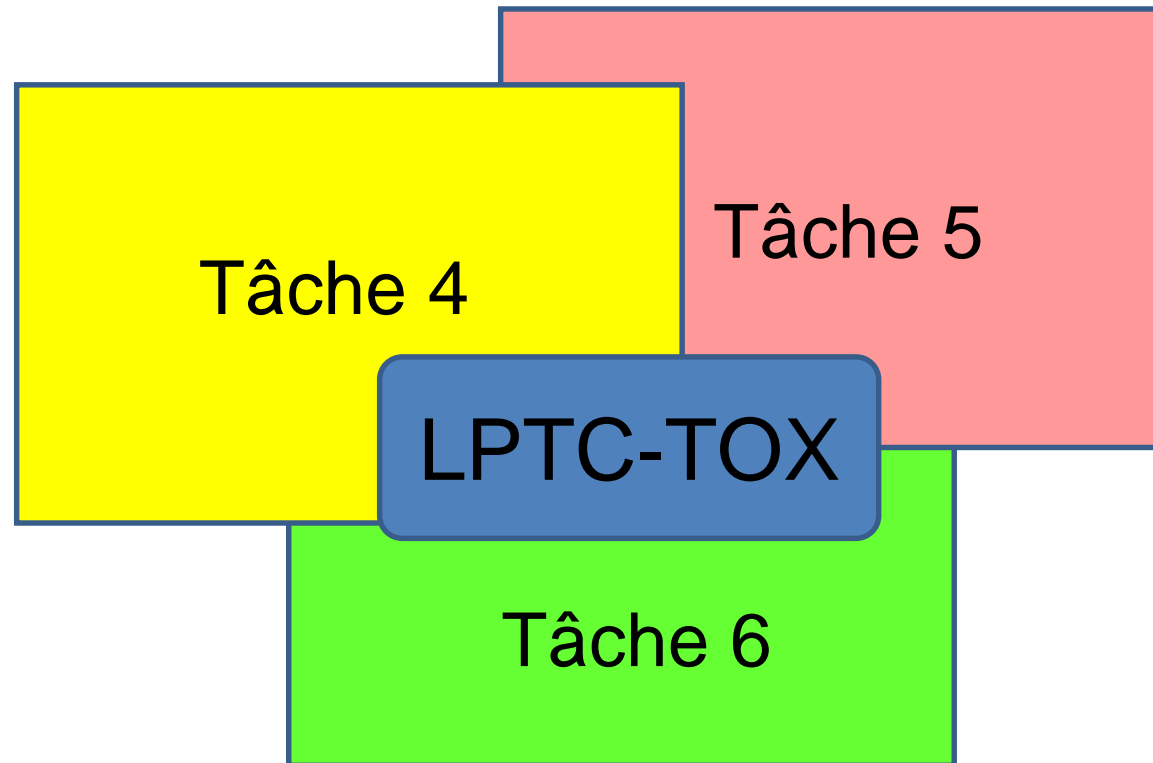


Projet ECHIBIOTEB (2011-2013) - Réunion d'avancement -

Paris 16 mai 2012



Equipe Toxicologie Environnementale



Equipe Toxicologie Environnementale

Tâche 4 : Détection de molécules biologiquement actives dans les eaux et les boues avant et après traitement au moyen d'une batterie de tests in vitro

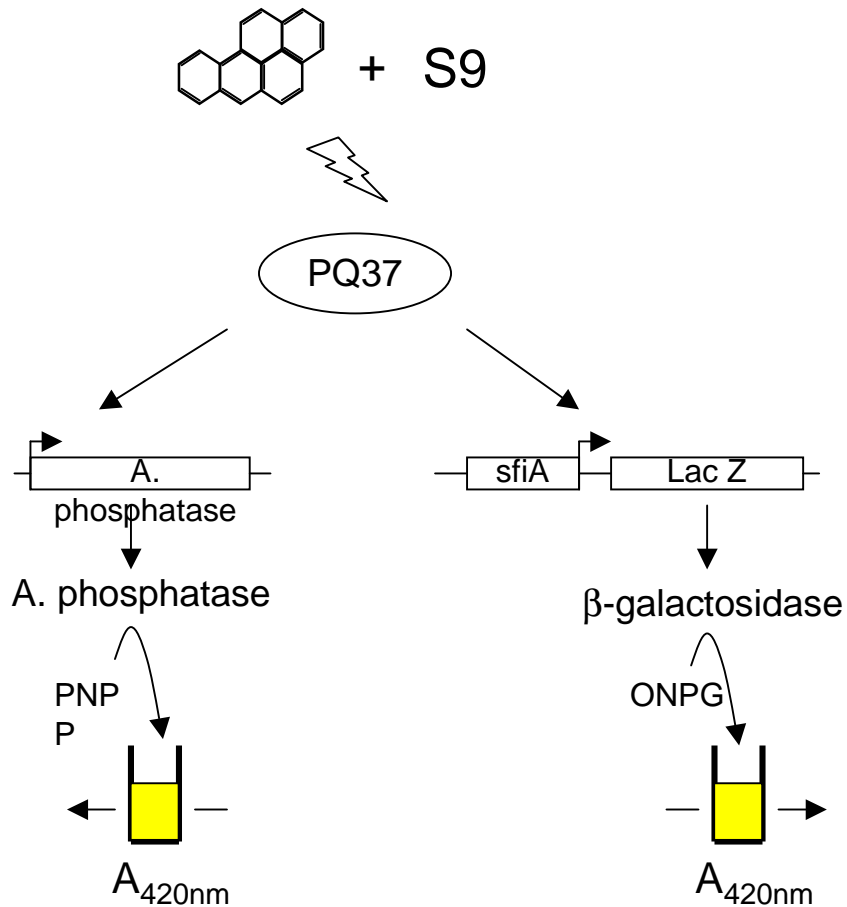
Coordination : Sélim Aît Aïssa (INERIS)

Participants : INERIS, UMR8079, LPTC-TOX

LPTC -TOX : détection des génotoxiques directs et des pro-génotoxiques au moyen du SOS-Chromotest (version en microplaques) sur eau brute ou extrait organique.

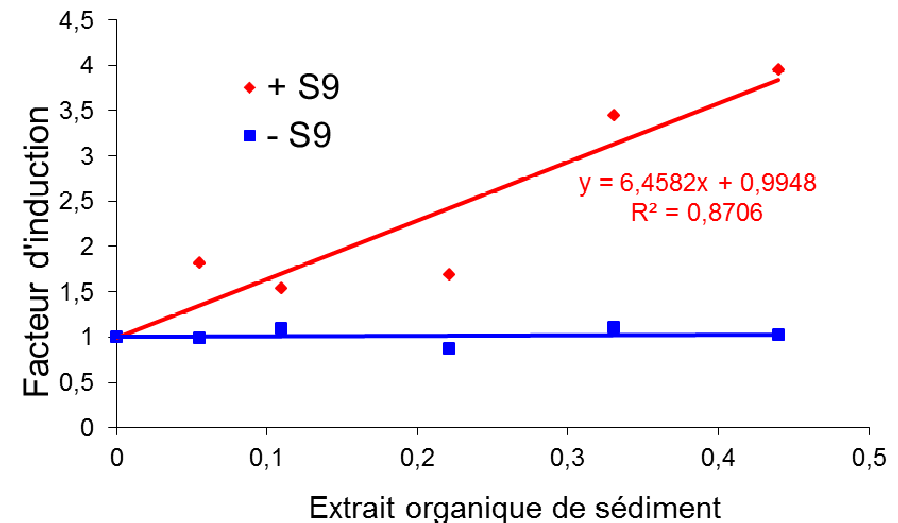


SOS Chromotest (Quillardet et al., 1982)



$$I = \frac{[\beta\text{-gal. / A. phosph.}]_{\text{essai}}}{[\beta\text{-gal. / A. phosph.}]_{\text{témoin}}}$$

Test de génotoxicité *in vitro* sur une souche modifiée de *E. coli* PQ37. Ce test permet la mesure indirecte des dommages à l'ADN par la mesure du niveau d'induction du gène de réparation SfiA.



Campagne ASE1-PA4

ng EQ NQO/ml eau ou ng EQ BaP / ml eau)

Nomenclature	Date de réception au labo	Echantillon	Génotoxique Direct (sans S9)	Cytotoxicité	Génotoxique indirect (Avec S9)	Cytotoxicité
ECH-08-SPE	05/07/11	Extrait SPE eau evian (protocole eau entrée)	-	-	-	-
AMQ-041-SPE	05/07/11	Extrait SPE-Entrée de l'Ozoneur	2,8	+	15	+
AMQ-039-SPE	05/07/11	Extrait SPE-Sortie Ozoneur-Entrée de colonne CA	-	-	11	-
AMQ-040-SPE	05/07/11	Extrait SPE- Sortie de colonne CA	1,3	+	28	-

Campagne ASE2-PA2 et 3

ng EQ NQO/ml eau ou ng EQ BaP / ml eau)

Nomenclature	Date de réception au labo	Echantillon	Génotoxique Direct (sans S9)	Cytotoxicité	Génotoxique indirect (Avec S9)	Cytotoxicité
Blanc AMQ 118, 119, 120, 121	10/04/12	Extrait SPE eau evian (protocole eau entrée)	-	-	-	-
Blanc ECH-100	10/04/12	Extrait SPE eau evian (protocole eau entrée)	-	-	-	-
Blanc ECH-101	10/04/12	Extrait SPE eau evian (protocole eau sortie)	-	-	-	-
AMQ-118	10/04/12	Extrait SPE-Entrée Peroxone 1/1	2,7	+	22	+
AMQ-119	10/04/12	Extrait SPE-Sortie Peroxone 1/1	-	+	-	-
AMQ-120	10/04/12	Extrait SPE-Entrée UV/Peroxyde 1 et 2	-	-	-	-
AMQ-121	10/04/12	Extrait SPE-sortie UV/Peroxyde 1	-	+	-	-
ECH-100	10/04/12	Extrait SPE-Eau Industrielle/Entrée charbon actif	2,6	+	-	+
ECH-101	10/04/12	Extrait SPE-Sortie charbon actif	-	-	-	-

Equipe Toxicologie Environnementale

Tache 6 : Caractérisation des performances des procédés de traitement par l'évaluation de la toxicité in vivo des boues et des eaux avant et après traitement

Coordination : Olivier Geffard (Cemagref)

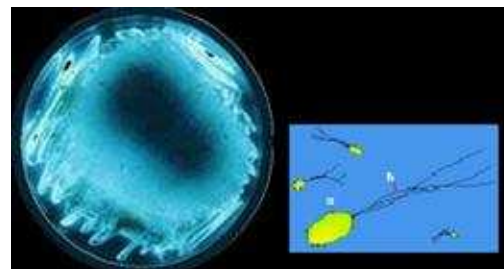
Partenaires : Cemagref, Ineris, LPTC-TOX

LPTC-TOX : test Microtox ® et test embryo-larvaire médaka (ELM) sur eau avant et après traitement (ex situ ou en laboratoire?)

Test Microtox® (NF EN ISO 11348-3)

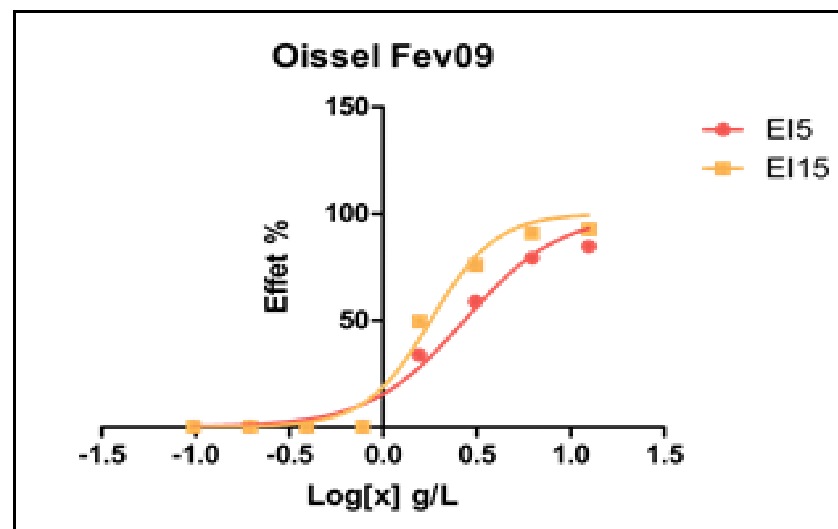
Le test Microtox® un test de toxicité aiguë qui consiste à mesurer la bioluminescence (à 490 nm) d'une culture bactérienne de *Vibrio fischeri* exposée à une substance pure ou en mélange ou à un échantillon environnemental. L'inhibition de la luminescence est directement proportionnelle à la toxicité de la substance testée. Cette toxicité est estimée par la valeur de CE_{50} .

Courbe dose-réponse typique obtenue sur un extrait organique de sédiment de Seine



Bactérie
Vibrio
fischeri

Luminomètre
Microtox ®
500



Test Microtox® sur eaux de STEP

Protocole : 100% test protocole

Gamme de dilutions : 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 et 6,25%

Diluant : NaCl 0,2%

Temps de contact : 30 minutes

Campagne ASE PA-ECH 2- J0

Nomenclature	Echantillon	CE50 _{30mn}	Interprétation
ECH-200a	BSM – eau industrielle – Entrée ozoneur Soluble (après filtration)-J0	> 100%	-
ECH-200b	BSM – eau industrielle – Entrée ozoneur Soluble (après filtration)-J0	> 100%	-
ECH-201a	BSM – eau industrielle – Sortie ozoneur Soluble (après filtration)-J0	>38%	+
ECH-201b	BSM – eau industrielle – Sortie ozoneur Soluble (après filtration)-J0	>44%	+

Toxique (+) Non Toxique (-)

- Les échantillons ECH-200a et ECH-200b prélevés en amont de l'ozoneur ne présentent pas de toxicité vis-à-vis de *Vibrio fischeri* (CE50_{30mn}>100%).
- Les échantillons ECH-201a et ECH-201b prélevés en aval de l'ozoneur présentent une toxicité aiguë sur la souche bactérienne *Vibrio fischeri*

Campagne ASE –PA-ECH 2- J14

Nomenclature	Echantillon	CE50 _{30mn} CE50 et intervalle de confiance	Interprétation
ECH-210	BSM – eau industrielle – Entrée ozoneur Soluble (après filtration)-J14	> 100%	-
ECH-211	BSM – eau industrielle – Sortie ozoneur Soluble (après filtration)-J14	55,1 (50,0-60,8)	+

Toxique (+) Non Toxique (-)

- L'échantillon ECH-210 en entrée de l'ozoneur ne présente pas de toxicité vis-à-vis de *Vibrio fischeri* (CE50_{30mn} > 100%)
- L'échantillon ECH-211 en sortie de l'ozoneur présente une toxicité aiguë sur la souche bactérienne *Vibrio fischeri* avec une CE50_{30mn} de 55,1(50,0-60,8) en % d'échantillon testé.

Campagne ASE –PA-ECH 2- J28

Nomenclature	Date prélèvement	Nature de l'échantillon	Echantillon	CE50 _{30mn} en% échantillon ou CE50 et intervalle de confiance	Interprétation
ECH-220a	10/04/12	Eau Fraiche	BSM – eau industrielle – Entrée ozoneur Soluble (après filtration)- J28-matin	> 100%	-
ECH-220b	10/04/12	Eau Fraiche	BSM – eau industrielle – Entrée ozoneur Soluble (après filtration)- J28-après-midi	> 100%	-
ECH-221a	10/04/12	Eau Fraiche	BSM – eau industrielle – Sortie ozoneur Soluble (après filtration)- J28-matin	> 100%	-
ECH-221b	10/04/12	Eau Fraiche	BSM – eau industrielle – Sortie ozoneur Soluble (après filtration)- J28-après-midi	> 100%	-

Toxique (+) Non Toxique (-)

- Pas de toxicité mesurée mais échantillons arrivés après 72h de transport

Toxicité des eaux au bout de 72h à T° ambiante

Nomenclature	Date prélèvement	Nature de l'échantillon	Temps (en h) entre prélèvement et Microtox	Echantillon	CE50 _{30mn} en% échantillon ou CE50 et intervalle de confiance	Interprétation
ECH-201a	13/03/12	Eau Fraiche	24h	BSM – eau industrielle – aval ozoneur Soluble (après filtration)-J0-matin	>38%	+/-
ECH-201a	13/03/12		Environ 72h	BSM – eau industrielle – aval ozoneur Soluble (après filtration)-J0-matin	> 100%	-
ECH-201b	13/03/12	Eau Fraiche	24h	BSM – eau industrielle – aval ozoneur Soluble (après filtration)-J0 après-midi	>44%	+/-
ECH-201b	13/03/12		Environ 72h	BSM – eau industrielle – aval ozoneur Soluble (après filtration)-J0 après-midi	> 100%	-
ECH-211	27/03/12	Eau Fraiche	24h	BSM – eau industrielle – Aval ozoneur Soluble (après filtration)-J14	55.1 (50.0-60.8)	+
ECH-211	27/03/12		Environ 72h	BSM – eau industrielle – Aval ozoneur Soluble (après filtration)-J14	> 100%	-

Microtox ® sur échantillons de boue

Essai Microtox® en « phase solide » (Environnement Canada, rapport SPE1/RM/24 1992) pour l'évaluation de substances toxiques présentes dans des sédiments ou des sols et susceptibles de passer dans la phase aqueuse.

Préparation des éluviats de sédiment

- 1) Agitation 15 minutes à 300tr/min
- 2) Centrifugation à 3000 g pendant 10 mn à 15°C
- 3) Contrôle du pH
- 4) Test Microtox® sur 4 concentrations d'élutriat après 30 min de contact :
100, 50, 25, 12,5, 6,5% dans NaCl à 0,2%

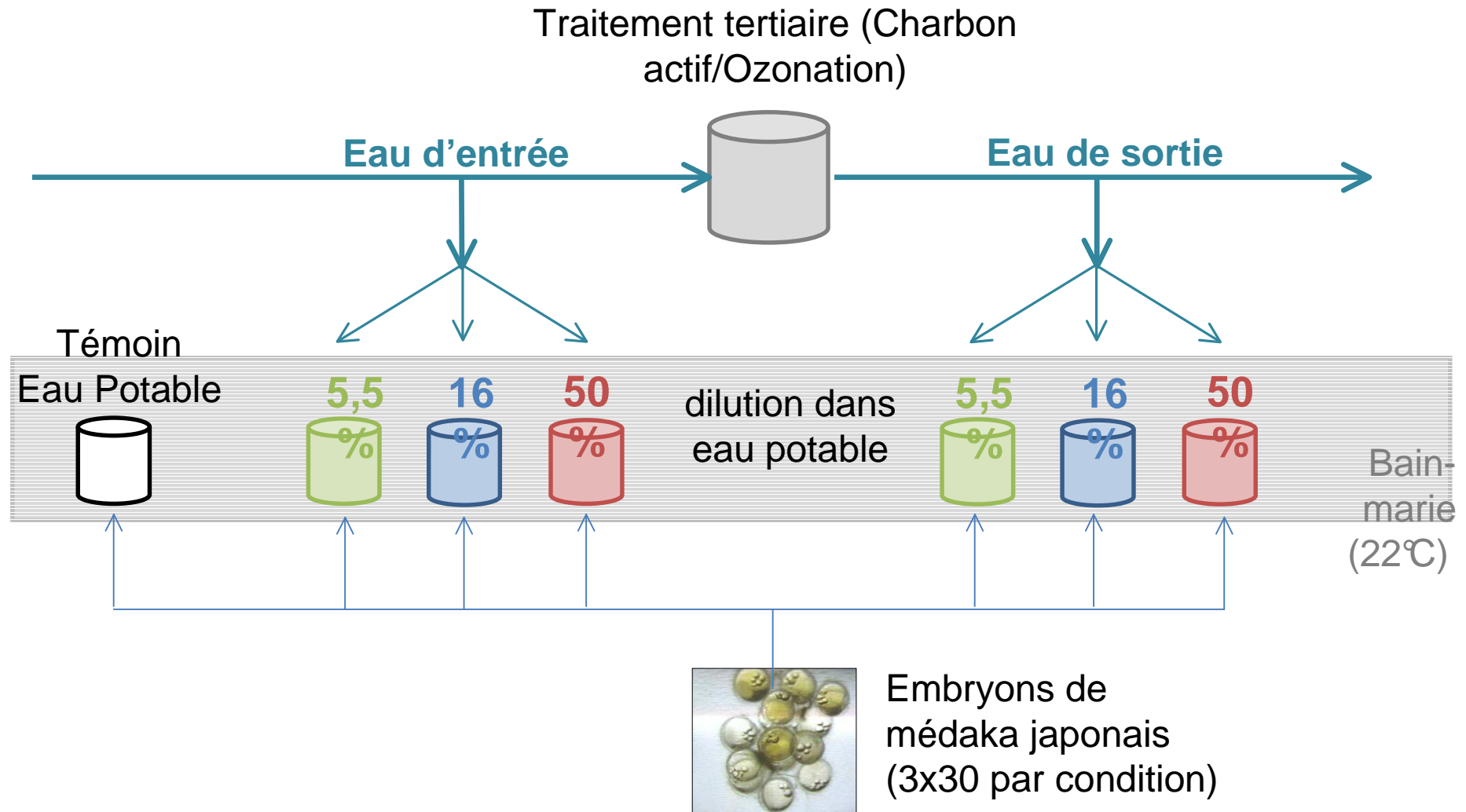
Campagne ASE5-Boue Moulin sous Touvent

Nomenclature	Date prélèvement	Nature de l'échantillon	Echantillon	CE50 _{30mn} en mg/ml et intervalle de confiance	Interprétation
AMQ-76 entrée compostage	27/06/11	Boue congelée	AMQ-76 Entrée compostage ASE5-Boue Moulin sous Touvent	6,5 (5,0-8,4)	++
AMQ-87 Sortie compostage	23/08/11	Boue congelée	AMQ-87 Sortie compostage ASE5-Boue Moulin sous Touvent	31,0 (27,6-34,7)	+

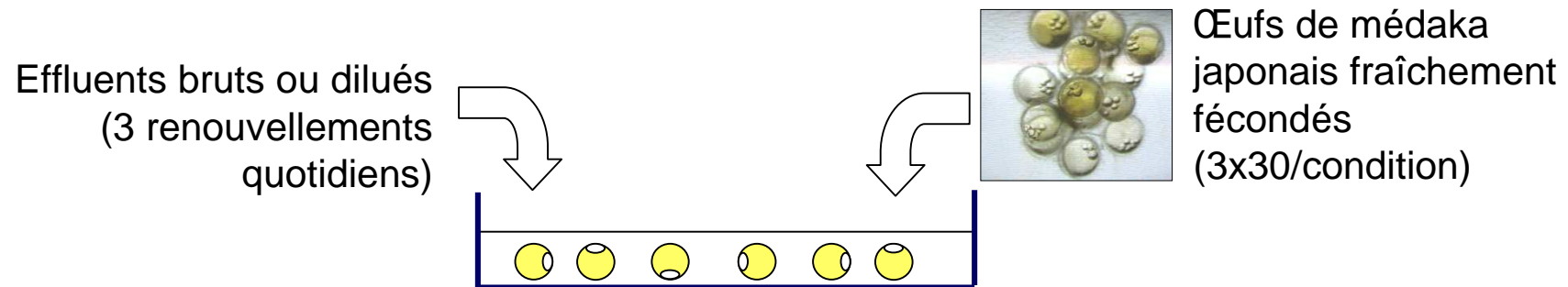
Toxique (+) Non Toxique (-)

- Les deux échantillons de boue présentent une toxicité vis-à-vis de *Vibrio fischeri*

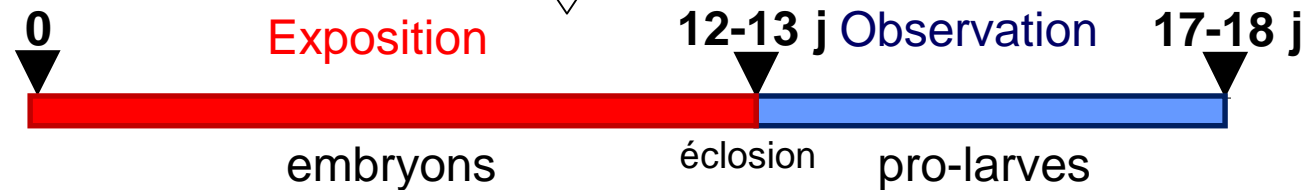
Dispositif expérimental pour l'évaluation de l'efficacité des traitements tertiaires sur organismes aquatiques



Test Embryo-Larvaire Médaka (ELM)



12 j d'exposition $T^{\circ} = 21-22^{\circ}\text{C}$
Photopériode 12h/12h

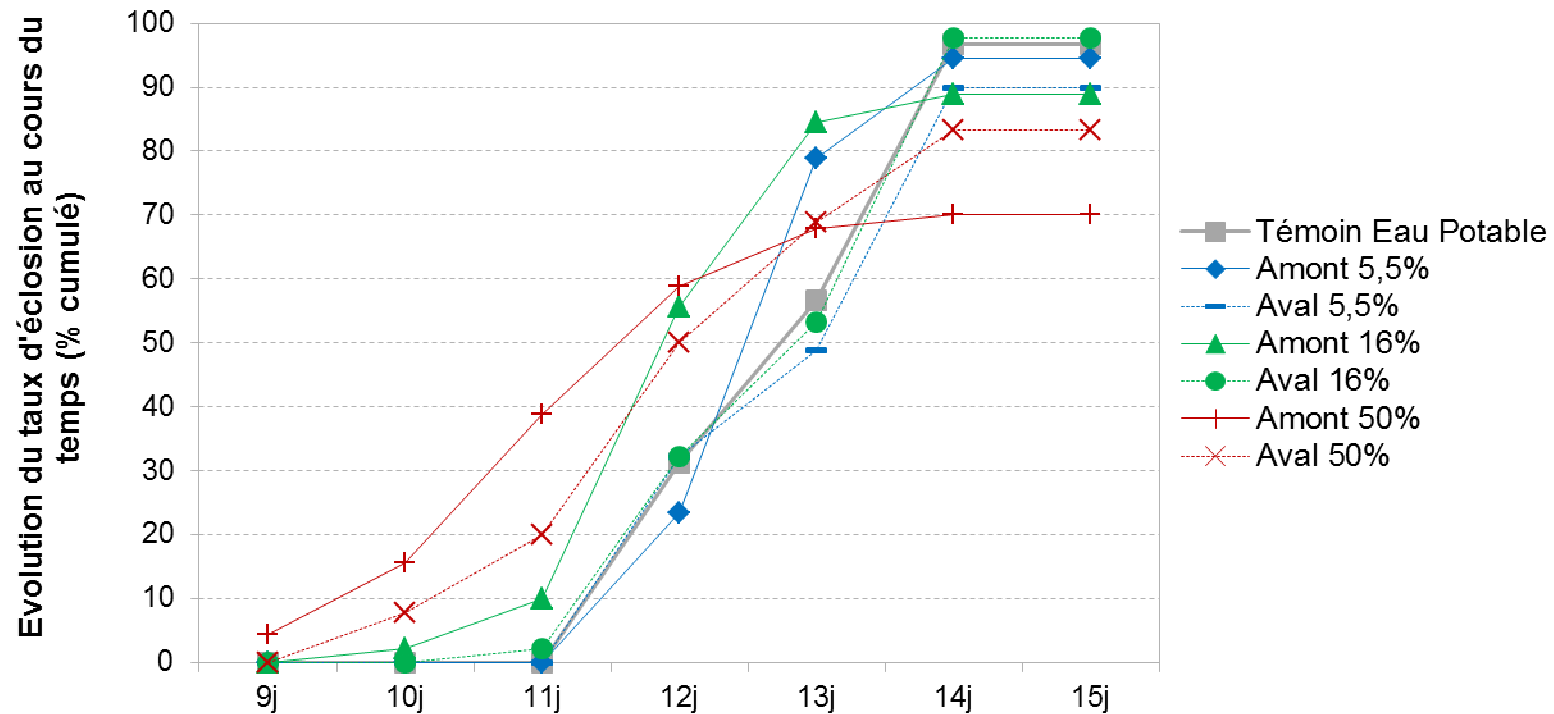


Analyse des effets biologiques induits : mortalité embryonnaire, mortalité larvaire, durée de développement, taux d'éclosion, malformations squelettiques et cardiaques, taille des larves à l'éclosion

Entrée/sortie charbon actif

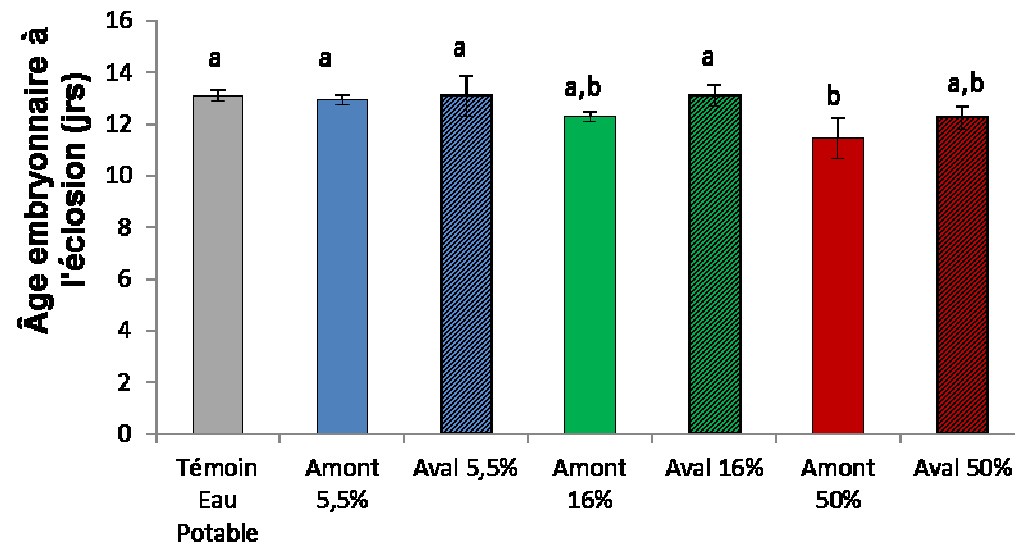
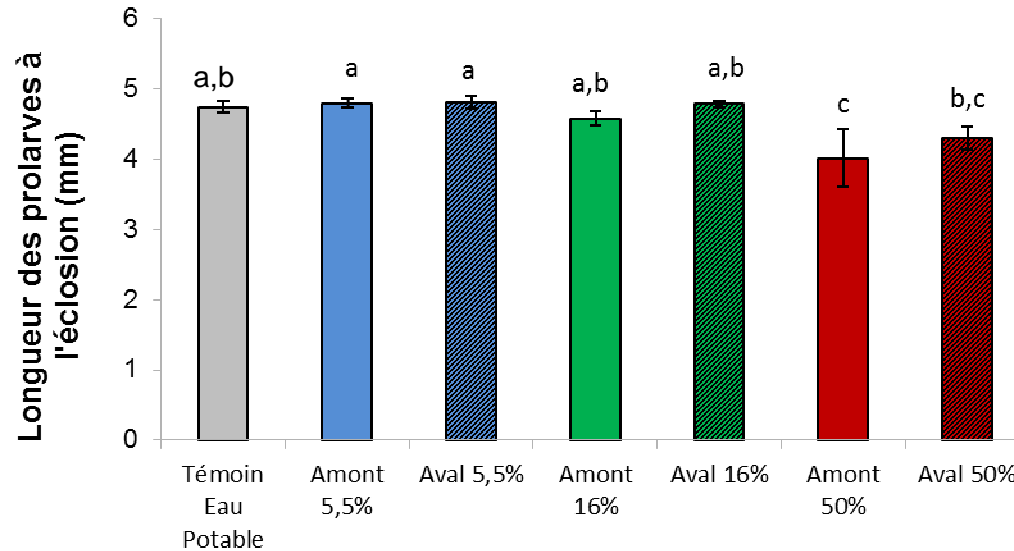
	Viabilité Embryonn aire	Viabilité Larvaire	Taux d'éclosion	Âge à l'éclosion	Pourcenta ge d'individu s malformés	Longueur des prolarves à l'éclosion
Amont 5,5%	—	—	—	—	—	—
Aval 5,5%	—	—	—	—	—	—
Amont 16%	—	—	—	—	—	—
Aval 16%	—	—	—	—	—	—
Amont 50%	—	—	—	↓ p= 0,016	—	↓ p= 0,002
Aval 50%	—	—	—	p= 0,428	—	p= 0,089

Entrée/sortie Charbon actif



- Durée de développement conforme ($T_{1/2} = 11$ à $13j$)
- Taux d'éclosion 90 à 100% sauf pour Eau amont 50% (70%) et Eau aval 50% (85%)

Entrée/sortie charbon actif

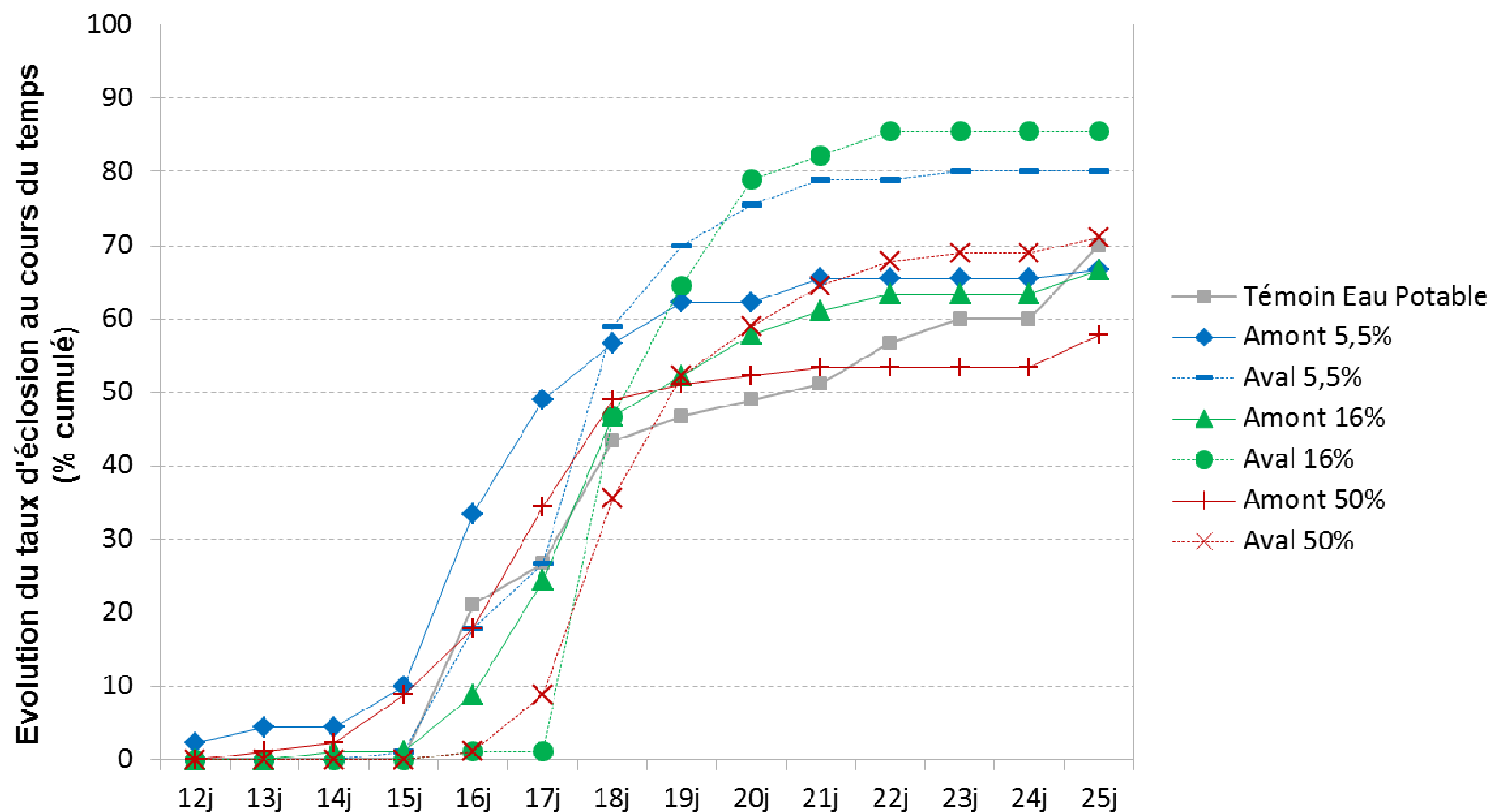


- Taille des larves à l'éclosion significativement plus réduite (-0,73 mm) pour le traitement Eau amont 50%
- Pas d'effet significatif sur la croissance pour le traitement Eau aval 50%
- Durée significativement plus réduite du développement embryonnaire (-1,66j) pour le traitement Eau amont 50%
- Pas d'effet significatif sur la durée du développement pour le traitement Eau aval 50%

Entrée/sortie ozonation

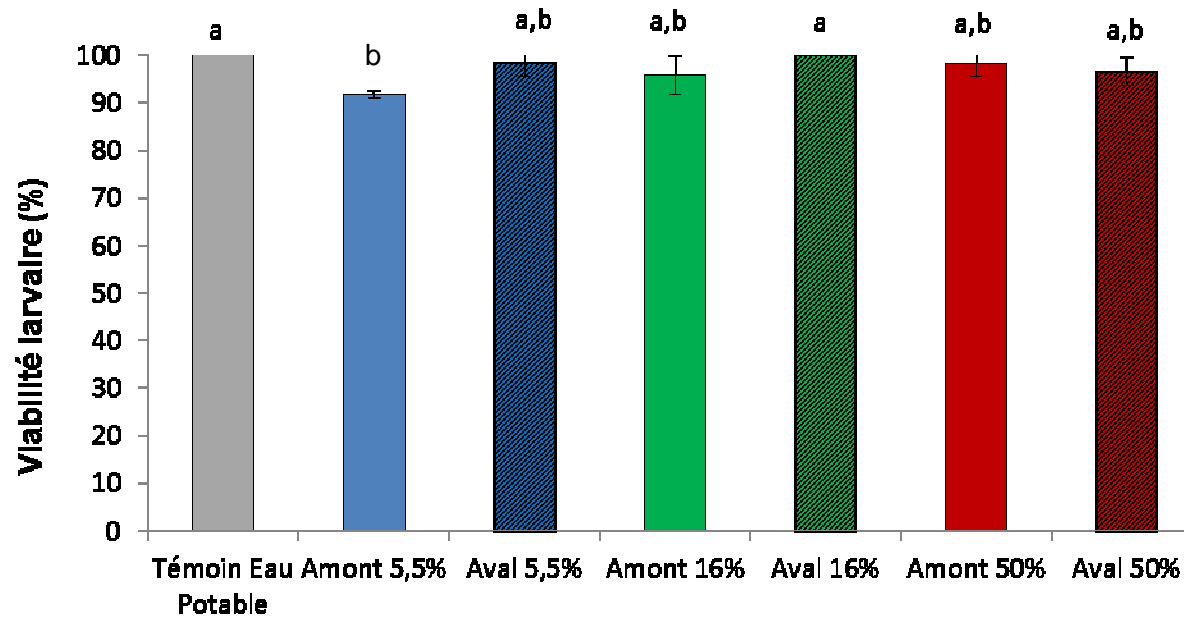
	Viabilité Embryonnaire	Viabilité Larvaire	Taux d'éclosion	Âge à l'éclosion	Pourcentage d'individus malformés	Longueur des prolarves à l'éclosion
Amont 5,5%	—	↓ p= 0,013	—	↓ p= 0,006	—	↓ p= 0,049
Aval 5,5%	—	p= 0,976	—	p= 0,379	—	p= 0,403
Amont 16%	—	—	—	—	—	↓ p= 0,033
Aval 16%	—	—	—	—	—	p= 0,087
Amont 50%	—	—	—	—	—	↓ p= 0,035
Aval 50%	—	—	—	—	—	p= 0,188

Entrée/Sortie ozonation



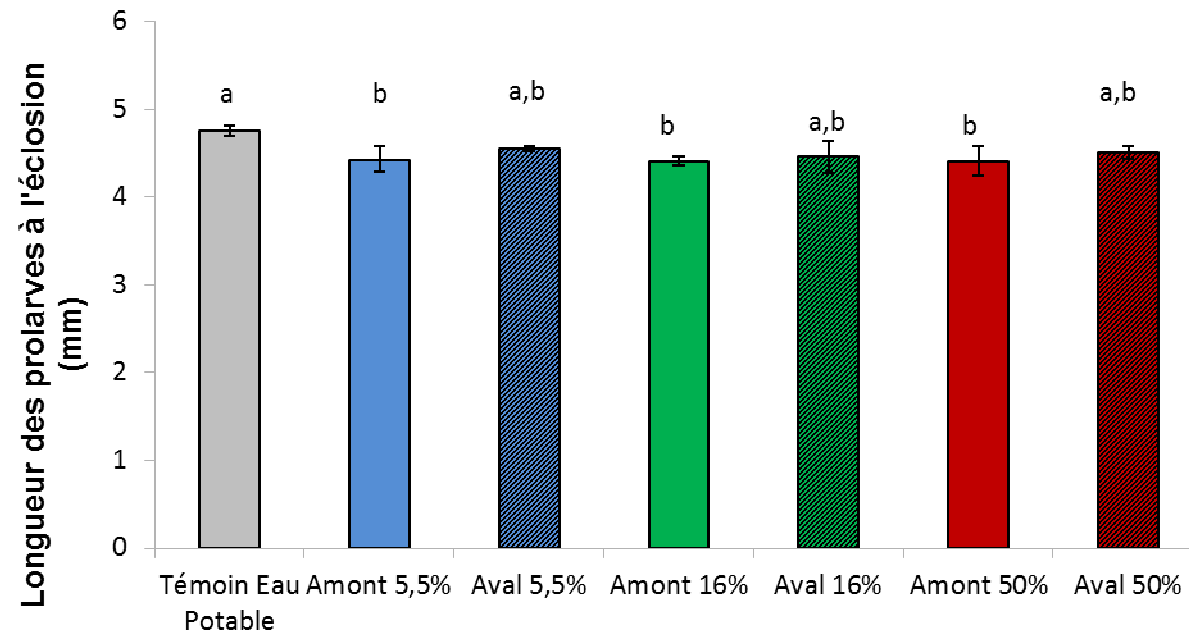
- Important retard d'éclosion pour toutes les conditions ($T_{1/2}=18-19j$)
- Taux d'éclosion plus réduit qu'attendu (60 à 85%)

Entrée/Sortie ozonation



- Viabilité larvaire moindre pour le traitement eau amont 5,5%

Entrée/sortie ozonation



- Taille des larves significativement plus réduite sur toutes les conditions Eau amont quelle que soit la dilution
- Pas d'effet sur la croissance pour les conditions Eau aval quelle que soit la dilution

Conclusions

1. Sensibilité des bioessais in vivo utilisés : Microtox et test ELM
2. Globalement faible toxicité des échantillons d'eau (en entrée)
3. Plus forte toxicité des échantillons de boue
4. Efficacité du charbon actif et de l'ozonation pour l'abattement de la toxicité sur embryons de médaka
5. Toxicité de résidus de l'ozonation sur la bactérie *Vibrio fischeri* ?