

## Compte-rendu intermédiaire

**Projet ANR- 10-ECOT-005-01**

# **ECHIBIOTEB**

Programme ECOTECH 2010

<b>A</b>	<b>IDENTIFICATION .....</b>	<b>2</b>
<b>B</b>	<b>LIVRABLES ET JALONS .....</b>	<b>3</b>
<b>C</b>	<b>RAPPORT D'AVANCEMENT .....</b>	<b>8</b>
C.1	Objectifs initiaux du projet. ....	8
C.2	Travaux effectués et résultats atteints sur la période concernée... 9	9
C.3	Difficultés rencontrées et solutions .....	21
C.4	Faits et résultats marquants .....	22
C.5	Travaux spécifiques aux entreprises (le cas échéant).....	22
C.6	Réunions du consortium (projets collaboratifs) .....	23
C.7	Commentaires libres.....	23
<b>D</b>	<b>VALORISATION ET IMPACT DU PROJET DEPUIS LE DEBUT.....</b>	<b>24</b>
D.1	Publications et communications .....	24
D.2	Autres éléments de valorisation .....	25
D.3	Pôles de compétitivité (projet labellisés) .....	26
D.4	Personnels recrutés en CDD (hors stagiaires) .....	26
D.5	État financier.....	26
<b>E</b>	<b>ANNEXES .....</b>	<b>27</b>
E.1	Annexe 1 : Campagnes réalisées pendant la période de mai 2011 à avril 2012 sur des procédés eaux et boues .....	27
E.2	Annexe 2 : Liste des molécules ciblées dans le projet .....	31
E.3	Annexe 3 : Analyse des molécules cibles (tâche 2).....	34
E.4	Annexe 4 : Batterie de bioessais utilisés dans la tâche 4 .....	44
E.5	Annexe 5 : Activités toxicologiques en toxique-équivalents (Tox-Eq) mesurées dans les extraits d'eaux et de SPMD.....	45
E.6	Annexe 6 : Synthèse des essais <i>in vivo</i> qui seront mis en œuvre pour l'évaluation de la toxicité des eaux et des boues avant et après traitement .....	46

E.7 Annexe 7 : Taux d'alimentation (mm<sup>2</sup>/gammare/jour ; moy ± E.T ; n = 6) des organismes exposés aux différentes concentrations des eaux en amont et aval du traitement tertiaire (ozonation + charbon actif)..... 47

E.8 Annexe 8 : Réponses toxiques significatives des embryons de médaka exposés à des eaux en amont ou en aval du traitement tertiaire (ozonation + charbon actif)..... 47

E.9 Annexe 9 : Principe du test de Caractérisation *in situ* des interactions entre matière organique et micropolluants ..... 48

## A IDENTIFICATION

Acronyme du projet	<b>ECHIBIOTEB</b>
Titre du projet	Outils innovants d'Echantillonnage, d'analyses <b>CHI</b> miques et <b>BIO</b> logiques pour le suivi de <b>T</b> raitements avancés des <b>E</b> aux usées et des <b>B</b> oues
Coordinateur du projet (société/organisme)	Irstea (Cemagref ) Cécile Miège
Date de début du projet Date de fin du projet	17 mars 2011 16 mars 2014
Labels et correspondants des pôles de compétitivité (pôle, nom et courriel du corresp.)	Pôle de compétitivité AXELERA
Site web du projet, le cas échéant	<a href="https://echibioteb.cemagref.fr/">https://echibioteb.cemagref.fr/</a> (encore en construction, ouvert au public à l'automne 2012)

Rédacteur de ce rapport	
Civilité, prénom, nom	Cécile Miège
Téléphone	Tel : +33 (0)4 72 20 87 44
Courriel	cecile.miege@irstea.fr
Date de rédaction	Juin 2012
Période faisant l'objet du rapport d'activité	Janvier 2011 à Juin 2012

## B LIVRABLES ET JALONS

Tâches et livrables	Année 1	Année 2	Année 3	Degré d'avancement / Commentaires
<b>Tâche 1. Coordination du projet et harmonisation des méthodes</b>				
<b>Livrable 1</b> : Planning définitif des campagnes du projet.	▲	□		80% : 9 campagnes réalisées, 2 planifiées fin 2012, 2 restant à planifier en 2013 (premier semestre) Il est finalement difficile d'acter sur un planning définitif en début de projet (aléas dus à l'implication de nombreux partenaires, i.e. ceux du projet et les gestionnaires des stations d'épuration). Le planning est donc calé au fur et à mesure de l'avancée du projet.
<b>Livrable 2</b> : Cahier des charges pour l'organisation des campagnes <i>in situ</i> , la préparation et la distribution des échantillons et des extraits.	▲□			100 % La version actuelle est cependant susceptible d'être mise à jour.
<b>Livrable 3</b> : Accord de consortium pour fixer la stratégie de valorisation et le mode de protection et d'exploitation des résultats.	▲	□		En cours de signature.
<b>Tâche 2 : Caractérisation chimique ciblée des eaux et boues avant et après traitement</b>				
<b>Livrable 4</b> : Choix définitif des sites et traitements optimisés pour la mise en œuvre des outils innovants chimiques et biologiques	▲	□		80% : Idem Livrable 1.
<b>Livrable 5</b> : Résultats des analyses chimiques ciblées sur les différentes campagnes pour les traitements avancés		▲	□	50% Traitement et interprétation des résultats en cours. Les dernières analyses seront réalisées en début d'année 3 compte tenu que les dernières campagnes seront organisées début 2013.
<b>Livrable 6</b> : Résultats des analyses chimiques ciblées sur les différentes campagnes pour les procédés de traitement des boues		▲	□	50% Traitement et interprétation des résultats en cours. Les dernières analyses seront réalisées en début d'année 3 compte tenu que les dernières campagnes seront organisées début 2013.

### Tâche 3 : Méthodologies innovantes pour le screening chimique et l'identification de molécules nouvelles dans les eaux et boues avant et après traitement

<p><b>Livrable 7</b> : Liste non exhaustive de molécules non cibles identifiées et de produits de dégradation dans les eaux usées traitées et dans les boues</p>		<p>▲</p>	<p>□</p>	<p>50%</p> <p>* SE-CIRSEE : Le screening de boues par chromatographie bidimensionnelle révèle un nombre élevé de composés (1500-1800 par boue) présents individuellement à des niveaux supérieurs à 100 µg/kg. Le screening des eaux a été démarré, mais sur des eaux assez peu chargées (500-800 pics/échantillon) et devra donc être complété.</p> <p>* EPOC-LPTC : Le screening sera mis en œuvre sur des échantillons qui seront sélectionnés dans un 2<sup>ème</sup> temps.</p> <p>* Le screening sera finalisé en année 3, après les dernières campagnes <i>in situ</i>.</p>
<p><b>Livrable 8</b> Analyse quantitative d'une sélection de nouveaux composés pertinents : comportement dans les filières de traitement (eaux et boues)</p>		<p>▲</p>		<p>0%</p>

### Tâche 4 : Bioanalyse - Recherche de composés biologiquement actifs dans les eaux et boues avant et après traitement à l'aide de bioessais *in vitro*

<p><b>Livrable 9</b> : Identification ou pistes d'identification de nouveaux polluants biologiquement actifs.</p>		<p>▲</p>	<p>□</p>	<p>50%</p> <p>* Des tests préliminaires sur matrices réelles ont été discutés et organisés pour décider d'un protocole commun d'extraction des eaux et des boues.</p> <p>* Réalisation des analyses des campagnes ASE1-PA4, ASE3-PA2&amp;3, ASE-PA-ECH1 et ASE2-PA2&amp;3 (cf annexe 1 pour les codes campagnes).</p> <p>* Les dernières analyses seront réalisées en début d'année 3 compte tenu que les dernières campagnes seront organisées début 2013.</p>
<p><b>Livrable 10</b> : Synthèse sur les performances et les modes opératoires des traitements vis-à-vis des activités biologiques mesurées.</p>			<p>▲</p>	<p>0%</p>
<p><b>Livrable 11</b> : Synthèse sur les profils de toxicité/d'activités dans les différents compartiments (eaux, boues) et en fonction du type de traitement.</p>			<p>▲</p>	<p>0%</p>

<b>Tâche 5 : Amélioration de la détection des fractions toxiques par la méthode EDA</b>				
<b>Livrable 12</b> : Protocole de l'approche EDA appliquée aux eaux et aux boues avant et après traitement avancé.	▲	□		50% L'organisation générale (modalités d'échantillonnage, de transport et de stockage) a été définie.  Il reste à : *organiser des tests préliminaires pour tester la compatibilité du Nalgène avec les bioessais <i>in vitro</i> (pour stockage des échantillons d'eaux issus de sites avec pilote). *détailler le protocole de laboratoire qui sera mis en œuvre pour les différents échantillons.
<b>Livrable 13</b> : Synthèse sur l'apport de l'approche EDA dans la démarche de caractérisation des effets <i>in vitro</i> .			▲	0%
<b>Livrable 14</b> : Liste des molécules ayant été identifiées en lien avec leur activité.			▲	0%
<b>Tâche 6 : Application des échantillonneurs intégratifs pour analyses chimiques et biologiques des eaux avant et après traitement</b>				
<b>Livrable 15</b> : Rapport technique pour la bonne exploitation des échantillonneurs intégratifs couplés aux analyses chimiques et aux bioessais <i>in vitro</i> , et appliqués aux traitements avancés. Bilan sur leurs avantages par rapport à un échantillonnage ponctuel.		▲	□	50% Deux campagnes longues ont été réalisées avec mise en œuvre des échantillonneurs intégratifs en 2011 et 2012. Il en reste 2 autres à réaliser avant de finaliser ce rapport (début d'année 3 compte tenu que les dernières campagnes seront organisées début 2013).
<b>Livrable 16</b> : Bilans qualitatif et quantitatif des molécules retrouvées dans les filières de traitements avancés.			▲	40% Deux campagnes longues (sur 4) ont été réalisées en 2011 et 2012. Analyses et bilans partiellement réalisés.
<b>Livrable 17</b> : Bilan des activités retrouvées dans les filières de traitements avancés.			▲	40% Deux campagnes longues (sur 4) ont été réalisées en 2011 et 2012. Analyses et bilans partiellement réalisés.
<b>Livrable 18</b> : Comparaison des TEQ chimie et des TEQ biologie mesurées dans les filières de traitements avancés.			▲	40% Deux campagnes longues (sur 4) ont été réalisées en 2011 et 2012. Exercice partiellement réalisé.
<b>Tâche 7 : Evaluation de la toxicité des eaux et boues avant et après traitement à l'aide de bioessais <i>in vivo</i></b>				
<b>Livrable 19</b> : Caractérisation écotoxicologique de la toxicité des eaux et de l'efficacité des traitements tertiaires testés.		▲	□	50%  Les tests ont été mis en œuvre sur des eaux (campagnes ASE-PA-ECH1&2) et sur des boues (campagnes ASE3&5-Boue). Les dernières évaluations seront réalisées en début d'année 3 compte tenu que les dernières campagnes seront organisées début 2013.

<b>Livrable 20</b> : Comparaison de la sensibilité des différents tests déployés et conclusions sur la complémentarité des approches mises en œuvre.			▲	50%  Cette comparaison sera finalisée après que toutes les campagnes soient réalisées.
<b>Tâche 8 : Caractérisation <i>in situ</i> des interactions entre matière organique et micropolluants dans les eaux avant et après traitement</b>				
<b>Livrable 21</b> : Choix des molécules cibles pour adaptation du test.	▲□			100% (la décision a été prise de se laisser la possibilité d'étudier de nouvelles molécules fluorescentes, à sélectionner en fonction de leur intérêt mis en évidence tout au long du projet). Choix du pérylène pour le développement du test.
<b>Livrable 22</b> : Protocole du test de mesure rapide pour quantifier les interactions entre les micropolluants organiques ciblés et les MOD d'échantillons d'eaux naturelles.	▲□			100% Le protocole a été mis au point en utilisant le pérylène comme micropolluant de référence. Le quenching de fluorescence du pérylène par la matière organique dissoute est au point au laboratoire et a été validé sur des échantillons réels (eau d'entrée et de sortie de STEP). La mise au format microplaque est finalisée et la validation du protocole sur plusieurs échantillons réels a été réalisée.
<b>Livrable 23</b> : Bilan sur les interactions mesurées.		▲	□	30% Ce bilan sera finalisé quand toutes les campagnes seront réalisées.
<b>Livrable 24</b> : Eléments d'interprétation des résultats de toxicité mesurée dans la tâche 7 en prenant pleinement en considération le rôle des MOD.			▲	0%
<b>Tâche 9 : Synthèse, exploitation concertée des résultats et valorisation</b>				
<b>Livrable 25</b> : Liste (non exhaustive) de nouveaux composés indésirables, couramment présents dans les eaux résiduaires brutes et traitées, ceci afin d'anticiper les législations futures.			▲	20% En cours.
<b>Livrable 26</b> : Guides de bonne exploitation des outils mis en œuvre dans le projet pour la caractérisation des procédés de traitement des eaux et des boues.			▲	20% En cours.
<b>Livrable 27</b> : Comparaison de l'efficacité des procédés optimisés selon les outils innovants testés.			▲	40% En cours.

<b>Livrable 28</b> : Méthodologies de diagnostic des performances des procédés de traitement des eaux usées et des boues vis à vis des micropolluants ; et stratégies de déploiement des outils et d'interprétation des données issues de ces technologies innovantes pour faciliter les schémas de gestion et la prise de décision par les industriels et les collectivités territoriales vis à vis de l'implémentation de la DCE.			<input checked="" type="checkbox"/>	20% En cours.
<b>Livrable 29</b> : Colloque public final.			<input checked="" type="checkbox"/>	0%

prévu ;  Reprévu ;  Abandonné ;  Réalisé  
*\* jalon, rapport, logiciel, prototype, données, ...*

## C RAPPORT D'AVANCEMENT

### C.1 OBJECTIFS INITIAUX DU PROJET.

Par ces développements et mise en oeuvre de technologies innovantes d'échantillonnage et de mesures chimiques et biologiques pour le suivi des procédés avancés de traitement des eaux usées urbaines et des boues, le projet ECHIBIOTEB vise à :

- réaliser des évaluations techniques poussées des procédés optimisés étudiés ;
- contrôler les émissions de substances dangereuses issues des procédés avancés des stations d'épuration des eaux urbaines ou contenus dans les boues prévues pour épandage ;
- traduire l'amélioration des connaissances scientifiques en outils opérationnels destinés aux organismes et autorités chargés de la mise en place de mesures pour l'atteinte du bon état des eaux, notamment dans le cadre des SDAGE.

Le projet propose d'évaluer des outils et stratégies innovantes pour mieux caractériser les procédés étudiés. Plus précisément, il s'agit :

- d'améliorer la représentativité de l'échantillonnage et la sensibilité des analyses chimiques et biologiques par utilisation des échantillonneurs intégratifs (tâche 6) ;
- d'évaluer les domaines d'application et la complémentarité d'outils d'analyses chimiques et biologiques (i.e. bioessais *in vitro* pour l'évaluation du potentiel perturbateur endocrinien, "dioxin like" et génotoxique ; tests *in vivo* pour l'évaluation de la toxicité sur des d'organismes représentatifs des milieux récepteurs, analyses chromatographiques pour la quantification de molécules cibles), et de proposer des stratégies de déploiement de ces outils et d'interprétation des données (tâches 2, 4 et 7) ;
- d'éprouver des technologies innovantes d'analyse pour l'identification de molécules non cibles et de produits de dégradation. Certains échantillons, dans lesquels auront été identifiés des micropolluants biologiquement actifs, seront soumis à une démarche de type EDA (Effect Directed Analyses) pour isoler et caractériser plus finement les fractions et les molécules actives et éventuellement identifier de nouvelles substances pertinentes par des méthodologies de screening telles que la GC-2D-TOF (tâches 3 et 5) ;
- par des tests rapides *in situ*, d'appréhender le caractère inhérent aux matières organiques dissoutes à moduler la qualité et la toxicité des eaux étudiées (tâche 8).

## C.2 TRAVAUX EFFECTUES ET RESULTATS ATTEINTS SUR LA PERIODE CONCERNEE

### I/ Procédés étudiés

Les campagnes réalisées et procédés testés entre mai 2011 et avril 2012 consistent en :

- 7 campagnes (dont 2 campagnes longues, sur 1 mois) pour le traitement tertiaire des eaux sur les procédés ozonation, charbon actif et oxydation avancée (avec 2 conditions testées pour l'oxydation avancée).
- 2 campagnes pour le traitement des boues sur les procédés sécheur solaire et compostage.

L'annexe 1 reprend ces informations sous forme de schémas avec les codes des campagnes et des échantillons prélevés. Les lieux des campagnes ne sont pas communiqués par soucis de confidentialité.

### II/ Caractérisation chimique ciblée des eaux et boues avant et après traitement (Tâche 2)

#### Objectifs et molécules ciblées

14 éléments traces métalliques (ETM, métaux) et 168 micropolluants organiques ont été analysés (cf. annexe 2). Parmi ces composés, 12 ETM et 137 contaminants organiques ont été recherchés dans la phase dissoute d'eaux prélevées en entrée et en sortie des différents procédés de traitement tertiaire. De même, parmi ces composés, 12 ETM (dont 10 communs avec la phase dissoute) et 112 contaminants organiques (dont 81 communs avec la phase dissoute) ont été recherchés dans des boues prélevées avant et après traitement. L'objectif est de mettre en évidence un effet des procédés sur les concentrations en micropolluants.

#### Résultats

Les résultats sont illustrés par famille de molécules en annexe 3. Nous re prenons ci-dessous les principales conclusions.

#### **Caractérisation de la phase dissoute (échantillons d'eaux) :**

##### Métaux

A l'heure actuelle, les 12 ETM sélectionnés ont été analysés dans tous les échantillons hormis ceux de la dernière campagne longue (ASE-PA-ECH2). A l'exception de l'étain (Sn), ils ont été détectés et quantifiés systématiquement dans les 17 échantillons analysés, aussi bien en amont qu'en aval des traitements étudiés. Le zinc (Zn) et le bore (B) sont les éléments les plus abondants, avec des concentrations individuelles supérieures à plusieurs dizaines et plusieurs centaines de µg/L respectivement, en amont comme en aval des traitements. De l'étain est également retrouvé en forte concentration, de l'ordre de quelques centaines de µg/L, en sortie de traitement lorsque le pilote UV-peroxyde-ozone est utilisé. Ces fortes concentrations sont donc probablement liées à un relargage en Sn du pilote. Le cuivre (Cu), le nickel (Ni) et le titane (Ti) sont dosés à des concentrations supérieures au µg/L. Seul le cadmium est quantifié à des concentrations inférieures à la centaine de ng/L. A l'exception de l'étain, les concentrations sont équivalentes en amont et en aval des différents traitements étudiés. Il n'y a donc pas d'effet de ces traitements sur les ETM sélectionnés

##### Médicaments

104 molécules pharmaceutiques, appartenant à 11 familles différentes (bêtabloquants, analgésiques-anti-inflammatoires, antiépileptiques-antidépresseurs, bronchodilatateurs, hypolipémiants, stimulants, agents de contraste, antibiotiques, anticancéreux, antiviraux et inhibiteurs de phosphodiésterases de type 5 ou PDE 5) ont été sélectionnées pour être analysées dans la phase dissoute des eaux prélevées. A l'heure actuelle, à l'exception de l'iopromide, toutes ont été analysées pour ce qui concerne les campagnes ASE1-PA4, ASE-PA-ECH1, ASE3-PA2 et ASE3-PA3. Les analyses ne sont pas toutes finalisées pour les autres campagnes (cf. annexe 3).

Sur les 103 molécules qui ont été analysées à l'heure actuelle, 34 sont quantifiées dans tous les échantillons prélevés en amont des traitements et 40 n'ont jamais été quantifiées dans ces mêmes échantillons ; seule la caféine a été quantifiée dans tous les échantillons prélevés en aval des traitements et 80 molécules n'ont jamais été quantifiées dans ces échantillons.

En amont des traitements, les principales familles retrouvées par niveau décroissant de concentration sont : les bêtabloquants (avec le sotalol jusqu'à 2571 ng/L, l'aténolol jusqu'à 545 ng/L et le propranolol jusqu'à 920 ng/L), les antibiotiques (avec la spiramycine jusqu'à 411 ng/L, la norfloxacine jusqu'à 370 ng/L, l'azithromycine jusqu'à 279 ng/L, l'ofloxacine jusqu'à 258 ng/L, la ciprofloxacine jusqu'à 243 ng/L, le sulfaméthoxazole jusqu'à 241 ng/L, l'érythromycine jusqu'à 118 ng/L et la roxithromycine jusqu'à 119 ng/L), les analgésiques-anti-inflammatoires (avec le diclofénac jusqu'à 810 ng/L), les antiépileptiques-antidépresseurs (avec la carbamazépine jusqu'à 808 ng/L) et les stimulants (avec la caféine jusqu'à 105 ng/L et la théophylline jusqu'à 105 ng/L). En aval des traitements, 2 familles sont principalement retrouvées, les bêtabloquants (avec le sotalol jusqu'à 538 ng/L, l'aténolol jusqu'à 157 ng/L et le propranolol jusqu'à 5 ng/L) et les stimulants (avec la caféine jusqu'à 76 ng/L et la théophylline jusqu'à 39 ng/L).

D'une façon générale, une forte diminution des concentrations est observée entre l'amont et l'aval des procédés étudiés, ce qui met en évidence une bonne efficacité de ces traitements pour éliminer les molécules pharmaceutiques. La combinaison ozone + charbon actif lors de la campagne ASE-PA-ECH1 est (à ce jour) le procédé le plus efficace pour éliminer les résidus médicamenteux (cf. annexe 3).

#### Hormones

5 hormones estrogéniques ont été recherchées dans tous les échantillons prélevés à l'heure actuelle, sauf ceux à J14 et J28 de la campagne ASE-PA-ECH2. Les hormones sont retrouvées à des fréquences de détections < 50% et à des concentrations <1 ng/L aussi bien en sortie qu'en entrée de procédés. L'estrone est la molécule la plus fréquemment détectée. La variabilité et les faibles niveaux de concentrations ne permettent pas de tirer des conclusions sur l'efficacité des traitements étudiés vis-à-vis de ces composés.

#### Pesticides

A l'heure actuelle, 2 pesticides appartenant à la famille des triazines et 2 appartenant à la famille des phénylurées ont été recherchés dans les échantillons issus des campagnes courtes. En entrée de procédés, l'atrazine (de 21 à 121 ng/L) et le diuron (de 27 à 152 ng/L) sont quantifiés dans 100 % des échantillons dans lesquels ils ont été recherchés. L'atrazine seul, est retrouvé en sortie des traitements étudiés à des concentrations faibles (de 8 à 14 ng/L). Les procédés étudiés semblent donc efficaces pour éliminer ces composés de la phase dissoute.

Le glyphosate et l'AMPA ont été analysés dans tous les échantillons prélevés (sauf ceux à J14 et J28 des campagnes longues). En entrée, l'AMPA est quantifié dans 100% des échantillons et le glyphosate dans 57 % d'entre eux. En sortie de traitement, l'AMPA est quantifié dans 71 % des échantillons et le glyphosate dans 29 % d'entre eux. Avec des concentrations en entrée et en sortie du même ordre de grandeur, ces composés ne semblent pas être éliminés par les traitements étudiés.

#### Alkylphénols (AKP)

A l'heure actuelle, les AKP ont été recherchés dans tous les échantillons des campagnes courtes. Sur les 6 composés analysés, 4 sont quantifiés dans tous les échantillons en amont contre 3 en aval. En entrée comme en sortie des procédés, les composés majoritaires sont l'acide nonylphénoxyacétique (4-NP1EC, de 272 à 481 ng/L en entrée et de 8 à 32 ng/L en sortie) et les isomères du nonylphénol (4-NP, de 42 à 314 ng/L en entrée et de 12 à 57 ng/L en sortie). De façon générale, quels que soient le procédé et le composé considéré, on remarque que les concentrations en AKP en aval sont plus faibles que celles de l'amont.

#### Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

Les HAP ont été recherchés dans l'ensemble des échantillons prélevés à l'heure actuelle. De façon générale, quels que soient la station et les points de prélèvements (amont/aval de traitement tertiaire), les concentrations sont faibles (< 25 ng/L). Aucun HAP de haut poids moléculaire (i.e. > 5 cycles aromatiques) n'est détecté dans ces échantillons à l'exception

des benzo-fluoranthènes sur la campagne ASE-PA-ECH2 en amont de l'ozoneur (de 0,2 à 0,7 ng/L). Seuls quelques échantillons présentent des concentrations en phénanthrène et pyrène supérieures à 5 ng/L, pouvant marquer une signature pyrolytique. Les procédés testés semblent réduire les concentrations totales en HAP. Néanmoins, celles-ci étant relativement faibles (100 à 1000 fois plus faibles que les normes de qualité standards, NQE), on ne peut constater que des tendances.

### **Caractérisation des boues :**

Les résultats des analyses de boues ne peuvent être commentés qu'en termes de concentrations brutes et ne peuvent pas vraiment être comparés compte-tenu de la variabilité des taux d'humidité entre entrées et sorties.

#### Métaux

A l'heure actuelle, une seule des 2 campagnes boue (ASE5-boue, composteur) a été analysée pour les ETM et parmi les 10 ETM sélectionnés, 2 n'ont pas encore été analysés. Pour les ETM recherchés, les fréquences de quantification sont de 100 % aussi bien dans la boue brute d'entrée que dans le compost. Avec des concentrations individuelles supérieures à 100 µg/g m.s, le zinc, le titane, le cuivre et le plomb (dans le compost) sont les ETM les plus abondants. Le mercure et le cadmium sont mesurés aux concentrations les plus faibles (< 1 µg/g m.s).

#### Médicaments

A l'heure actuelle, les bêtabloquants sont la seule classe de molécules pharmaceutiques à avoir été analysée dans les boues. Ils ont été recherchés dans tous les échantillons des 2 campagnes menées jusqu'à présent. Seulement 3 bêtabloquants sont recherchés dans les boues. Le propranolol est quantifié dans tous les échantillons et est aussi la molécule majoritaire avec des concentrations variant de 43 à 247 ng/g m.s. L'acébutolol, lorsqu'il est détecté, est quantifié à des concentrations plus faibles, de 5,5 à 17 ng/g m.s. L'aténolol n'a jamais été détecté dans aucun des échantillons.

#### Hormones

Les hormones ont été recherchées dans tous les échantillons des 2 campagnes boue menées jusqu'à présent. Sur les 5 hormones estrogéniques recherchées, seule l'estrone est dosée dans tous les échantillons. Ses concentrations varient entre 6 et 15 ng/g m.s sauf dans le compost où elle atteint 359 ng/g m.s. L'éthinylestradiol est également dosée dans les 2 échantillons de la campagne ASE3-boue (i.e. la boue déshydratée et la boue séchée) à des concentrations de 12 et 8 ng/g m.s respectivement.

#### Alkylphénols (AKP)

A l'heure actuelle, seuls les échantillons de la campagne ASE3-boue ont été analysés en AKP. Le 4-NP1EC et le 4-ter butylphénol ne sont détectés dans aucune des 2 boues du sécheur solaire alors que les 4 autres composés ont une fréquence de quantification de 100 %. Les isomères du 4-NP et le 4-ter octylphénol (4-t-OP) sont retrouvés à des concentrations similaires dans la boue séchée et la boue déshydratée (1200 ng/g pour NP et 85 ng/g pour OP). Enfin, les 4-nonylphénols mono- et di-éthoxylate ont des concentrations plus fortes dans la boue déshydratée que dans la boue séchée et les teneurs en 4-NP1EO sont plus fortes que celles en 4-NP2EO.

#### DEHP

Le DEHP a été recherché dans tous les échantillons et a été quantifié à des concentrations élevées variant de 24 à 93 µg/g m.s.

#### Pesticides

Seuls les pesticides organochlorés sont recherchés dans les boues. 7 des 11 pesticides organochlorés ont été recherchés dans les boues du procédé de compostage (ASE5-boue). 3 composés (PP-dichlorodiphényltrichloroéthane, OP-dichlorodiphényldichloroéthane et hexachlorobenzène) n'ont pas été détectés, ni en entrée, ni en sortie. Les 4 autres composés dosés ont des concentrations de 2 à 16 ng/g et présentent un profil moléculaire proche entre la boue brute et le compost.

#### Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

Les HAP ont été recherchés dans tous les échantillons des 2 campagnes boue. Les concentrations en HAP totaux en entrée sont de 353 et 3383 ng/g pour les boues du sécheur solaire et du composteur respectivement, avec comme composés majoritaires le pyrène, le fluoranthène et le chrysène dans la boue déshydratée du sécheur solaire et le chrysène et les benzo-fluoranthènes dans la boue brute du composteur. Les concentrations totales en sortie de procédé sont de 269 ng/g pour la boue séchée avec le pyrène, le chrysène et les benzo-fluoranthènes comme composés majoritaire ; et de 4201 ng/g pour le compost avec des abondances plus fortes pour le fluoranthène, le chrysène et le pyrène.

#### Polychlorobiphényles (PCB)

Les PCB ont été recherchés dans tous les échantillons des 2 campagnes boue. Pour le sécheur solaire, les concentrations en PCB totaux sont de 32 ng/g et 16 ng/g pour les boues déshydratée et séchée respectivement. Les PCB101, PCB153 et PCB138 sont majoritaires pour ces 2 boues. Concernant le procédé de compostage, les concentrations totales en PCB sont plus fortes que celles du sécheur solaire avec 212 ng/g pour la boue brute et 130 ng/g pour le compost. Dans ce cas, les composés majoritaires sont les PCB101, PCB118 et PCB138 en entrée et les PCB138, PCB153 et PCB180 dans le compost.

#### Polybromodiphényléthers (PBDE)

Les PBDE ont été recherchés dans tous les échantillons des 2 campagnes boue. De même que pour les HAP et les PCB, les concentrations totales en PBDE sont plus élevés dans les boues du procédé par compostage que dans celles du sécheur solaire, avec des concentrations de 2011 ng/g et 2142 ng/g en entrée et sortie du composteur et de 237 ng/g et 99 ng/g pour les boues déshydratée et séchée respectivement. Le PBDE 209 présente les plus fortes concentrations dans l'ensemble des échantillons (entre 75 et 2096 ng/g) tandis que les autres composés ont des concentrations comprises entre 0,1 et 21 ng/g.

#### **Conclusions et perspectives**

D'autres résultats d'analyses sont attendus pour compléter ces conclusions. Les dernières analyses seront réalisées en 2013 à la suite des dernières campagnes de prélèvement *in situ* (à organiser début 2013). Au final, il conviendra d'identifier parmi les 182 molécules ciblées ici, celles réellement pertinentes à suivre pour caractériser les traitements tertiaires des eaux ou les traitement des boues.

### **III/ Screening chimique (Tâche 3)**

#### **Objectifs**

Les objectifs sont d'évaluer des méthodes de screening innovantes pour (i) permettre l'identification de nouvelles molécules et de produits de dégradation présents dans des eaux usées ou traitées représentatives et dans des boues, et (ii) proposer une liste de composés pertinents à suivre dans le futur.

#### **Résultats**

Pour le moment, 3 boues (Echantillons AMQ69, 70 et 75) et 4 eaux (Echantillons ECH100, 101, AMQ107, 108-avant et après traitement) ont été soumises à un screening par la méthode de chromatographie bidimensionnelle (GCxGC) couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (TOFMS). Dans le cas des boues, environ 1800 spectres ont été examinés pour chaque échantillon, tandis que 500-800 spectres ont été examinés par échantillon d'eau. Les boues ont été extraites par une méthode ASE (Accelerated-Solvent-Extraction) avec un mélange méthanol/acétone tandis que les eaux ont été extraites par extraction liquide-liquide au dichlorométhane d'abord à pH basique puis à pH acide. Les spectres ont été classés suivant la qualité de la recherche en librairie et leur examen critique par un expert, en deux catégories :

-Liste 1. Spectres jugés parfaits. Tous les fragments spécifiques sont présents, y compris ceux de faible intensité. L'identification est très probable, à l'isomère près. Elle devra toutefois être confirmée par l'injection d'un composé de référence pur. La liste 1 compilée à partir des 3 boues analysées est jugée assez représentative et contient un peu plus de 190 substances.

-Liste 2. Les spectres nécessitent une amélioration. Il manque quelques fragments ou quelques fragments sont en trop. Dans la majorité des cas il faudrait un spectre plus intense pour en améliorer la qualité. Du fait du nombre suffisamment élevé de substances sur la liste 1, la liste 2 ne sera pas conservée pour la suite de l'étude.

La liste 1 comprend des composés appartenant à des familles très diverses, résumées dans le tableau 1 ci-dessous.

**Tableau 1** : Familles et exemples de composés identifiés dans 3 boues (prélevées avant et après un sécheur solaire, campagne ASE3-boue)

<b>Famille</b>	<b>Exemples</b>
Composés aliphatiques et cycloaliphatiques	Alcanes, acides, alcènes, diènes, cycloalcanes, amides, alcools, cétones, aldéhydes, éthers, esters
Lactone	Butyrolactone
Alkylbenzènes	Du benzène au C10-C13 alkylbenzènes
Alkylpyridines	2-méthylpyridine, 2,3,5-triméthylpyridine, Nicotinamide
Dérivés du pyrrole	Méthylpyrrole, diméthylpyrrole
Dérivés de l'indole	Indole, méthylindole
Pipéridinones et pipéridones	Pipéridinone, tétraméthylpipéridone (analgésique)
Dérivés phénoliques	Phénol, crésol
HAP et dérivés	Pyrène, 2-méthoxynaphtalène, 2,6-diisopropylnaphtalène (pesticide)
Composés aliphatiques soufrés	Diméthyltrisulfure
Composés hétérocycliques soufrés	Diméthylthiophène, Benzothiazole
Thiocyanates	Méthylthiophénylisothiocyanate, méthylthiocyanate
Anti-UV	Bumetrizole, benzophénone
Furannes	Acétamidofuran, 2(5H)-Furanone
Composés chlorés	Dichlorobenzène, chlorure de benzyle
Sucres anhydres	Levoglucosan
Colorant	Indigo
Aromatiques oxygénés	Acétophénone, méthylbenzoate, 4-hydroxybenzaldéhyde
Muscs	Tonalide, galaxolide, galaxolide lactone
Stérols	Cholestérol, coprostanol
Phtalates	Phtalates classiques+inconnus
Amines aromatiques	Aniline, éthylaniline
Retardateur de flamme	1-propanol 2,3-dichlorophosphate, 2-propanol 1-chlorophosphate
Composés naturels	Géosmine, terpènes et hémiterpènes (aromadendrène)
Divers	Triclosan, BHT, BPA, glycérine, vitamine E, vitamine E acétate

Si les composés aliphatiques sont à priori de peu d'intérêt et si d'autres composés sont déjà connus, on est frappé par la diversité de composés hétérocycliques azotés. Il est clair que la liste 1 comprend de nombreux composés dont la présence dans les boues n'a pas encore été étudiée. Cette liste doit être discutée avec les spécialistes de toxicité / bio-activité du consortium pour en faire ressortir les éléments potentiellement actifs.

Du fait de la plus faible charge des eaux étudiées, il apparaît nécessaire d'examiner des échantillons de stations supplémentaires avant de dresser une liste équivalente pour l'eau.

### **Conclusions et perspectives**

Le travail de screening reste donc à poursuivre par GCxGC-TOFMS, notamment pour identifier des composés non ciblés dans les eaux.

Parallèlement à cette technique, la micro-extraction sur phase solide associée à une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (SPME-GC-MS) sera appliquée aux échantillons d'eaux mentionnés plus haut (Echantillons ECH100, 101, AMQ107, 108-avant et après traitement). En effet, cette technique permettra d'apporter des informations complémentaires, en ciblant une identification de composés plus polaires et en modifiant la sélectivité, via une étape de préparation d'échantillon simplifiée.

Dans un second temps, des analyses par LC/TOF seront réalisées sur des échantillons de boues et d'eaux. Cette technique puissante nécessite au préalable un choix stratégique et pertinent des échantillons, afin d'interpréter les résultats de façon comparative (soustraction de spectres). Pour cela, on se propose d'étudier des entrées et sorties de procédés et/ou de comparer des échantillons présentant des réponses positives aux tests biologiques avec d'autres n'ayant pas d'effets toxicologiques avérés. Ainsi, les composés pourront être identifiés en tant que produits de dégradation et/ou de transformation du procédé ou comme ayant potentiellement un rôle sur la réponse biologique de l'échantillon d'eau ou de boue. Cette démarche nécessite au préalable d'avoir un certain recul sur les résultats des analyses de molécules ciblées (tâche 2) et sur les divers tests biologiques effectués sur les échantillons (tâche 4 et tâche 7) afin de pouvoir choisir les échantillons potentiellement intéressants pour ce screening chimique.

#### **IV/ Bioanalyse - Recherche de composés biologiquement actifs dans les eaux et boues avant et après traitement à l'aide de bioessais *in vitro* (Tâche 4)**

##### **Objectifs et démarche expérimentale**

L'objectif est de fournir, à l'aide de bioessais, une première caractérisation sur le type et les niveaux d'effets liés à la contamination par des polluants biologiquement actifs dans les différents échantillons d'eaux et de boues, avant et après traitement. La batterie de bioessais *in vitro* mise en œuvre renseigne sur la présence de composés capables d'agir via des mécanismes d'action toxique spécifiques : perturbation de la transcription de récepteurs hormonaux (composés estrogéniques, (anti)androgéniques et (anti)thyroïdiens), activité dioxin-like et génotoxicité (cf. annexe 4). L'approche biologique proposée vise à dresser des profils de toxicité dans le but d'orienter l'analyse chimique vers l'identification des polluants effectivement actifs dans les eaux examinées.

Pour chaque bioessai, différentes dilutions de chaque échantillon sont testées. Dans le cas d'échantillon positif, l'établissement de courbes dose-réponse permet de dériver des concentrations actives en extrait exprimées en toxique-équivalents (TOX-Eq) par quantité d'échantillon en référence à une courbe de calibration avec une molécule témoin.

##### **Résultats**

###### ***Essais préliminaires : définition d'un protocole commun d'extraction***

Des essais préliminaires ont été réalisés au cours du premier semestre du programme afin i) de définir les protocoles d'extraction d'eaux communs à l'ensemble des bioessais, ii) de fournir une première caractérisation qualitative sur les profils de toxicité potentielle de 2 stations d'épuration, notées A et B. Dans ce but, des échantillons d'eau d'entrée et de sortie de traitement ont été préparés par Irstea par extraction liquide-liquide (LL, avec du dichlorométhane) et par extraction sur phase solide (SPE, sur OASIS HLB, élution au méthanol). Les extraits ont été transmis aux équipes réalisant les bioessais.

Les résultats montrent globalement peu de différences entre les méthodes LL et SPE pour ce type d'échantillons, les deux méthodes ayant révélé la présence de faibles activités estrogéniques en entrée et sortie des deux stations et androgénique en entrée de la station A. Un biais de la méthode LL a cependant été noté avec la génération de blancs positifs dans certains tests. La méthode SPE, moins consommatrice de solvants et globalement moins fastidieuse à mettre en œuvre que l'extraction liquide-liquide, a finalement été retenue.

Parallèlement, il apparaît peu d'influence de la filtration préalable des échantillons liquides sur la réponse des bioessais *in vitro*, du fait d'une faible charge en matières en suspension des échantillons (< 2 mg/L).

### **Application aux échantillons d'eau des campagnes ASE1-PA4, ASE3-PA2&3, ASE-PA-ECH1 (station d'épuration A) et ASE2-PA2&3 (station d'épuration C)**

Les profils d'activité mesurés sont présentés en annexe 5 et commentés ci-après.

Perturbateurs endocriniens - L'eau d'entrée de tertiaire de la station A se caractérise principalement par l'observation d'un effet œstrogéno-mimétique (1,5-3 ng E2-Eq/L). Les composés qui induisent cet effet semblent épurés par le traitement au charbon actif (<0,3 ng E2-Eq/L). Le même constat est observé pour la station C avec une activité estrogénique (1-3 ng E2-Eq/L) qui devient non détectable en sortie de traitement.

L'utilisation d'échantillonneur intégratif SPMD (Semi-Permeable Membrane Device) dans les eaux de la station A confirme la présence de composés estrogéniques détectables, y compris en aval de traitement même si l'on constate un abattement de 50%.

De manière intéressante, une activité androgénique significative (14-18 ng DHT-Eq/L) est mesurée dans les premières campagnes sur les eaux de la station A (essais préliminaires et campagne ASE1-PA4), mais cette activité n'a pas été retrouvée dans la dernière campagne ASE3-PA2&3 réalisée en mars 2012. Globalement aucune activité anti-androgénique n'est observée dans les extraits d'eau. En revanche, la capacité de concentration des SPMD permet de révéler la présence de molécules anti-androgéniques à la station A, aux mêmes concentrations en amont et en aval du traitement.

Enfin, aucune activité de type (anti)thyroïdienne n'est détectée dans l'eau ni les SPMD. Aucun effet sur la viabilité cellulaire n'a été noté sur les cellules MELN et PC-DR-Luc.

Composés dioxin-like et HAP-like - Globalement, les échantillons ne contiennent pas de niveaux détectables de molécules analogues de la dioxine (<2 ng TCDD-Eq/L). Cependant, de faibles activités de type HAP-like sont détectées dans l'eau et dans les SPMD. Ce constat est à mettre en regard des faibles concentrations en HAPs dissous rapportées dans la tâche 2.

Génotoxicité/Cytotoxicité - Toutes les campagnes analysées montrent une génotoxicité directe et/ou indirecte, accompagnée d'une cytotoxicité, en sortie de traitement secondaire. Dans tous les cas, cette génotoxicité n'est plus observée en sortie de traitements tertiaires, alors que l'effet cytotoxique peut perdurer. Dans le cas de la campagne ASE1-PA4, il apparaît cependant une toxicité significative en sortie de colonne de charbon actif. Ce résultat fait écho à la présence d'activité androgénique dans ce même extrait et pourrait souligner un dysfonctionnement de la colonne, avec relargage de composés actifs, au moment de l'échantillonnage.

### **Conclusions et perspectives**

Globalement, de manière commune aux différentes campagnes, les profils d'activités en entrée de tertiaire révèlent la présence récurrente d'activités de type estrogénique à faible niveau, HAP-like et génotoxique. De plus, selon les campagnes, la station ou le type d'échantillon (i.e. eau vs SPMD), des activités (anti)androgéniques sont révélées. Aucune activité (anti)thyroïdienne n'a été détectée quelle que soit la campagne. Dans l'ensemble, les activités mesurées en sortie, lorsqu'elles sont détectées, restent relativement faibles au regard de ce que l'on peut mesurer classiquement en sortie de stations d'épurations urbaines sans traitement tertiaire.

Néanmoins, ces résultats ont permis de dresser un premier constat sur le type d'activités potentiellement présentes dans les eaux de ces stations. Ils devront être complétés par des essais sur les boues et les échantillonneurs intégratifs POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) pour obtenir une vision plus complète de l'état de contamination des systèmes étudiés. Les premiers résultats sur SPMD montrent notamment l'intérêt des échantillonneurs intégratifs pour travailler sur ces matrices aqueuses peu concentrées.

Dans l'ensemble, les traitements tertiaires évalués permettent une réduction significative des effets biologiques mesurés en entrée. Les résultats des bioessais d'activités estrogénique et HAP-like rejoignent ainsi les conclusions apportées par analyses chimiques ciblées concernant les HAP et les alkylphénols (tâche 2). Cependant, il peut aussi exister une différence entre les deux approches, chimique et biologique, comme une toxicité *sur E. Coli* mesurée en sortie de charbon actif à la station A dans la campagne ASE1-PA4, suggérant un relargage de composés non identifiés par les analyses chimiques ciblées. Il est à noter que

cette toxicité sur bactéries ne s'observe pas sur les lignées cellulaires. Ce constat confirme l'intérêt des bioessais, en complémentarité avec les analyses chimiques.

Par la suite, d'autres stations de typologie différente seront étudiées afin de comparer les profils d'effets et de statuer sur le choix des échantillons à caractériser plus avant par l'approche EDA (Effect Directed Analyses, Tâche 5).

## **V/ Evaluation de la toxicité des eaux et boues avant et après traitement à l'aide de bioessais *in vivo* (Tâche 7 )**

### **Objectif et méthodologie :**

L'objectif est d'évaluer les performances des procédés de traitement (eaux et boues) testés, en terme de réduction de toxicité, à l'aide de tests en laboratoire et *ex situ* (exposition directe aux eaux et en continu) sur un grand nombre d'espèces, représentatives des différents groupes phylogénétiques et des milieux récepteurs (rivières et sols).

Pour les eaux, les tests de laboratoire et *ex situ* menés lors des deux campagnes longues (ASE-PA-ECH1&2) sont présentés en annexe 6. Pour les tests *ex-situ*, les expositions ont été réalisées par exposition aux eaux brutes (non filtrées) et aux concentrations de 50, 16 et 5.5 % (par dilution des eaux brutes avec une eau qui sert également de condition contrôle). Pour les tests au laboratoire, les eaux ont été préalablement filtrées avant d'être testées. Pour les boues (campagnes ASE3&5-Boue), la toxicité des boues a été évaluée soit directement à partir d'organismes terrestres (plantes) soit à l'aide d'extrait aqueux (léxiviats) et à partir d'organismes aquatiques (micro-algue et micro-crustacé) (cf. annexe 6). Les léxiviats sont obtenus par une agitation pendant 24h des boues dans les milieux de tests selon la norme NF EN 14735. Les léxiviats sont filtrés à 1,2 µm avant la réalisation des tests, excepté pour le test croissance de *P. subcapitata* ou la filtration se fait à 0,45µm.

### **Résultats :**

#### Efficacité du traitement tertiaire ozonation+charbon actif sur la toxicité des eaux

Concernant les tests menés en laboratoire (cf. annexe 6) sur des prélèvements ponctuels, des effets toxiques faibles ont été observés. Que ce soit pour les eaux en amont ou aval du traitement tertiaire, aucun effet n'a été observé avec le microtox, le test de croissance algale et chez *D. magna*. Seule une induction significative de la reproduction de *C. dubia* a été observée aux plus fortes concentrations testées de l'eau en amont

Concernant les tests menés *ex situ*, c'est à dire sous une exposition en continu aux différentes eaux, très peu d'effets toxiques ont été observés. Quelle que soit la réponse mesurée, aucun effet significatif n'a été observé avec la larve d'insecte *C. riparius*, le gastéropode *P. antipodarum* et l'amphipode *G. fossarum*, excepté pour le taux d'alimentation avec les eaux en amont. Comme pour la reproduction de *C. dubia*, le taux d'alimentation des gammares a été induit à la plus forte concentration (50 %) pour les eaux amont (cf. annexe 7). En revanche, l'utilisation des larves de médaka a permis de mettre en évidence une action bénéfique du traitement tertiaire sur la toxicité des eaux (cf. annexe 8). En effet, à l'amont du traitement, la concentration de 50 % des eaux conduit à une diminution significative du taux d'éclosion et de la taille à l'éclosion, alors que ces effets ne sont plus observés dans les eaux en aval du traitement.

#### Efficacité du traitement tertiaire ozonation sur la toxicité des eaux

Comme pour les résultats présentés ci-dessus, une induction de la reproduction de *C. dubia* a été observée, ceci aussi bien dans les eaux en amont et en aval du traitement, ne montrant pas de différence liée au traitement (même si ces résultats n'ont été observés que pour l'un des deux tests réalisés). De la même façon, une induction de la reproduction de *B. calyciflorus* a été observée pour les concentrations les plus fortes testées, en amont et en aval du traitement. A l'inverse, le test microtox a clairement mis en évidence une augmentation de la toxicité de l'effluent suite à l'ozonation (Tableau 2). Cette toxicité peut se traduire selon les échantillons par une inhibition allant de 38 à 60%. Par conséquent, le procédé d'ozonation conduit donc à accroître la toxicité des eaux sur la souche bactérienne *V. fisheri*. Ce résultat devra être confirmé par de nouvelles expériences.

**Tableau 2** : Test microtox en amont et aval de l'ozonation (traitement tertiaire) lors de la campagne ASE-PA-ECH1.

Date	Echantillon	CE50 <sub>30mm</sub>	Interprétation
prélèvement		en% échantillon ou CE50 et intervalle de confiance	Toxique (+) Non Toxique (-)
13/03/12	Eau amont ozoneur J0 matin	> 100%	-
13/03/12	Eau aval ozoneur J0 matin	>38%	+/-
13/03/12	Eau amont ozoneur J0 après-midi	> 100%	-
13/03/12	Eau amont ozoneur J0 après-midi	> 100%	-
27/03/12	Eau Amont ozoneur-J14	> 100%	-
13/03/12	Eau aval ozoneur J0 matin	>38%	+/-

Comme précédemment, les eaux avant et après traitement n'induisent aucune toxicité significative avec les tests *in vivo* conduits chez *C. riparius* et *G. fossarum*. Enfin, les larves de médaka se sont montrées une nouvelle fois les plus sensibles aux eaux de station. Un impact significatif sur la taille a été observé dans les eaux en amont pour les concentrations de 16 et 50%, et qui disparaît totalement à la suite de l'ozonation.

#### Impact du séchage solaire et du compostage sur la toxicité des boues

Concernant les tests menés sur les plantes, les premiers résultats de ces travaux montrent que le test d'élongation racinaire, plus rapide et simple à mettre en place donne la même information que les autres tests. Par conséquent, ce test devient pertinent pour une mise en place en routine. Pour les tests aquatiques, c'est le test de reproduction chez *B. calyciflorus* qui s'est montré le plus sensible.

Concernant les traitements testés, aucune différence de toxicité n'a été observée pour les échantillons de boues ayant subi le séchage solaire. A l'inverse, tous les biotests utilisés (plantes et organismes aquatiques) ont montré une diminution significative de la toxicité des échantillons de boues après compostage. Cependant, aujourd'hui il n'est pas possible de dire si la diminution de toxicité de ces boues est due à une efficacité plus grande du compostage ou à une dilution artificielle de l'échantillon (par l'apport de complément carboné via les déchets verts, les résidus de bois).

#### **Conclusions et perspectives**

En conclusion de ces travaux, il est important de noter que sur l'ensemble des biotests mis en place, peu d'effets toxiques ont été observés, notamment pour les eaux à l'amont des traitements, limitant ainsi la possibilité d'évaluer l'efficacité des traitements testés. Des démarches plus sensibles ou la re-définition de la façon dont on peut évaluer, sur la base de réponses biologiques, les bienfaits de tels traitements tertiaires devront être mises en place. Parmi ces approches, il serait intéressant d'étudier les niveaux de contamination des organismes par les micropolluants, afin d'évaluer l'impact des traitements sur les fractions biodisponibles des micropolluants.

Cependant, les résultats obtenus ont montré que le traitement d'ozonation est susceptible d'accroître la toxicité des effluents vis à vis de la bactérie *V. fisheri*. A l'inverse, l'utilisation des embryons du poisson médaka, montre que les deux traitements testés (ozonation et ozonation+charbon actif) permettent de diminuer significativement la toxicité des effluents. Enfin, concernant les boues, seul le processus de compostage a permis d'obtenir une réduction significative de leur toxicité. Cependant, il sera important de déterminer plus clairement s'il s'agit d'une réduction de la toxicité des boues ou d'une dilution de la toxicité liée à l'apport de matière carbonée.

## VI/ Application des échantillonneurs intégratifs pour analyses chimiques et biologiques des eaux avant et après traitement

### Objectifs et démarche expérimentale

Sur l'ensemble du projet, il s'agit :

- d'évaluer la faisabilité et l'intérêt des échantillonneurs intégratifs déployés dans des eaux avant ou après traitements avancés, pour (i) concentrer et faciliter l'identification et la quantification des molécules cibles et de nouvelles molécules non cibles et (ii) améliorer les seuils de détection des bioessais *in vitro*.
- de permettre l'intégration au cours du temps de la contamination en vue d'une détection basée sur des analyses chimiques et sur des bioessais *in vitro*.

### Résultats

Les premiers résultats obtenus sur les échantillonneurs intégratifs concernent l'analyse de 32 médicaments (bêtabloquants, analgésiques-anti-inflammatoires, antiépileptiques-antidépresseurs, bronchodilatateurs, hypolipémiants, stimulants) dans les POCIS exposés 14 jours en amont et en aval du traitement ozone + charbon actif de la campagne longue ASE-PA-ECH1. Les autres échantillons de POCIS ou SPMD dédiés à l'analyse des alkylphénols, antibiotiques et autres sont actuellement en cours d'analyse (échantillons complémentaires de la campagne ASEPA-ECH1 et tous ceux de ASE-PA-ECH2).

De façon générale, on remarque que les concentrations brutes (ng/g de phase) sont assez faibles (cf ci-dessous), plus particulièrement pour les POCIS exposés en aval du traitement mentionné ci-dessus. A l'heure actuelle, sur les 32 composés dosés dans les POCIS, 8 (aténolol, bisoprolol, métoprolol, propranolol, sotalol, carbamazépine, théophylline et caféine) sont quantifiés, 8 sont détectés mais non quantifiés (concentrations inférieures aux limites de quantification) et 16 ne sont pas détectés pour les POCIS exposés en sortie de procédé. Cependant, ces résultats sont à nuancer car la caféine et la théophylline sont présentes à des concentrations non négligeables dans les blancs (blanc de laboratoire et blanc POCIS). En amont du traitement, 22 composés sont quantifiés : 9 bêtabloquants, 1 analgésique-anti-inflammatoire, 8 antiépileptiques-antidépresseurs, 2 bronchodilatateurs et les 2 stimulants. La carbamazépine ( $7221 \pm 3573$  ng/g phase), le sotalol ( $4157 \pm 614$  ng/g phase), le propranolol ( $2507 \pm 717$  ng/g phase), le bisoprolol ( $976 \pm 73$  ng/g phase), le métoprolol ( $744 \pm 115$  ng/g phase), l'acébutolol ( $483 \pm 51$  ng/g phase), l'amitryptilline ( $467 \pm 230$  ng/g phase), l'aténolol ( $359 \pm 75$  ng/g phase), l'oxprénolol ( $325 \pm 33$  ng/g phase), le nordiazépam ( $246 \pm 144$  ng/g phase) et la fluoxétine ( $245 \pm 106$  ng/g phase) ont les concentrations les plus élevées. 3 à 5 composés ne sont pas détectés en amont du traitement (bétaxolol, aspirine, clenbuterol, gemfibrozil et/ou ibuprofène).

Par comparaison avec les données obtenues lors de l'échantillonnage ponctuel (tâche 2 du projet), on remarque que l'échantillonnage intégratif permet de détecter 4 à 7 composés supplémentaires (aténolol, sotalol, propranolol, métoprolol, nordiazepam, amitryptilline et alprazolam en aval ; clenbuterol, gemfibrozil, imipramine et doxépine en amont, ce qui confirme l'intérêt de ce mode d'échantillonnage.

L'utilisation de composés de référence et de performance (PRC) a permis de corriger les taux d'échantillonnage *in-situ* avec le POCIS pour les 15 médicaments dosés par EPOC-LPTC et de déterminer des concentrations moyennées sur la durée d'exposition (exprimées en ng/L). Il restera à extrapoler ces corrections pour les autres molécules dosées par l'Irstea et le Cirsee/Suez-Environnement. Les valeurs obtenues sont homogènes pour l'ensemble des médicaments et confirment une réelle accumulation/adsorption des composés dans le POCIS parallèlement à la désorption des PRC. Les concentrations obtenues par POCIS sont plus faibles que celles obtenues par un prélèvement ponctuel.

De façon générale, les concentrations en médicaments sont plus faibles en aval du procédé qu'en amont. Cette tendance est particulièrement marquée pour les bêtabloquants, la carbamazépine, l'amitryptilline, l'alprazolam, le bromazépam et la fluoxétine qui présentent une forte baisse de concentration grâce au procédé (composé non détecté ou concentration inférieure au ng/L en sortie de procédé).

## Conclusions et perspectives

D'autres résultats d'analyses sont attendus pour compléter ces conclusions, comme les analyses complémentaires de molécules cibles mais aussi les résultats de screening chimique et de bioanalyse dans les échantillonneurs intégratifs. Au final, il s'agira d'évaluer la pertinence et l'intérêt d'utiliser ce mode d'échantillonnage pour la caractérisation des procédés de traitement tertiaire des eaux.

## VII/ Caractérisation *in situ* des interactions entre matière organique et micropolluants dans les eaux avant et après traitement (Tâche 8)

### Objectif

L'objectif est de développer un outil analytique pour caractériser facilement et rapidement sur site les interactions entre la matière organique dissoute (MOD) et les micropolluants organiques présent dans les eaux usées ou les eaux après traitement. L'intérêt d'un tel outil est de pouvoir évaluer la biodisponibilité d'un micropolluant organique en fonction des caractéristiques de la MOD présente dans l'échantillon ; c'est donc un test de caractérisation des capacités d'adsorption de la MOD vis-à-vis d'un micropolluant organique donné (cf. annexe 9). La biodisponibilité d'un micropolluant est un paramètre important dans l'évaluation de l'efficacité des processus de traitement des eaux et de l'impact final des micropolluants sur l'environnement. En effet, il est admis que lorsqu'un micropolluant est peu biodisponible, sa toxicité est limitée. L'outil développé permettra donc d'évaluer l'impact des différents procédés de traitements sur la biodisponibilité et donc sur la toxicité des micropolluants organiques contenus dans les eaux usées.

### Résultats

La figure 1 représente les résultats préliminaires obtenus sur deux échantillons prélevés en dehors du cadre des campagnes du projet ECHIBIOTEB et qui ont permis de valider la méthode.

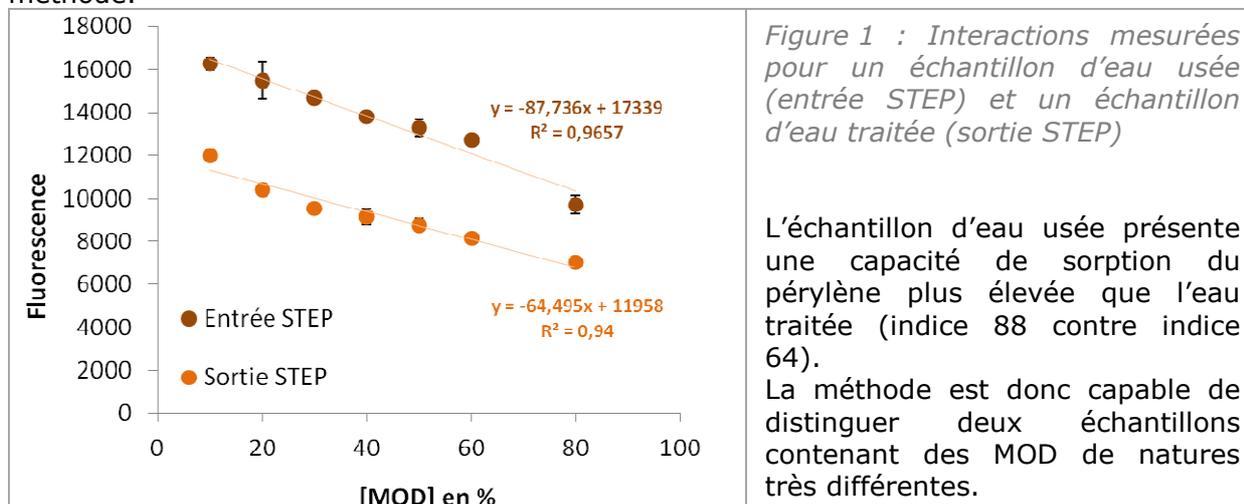


Figure 1 : Interactions mesurées pour un échantillon d'eau usée (entrée STEP) et un échantillon d'eau traitée (sortie STEP)

L'échantillon d'eau usée présente une capacité de sorption du pérylène plus élevée que l'eau traitée (indice 88 contre indice 64).

La méthode est donc capable de distinguer deux échantillons contenant des MOD de natures très différentes.

Par la suite, la méthode a été appliquée aux échantillons issus de la première campagne de prélèvement d'ECHIBIOTEB. Pour ces échantillons, la méthode a dû être optimisée et un ajustement de la concentration de pérylène ajouté a été effectué en passant de 20 mg/L à 2 mg/L. Cette modification a permis d'élargir la phase de quenching qui était initialement trop étroite (uniquement à partir de 50% de MOD).

## Conclusions et perspectives

Nous avons pu mettre en place un protocole tout à fait prometteur en vue du développement d'un outil de caractérisation des interactions MOD-micropolluants organiques. La méthode semble capable de distinguer deux MOD de natures très différentes présentant des capacités de sorption des micropolluants organiques différentes. Dans le contexte des échantillons du projet ECHIBIOTEB, la méthode a nécessité un ajustement qui s'est révélé efficace pour

améliorer la sensibilité de la méthode. D'autres ajustements sont prévus avant d'appliquer la méthode en routine et sur site dans le cadre des campagnes de prélèvement du projet ECHIBIOTEB.

## VIII/ Conclusions générales et perspectives

A ce jour, 9 campagnes d'échantillonnage ont été réalisées :

- 7 pour étudier les procédés d'ozonation, charbon actif et d'oxydation avancée appliqués aux eaux,
- 2 pour étudier les procédés de sécheur solaire et de compostage appliqué aux boues.

Les analyses des molécules cibles (14 éléments traces métalliques (ETM) et 168 micropolluants organiques) ont été réalisées en partie. L'interprétation des résultats est en cours. Il s'agira de sélectionner les molécules pertinentes à suivre pour caractériser les traitements tertiaires des eaux ou les traitements des boues. Par exemple, les molécules absentes (comme certains antibiotiques et anticancéreux dans les eaux) ou celles qui ne sont pas éliminées par les traitements étudiés (comme les ETM dans les eaux, sauf l'étain) ne seront pas forcément sélectionnées ; au contraire des molécules présentes en amont des traitements et qui sont éliminées plus ou moins bien en fonction du traitement considéré (comme certains bêtabloquants).

A ce jour, seul le screening par chromatographie bidimensionnelle (GCxGC) couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (TOFMS) a été réalisé et a permis de distinguer 190 substances dans les échantillons de boue. Il s'agira d'identifier les molécules les plus pertinentes, en terme de toxicité et bio-activité notamment et de les quantifier plus précisément. Ce screening par GCxGC-TOFMS sera poursuivi dans les eaux et aussi par d'autres techniques complémentaires (i.e. la micro-extraction sur phase solide associée à une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour des échantillons d'eaux et des analyses par LC/TOF pour des échantillons de boues et d'eaux).

Concernant les biotests *in vitro*, les profils d'activités en entrée de traitement tertiaire des eaux révèlent la présence récurrente d'activités de type estrogénique à faible niveau, HAP-like et génotoxique. De plus, selon les campagnes, la station ou le type d'échantillon (i.e. eau vs SPMD), des activités (anti)androgéniques sont révélées. Aucune activité (anti)thyroïdienne n'a été détectée quelle que soit la campagne. Dans l'ensemble, les activités mesurées en sortie, lorsqu'elles sont détectées, restent relativement faibles au regard de ce que l'on peut mesurer classiquement en sortie de stations d'épurations urbaines sans traitement tertiaire. Les traitements tertiaires évalués permettent donc une réduction significative des effets biologiques, les résultats des bioessais d'activités estrogénique et HAP-like rejoignent ainsi les conclusions apportées par analyses chimiques ciblées concernant les HAP et les alkyphénols (tâche 2). Cependant, les faibles niveaux d'activité détectés dans les eaux compromettent la mise en œuvre de l'approche EDA (Effect Directed Analyses) sur ces échantillons ; cette démarche devra probablement être limitée à des échantillons de boue, et éventuellement à des échantillonneurs intégratifs.

Concernant les biotests *in vivo*, peu d'effets toxiques ont été observés pour les eaux à l'amont des traitements tertiaires. Des démarches plus sensibles ou la redéfinition de la façon dont on peut évaluer l'efficacité de tels traitements devront être mises en place. Il serait intéressant par exemple d'étudier les niveaux de contamination des organismes par les micropolluants, afin d'évaluer l'impact des traitements sur les fractions biodisponibles des micropolluants. Néanmoins, les premiers résultats obtenus ont montré que le traitement d'ozonation est susceptible d'accroître la toxicité des effluents vis à vis de la bactérie *V. fischeri*. A l'inverse, l'utilisation des embryons du poisson médaka, montre que les deux traitements testés (ozonation et ozonation+charbon actif) permettent de diminuer significativement la toxicité des effluents.

A ce jour, nous avons observé que l'échantillonnage intégratif permettait de détecter des composés supplémentaires (comme l'aténolol, sotalol, propranolol, métoprolol, nordiazepam, amitryptilline et alprazolam en aval des traitements tertiaires ; le clenbuterol, gemfibrozil,

imipramine et doxépine en amont des traitements tertiaires) par rapport à l'échantillonnage ponctuel. Nous avons également observé que l'application de bioessais *in vitro* sur les SPMD a permis un effet de concentration des activités mesurées par rapport aux matrices aqueuses. Ces premières conclusions devront être complétées suite aux analyses à venir. Néanmoins, ceci confirme l'intérêt de ce mode d'échantillonnage couplé aux analyses chimiques ciblées ou aux bioessais *in vitro* pour caractériser les traitements tertiaires des eaux.

Enfin, le protocole développé pour caractériser des interactions MOD-micropolluants organiques semble capable de distinguer deux MOD d'origine différentes et présentant des capacités de sorption des micropolluants organiques différentes.

Au terme du projet, nous devrions pouvoir fournir :

- Une liste (non exhaustive) de nouveaux composés indésirables, présents dans les eaux avant et après traitement avancé, ceci afin d'anticiper les législations futures ;
- Des guides de bonne exploitation des outils pertinents parmi ceux testés pour la caractérisation des procédés de traitement des eaux et des boues ;
- Un bilan de la comparaison de l'efficacité des procédés optimisés selon les outils innovants testés ;
- Une méthodologie de diagnostic des performances des procédés de traitement des eaux usées et des boues vis à vis des micropolluants ;
- Des stratégies de déploiement des outils et d'interprétation des données issues de ces technologies innovantes pour faciliter les schémas de gestion et la prise de décision par les industriels et les collectivités territoriales vis à vis de l'implémentation de la DCE.

### C.3 DIFFICULTES RENCONTREES ET SOLUTIONS

- A propos des livrables 1 (planning définitif des campagnes) et 4 (choix définitif des sites et traitements optimisés à étudier) : Il est finalement difficile d'acter sur un planning définitif dès le démarrage du projet pour les 2 ans à venir (aléas dus à l'implication de nombreux partenaires, i.e. ceux du projet et les gestionnaires des stations d'épuration). Le planning et le choix des sites sont donc calés au fur et à mesure de l'avancée du projet (à ce jour : 9 campagnes réalisées, 2 déjà planifiées fin 2012, 2 restant à planifier début 2013).

- Nous pensions pouvoir exposer les échantillonneurs intégratifs (tâche 6) directement dans les influents et effluents des procédés étudiés. Nous n'avions pas prévu que les conditions en entrée et sortie de ces procédés pouvaient être différentes et donc non comparables (les débits notamment). Nous avons dû repenser notre organisation et prévoir une exposition *ex situ* comme réalisé pour les bioessais *in vivo*. Ce contretemps n'a finalement pas induit de retard dans notre calendrier.

- Lors de la première campagne longue (ASE-PA-ECH1), nous avons rencontré des problèmes de disjonctage liés à l'installation électrique. Afin d'éviter que ces problèmes ne se reproduisent lors de la deuxième campagne sur ce site (ASE-PA-ECH2), nous avons fait venir un spécialiste pour vérifier et rendre conforme le système électrique.

- Suez-Environnement CIRSEE : L'analyse de l'iopromide, initialement prévue en même temps que celle des herbicides, n'a pas conduit à des résultats satisfaisants du fait des propriétés physico-chimiques de ce composé. Ce paramètre a été remplacé par une dizaine d'antibiotiques.

- Pour les tâches 4 et 7 (bioessais *in vitro* et *in vivo*), une principale difficulté rencontrée concerne la faible voire la non réponse biologique mesurée dans les eaux avant et après traitement tertiaire vis à vis des bioessais *in vitro* et *in vivo* sélectionnés. Des niveaux de réponses (de toxicité ou d'activité biologique) plus forts sont attendus dans les boues.

Concernant les bioessais *in vivo* focalisés sur les eaux, une alternative à envisager serait de réaliser des mesures chimiques des contaminants (à cibler) dans les organismes. Ces mesures de contaminants bioaccumulés permettraient d'évaluer l'impact des traitements étudiés sur le niveau de contamination biodisponible dans les eaux.

- La faible réponse biologique (bioessais *in vitro*) mesurée dans les eaux compromet l'intérêt de mettre en œuvre la démarche EDA sur les échantillons d'eau. Nous envisageons donc de restreindre la démarche EDA aux échantillons de boue (à confirmer suite aux prochaines campagnes et au sein du consortium).

#### C.4 FAITS ET RESULTATS MARQUANTS

- Le partenaire Envulure a mis au point une première version d'un prototype de test au format microplaque pour la détection rapide et sur site des interactions entre MOD et micropolluants. Envulure envisage la possibilité d'un dépôt de brevet sur ce test.

- CIRSEE Suez Environnement, EPOC-LPTC et Irstea : Les premiers résultats de mesure chimiques ciblées permettent de dresser une liste de molécules présentes en amont des procédés étudiés et confirment pour une partie de ces molécules une baisse des concentrations en aval de ces procédés.

- CIRSEE Suez Environnement : Le screening de boues par chromatographie bidimensionnelle révèle un nombre élevé de composés (1500-1800 par boue) présents individuellement à des niveaux supérieurs à 100 µg/kg. Parmi les composés identifiés, on note une grande variété de composés hétérocycliques azotés (dérivés de pyridine, pyrrole, indole, pipéridone et pipéridinone...) non étudiés à ce jour. Le screening des eaux a été démarré, mais sur des eaux assez peu chargées (500-800 pics/échantillon) et devra donc être complété.

- EPOC-LPTC : Mise en évidence d'une toxicité des effluents de station après ozonation sur la souche bactérienne *Vibrio fisheri*. En revanche, aucune toxicité mise en évidence sur modèle poisson (embryons et larves de Médaka Japonais).

- 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 fin 2014.

#### C.5 TRAVAUX SPECIFIQUES AUX ENTREPRISES (LE CAS ECHEANT)

Entreprise	Envulure SAS
Rédacteur (nom + adresse mél)	Mathieu Muller ; mathieu.muller@envulure.com
<p>Envulure est impliqué sur la tâche 8 du projet ECHIBIOTEB : développement d'un outil analytique haut-débit pour la caractérisation <i>in situ</i> des interactions matières organiques dissoutes-micropolluants organiques. Cet outil permettra d'évaluer la biodisponibilité d'un micropolluant au cours du traitement des eaux usées et donc de se faire une idée de son impact toxicologique éventuel. Pour ce développement, Envulure apporte au projet son expertise sur la caractérisation des matières organiques par fluorescence et son savoir faire sur la conception d'outil analytique haut débit, sur la base du format microplaque, pour un diagnostic rapide sur site. Le test développé complète de manière intéressante les autres outils chimiques et biologiques mis en œuvre dans le projet ECHIBIOTEB afin de permettre une évaluation complète et pertinente des procédés de traitement étudiés. Malgré l'intérêt que présente l'outil développé dans le cadre d'un projet de recherche (rapidité, facilité d'utilisation, screening haut-débit), aucune perspective industrielle et commerciale n'est envisagée à ce jour par Envulure. Une étude de marché plus poussée serait à envisager avant de songer à intégrer cet outil dans le catalogue Envulure sous la forme d'un kit.</p>	

Entreprise	<b>Suez-Environnement</b>
Rédacteur (nom + adresse mél)	Auguste Bruchet auguste.bruchet@suez-env.com
La tâche 3 de screening, dont Cirsee-Suez Environnement est responsable, devrait permettre de dégager des indicateurs pertinents à suivre dans les eaux traitées et à mieux faire face aux appels d'offre comportant des spécifications sur des micropolluants émergents (approche Suisse).	

## C.6 REUNIONS DU CONSORTIUM (PROJETS COLLABORATIFS)

Date	Lieu	Partenaires présents	Thème de la réunion
15/09/2010 (avant le démarrage officiel du projet)	Paris	Jérôme Cachot, Marie-Hélène Devier (LPTC, univ. Bordeaux 1) Mar Esperanza, Auguste Bruchet (Suez-Environnement) Yves Dudal (Envolure) Selim Ait-Aissa (INERIS) Cécile Miège, Fabienne Serveto, Romain Jacquet, Jean-Marc Choubert, Marina Coquery (Cemagref) Lucie Oziol (matin), Yves Levi (après-midi) (Univ. Paris Sud) Stéphane Garnaud, Pierre-Francois Staub (Onema)	Prise de contact entre les partenaires, présentation du projet, préparation au démarrage du projet.
28/09/2011	Paris	M. Coquery, O Geffard, C. Miège, F. Serveto (Cemagref) Y. Dudal (Envolure) H. Budzinski, J. Cachot (EPOC-LPTC) S. Ait-Aissa, E. Maillot-Maréchal, P. Pandard (INERIS) S Garnaud, O Perceval (ONEMA) S. Besnault, A. Bruchet, S. Martin, N. Noyon (Suez Environnement) M Bimbot, Y Lévi, L Oziol (Univ Paris Sud)	Bilan à 6 mois (résultats préliminaires aux campagnes <i>in situ</i> ; résultats des premières campagnes réalisées) et préparation des campagnes suivantes.
16/05/2012	Paris	Ph Bados, M-J Capdeville, M. Coquery, L Dherret, O Geffard, A François, C Michard, C. Miège, F. Serveto (Cemagref) M Muller (Envolure) J. Cachot, A Guillon, K Le Menach (EPOC-LPTC) S. Ait-Aissa, N Creusot, P. Pandard (INERIS) S. Besnault, A. Bruchet, N. Noyon (Suez Environnement) M Bimbot, Y Lévi (Univ Paris Sud)	Bilan en début d'année 2 sur les résultats obtenus, préparation du rapport à mi-parcours et de la présentation à rendre à l'ANR.

## C.7 COMMENTAIRES LIBRES

### Commentaires du coordinateur

Les échanges au sein du consortium sont nombreux et fructueux ; ils ont permis la mise en place (i) de tests préliminaires pour le calage des outils et (ii) des 9 premières campagnes *in situ* pour l'application de ces outils. Aucun retard notable à signaler pour ce projet. Accord du coordinateur pour la poursuite du financement de chaque partenaire.

## Commentaires des autres partenaires

RAS

## Question(s) posée(s) à l'ANR

RAS

## D VALORISATION ET IMPACT DU PROJET DEPUIS LE DEBUT

### D.1 PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Liste des publications multipartenaires (résultant d'un travail mené en commun)		
International	Revue à comité de lecture	RAS
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage	
	Communications (conférence)	
		<ol style="list-style-type: none"><li>1. C Miège, F Serveto, R Jacquet, O Geffard, J-M Choubert, A Bruchet, M Esperanza, S Besnault, S Martin, H Budzinski, J Cachot, M-H Devier, S Aït-Aïssa, P Pandard, Y Levi, L Oziol, S Karolak, Y Dudal, N Pautremat, M Coquery, Outils innovants d'Echantillonnage, d'analyses CHImiques et BIOLogiques pour le suivi de Traitements avancés des Eaux usées et des Boues (ECHIBIOTEB) (<b>poster</b>) 6èmes journées Ecotechnologies 2011, 8-10 novembre 2011, Paris, France</li><li>2. N. Noyon, M. Esperanza, S. Besnault, C. Miège, A. Bruchet, Screening of Environmental matrices by comprehensive two-dimensional Gas-Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry (<b>poster</b>), 9<sup>th</sup> GCxGC Symposium, May 27-June 1<sup>st</sup>, 2012, Riva des Garda, Italy</li><li>3. MJ. Capdeville, F. Serveto, H. Budzinski, A. Guillon, A. Bruchet, N. Noyon, R. Jacquet, K Le Menach, M. Coquery, C. Miège, Use of passive samplers (POCIS and SPMD) for the monitoring of wastewater advanced treatments (<b>conference proposée</b>) 5th International Passive Sampling Workshop and Symposium (IPSW 2012), 11-12 sept, Columbia, Missouri, Etats-Unis.</li></ol>
France	Revue à comité de lecture	RAS
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage	
	Communications (conférence)	
Actions de diffusion	Articles de vulgarisation	RAS
	Conférences de vulgarisation	
	Autres	

Liste des publications monopartenaires (impliquant un seul partenaire)		
International	Revue à comité de lecture	RAS
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage	
	Communications (conférence)	
France	Revue à comité de lecture	
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage	
	Communications (conférence)	
Actions de diffusion	Articles de vulgarisation	
	Conférences de vulgarisation	
	Autres	

## D.2 AUTRES ELEMENTS DE VALORISATION

Liste des éléments. Préciser les titres, années et commentaires	
Brevets internationaux obtenus	RAS
Brevet internationaux en cours d'obtention	
Brevets nationaux obtenus	
Brevet nationaux en cours d'obtention	
Licences d'exploitation (obtention / cession)	
Créations d'entreprises ou essaimage	
Nouveaux projets collaboratifs	
Colloques scientifiques	
Autres (préciser)	

### D.3 POLES DE COMPETITIVITE (PROJET LABELLISES)

Le projet ECHIBIOTEB a été labellisé par le **pôle de compétitivité Axelera** (abondement de **12 000 €**). Ce complément de financement sera utilisé notamment pour l'organisation d'un colloque public de restitution final, qui aura pour but de diffuser et discuter des guides méthodologiques qui permettront aux opérateurs de l'eau et aux instances chargées de la mise en application de la DCE de répondre au mieux à la problématique de l'élimination des micropolluants dans les rejets, notamment urbains.

### D.4 PERSONNELS RECRUTES EN CDD (HORS STAGIAIRES)

Identification				Avant le recrutement sur le projet			Recrutement sur le projet			
Nom et prénom	Sexe H/F	Adresse email (1)	Date des dernières nouvelles	Dernier diplôme obtenu au moment du recrutement	Lieu d'études (France, UE, hors UE)	Expérience prof. antérieure (ans)	Partenaire ayant embauché la personne	Poste dans le projet (2)	Date de recrutement	Durée missions (mois) (3)
Landi Laure	F	laure.land i@hotmail .fr	/	Master Eau et Santé Environnement Bordeaux I	Bordeaux	24 mois (LPTC, IRD, industrie pharmaceutique, ...)	EPOC-LPTC	Assistant Ingénieur	01/09/2011	6 mois
Serveto Fabienne	F	fabienne.s erveto@g mail.com	Encore en poste	Master pro MSA Rennes I	Le Mans et Rennes (France)	30 mois (CDD INRA + Savoie labo + Irstea)	Irstea (Cemagref)	Ingénieur d'Etude	01/12/2010	24 mois

### D.5 ÉTAT FINANCIER

Nom du partenaire	Crédits consommés (en %)	Commentaire éventuel
Irstea (Cemagref)	46%	% de la subvention allouée
Suez Environnement	31%	
Epoc, UMR 5805, Université Bordeaux 1	23%	
UMR8079 (Université Paris Sud 11)	20%	
INERIS	30%	
ENVOLURE SAS	29%	

## E ANNEXES

### E.1 ANNEXE 1 : CAMPAGNES REALISEES PENDANT LA PERIODE DE MAI 2011 A AVRIL 2012 SUR DES PROCEDES EAUX ET BOUES

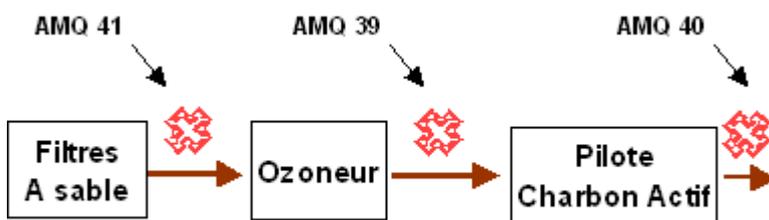
Les échantillons sont identifiés par le code "AMQ X" (pour les campagnes courtes communes avec le projet ARMISTIQ) ou "ECH X" (pour les campagnes longues exclusivement ECHIBIOTEB). Les lieux des campagnes ne sont pas communiqués par soucis de confidentialité.

#### I/ Campagnes Eaux

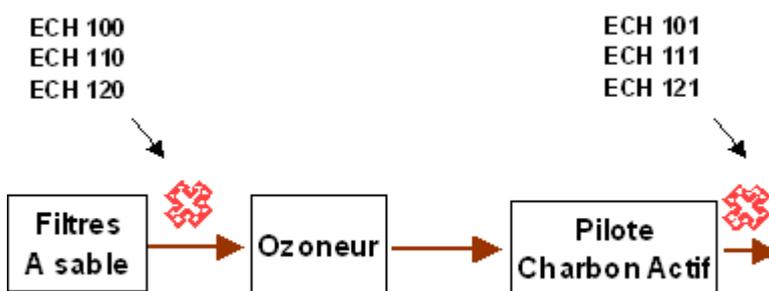
#### **Campagnes ASE1-PA4, ASE-PA-ECH1 et ASE-PA-ECH2 => Ozonation (+ Pilote de Charbon actif)**

- Dose d'ozone : 3g /m<sup>3</sup>

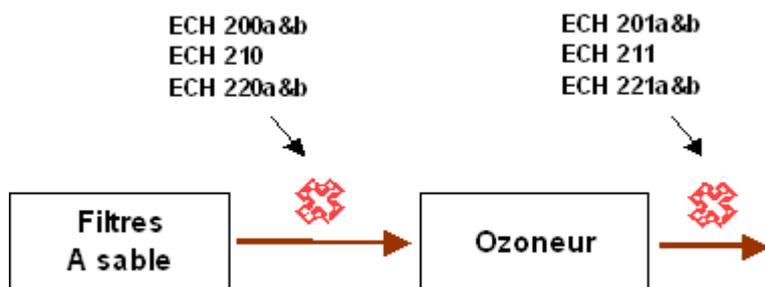
#### **ASE1-PA4 (Mai 2011):**



#### **ASE-PA-ECH1 (Septembre/Octobre 2011):**



**ASE-PA-ECH2 (Mars/Avril 2012):**



**Durée exposées :**

Prélèvement à J0 : ECH100, 101, 200a&b, 201a&b

Prélèvement à J14 : ECH110, 111, 210, 211,

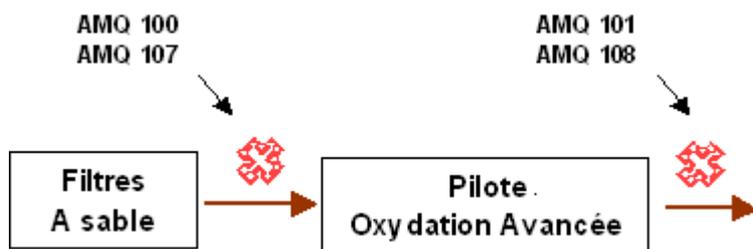
Prélèvement à J28: ECH 120, 121, 220a&b, 221a&b

**Campagnes ASE2-PA2&3 et ASE3-PA2&3  
=> *Pilote d'oxydation avancée***

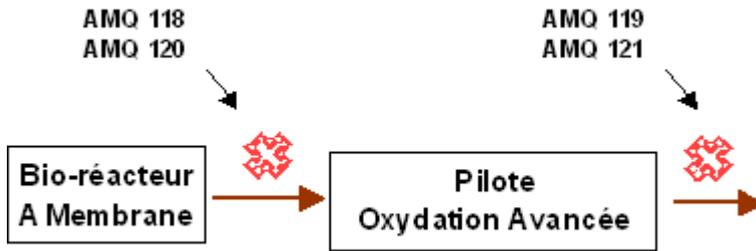
**Conditions testées :**

Echantillons	Description	Dose Ozone (g/m3)	Dose H2O2 (mg/L)	Dose UV (mJ/cm2)	Temps de contact
AMQ 100, 101 AMQ 118, 119	Ozone / peroxide 1/1	5	3.5	0	2.71
AMQ 107, 108 AMQ 120, 121	UV / Peroxide	0	10	795	10

**ASE3-PA2&3 (Octobre 2011):**



**ASE2-PA2&3 (Novembre/Décembre 2011):**

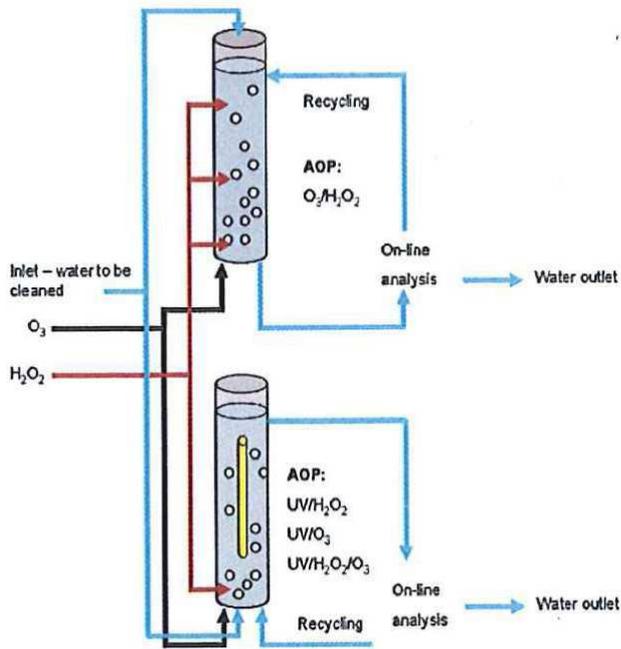


**Fonctionnement du pilote d'oxydation avancée :**

Deux lignes de traitement en parallèle :

O3 ou O3/H2O2

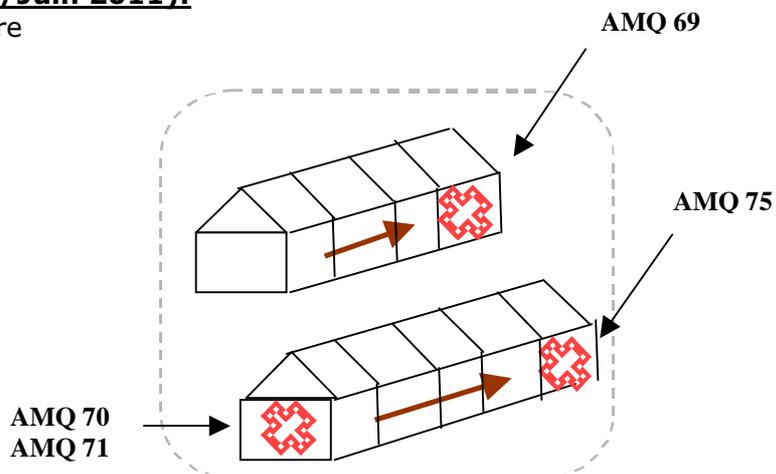
O3/UV ou H2O2/UV



**II/ Campagnes Boues**

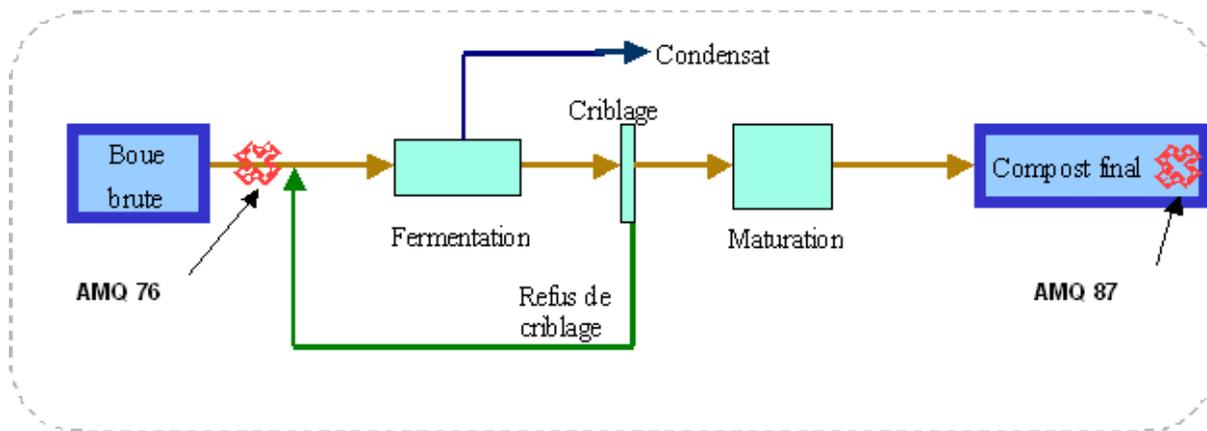
**ASE3-Boue (Mai/Juin 2011):**

=> Sécheur Solaire



**ASE5-Boue (Juin/Aout 2011):**

=> Compostage



## E.2 ANNEXE 2 : LISTE DES MOLECULES CIBLEES DANS LE PROJET

### Les micropolluants organiques :

Laboratoire	Classe	Molécules	Dans les eaux	Dans les boues	Dans les extraits de POCIS ou SPMD
EPOC-LPTC	Alkyphénols	4-NP (Nonylphenols)	x	x	POCIS
		4-t-OP (Octylphenols)	x	x	POCIS
		4-NP1EO (Nonylphenols poly-ethoxylates)	x	x	POCIS
		4-NP2EO (Nonylphenols poly-ethoxylates)	x	x	POCIS
		Acides alkylphenol-polyethoxy-phenoxyacetiques	x	x	POCIS
		Bisphénol A	x	x	POCIS
		Terbutylphénol	x		POCIS
Cirsee		Terbutylphénol	x	x	POCIS
EPOC-LPTC	Antibiotiques	Amoxicilline	x		POCIS
		Ampicilline	x		POCIS
		Oxacilline	x		POCIS
		Cloxacilline	x		POCIS
		Dicloxacilline	x		POCIS
		Pénicilline G	x		POCIS
		Pénicilline V	x		POCIS
		Cefalexine	x		POCIS
		Cefotaxime	x		POCIS
		Ceftiofur	x		POCIS
		Cefpodoxime	x		POCIS
		Cefuraoxime	x		POCIS
		Azithromycine	x	x	POCIS
		Clarithromycine	x	x	POCIS
		Erythromycine	x	x	POCIS
		Josamycine	x		POCIS
		<b>Roxithromycine</b>	x	x	POCIS
		Spiramycine	x		POCIS
		Tylosine	x		POCIS
		Lincomycine	x		POCIS
		Clindamycine	x	x	POCIS
		Ciprofloxacine	x	x	POCIS
		Enrofloxacin	x	x	POCIS
		Marbofloxacine	x		POCIS
		Norfloxacine	x	x	POCIS
		Ofloxacine	x	x	POCIS
		Acide pipémidique	x	x	POCIS
		Acide oxolinique	x	x	POCIS
		Fluméquine	x	x	POCIS
		Tétracycline	x	x	POCIS
		Oxytétracycline	x	x	POCIS
		Chlortétracycline	x		POCIS
		Doxycycline	x	x	POCIS
		Sulfadiazine	x	x	POCIS
		Sulfadiméthoxine	x	x	POCIS
		Sulfamérazine	x	x	POCIS
		Sulfaméthazine	x	x	POCIS
		Sulfaméthizole	x	x	POCIS
		<b>Sulfaméthoxazole</b>	x	x	POCIS
		Sulfapyridine	x		POCIS
		Sulfathiazole	x	x	POCIS
Sulfanilamide	x		POCIS		
Triméthoprime	x	x	POCIS		
Monensine	x		POCIS		
Salinomycine	x		POCIS		
Virginiamycine	x		POCIS		
Chloramphénicol	x		POCIS		
Thiamphénicol	x		POCIS		
Bacitracine	x		POCIS		
Rifampicine	x		POCIS		
Métronidazole	x	x	POCIS		

Laboratoire	Classe	Molécules	Dans les extraits		
			Dans les eaux	Dans les boues	de POCIS ou SPMD
EPOC-LPTC	Anticancéreux	5-Fluorouracil	x		POCIS
		Daunorubicine	x	x	POCIS
		Doxorubicine	x		POCIS
		Epirubicine	x		POCIS
		Ifosfamide	x	x	POCIS
		Cyclophosphamide	x	x	POCIS
		Docetaxel	x		POCIS
		Methotrexate	x	x	POCIS
		Tamoxifen	x	x	POCIS
		Gemcitabine	x		POCIS
EPOC-LPTC	Antiviraux	Abacavir	x		POCIS
		Indinavir	x		POCIS
		Lamivudine	x		POCIS
		Nelfinavir	x		POCIS
		Nevirapine	x		POCIS
		Ritonavir	x		POCIS
		Saquinavir	x		POCIS
		Stavudine	x		POCIS
Zidovudine	x		POCIS		
EPOC-LPTC	Inhibiteurs PDE 5	Sildenafil	x		POCIS
Irstea (Cemagref)	Bêtabloquants	Oxprénolol	x		POCIS
		<b>Métoprolol</b>	x		POCIS
		Timolol	x		POCIS
		<b>Propranolol</b>	x	x	POCIS
		Nadolol	x		POCIS
		Bêtaxolol	x		POCIS
		Bisoprolol	x		POCIS
		<b>Acébutolol</b>	x	x	POCIS
		<b>Aténolol</b>	x	x	POCIS
		<b>Sotalol</b>	x		POCIS
EPOC-LPTC	Médicaments courants	Caféine	x	x	POCIS
		<b>Carbamazépine</b>	x	x	POCIS
		Diazépam	x	x	POCIS
		Nordiazépam	x	x	POCIS
		Amitriptyline	x	x	POCIS
		Doxépine	x	x	POCIS
		Imipramine	x	x	POCIS
		<b>Ibuprofène</b>	x	Pb	POCIS
		<b>Paracétamol</b>	x	x	POCIS
		Kétoprofène	x	Pb	POCIS
		Naproxène	x	Pb	POCIS
		Aspirine	x	Pb	POCIS
		<b>Diclofénac</b>	x	Pb	POCIS
		Gemfibrozil	x	Pb	POCIS
		Clenbutarol	x	x	POCIS
		Salbutamol	x	x	POCIS
		Terbutaline	x	x	POCIS
		Théophylline	x	x	POCIS
		Alprazolam	x	x	POCIS
		Bromazépam	x	x	POCIS
Fluoxétine	x	x	POCIS		
Acide fenofibrique	x	Pb	POCIS		
Cirsee	Agents de contraste	<b>Iopromide</b>	x		POCIS
Irstea (Cemagref)	Hormones	<b>Estrone (E1)</b>	x	x	POCIS
		<b>17<math>\alpha</math>-estradiol (Ea2)</b>	x	x	POCIS
		<b>17<math>\beta</math>-estradiol (Eb2)</b>	x	x	POCIS
		<b>Estriol (E3)</b>	x	x	POCIS
		<b>Ethinylestradiol (EE2)</b>	x	x	POCIS
EPOC-LPTC	Pesticides (organochlorés)	Hexachlorobenzène		x	SPMD
		Hexachlorobutadiène		x	SPMD
		Alpha Hexachlorocyclohexane		x	SPMD
		Beta hexachlorocyclohexane		x	SPMD
		Gamma hexachlorocyclohexane (lindane)		x	SPMD
		OP Dichlorodiphényldichloroethylene		x	SPMD
		PP Dichlorodiphényldichloroethylene		x	SPMD
		OP Dichlorodiphényldichloroethane		x	SPMD
		PP Dichlorodiphényldichloroethane		x	SPMD
		OP Dichlorodiphényltrichloroethane		x	SPMD
		PP Dichlorodiphényltrichloroethane		x	SPMD

Laboratoire	Classe	Molécules	Dans les extraits		
			Dans les eaux	Dans les boues	de POCIS ou SPMD
Cirsee	Pesticides (triazines, phénylurées)	Atrazine	x		POCIS
		Simazine	x		POCIS
		Diuron	x		POCIS
		Isoproturon	x		POCIS
Irstea (Cemagref) (sous-traitance)	Pesticides	Glyphosate	x		
		AMPA	x		
Cirsee	Phtalate	DEHP		x	SPMD
EPOC-LPTC	PCB	PCB 28		x	SPMD
		PCB 52		x	SPMD
		PCB 101		x	SPMD
		PCB 118		x	SPMD
		PCB 138		x	SPMD
		PCB 153		x	SPMD
		PCB 180		x	SPMD
EPOC-LPTC	HAP	Naphtalène	x	x	SPMD
		Acénaphtylène	x	x	SPMD
		Acénaphène	x	x	SPMD
		Fluorène	x	x	SPMD
		Phénanthrène	x	x	SPMD
		Anthracène	x	x	SPMD
		Fluoranthène	x	x	SPMD
		Pyrène	x	x	SPMD
		Benzo(a)anthracène	x	x	SPMD
		Chrysène	x	x	SPMD
		Benzo(b)fluoranthène	x	x	SPMD
		Benzo(k)fluoranthène	x	x	SPMD
		Benzo(a)pyrène	x	x	SPMD
		Indenopyrène	x	x	SPMD
Dibenz(ah)anthracène	x	x	SPMD		
Benzo(ghi)pérylène	x	x	SPMD		
EPOC-LPTC	PBDE	BDE 28		x	SPMD
		BDE47		x	SPMD
		BDE99		x	SPMD
		BDE100		x	SPMD
		BDE153		x	SPMD
		BDE154		x	SPMD
		BDE183		x	SPMD
		BDE209		x	SPMD
EPOC-LPTC	Autres	Hexabromocyclododecane		x	SPMD
		Tetrabromobisphénol A		x	SPMD
		PBB153		x	SPMD
Cirsee		Benzothiazole		x	SPMD

Pb : problèmes d'interférences chromatographiques

**Les micropolluants métalliques** : Titane, Chrome, Nickel, Cobalt, Cuivre, Zinc, Arsenic, Cadmium, Plomb, Uranium dans les eaux et boues ; Mercure et Argent dans les boues seulement.

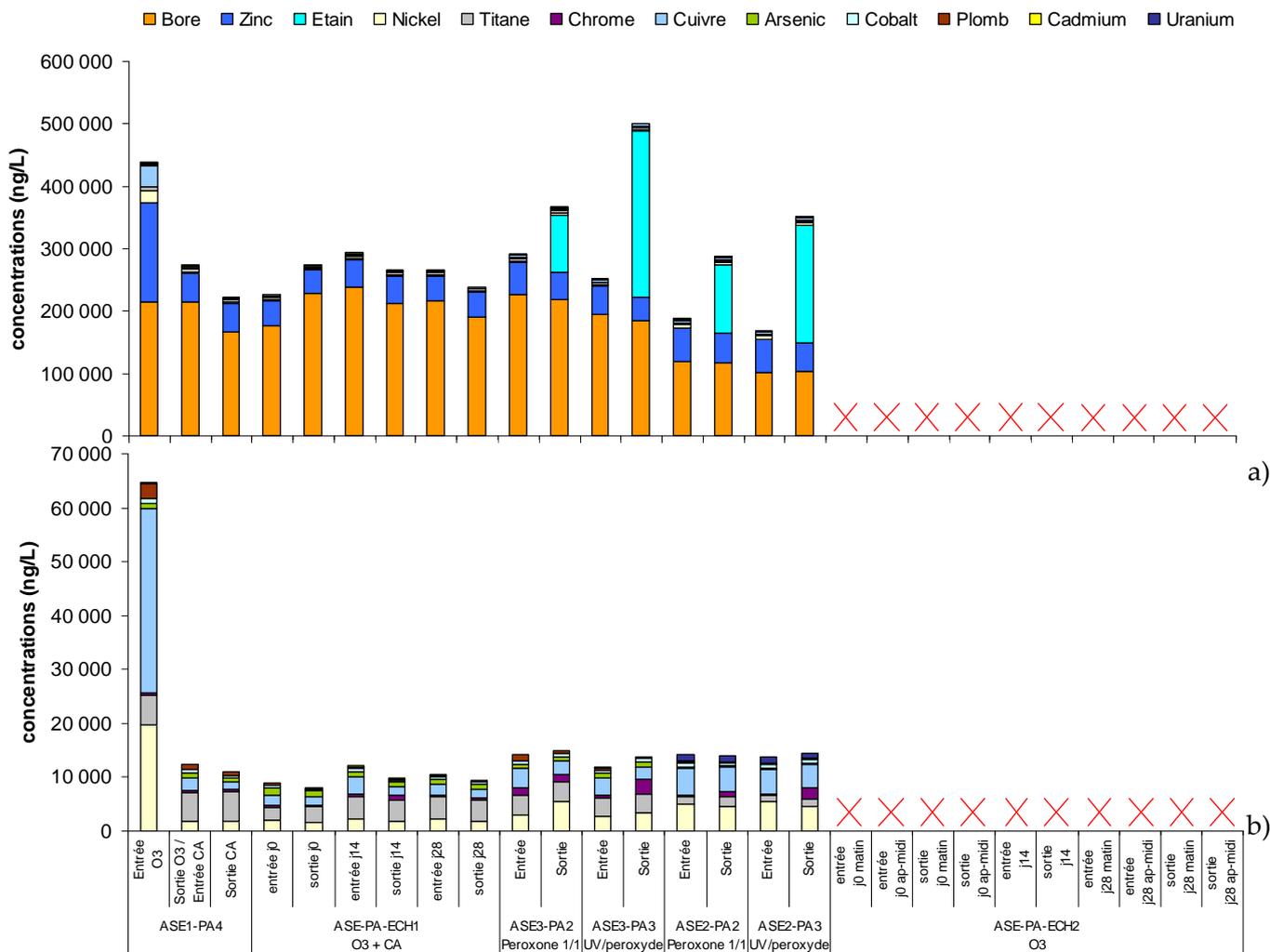
### E.3 ANNEXE 3 : ANALYSE DES MOLECULES CIBLES (TACHE 2)

✗ : résultat d'analyse non disponible aujourd'hui.

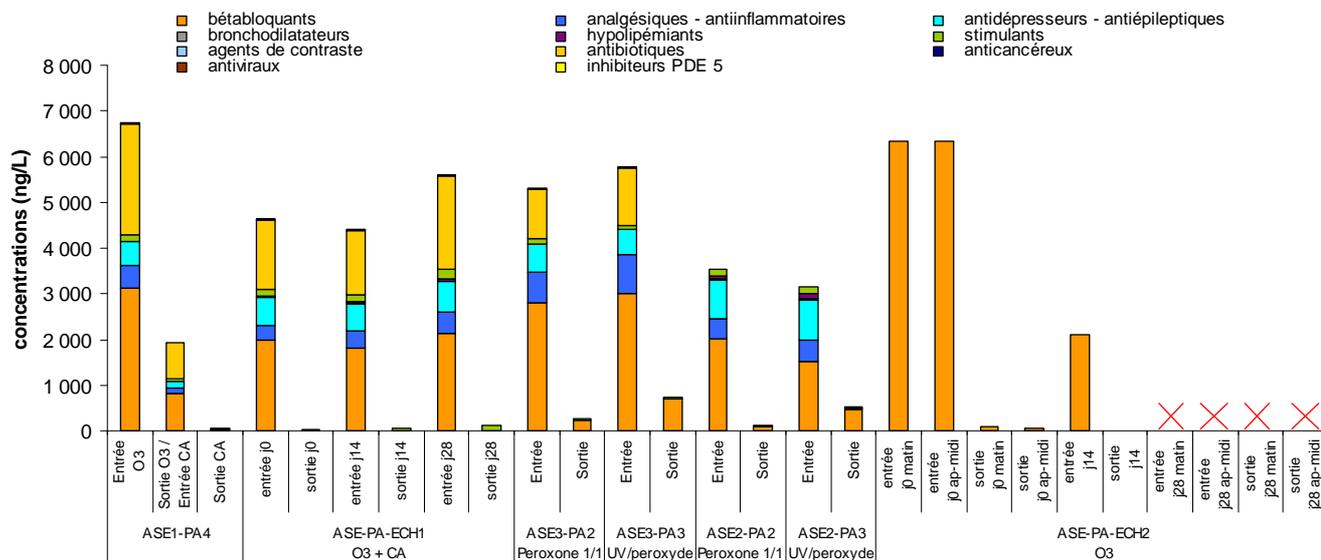
CA : charbon actif

m.s. : matière sèche

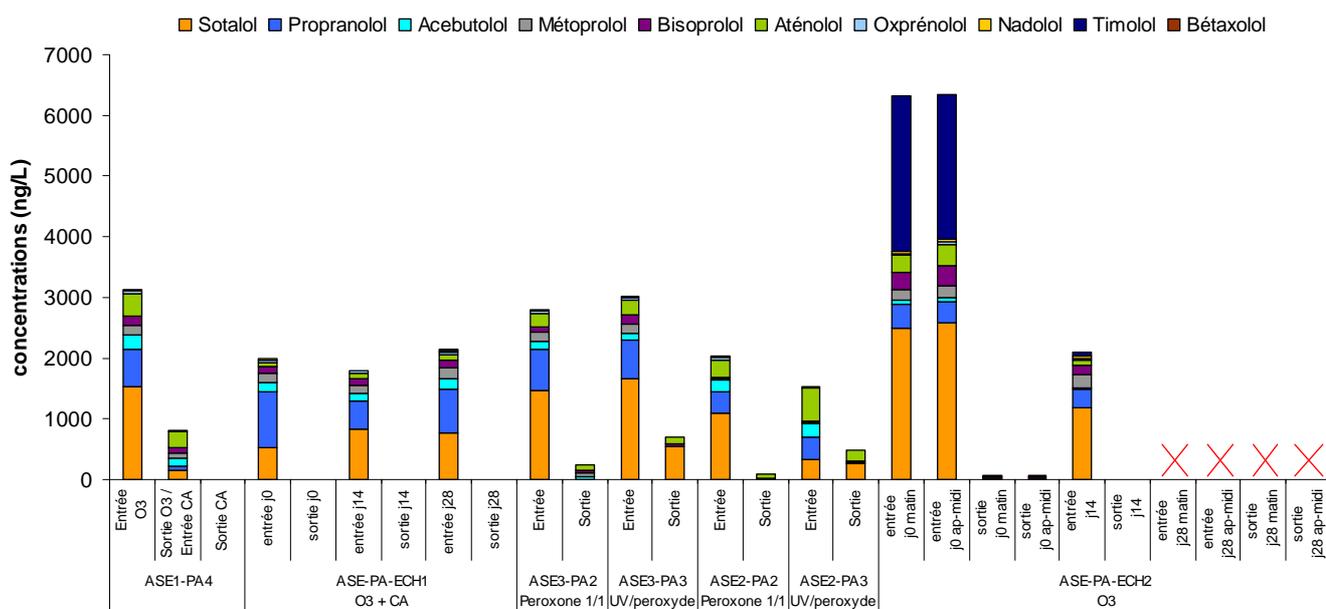
#### 1/ Caractérisation de la phase dissoute :



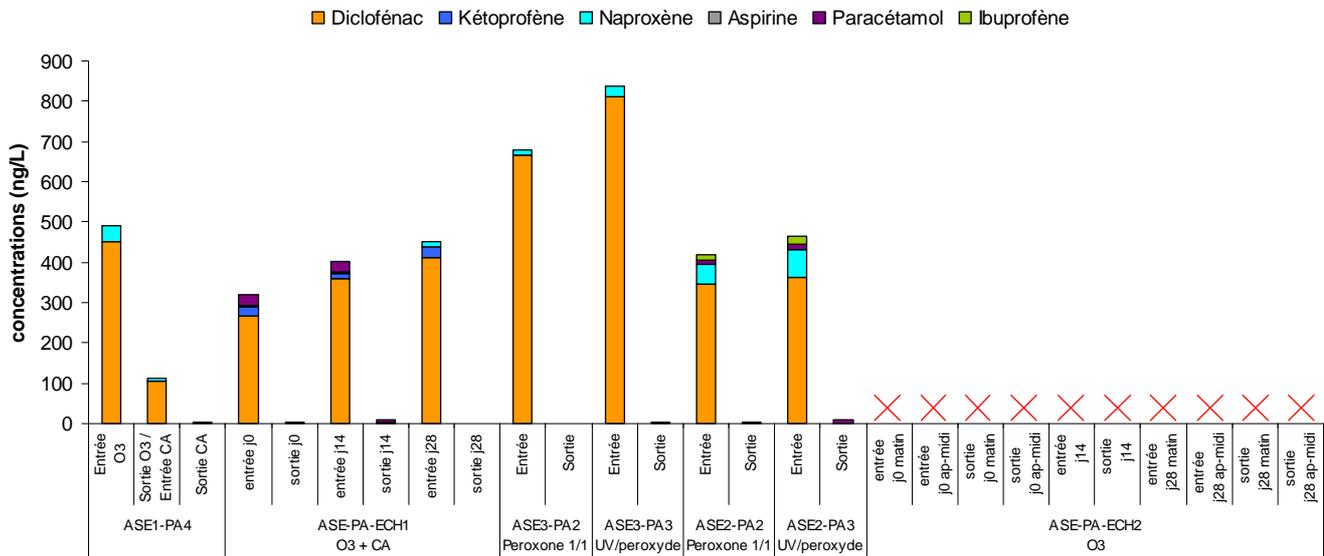
**Figure 1** : Concentration en éléments traces métalliques dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés. Les concentrations en ETM non visibles sur le graphe a) sont visibles sur le graphe b) sans les ETM les plus abondants (B, Zn, Sn).



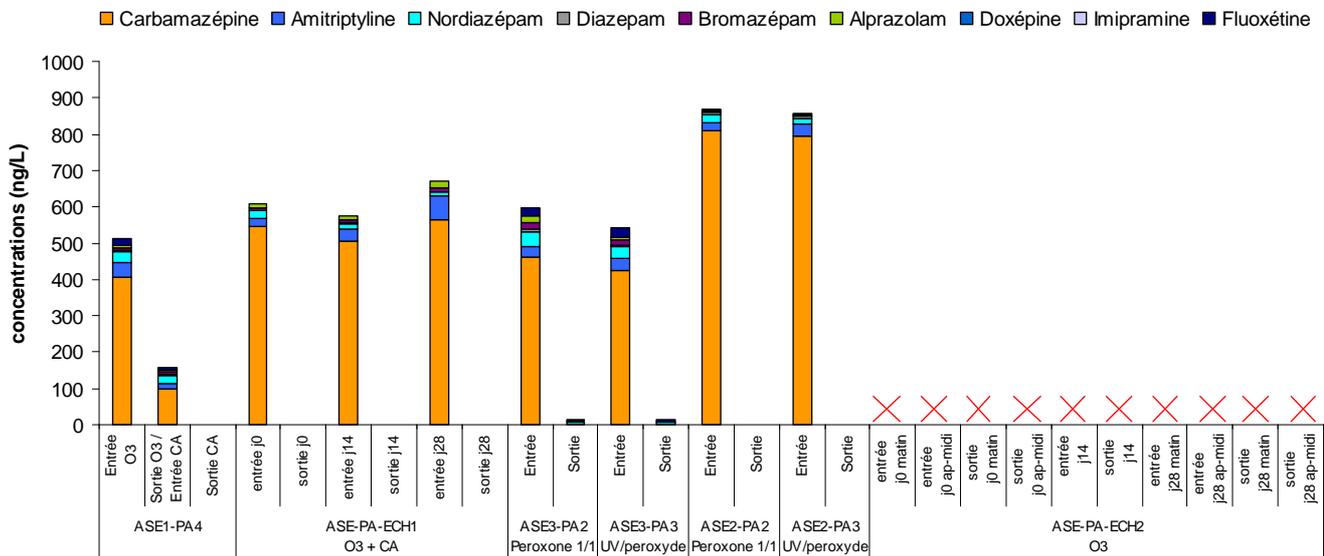
**Figure 2 :** Concentration en médicaments dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés (remarque : à l'heure actuelle, les antibiotiques n'ont pas été recherchés pour les campagnes ASE2-PA2 et ASE2-PA3 et seuls les bêtabloquants ont été recherchés dans les échantillons J0 et J14 de la campagne ASE-PA-ECH2).



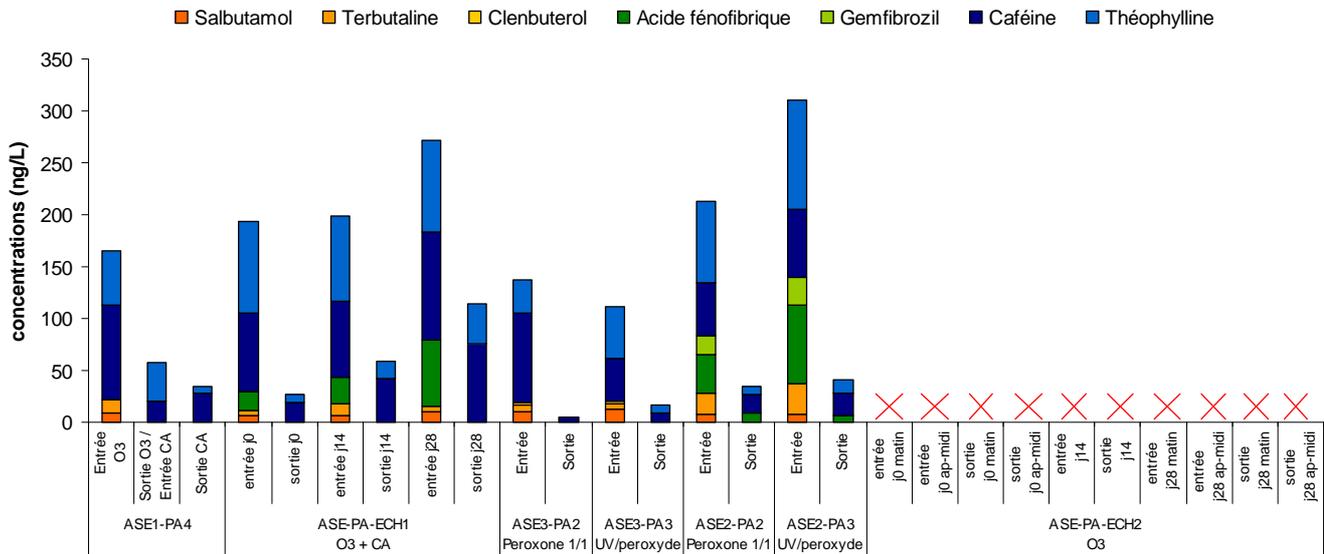
**Figure 3 :** Concentration en bêtabloquants dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.



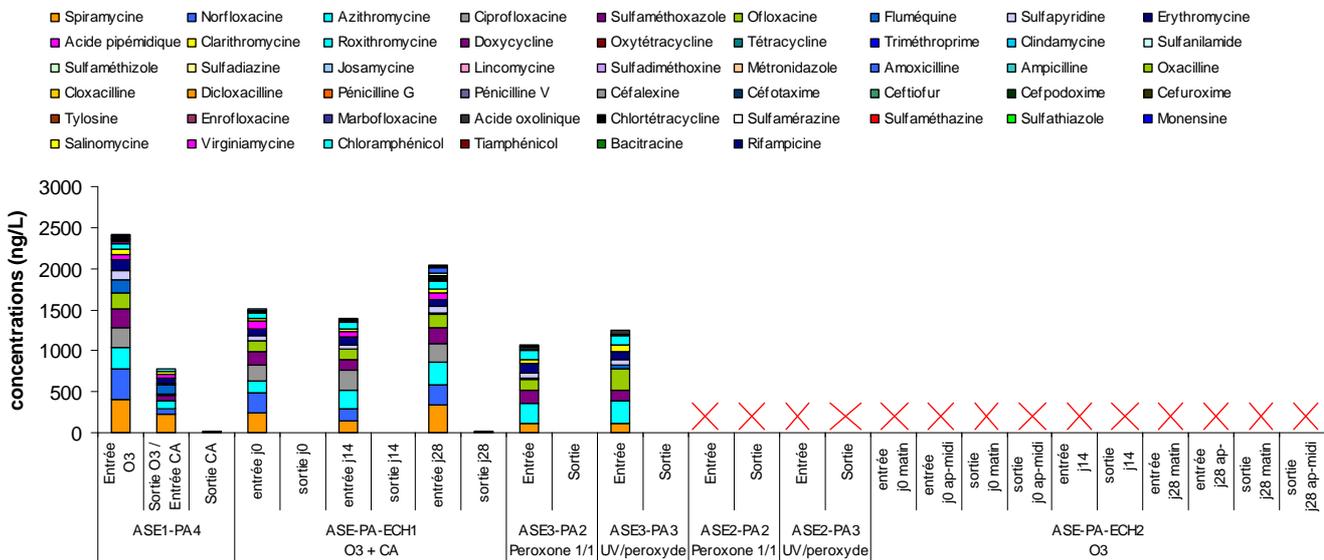
**Figure 4 :** Concentration en analgésique-anti-inflammatoires dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.



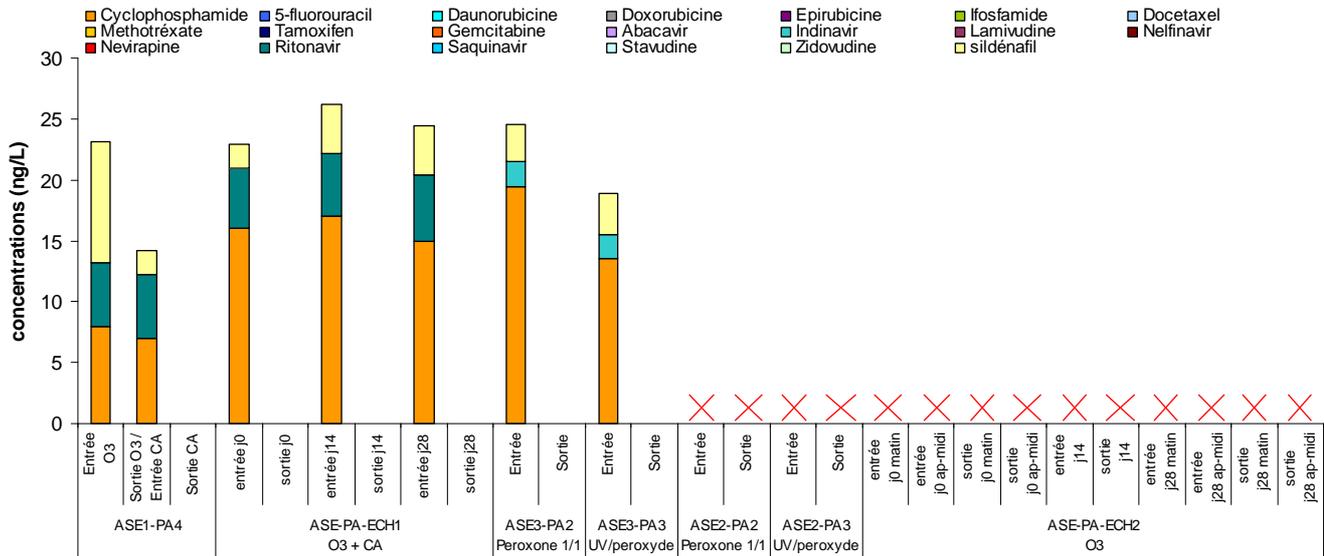
**Figure 5 :** Concentration en antidépresseurs-antiépileptiques dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.



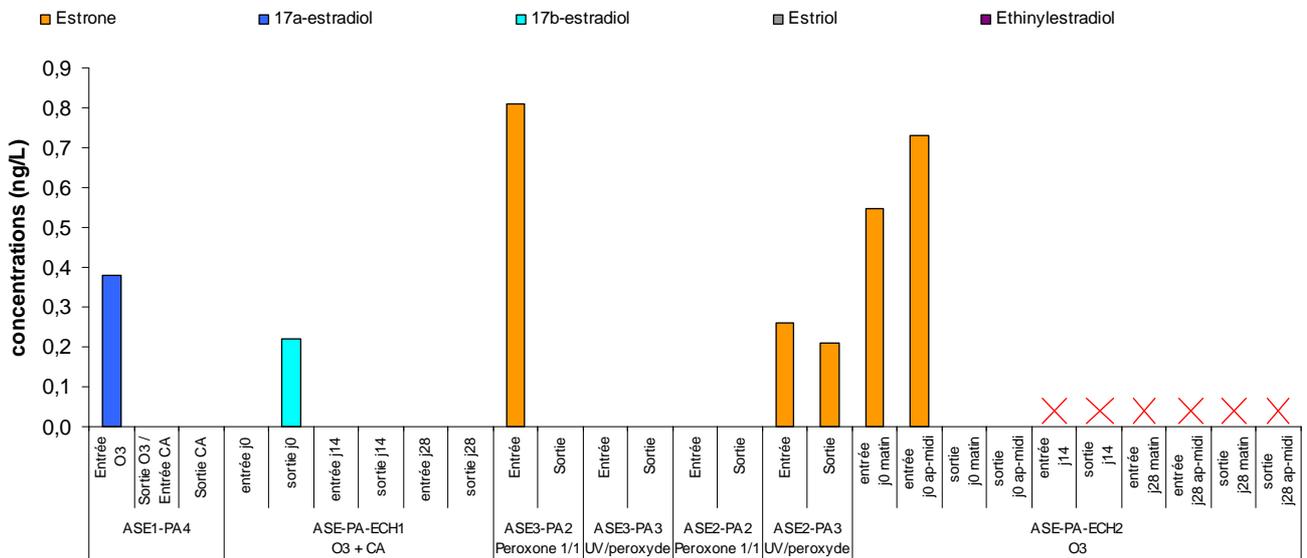
**Figure 6 :** Concentration en bronchodilatateurs, hypolipémiants et stimulants dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.



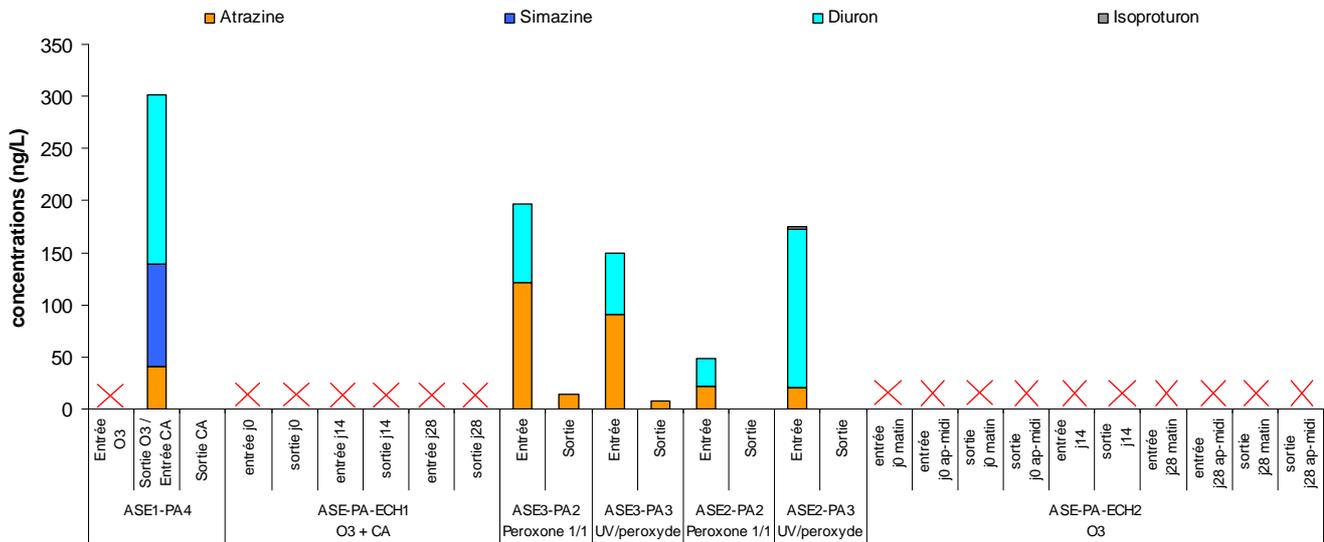
**Figure 7 :** Concentration en antibiotiques dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.



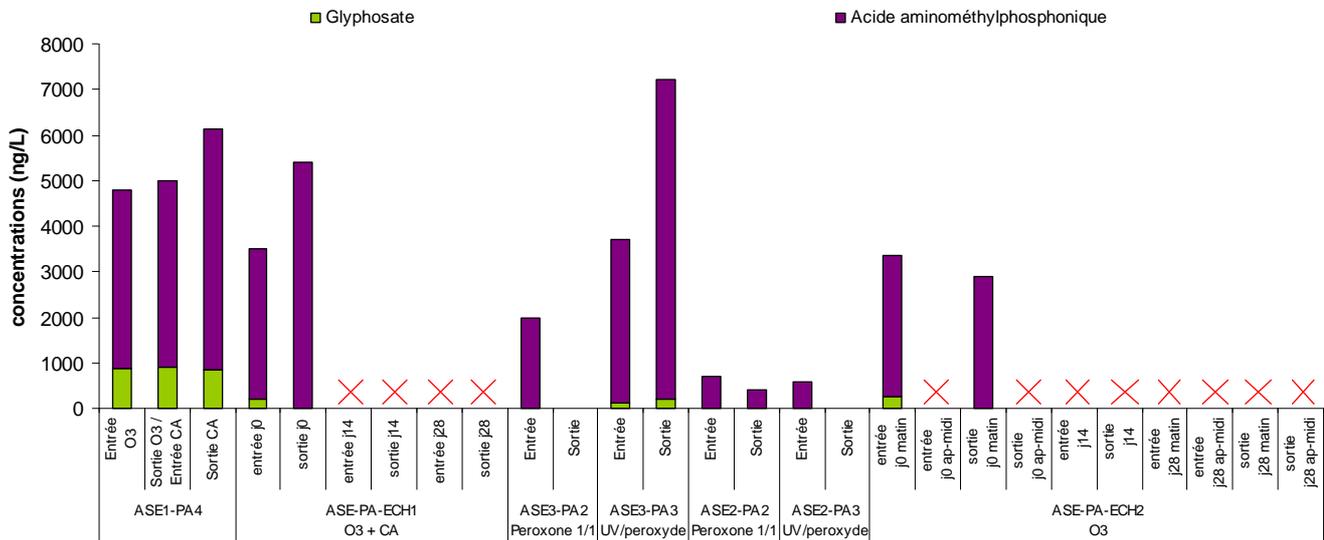
**Figure 8 :** Concentration en anticancéreux, antiviraux et inhibiteurs de PDE 5 dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.



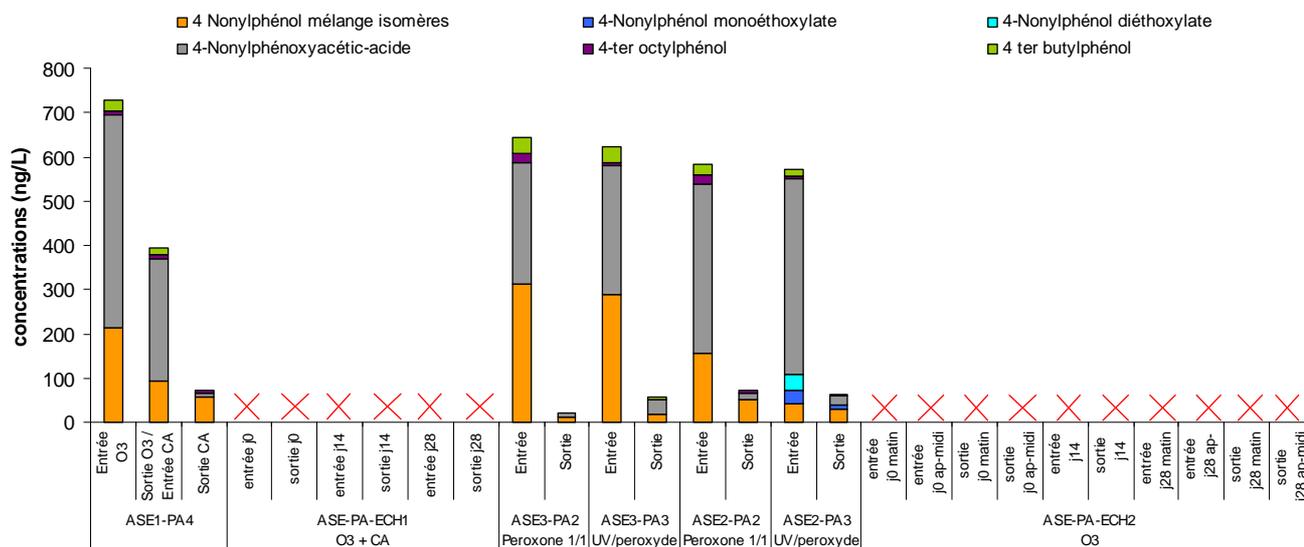
**Figure 9 :** Concentration en hormones dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.



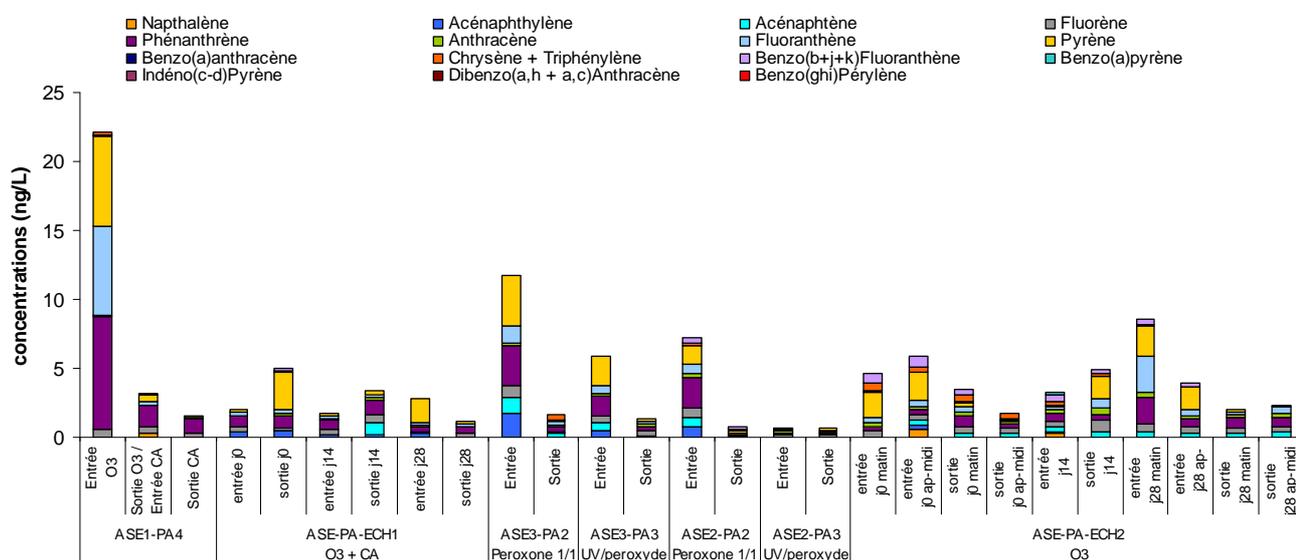
**Figure 10 :** Concentration en pesticides de la famille des triazines et des phénylurées dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.



**Figure 11 :** Concentration en glyphosate et AMPA dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.



**Figure 12 :** Concentration en alkylphénols dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.



**Figure 13 :** Concentration en HAP dans la phase dissoute des eaux prélevées en entrée et sortie des procédés de traitement avancé étudiés.

## 2/ Caractérisation des boues :

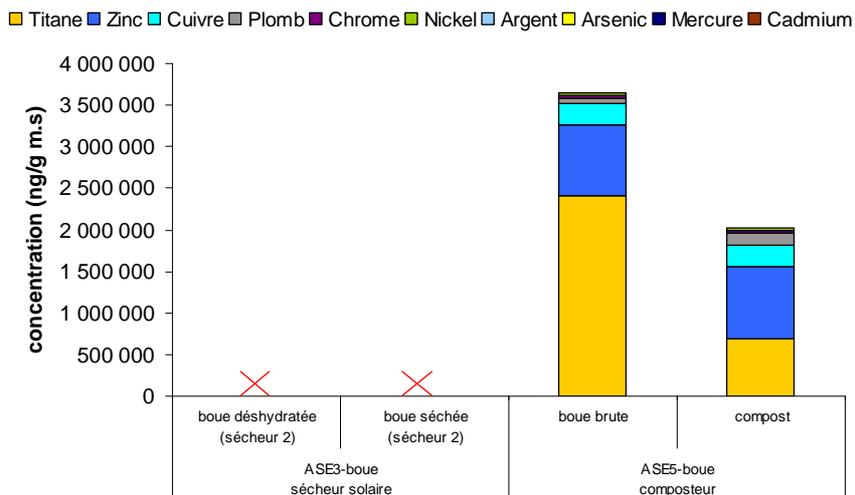


Figure 14 : Concentration en ETM dans les boues prélevées avant et après traitement.

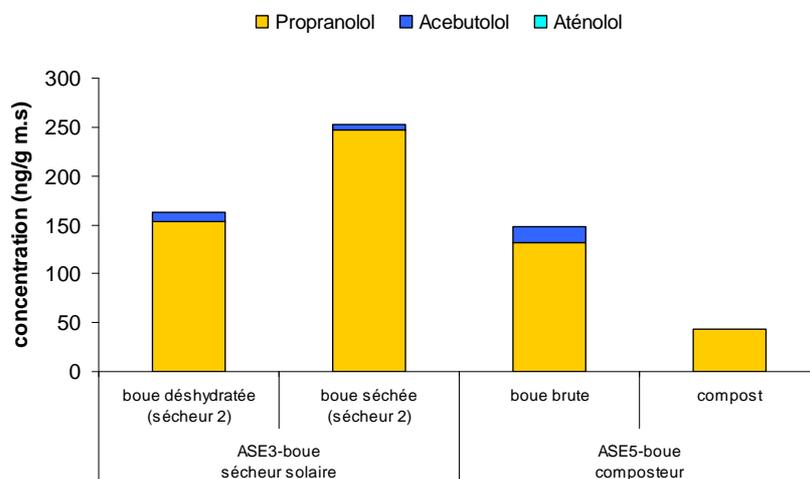


Figure 15 : Concentration en bêtabloquants dans les boues prélevées avant et après traitement.

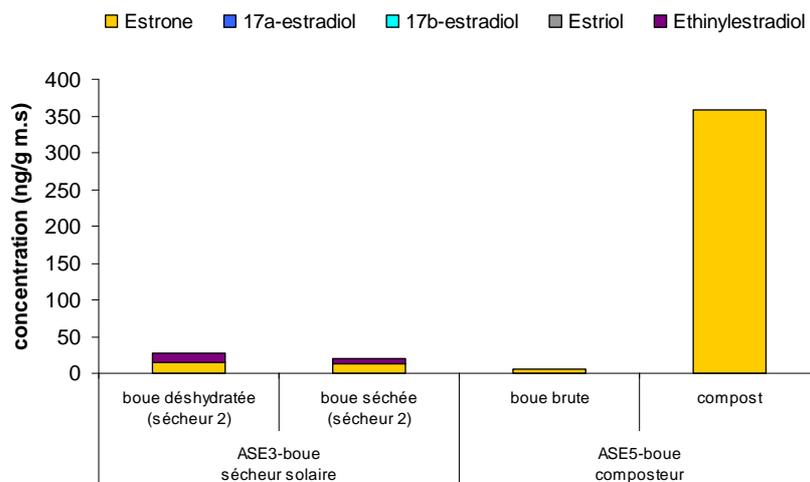
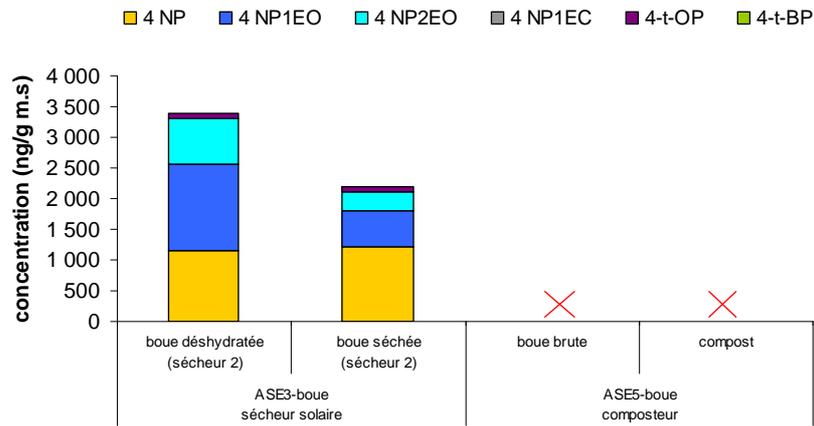
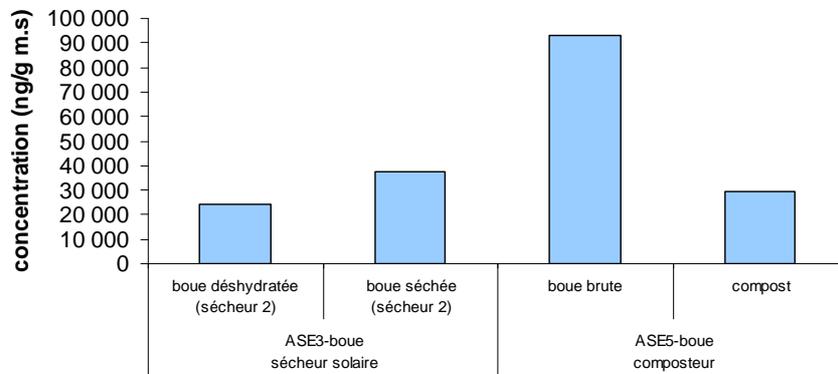


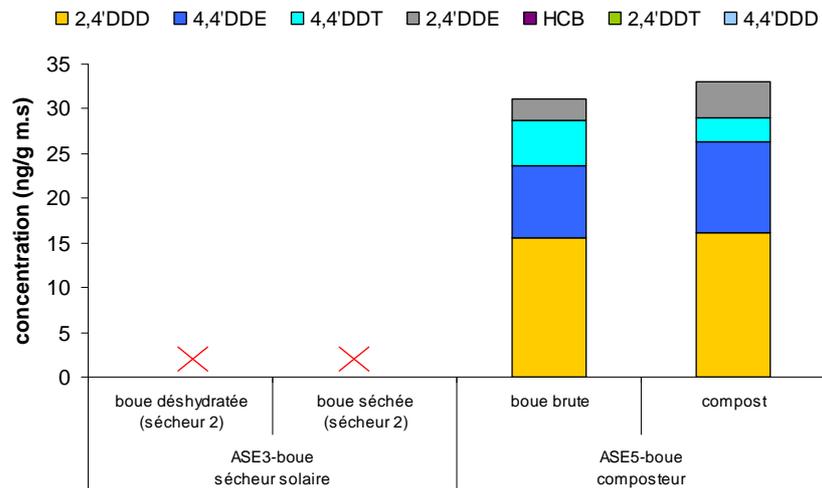
Figure 16 : Concentration en hormones dans les boues prélevées avant et après traitement.



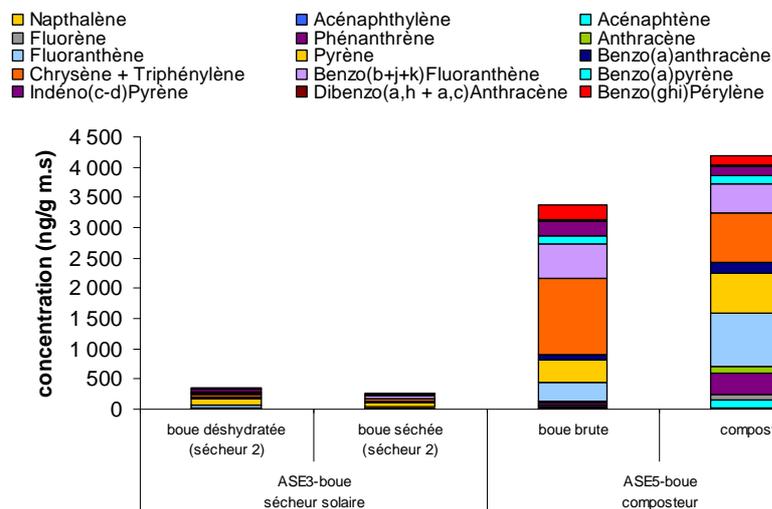
**Figure 17** : Concentration en alkylphénols dans les boues prélevées avant et après traitement.



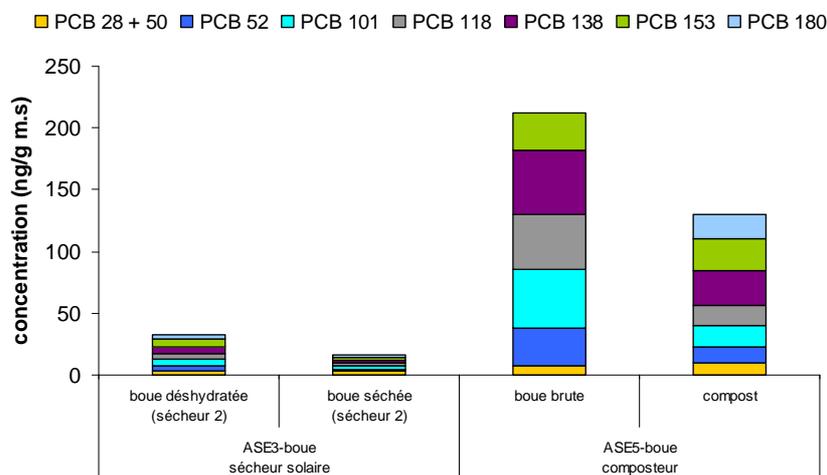
**Figure 18** : Concentration en DEHP dans les boues prélevées avant et après traitement.



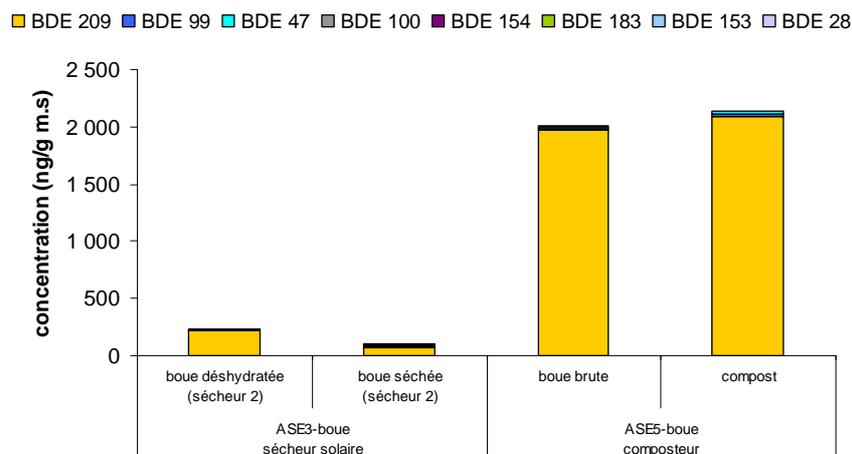
**Figure 19** : Concentration en pesticides organochlorés dans les boues prélevées avant et après traitement.



**Figure 20** : Concentration en HAP dans les boues prélevées avant et après traitement.



**Figure 21** : Concentration en PCB dans les boues prélevées avant et après traitement.



**Figure 22** : Concentration en PBDE dans les boues prélevées avant et après traitement.

#### E.4 ANNEXE 4 : BATTERIE DE BIOESSAIS UTILISES DANS LA TACHE 4

Activité	Nom du Test	Principe	Substances de référence
(Anti)Estrogénique	MELN	Activation/inhibition du récepteur des œstrogènes (ER)	17 β œstradiol (E2)
(Anti)Androgénique/ Glucocorticoïdique	MDA-kb2	Activation/inhibition du récepteur des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR)	Dihydrotestostérone (DHT)/flutamide (Flu) Dexamethasone (Dex)
(Anti)Thyroïdienne	PC-DR-LUC	Activation/inhibition du récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR)	Triiodothyronine (T3)
Dioxin-like	PLHC-1	Induction EROD via le récepteur de la dioxine (AhR) en 4h (HAP-like) ou 24h (dioxin-like)	Dioxine (TCDD)/ Benzo(a)pyrene (BaP)
Génotoxique	SOS Chromotest	Induction du système de réparation de l'ADN (gène <i>sfiA-βGal</i> ) dans <i>E. coli</i>	Sans S9 : 4nitroquinoline-1-oxide (NQO) Avec S9 : BaP
Cytotoxique	-	Mesure de la viabilité bactérienne sur <i>E. coli</i> (SOS Chromotest) Mesure de la viabilité de cellules de mammifères (test Bleu Alamar sur MELN et PC-DR-LUC)	-

## E.5 ANNEXE 5 : ACTIVITES TOXICOLOGIQUES EN TOXIQUE-EQUIVALENTS (TOX-EQ) MESUREES DANS LES EXTRAITS D'EAUX ET DE SPMD

n.d. non détecté, n.m. non mesuré, CA : charbon actif, triol : trioléine

\* : Contamination du blanc

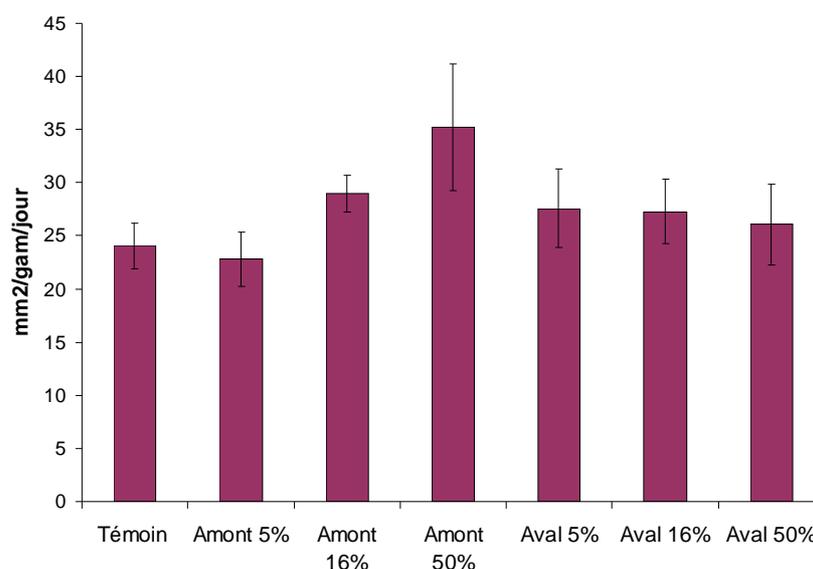
Echantillons	Estrogènes	Androgènes	Anti-androgènes	Thyroïdiens	HAP-like	Dioxin-like	SOS (-S9)	SOS (+S9)	SOS (-S9)	SOS (+S9)	
	E2-Eq <i>ng/L</i>	DHT-Eq <i>ng/L</i>	Flu-Eq <i>µg/L</i>	T3-Eq <i>ng/L</i>	BaP-Eq <i>µg/L</i>	TCDD-Eq <i>ng/L</i>	NQO-Eq <i>µg/L</i>	BaP-Eq <i>µg/L</i>	Cytotox	Cytotox	
ASE1-PA4	Blanc Evian	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				
ASE3-PA2&3	Blanc	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	-	-	
	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				
ASE-PA-ECHI		<i>ng/g triol</i>	<i>ng/g triol</i>	<i>µg/g triol</i>	<i>ng/g triol</i>	<i>µg/g triol</i>	<i>ng/g triol</i>				
	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					
ASE2-PA2&3	Blanc	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					

## E.6

**ANNEXE 6 : SYNTHÈSE DES ESSAIS *IN VIVO* QUI SERONT MIS EN ŒUVRE POUR  
L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES EAUX ET DES BOUES AVANT ET APRES TRAITEMENT**

<b>Nom</b>	<b>Référence</b>	<b>Réponses</b>
<b>Tests de laboratoire / Eaux</b>		
Microtox (bactérie)	NF EN ISO 11348-3	toxicité aiguë
Daphnia magna (micro-crustacé)	NF EN ISO 6341	reproduction
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (micro-algue)	NF EN ISO 8692	croissance
Ceriodaphnia dubia (micro-crustacé)	NF ISO 20665	reproduction
<b>Tests ex situ / Eaux</b>		
Chironomus riparius (insecte)	AFNOR T90-339-1	Survie Croissance
Gammarus fossarum (crustacé)	Geffard et al. 2010	Survie Taux d'alimentation Reproduction
Potamopyrgus antipodarum (gastéropode)	Duft et al., 2007	Survie Croissance Reproduction
Oryzias latipes (embryon poisson)	Cachot et al., 2007	Survie, Tps à l'éclosion Anomalies embryonnaires
<b>Boues brutes</b>		
Microtox (bactérie)	NF EN ISO 11348-3	toxicité aiguë
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (micro-algue)	NF EN ISO 8692	croissance
Ceriodaphnia dubia (micro-crustacé)	NF ISO 20665	reproduction
<b>Léxiviats</b>		
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (micro-algue)	NF EN ISO 8692	croissance
Brachionus calyciflorus (rotifère)	NF ISO 20666	reproduction
Ceriodaphnia dubia (micro-crustacé)	NF ISO 20665	reproduction
Daphnia magna (micro-crustacé)	NF EN ISO 6341	reproduction

**E.7 ANNEXE 7 : TAUX D'ALIMENTATION (MM<sup>2</sup>/GAMMARE/JOUR ; MOY ± E.T ; N = 6) DES ORGANISMES EXPOSES AUX DIFFERENTES CONCENTRATIONS DES EAUX EN AMONT ET AVAL DU TRAITEMENT TERTIAIRE (OZONATION + CHARBON ACTIF).**



**E.8 ANNEXE 8 : REPONSES TOXIQUES SIGNIFICATIVES DES EMBRYONS DE MEDAKA EXPOSES A DES EAUX EN AMONT OU EN AVAL DU TRAITEMENT TERTIAIRE (OZONATION + CHARBON ACTIF).**

ns = non significatif

Echantillon	Viabilité embryons	Viabilité larves	Taux d'éclosion	Age à l'éclosion	Taille totale	Malformations
Amont 50%	ns	ns	↓ p=0,016	ns	↓ p=0,002	ns
Aval 50%	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Amont 16%	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Aval 16%	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Amont 5,5%	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Aval 5,5%	ns	ns	ns	ns	ns	ns

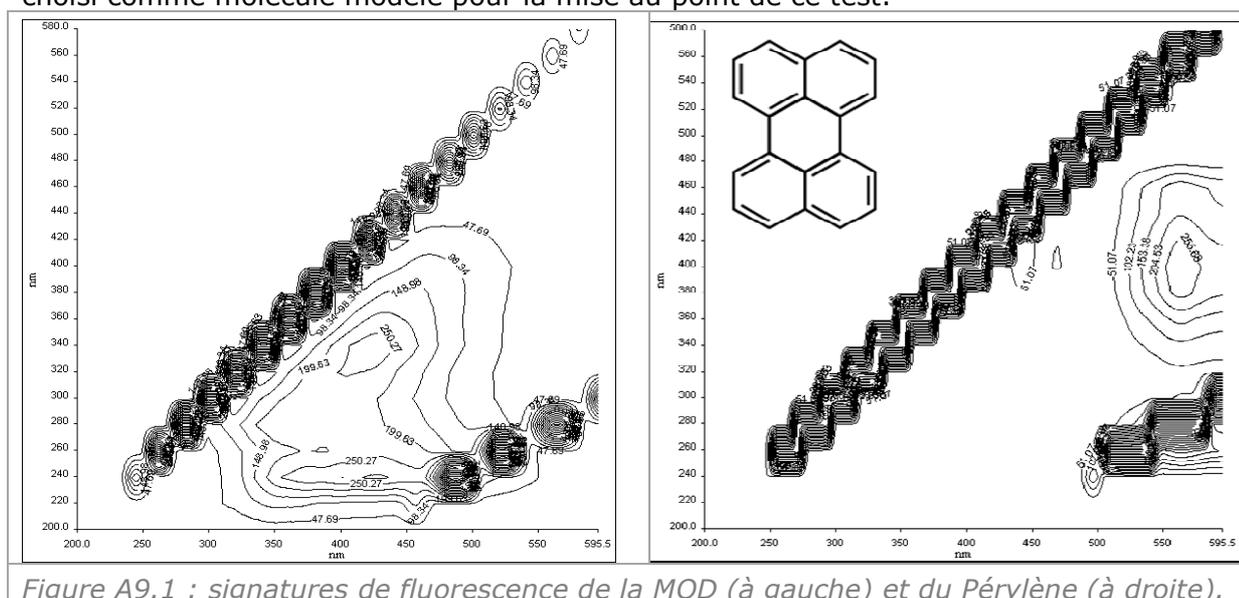
## E.9 ANNEXE 9 : PRINCIPE DU TEST DE CARACTERISATION *IN SITU* DES INTERACTIONS ENTRE MATIERE ORGANIQUE ET MICROPOLLUANTS

### Principe de l'outil

La façon la plus simple et la plus rapide de caractériser une interaction entre la MOD et un micropolluant organique est d'exploiter le phénomène de quenching de fluorescence (Backhus *et al.* 2003). En effet, dans la plupart des cas, les micropolluants organiques sont des molécules aromatiques qui sont capables d'émettre un rayonnement fluorescent lorsqu'elles sont soumises à une lumière d'excitation spécifique. Or, lorsqu'un micropolluant est adsorbé sur la MOD, celle-ci va influencer sur le rendement de fluorescence du micropolluant. D'un point de vue pratique, nous observerons une diminution de l'intensité de fluorescence du micropolluant ; intensité de fluorescence qui est facilement mesurable sur site via un simple lecteur de fluorescence. Outre le fait de définir et d'optimiser un protocole de mesure en ce sens, l'objectif de la tâche 8 est aussi de créer un outil d'analyse à haut débit pour effectuer des screening rapides : une MOD vis-à-vis de plusieurs micropolluants différents ou plusieurs MOD différentes vis-à-vis d'un seul micropolluant. Pour cela, nous avons décidé d'adapter le protocole au format microplaque 96 puits permettant de tester jusqu'à 12 combinaisons en parallèle de manière simultanée.

### Choix du micropolluant modèle

Une des premières étapes du travail qui nous incombait fut de sélectionner un micropolluant modèle pour mettre au point et valider la méthode de dosage. Les critères de sélection pour faire ce choix étaient la représentativité de la molécule par rapport à un groupe de micropolluants considéré dans le projet ECHIBIOTEB et la non superposition des signaux de fluorescence de la molécule modèle et de la MOD. Trois molécules ont été considérées en première approche : le carbofuran (phytosanitaire), la carbamazépine (pharmaceutique) et le pérylène (hydrocarbure aromatique polycyclique - HAP). Les signaux de fluorescence des deux premières molécules se sont révélés confondus avec la fluorescence naturelle de la MOD. Par contre, la fluorescence du pérylène pouvait très nettement être distinguée de la fluorescence de la MOD (figure 1). Par ailleurs, le Pérylène est un HAP et appartient donc à une famille de micropolluants organiques considérée dans le projet ECHIBIOTEB. Le pérylène a donc été choisi comme molécule modèle pour la mise au point de ce test.



## Protocole analytique

Le protocole analytique développé pour caractériser les interactions MOD-micropolluants organiques est illustré par la figure 2. De manière synthétique, le protocole consiste à réaliser plusieurs dilutions de l'échantillon à tester dans un tampon, directement au sein des puits de la microplaque, afin de faire varier la concentration en MOD de l'échantillon. La molécule modèle est ensuite ajoutée de manière équivalente dans tous les puits. Après une période de 30 min, permettant d'atteindre l'état d'équilibre de l'interaction MOD-micropolluant organique, la fluorescence du micropolluant est mesurée grâce à un lecteur de microplaque. La fluorescence mesurée est ensuite reportée sur un graphique en fonction de la dilution de l'échantillon. La pente de la droite obtenue permet de caractériser l'interaction MOD-micropolluant.

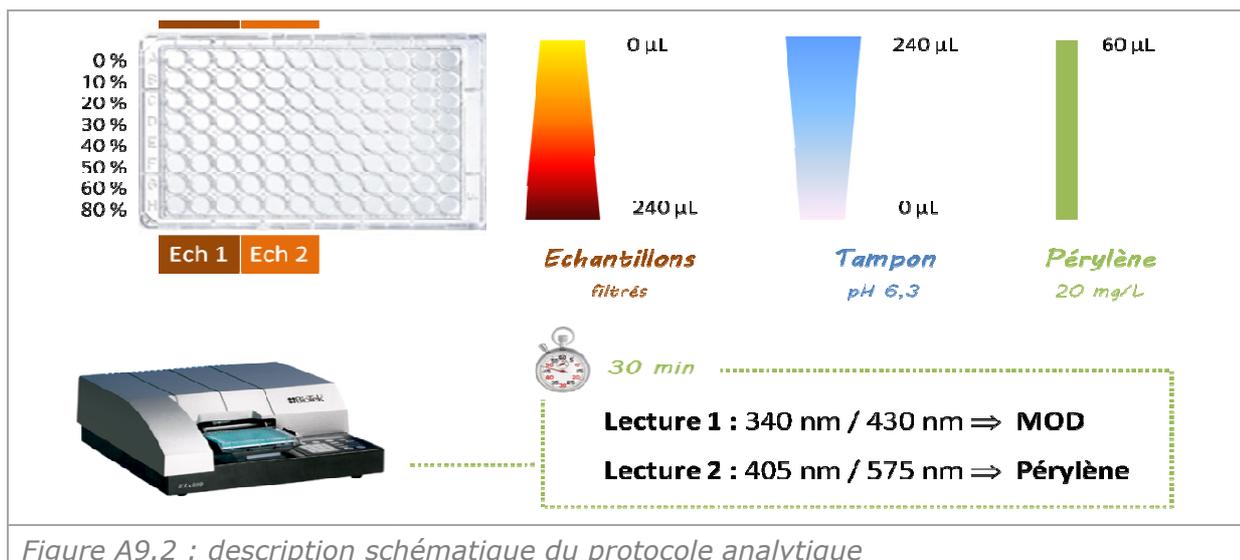


Figure A9.2 : description schématique du protocole analytique

## Références citées

**Backhus et al.** Evaluation of Fluorescence Quenching for Assessing the Importance of Interactions between Nonpolar Organic Pollutants and Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 4717-4723.