toxicité des boues après compostage montrée par tous les biotests (il faut vérifier l'effet dilution par apport de complément carboné via les déchets verts et résidus de bois)

Conclusions et perspectives

- Molécules ciblées ➔ molécules pertinentes à sélectionner
- Screening chimique ➔ LC et GC-HRMS (TOF) + éch. identifiés toxiques à analyser (démarche EDA) ➔ quantification des molécules bioactives et liste molécules pertinentes à compléter
- Biotests *in vivo* et *in vitro* ➔ très faibles niveaux d'activité détectés dans les eaux
 - ➔ l'approche EDA (Effect Directed Analyses) devra être limitée à des boues et échantillonneurs intégratifs (toxicité significative)
 - ➔ étudier la bioaccumulation *in vivo* pour les eaux
- Echantillonneurs intégratifs ➔ premiers résultats prometteurs, effet de concentration confirmé pour l'analyse ciblée et les biotests *in vitro*

Actions de communication

- Un site web bientôt accessible
- Présentation des résultats dans des colloques internationaux
 - 9th GCxGC Symposium, May 27-June 1st, 2012, Riva des Garda, Italy
 - Norman workshop, November 29,30th, 2012, Amsterdam, The Netherlands
 - the 8th Micropol & Ecohazard, June 17-19th, 2013 Zurich, Switzerland
- Un colloque de restitution final prévu en 2014
- Un numéro spécial sur les résultats du projet ECHIBIOTEB dans le journal *Environmental Science and Pollution Research* (<http://www.springer.com/environment/journal/11356>, IF = 2.87) est en cours de discussion pour une publication début 2015



**Merci pour
votre attention**