

## Sommaire

<b>Le Programme ECHIBIOTEB : Outils innovants d'échantillonnage, d'analyses chimiques et biologiques pour le suivi des traitements complémentaires des eaux usées et des boues</b>	<b>2</b>
<b>Le double enjeu de l'analyse chimique ciblée : évaluer l'efficacité des procédés de traitement étudiés et sélectionner les micropolluants pertinents pour caractériser ces procédés</b>	<b>4</b>
<b>Le screening chimique. Identification de nouveaux micropolluants et produits de dégradation pour compléter le diagnostic chimique</b>	<b>6</b>
<b>L'échantillonnage passif/intégratif : un moyen d'améliorer la représentativité de l'échantillonnage et du résultat analytique</b>	<b>8</b>
<b>Les matières organiques : deux solutions innovantes pour les caractériser dans les eaux usées et traitées</b>	<b>10</b>
• Caractérisation par fluorescence 3D de la matière organique dissoute au cours de différents procédés de traitement complémentaire des eaux	10
• Mesure de l'affinité de la matière organique dissoute pour les micropolluants organiques	11
<b>Caractérisation de la contamination des rejets de stations d'épuration des eaux usées, avant et après traitement complémentaire, par des composés perturbateurs endocriniens, dioxin-like et génotoxiques à l'aide d'outils bio-analytiques <i>in vitro</i></b>	<b>12</b>
<b>La démarche EDA (effect directed analysis) : couplage entre bioessais <i>in vitro</i> et méthodes physico-chimiques pour identifier les micropolluants responsables de l'activité biologique</b>	<b>14</b>
<b>Les bioessais <i>in vivo</i> pour évaluer le bénéfice des traitements complémentaires des eaux usées et des boues</b>	<b>16</b>

## Le Programme ECHIBIOTEB : Outils innovants d'échantillonnage, d'analyses chimiques et biologiques pour le suivi des traitements complémentaires des eaux usées et des boues

Irstea : **C. Miège\***, **JM. Choubert\***, O. Geffard, M. Coquery  
CIRSEE : A. Bruchet, S. Besnault  
Université de Bordeaux : H. Budzinski, J. Cachot, E. Parlanti  
INERIS : S. Aït-Aïssa, P. Pandard  
Université Paris Sud, UMR 8079 : Y. Lévi  
Envolure SAS : Y. Dudal

### \* Conférenciers

Bien que les stations de traitement des eaux usées (STEU) ne soient pas construites dans le but d'éliminer les micropolluants organiques et métalliques, ces derniers peuvent néanmoins être éliminés de la phase dissoute des eaux usées par les procédés de traitement biologique conventionnels. L'élimination peut se faire grâce aux mécanismes d'adsorption sur les boues ou de dégradation biologique ou abiotique. Cependant, certains micropolluants sont réfractaires à ces procédés de traitement et sont rejetés dans les milieux aquatiques avec les eaux traitées. Pour limiter ces rejets de micropolluants réfractaires, des procédés de traitements complémentaires peuvent être mis en place. Par ailleurs, les micropolluants contenus dans les boues sont aussi susceptibles de contaminer les nappes d'eau souterraines et les milieux aquatiques de surface, quand ces boues sont épandues sur sols agricoles. Actuellement, il y a besoin de mieux comprendre l'efficacité vis-à-vis des micropolluants des procédés complémentaires de traitement des eaux et des procédés de traitement des boues.

Le but du programme ECHIBIOTEB est d'étudier, au moyen de combinaisons innovantes d'outils chimiques, biologiques et d'échantillonnage, des procédés de traitement des eaux usées et des boues. Le deuxième objectif est d'étudier les avantages et les inconvénients comparés de chacun de ces outils innovants, ainsi que leur complémentarité, pour l'étude de l'efficacité des procédés de traitement des eaux et des boues.

Les outils d'échantillonnage mis en œuvre dans les eaux sont des échantillonneurs intégratifs tels que les POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) et les SPMD (Semi-Permeable Membrane Device). L'intérêt de ces échantillonneurs est d'améliorer la représentativité temporelle de l'échantillonnage des eaux avec obtention de concentrations dans l'eau moyennées sur la durée d'exposition (de 2 à 4 semaines). Les outils chimiques utilisés sont l'analyse ciblée de presque 180 contaminants prioritaires et émergents, et l'analyse non-ciblée, ou screening, réalisée au moyen de techniques chromatographiques combinées à de la spectrométrie de masse haute résolution ; ainsi que la caractérisation de la matière organique dissoute et de ses interactions avec les micropolluants (par l'étude de la fluorescence). Les outils biologiques testés, pratiqués en laboratoire ou *in situ*, consistent en des bioessais *in vitro*, pour évaluer des activités biologiques à l'échelle cellulaire, et des bioessais *in vivo*, pour évaluer des effets à l'échelle d'un organisme vivant.

Pour répondre aux objectifs d'ECHIBIOTEB, 8 procédés de traitement complémentaire des eaux usées et 3 procédés de traitement des boues ont été étudiés. Les procédés de traitement des eaux usées sont des procédés d'oxydation à l'ozone (O<sub>3</sub>) ou à l'ozone associé à du charbon actif en grain (CAG), des procédés d'oxydation avancée comme l'ozone couplé à du peroxyde d'hydrogène (O<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou l'UV couplé à du peroxyde d'hydrogène (UV+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), des procédés d'adsorption comme un filtre à écoulement horizontal garni de CAG, d'argile expansée et de zéolite, et enfin une lagune de finition. Ils ont été étudiés à l'échelle réelle ou à l'échelle de pilotes semi-industriels positionnés à la sortie des procédés de traitement biologique conventionnels. Les STEU sur lesquelles ces procédés ont été étudiés sont de

tailles variables (entre 1 000 et 300 000 équivalents habitants) et sont équipées de procédés de traitement biologique variés, réalisant soit nitrification et dénitrification (tels que des boues activées à aération prolongée, des bioréacteurs à membranes), ou réalisant une nitrification seulement (biofiltres nitrifiants ou disques biologiques suivis de lits de clarification-séchage plantés de roseaux). Pour les boues, 3 procédés de traitement ont été étudiés : le sécheur solaire, le compostage et le lit de séchage planté de roseaux. Ils ont été étudiés à échelle réelle sur 3 sites.

Pour étudier les procédés de traitement complémentaire des eaux, 2 sortes de campagnes de prélèvement ont été menées : les « campagnes courtes » où l'échantillonnage a été réalisé pendant une journée, avec des échantillonnages d'eau moyens 2h (représentatifs des procédés étudiés) et des analyses en laboratoire ; et les « campagnes longues » réalisées pendant une durée d'un mois, avec des échantillonnages d'eau et l'exposition d'échantillonneurs intégratifs (sur 15 jours ou 4 semaines), ainsi que l'exposition des organismes biologiques « *in situ* dérivé » (i.e. « *ex situ* sur le site ») en plus de celle en laboratoire. Au total, ont été réalisées 11 campagnes courtes et 4 campagnes longues pour les eaux. Pour étudier les procédés de traitement des boues, 3 campagnes de prélèvement ont été menées et afin d'analyser le même lot de boue avant et après traitement, les campagnes ont été réalisées à l'intervalle de temps correspondant à la durée du séchage ou du compostage.

## Le double enjeu de l'analyse chimique ciblée : évaluer l'efficacité des procédés de traitement étudiés et sélectionner les micropolluants pertinents pour caractériser ces procédés

Irstea : **MJ. Capdeville\***, F. Serveto, A. Roussel-Galle, L. Dherret, P. Bados, A. Larrose, G. Grisot, M. Coquery, C. Miège

Université de Bordeaux : K. Lemenach, P. Pardon, T. Geny, S. Augagneur, E. Geneste, MH. Devier, L. Peluhet, P. Labadie, H. Budzinski

CIRSEE : N. Noyon, C. Gogot, A. Bruchet

### \* Conférencier

Dans le but d'identifier, les procédés de traitement complémentaire des eaux usées et les procédés de traitement des boues les plus efficaces pour réduire, voire éliminer, les micropolluants, des analyses chimiques ciblées ont été réalisées.

Les micropolluants ciblés ont été choisis parmi les micropolluants prioritaires et émergents en fonction de leur occurrence dans les effluents de traitement secondaire (Coquery et *al.*, 2011<sup>1</sup> ; Martin Ruel et *al.*, 2011<sup>2</sup>), de leurs propriétés physico-chimiques, de leur toxicité, de la législation (certaines substances de la Directive Cadre sur l'Eeau ont été incluses) et de la disponibilité d'une méthode analytique fiable. Au total, 14 métaux et 170 molécules organiques appartenant aux classes des molécules pharmaceutiques ( $\beta$ -bloquants, anti-inflammatoires, antidépresseurs, antibiotiques, anticancéreux, etc.), des hormones oestrogéniques, des alkylphénols (AkP), des plastifiants, des pesticides dont des organochlorés, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des polychlorobiphényles (PCB) et des polybromodiphényléthers (PBDE) ont été analysés. Selon leurs propriétés physico-chimiques, ils ont été recherchés dans la phase dissoute des échantillons d'eau (12 métaux et 136 molécules organiques) et/ou dans les échantillons de boues (12 métaux et 113 molécules organiques). En plus de caractériser l'efficacité des procédés, l'objectif est aussi d'établir une liste de micropolluants pertinents à analyser pour caractériser les procédés de traitement complémentaires des eaux et de traitement des boues.

Les molécules organiques sont analysées par chromatographie en phase liquide ou gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse simple ou en tandem (LC/MS/MS, GC/MS) après filtration à 0,7  $\mu\text{m}$  et extraction par SPE (Solid Phase Extraction) ou SPME (Solid Phase MicroExtraction) pour les échantillons d'eau. Elles sont analysées par LC/MS/MS, GC/MS ou GC/ECD (chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons) après lyophilisation, extraction par ASE (Accelerated Solvent Extraction) ou par micro-ondes et après purification par SPE ou sur micro-colonne pour les échantillons de boues. Les limites de quantification (LQ) varient entre 0,1 et 100 ng/L et entre 0,3 et 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de matière sèche (MS) respectivement dans les eaux et dans les boues.

Les métaux sont analysés par torche à plasma couplée à un spectromètre de masse (ICP/MS) après filtration à 0,45  $\mu\text{m}$  et acidification pour les échantillons d'eau. Ils sont analysés par ICP/MS ou par DMA (Direct Mercury Analyzer) après lyophilisation et extraction par micro-ondes pour les échantillons de boues. Les LQ varient entre 10 et 5000 ng/L et entre 10 et 6700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  MS respectivement dans les eaux et dans les boues.

Afin d'assurer la qualité des résultats d'analyse, des blancs de procédure (préparation et extraction) et d'analyse ainsi que des contrôles qualité (échantillons certifiés ou enrichis avec

---

<sup>1</sup> Coquery M., Pomies M., Martin Ruel S., Budzinski H., Miegé C., Esperanza M., Soulier C., Choubert J-M., 2011. Mesurer les micropolluants dans les eaux usées brutes et traitées. Protocoles et résultats pour l'analyse des concentrations et des flux. Tech. Sci. Méthodes 25-43.

<sup>2</sup> Martin Ruel S., Choubert J-M., Esperanza M., Miegé C., Navalon Madrigal P., Budzinski H., Le Menach K., Lazarova V., Coquery M., 2011. On-site evaluation of the removal of 100 micro-pollutants through advanced wastewater treatment processes for reuse applications. Water Sci. Technol. 63, 2486-2497.

une quantité connues de micropolluants) sont analysés en parallèle des échantillons environnementaux.

Afin de calculer des valeurs robustes de rendements d'élimination (R), les incertitudes analytiques et les limites de quantification associés aux résultats d'analyse, sont pris en compte en s'inspirant de la méthodologie décrite par Choubert et *al.* (2011<sup>3</sup>) et en l'adaptant aux traitements complémentaires.

En entrée des procédés de traitement des eaux, sur les 148 micropolluants analysés, 33 molécules organiques n'ont jamais été quantifiées parmi lesquelles l'ampicilline (un antibiotique) et l'éthinylestradiol (une hormone oestrogénique de synthèse), 18 ont été quantifiées seulement 1 à 2 fois. Les profils de contamination en entrée des procédés de traitement confirment i) la pertinence d'un échantillonnage moyenné sur 2h pour étudier les procédés choisis ; et ii) reflètent l'origine des eaux usées dans la STEU (rurales/urbaines, industrielles/domestiques). Globalement, avec des rendements d'élimination faibles (< 50%) ou nuls, les métaux ne sont pas éliminés par les procédés testés. En dehors de la lagune de finition, les concentrations en micropolluants organiques sont nettement diminuées par les procédés de traitement des eaux. Avec des rendements d'élimination généralement supérieurs à 70 %, les molécules pharmaceutiques sont particulièrement bien éliminées. Le NP1EC (acide nonylphénoxy acétique) et les pesticides (triazines et phenylurées) sont également bien éliminés (R > 70%) sauf par la lagune de finition. Les procédés d'oxydation avancée et le CAG (Charbon Actif en Grain) permettent d'éliminer en partie les AkP. En dépit de leurs bon rendement d'élimination (R > 70%, excepté procédé lagune de finition), l'aténolol, le sotalol, la carbamazépine et le NP1EC sont encore quantifiés à 97, 148, 95 et 178 ng/L respectivement, en moyenne en sortie des procédés de traitement complémentaires. Le bisphénol A et la théophylline sont aussi quantifiés en sortie des procédés de traitement (concentration moyenne de 155 et 81 ng/L et concentration médiane de 56 et 43 ng/L respectivement) ; leurs rendements d'élimination varient selon le procédé étudié. L'aspirine (aspirine + acide salicylique) est aussi quantifiée à plus de 80 ng/L en moyenne en sortie des procédés de traitement mais son rendement d'élimination n'a pratiquement jamais pu être calculé en raison de concentrations mesurées proches des LQ (30ng/L). Au final, nous proposons une liste plus ou moins restreinte (5, 10 ou 20 molécules) de micropolluants pertinents à analyser pour caractériser ces procédés.

En amont des procédés de traitement des boues, sur les 125 micropolluants analysés, 31 molécules organiques n'ont jamais été quantifiées parmi lesquelles l'aténolol ( $\beta$ -bloquant) et le NP1EC (AkP), 17 ont été quantifiés seulement 1 à 2 fois. Le titane, le zinc et le cuivre sont les métaux les plus abondants avec une fréquence de quantification de 100% et une concentration moyenne supérieure à 300 mg/kg. Le DEHP (di(2-éthylhexyl)phthalate), la norfloxacine et la ciprofloxacine sont les molécules organiques les plus abondantes avec des fréquences de quantification de 100% et une concentration moyenne supérieure à 10 mg/kg. Ces micropolluants, métalliques et organiques, sont aussi les plus abondants dans les boues en aval des procédés de traitement avec une fréquence de quantification toujours égale à 100% et des concentrations dans les mêmes ordres de grandeur (supérieure à 300 mg/kg pour les métaux et supérieure à 6 mg/kg pour les molécules organiques).

---

<sup>3</sup> Choubert J-M., Martin Ruel S., Budzinski H., Miège C., Esperanza M., Soulier C., Lagarrigue C., Coquery, M., 2011. Évaluer les rendements des stations d'épuration Apports méthodologiques et résultats pour les micropolluants en filières conventionnelles et avancées. Tech. Sci. Methodes 1-2, 44-62.

## **Le screening chimique**

### **Identification de nouveaux micropolluants et produits de dégradation pour compléter le diagnostic chimique**

CIRSEE : N. Noyon, **A. Bruchet\***

Université de Bordeaux : MH. Devier, K. Le Menach, H. Budzinski

Irstea : MJ. Capdeville, C. Miège

#### **\* Conférencier**

A ce jour, toutes les études sur le comportement des micropolluants organiques dans les procédés d'épuration ont mis en œuvre une approche de chimie ciblée, à savoir l'étude quantitative d'une liste prédéfinie à l'avance, comportant de quelques dizaines de composés jusqu'à 250 composés. Or, l'avènement récent de techniques de séparation-détection à haute résolution a révélé la présence de plusieurs milliers de composés dans un échantillon de boues (Semard *et al.*, 2008<sup>4</sup>), démontrant les insuffisances de l'approche chimie ciblée. Le présent travail a donc consisté à réaliser des screenings non ciblés des boues et eaux étudiées dans le programme ECHIBIOTEB.

La technique utilisée est la chromatographie bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GCxGC-TOFMS). Cette technique associe deux colonnes de séparation en série, la première consistant en une colonne à phase apolaire de dimension classique, la seconde consistant en une colonne très courte et de très faible diamètre contenant une phase plus polaire. Une pièce centrale (« modulateur ») découpe littéralement chaque pic (ayant une largeur de 10 à 30 secondes) éluant de la première colonne en fonction de son point d'ébullition en portions de 6 secondes (« temps de modulation »). Ces dernières sont refocalisées à l'entrée de la seconde colonne où elles vont être séparées à nouveau dans des conditions de chromatographie rapide (en six secondes), en fonction de leur polarité. Le pouvoir de séparation d'un tel système est égal en théorie au pouvoir de séparation de la première colonne (environ 500 pics) multiplié par le pouvoir de séparation de la seconde colonne (environ 30 pics), soit un total maximum théorique de 15 000 pics par analyse. La détection et l'identification sont assurées par un spectromètre de masse à temps de vol acquérant des spectres à une fréquence de 100 spectres par seconde.

Les échantillons de boues ont été extraits par un système ASE (Accelerated solvent extraction) à 70°C et 100 bars, dans un mélange méthanol/acétone 90/10, sans concentration ni purification ultérieure de l'extrait. Les eaux en entrée et sortie des différents procédés de traitements complémentaires ont été extraites par une extraction liquide-liquide classique au dichlorométhane (2 extractions à pH 11 suivies d'une extraction à pH acide). Les extraits solvant ont été concentrés d'un facteur 1000. Après séparation par GCxGC-TOFMS, les données ont été filtrées en ne retenant que les pics chromatographiques ayant un fragment de base présentant un rapport signal/bruit au moins égal à 25. Tous les spectres (environ 1500 pour les boues, de 500 à 1200 pour les eaux) ont ensuite été vérifiés manuellement pour ne conserver que les spectres d'excellente qualité (absence de bruit de fond, présence d'ions ou séries d'ions caractéristiques, de l'ion moléculaire) et éviter une identification erronée par une recherche automatique en librairie de spectres. Les siloxanes qui peuvent être des artéfacts provenant des phases chromatographiques, n'ont pas été retenus. En ce qui concerne les séries homologues aliphatiques (alcane, acide gras, alcène, alcyne, cycloalcanes, aldéhydes, amides...), soit elles ont été regroupées (exemple : alcanes C10 à C40), soit un

---

<sup>4</sup> Semard G., Bruchet A., Cardinaël P., Bouillon J-P. 2008. Use of comprehensive two-dimensional gas chromatography for the broad screening of hazardous contaminants in urban wastewaters. *Water Science and Technology*, 57, 12, 1983-1989.

faible nombre de représentants ont été conservés. La liste finale pour les boues comporte 186 composés, tandis que la liste pour les eaux comporte 236 composés.

Les propriétés des composés (N° CAS, synonymes courants, usages, origines possibles, propriétés biologiques) ont été recherchées, répertoriées et examinées. Du fait du nombre élevé de composés, la présentation orale se focalise sur quelques familles ou groupes de composés avec des propriétés particulières, comme par exemple :

- les muscs tonalide et galaxolide dont un sous-produit, la galaxolide lactone;
- des dérivés de furannes dont un génotoxique (5-hydroxyméthyl-2-furfural) et un utilisé en synthèse ( $\gamma$ -butyrolactone) mais aussi comme substitut de la drogue GHB (acide gammahydroxybutyrique) ;
- certaines structures ne présentant aucune similitude chimique mais ayant été utilisées comme gaz de combat (chloroacétone, chlorure de benzyle, iodométhylbenzène) ou ayant des propriétés d'attraction-répulsion (phéromones) (2-pipéridinone, aromadendène, dihydroactinidiolide, benzène) ;
- de nombreux additifs de plastiques (N-butylbenzènesulfonamide, 4-méthyl-2,6-di-tert-butylphénol (BHT), alkylphosphates utilisés comme retardateurs de flamme, et des dérivés du benzothiazole utilisés comme agents de vulcanisation, retrouvés dans les eaux ;
- des sous-produits de chloration tels que trihalométhanes (THM) chlorés, bromés et un THM iodé, ainsi que des halonitrométhanés (chloropicrine, dibromonitrométhane). Ces sous-produits sont soit préformés dans les eaux potables rejetées dans les réseaux d'assainissement, soit résultent de la réaction des matières organiques avec les produits ménagers contenant de l'eau de Javel ;
- des pesticides (insecticide N,N-diéthyltoluamide ; fongicide tébuconazole) ainsi que d'autres composés divers (solvant cancérigène 1,4-dioxane, épichlorohydrine).

Au terme de la phase de screening, une trentaine de composés ont été retenus pour une approche plus quantitative par rapport à leurs étalons de référence, sur la base de leur toxicité potentielle, de leur forte concentration mesurée, de la disponibilité d'étalons commercialisés. Parmi ceux-ci, 24 ont pu être quantifiés dans des conditions satisfaisantes. Les concentrations dans les boues varient de 0,1 mg/kg (lidocaïne) à plus de 1 g/kg (galaxolide). Les niveaux observés dans les boues de compostage sont plus élevés que dans les boues prélevées dans un lit planté de roseaux. Quelques composés sont quantifiés à plus de 100 ng/L dans des eaux en entrée ou sortie de traitement (4-méthyl-1H-benzotriazole, méthylindole, acétophénone, benzophénone, benzothiazole, 2-méthyl-2-benzothiazole, alcool benzylique, butyrolactone, crotamiton, galaxolide, lilial, p-tert-butylphénol). Le charbon actif en poudre et, à un degré moindre, l'ozone, s'avèrent d'une excellente efficacité d'élimination vis-à-vis de cette sélection de composés.

Globalement le travail réalisé montre la pertinence de ce type d'outil pour compléter les résultats de la chimie ciblée. La poursuite de ce travail consistera à sélectionner dans les listes obtenues quelques indicateurs éventuels en complément à la liste établie après chimie ciblée pour assurer le suivi des procédés de traitement des eaux et des boues. La complexité révélée par cette approche, forcément non exhaustive, pour les eaux et les boues, justifie par ailleurs l'utilisation de tests biologiques en complément des analyses chimiques.

## L'échantillonnage passif/intégratif : un moyen d'améliorer la représentativité de l'échantillonnage et du résultat analytique

Université de Bordeaux : L. Mouret, N. Tapie, K. Lemenach, H. Budzinski\*  
Irstea : MJ. Capdeville, F. Serveto, J. Panay, C. Miège  
CIRSEE : N. Noyon, A. Bruchet

### \* Conférencier

Dans le cadre du projet ECHIBIOTEB, des échantillonneurs intégratifs ont été mis en œuvre dans le but d'améliorer la représentativité de l'échantillonnage des eaux étudiées et donc du résultat analytique. Cette présentation montre l'application originale de ce type d'outil pour l'étude des procédés de traitement complémentaires des eaux. En effet, les POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Samplers) ont été testés pour trois classes de molécules : les composés pharmaceutiques, les alkylphénols et les pesticides en entrée et sortie des procédés. Ces outils d'échantillonnage sont constitués d'une phase adsorbante solide Oasis HLB retenue entre deux disques de Poly-éther-sulfone, elles-mêmes maintenues entre deux anneaux en inox. Lors des campagnes ECHIBIOTEB, ils ont été déposés sur une période de 14 jours pour le suivi de 118 molécules. En complément, des échantillonnages d'eau moyennés sur 2h, représentatifs des procédés étudiés, ont été réalisés à J0, J7 et J14.

Sur les 118 molécules ciblées au démarrage de cette étude, 49 molécules n'ont pas été (ou peu) échantillonnées par les deux types d'échantillonnage (moyenné ou intégré). Ces 49 molécules, de concentration moyenne inférieure à 3 ng/L dans le milieu et quantifiées dans moins de 20% des échantillons ont été retirées de l'étude. Cinq molécules, non adaptées au POCIS (paracétamol, terbutaline, céfalexine, céfuroxime et ampicilline) ont également été retirées.

Les résultats obtenus sur les 64 molécules restantes démontrent que les POCIS, en diminuant les effets matriciels et en abaissant les limites de détection, permettent d'augmenter les fréquences de quantification des molécules. Sur les 64 molécules, 25 sont quantifiées dans plus de 70% des échantillons de POCIS contre seulement 18 molécules dans les échantillons moyennés d'eau. Trois molécules sont détectées uniquement par échantillonnage passif (lincomycine, rifampicine et tylosine).

Ce travail illustre également la capacité des POCIS à donner accès à la concentration moyenne sur la durée d'exposition pour les composés présents dans le milieu. Il démontre également l'intérêt de l'approche PRC (Performance Reference Compounds) pour la correction des taux d'échantillonnage (Huckins et al., 2002<sup>5</sup> ; Mazella et al., 2010<sup>6</sup> ; Belles et al., 2014<sup>7</sup>). En effet, les composés de référence et de performance (caféine d9, désisopropyl atrazine d5, salbutamol d3) permettent une correction des taux d'échantillonnage déterminés lors des calibrations en laboratoire en fonction des conditions *in situ*, et donc une correction des concentrations obtenues en ng/L, intégrées sur la durée d'exposition. En revanche, l'emploi de plusieurs PRC se révèle nécessaire à cause de la désorption parfois trop

---

<sup>5</sup> Huckins J.N., Petty J.D., Lebo J.A., Almeida F.V., Booij K., Alvarez D.A., Cranor W.L., Clark R.C. and B.B. Mogensen. (2002) Development of the permeability/performance reference compound approach for *in situ* calibration of semipermeable membrane devices. Environ. Sci. Technol., 36: 85-91.

<sup>6</sup> Mazella N., Lissalde S., Moreira S., Delmas F., Mazellier P., Huckins J.N. (2010) Evaluation of the use of performance reference compounds in an Oasis HLB adsorbent based passive sampler for improving water concentration estimates of polar herbicides in freshwater. Environ. Sci. Technol., 44: 1713-1719.

<sup>7</sup> Belles A., Tapie N., Pardon P., Budzinski H. (2014) Development of the performance reference compound approach for the calibration of "polar organic chemical integrative sampler" (POCIS). Anal. Bioanal. Chem., 406 : 1131-1140.

importante du salbutamol d3 et du phénomène de non-désorption rencontré avec la désisopropyl atrazine d5.

## Les matières organiques : deux solutions innovantes pour les caractériser dans les eaux usées et traitées

Université de Bordeaux : J. Parot, M. Faure, MA. Cordier, E. Parlanti\*  
Envolure SAS : M. Muller, Y. Dudal\*  
Irstea : MJ. Capdeville, C. Miège

### \* Conférenciers

- **Caractérisation par fluorescence 3D de la matière organique dissoute au cours de différents procédés de traitement complémentaire des eaux**

L'amélioration de l'état des cours d'eau aux normes fixées par la Directive cadre sur l'eau nécessite une connaissance des sources de pollution et des processus mis en jeu affectant l'écosystème aquatique. Pour être toxiques, les micropolluants doivent préalablement être accessibles. Or, dans la phase aqueuse, ceux-ci interagissent plus ou moins fortement avec l'ensemble des composés organiques présents, regroupés sous la dénomination de matière organique dissoute (MOD). Les sources de MOD dans les milieux aquatiques sont multiples : autochtone naturelle (algues, bactéries, macrophytes), allochtone naturelle (issue des sols) et allochtone anthropique (rejets urbains domestiques et industriels). La qualité et la quantité de MOD sont des paramètres clés influençant la qualité de l'eau et plus globalement les processus biogéochimiques en milieu aquatique. De nature très complexe et dynamique, la MOD est en effet un acteur clé dans la dispersion des éléments traces, le transport des contaminants, le cycle du carbone organique et la biodisponibilité des micronutriments et des contaminants. En excès dans les eaux de surface, sous une forme biodégradable, la MOD peut également conduire à des déficits en oxygène lors de sa minéralisation. D'autre part, d'un point de vue opérationnel, la MOD est impliquée, notamment lors de la potabilisation des eaux, dans la formation de sous-produits de désinfection et dans le colmatage des membranes de traitement des eaux. Afin de mieux contrôler la qualité des rejets liquides des stations d'épuration des eaux usées (STEU) dans l'environnement, et les matrices pouvant interférer dans la mesure des concentrations en contaminants, il s'avère donc important de caractériser cette MOD qui représente un mélange complexe et variable de molécules évoluant au cours des processus d'épuration.

Les propriétés de fluorescence de la MOD permettent d'obtenir des informations sur sa structure et ses propriétés générales. La fluorescence est une technique très sensible qui permet de caractériser la MOD à partir d'un échantillon aqueux de faible volume sans nécessité de concentration ou d'extraction. Pour caractériser la MOD, la fluorescence tridimensionnelle (3D ou matrice d'excitation émission de fluorescence - EEM) est généralement utilisée. Cette technique consiste à accumuler les spectres d'émission acquis pour plusieurs longueurs d'onde d'excitation. Les données quantitatives et qualitatives à prendre en compte sont l'intensité et la position des maxima de fluorescence qui varient en fonction de la nature et de l'origine des échantillons et dépendent des espèces moléculaires fluorescentes qu'ils contiennent.

Cette technique, très largement utilisée pour caractériser la MOD des milieux aquatiques et terrestres naturels, n'est pas utilisée dans les STEU, malgré son potentiel, pour suivre, voire pour améliorer, les procédés d'épuration des eaux usées.

Dans le cadre du projet ECHIBIOTEB, la spectroscopie de fluorescence 3D a été utilisée pour suivre les caractéristiques de la MOD au cours de différents procédés, intensifs et extensifs, de traitement des eaux et dans les rejets des STEU. Ce travail a permis de comparer l'efficacité des différents traitements pour l'élimination de la MOD.

- **Mesure de l'affinité de la matière organique dissoute pour les micropolluants organiques**

En complément de la caractérisation de la MOD pour les échantillons du projet ECHIBIOTEB, des efforts ont été menés pour quantifier l'affinité de cette matière envers les micropolluants organiques. Pour ce faire, un test analytique a été développé au format microplaque 96 puits, sur la base de l'inhibition des signaux de fluorescence issus d'un micropolluant organique observée lors d'ajouts croissants de l'échantillon contenant la matière organique dissoute. L'inhibition mesurée permet de quantifier la constante d'affinité de la MOD pour le micropolluant.

Ce test a été appliqué dans le cadre du projet à un ensemble de 43 échantillons d'eaux en provenance des différents sites d'étude et par conséquent ayant subi différents procédés de traitement complémentaire. Les résultats, en cours d'interprétation, démontrent la sensibilité de la méthode pour discerner finement des MOD d'origines variées et doivent être mis en lien avec les résultats de caractérisation des MOD par fluorescence 3D et participer à terme à l'interprétation des résultats sur la toxicité.

## **Caractérisation de la contamination des rejets de stations d'épuration des eaux usées, avant et après traitement complémentaire, par des composés perturbateurs endocriniens, dioxin-like et génotoxiques à l'aide d'outils bio-analytiques *in vitro***

INERIS : N. Creusot, E. Maillot-Maréchal, **S. Aït-Aïssa\***  
Université Paris Sud, UMR 8079 : L. Oziol, Y. Lévi  
Université de Bordeaux : C. Clérandeau, A. Pichon, J. Cachot  
Irstea : MJ. Capdeville, F. Serveto, C. Miège

### **\* Conférencier**

L'évaluation des risques associés aux rejets de stations d'épuration des eaux usées exige une bonne connaissance des substances qui y sont présentes et de leur toxicité. Si les analyses chimiques ciblées sont incontournables pour identifier et quantifier les micropolluants, elles restent limitées à un nombre défini de substances et ne fournissent donc qu'une vision partielle de la complexité des mélanges environnementaux et du danger (éco)toxique associé. L'utilisation de méthodes de détection basées sur la mesure d'effets biologiques (bioessais), plus intégratives, est donc indispensable pour répondre à ces enjeux. Dans ce contexte, les bioessais *in vitro* basés sur le mode d'action des micropolluants sont des outils pertinents pour le diagnostic de la qualité chimique des matrices environnementales. Ils permettent une détection sensible et spécifique de l'ensemble des micropolluants actifs ayant le même mécanisme d'action (e.g. activation de récepteurs hormonaux, réponse génique adaptative à un stress génotoxique). Leur application dans une démarche bio-analytique permet la quantification d'équivalents-toxiques (TEQ) dans les échantillons, information complémentaire à celles données par les analyses chimiques.

Dans le cadre du projet ECHIBIOTEB, un panel de bioessais *in vitro* complémentaires a été mis en œuvre, ciblant différentes familles de composés : des perturbateurs endocriniens interagissant avec les récepteurs des œstrogènes (ER), des androgènes (AR), des glucocorticoïdes (GR) et de l'hormone thyroïdienne (TR), des composés dioxin- et HAP-like (interaction avec le récepteur de la dioxine) et des composés génotoxiques (SOS Chromotest). Sur la base de cette batterie de bioessais, des profils de contamination dans les extraits organiques des eaux usées (eaux brutes et échantillonneurs passifs) et des boues, avant et après traitement, ont été établis.

Les profils observés varient en fonction du type d'échantillon et/ou des sites/campagnes de prélèvement. Dans les eaux de sortie de traitement secondaire et avant traitement complémentaire, les bioessais révèlent la présence systématique de composés à activité œstrogénique (0,1-1 ng œstradiol-Eq/L), de composés de type HAP (0,02-1 µg Benzo(a)pyrène -Eq/L) ; avec une fréquence moindre, de composés génotoxiques ou pro-génotoxiques (générés après bioactivation enzymatique) ; sur un seul site, de composés de type glucocorticoïdes (0,5-1 µg dexaméthasone-Eq/L). La contamination des boues est principalement caractérisée par de fortes activités dioxin-like et anti-androgéniques. Aucune activité de perturbation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes n'a été détectée, quel que soit le site et le type d'échantillon (eaux et boues, amont et aval des procédés étudiés).

La comparaison des activités *in vitro* avant et après traitement montre, en général, une réduction de ces activités après traitement. Toutefois, pour certaines campagnes, une rémanence voire une augmentation de l'activité œstrogénique et/ou génotoxique a pu être ponctuellement observée en sortie de lagunage ou après traitement par couplage de

rayonnements UV/péroxyde (uniquement activité génotoxique), suggérant la génération de composés biologiquement actifs par ces traitements.

En conclusion, nos travaux confirment que les outils bioanalytiques *in vitro* apportent des informations nouvelles et complémentaires à celles obtenues par chimie analytique, suggérant la présence de composés non ciblés par les analyses chimiques. La réduction des activités en sortie de traitement complémentaire confortent les résultats obtenus par la chimie. L'identification des molécules biologiquement actives détectées par les bioessais *in vitro* est envisagée au travers d'une approche de type EDA (effect-directed analysis) combinant fractionnement, bioessais et spectrométrie de masse (cf. présentation de Creusot et *al.*).

## La démarche EDA (effect directed analysis) : couplage entre bioessais *in vitro* et méthodes physico-chimiques pour identifier les micropolluants responsables de l'activité biologique

INERIS : **N. Creusot\***, E. Maillot-Maréchal, S. Aït-Aïssa  
Université de Bordeaux : MH. Dévier, C. Gardia-Parege, H. Budzinski  
Irstea : MJ. Capdeville, F. Serveto, C. Miège

### \* Conférencier

Si les bioessais *in vitro* et *in vivo* permettent d'évaluer l'efficacité des traitements des eaux et des boues en stations d'épuration et le danger associé à leurs rejets, ils ne permettent pas l'identification des composés qui en sont responsables et limitent donc la mise en œuvre de mesures permettant la réduction de leur émission (e.g. nouveaux traitements). Aujourd'hui, l'utilisation combinée d'outils de bio-détection sensibles (bioessais *in vitro* à gènes rapporteurs) et de méthodes physico-chimiques (techniques chromatographiques et de spectrométrie de masse) au sein de stratégies intégrées dites bio-analytiques telles que l'EDA (effect-directed analysis – analyse dirigée par l'effet) permet de répondre à ce challenge, i.e. identifier des composés actifs dans l'environnement aquatique. Dans son principe, elle consiste à fractionner par des techniques chimiques un échantillon présentant un(e) activité/effet biologique de manière à réduire la complexité du mélange de départ et d'isoler les composés biologiquement actifs en vue de leur identification chimique. Dans le cadre du projet ANR-ECHIBIOTEB, une telle démarche a été mise en œuvre pour l'identification de composés perturbateurs endocriniens (PE).

Après, un premier profilage toxicologique des échantillons issus des différents types de traitement, les extraits les plus actifs et/ou révélant une persistance d'une/des activité(s) PE ont été fractionnés par HPLC (chromatographie en phase liquide) afin d'identifier les composés actifs (i.e. composés réfractaires au traitement ou produits de transformation). Nos investigations ont été menées (1) sur un extrait de boue présentant de fortes activités oestrogénique (10 ng-estradiol-Eq/g), anti-androgénique (300 µg-flutamide-Eq/g) et dioxin-like (13,4 ng-benzo(a)pyrène-Eq/g) et (2) sur deux extraits de POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) disposés en amont et en aval d'un traitement sur charbon actif et montrant la persistance des activités oestrogénique (de 6 ng-E2-Eq/g de phase HLB en amont à 0.6 en aval) et glucocorticoïde (de 1,3 à 0,1 µg-dexaméthasone/g). Ces extraits ont été fractionnés sur phase normale (NH<sub>2</sub>, 20 fractions, uniquement pour la boue) et/ou sur phase inverse (C18, 40 fractions). La caractérisation des activités PE dans les fractions de l'extrait de boue montre la présence d'une activité oestrogénique dans 2 fractions NH<sub>2</sub> et dans 5 fractions C18 ; d'une activité anti-androgénique dans 3 fractions NH<sub>2</sub> et 1 fraction C18 ; d'une activité androgénique dans 1 seule fraction NH<sub>2</sub> et C18 ; d'une activité dioxin-like dans une seule fraction NH<sub>2</sub> et 4 fractions C18. Un résultat notable est la détection d'une activité androgénique dans une fraction dont la présence était masquée au sein de l'extrait brut (avant fractionnement) par un effet anti-androgénique global. Concernant les extraits de POCIS après fractionnement, aucune activité PE n'a pu être détectée à l'aval du charbon actif. En revanche, le pool de toutes les fractions issues du POCIS (une quarantaine) permet de rétablir les activités détectées dans l'extrait de POCIS avant fractionnement, témoignant de la présence vraisemblable de multiples composés dont l'effet additif est dilué par le fractionnement. Des analyses chimiques basées sur la spectrométrie de masse à haute résolution couplée à la chromatographie en phase liquide ou gazeuse (LC-QTOF, GC-QTOF) sont en cours. Les premiers résultats sur les fractions de boue nous font suspecter la présence de composés présentant une structure stéroïdienne (e.g. sitostérol, cholestan-3-one) dans les fractions oestrogéniques.

Dans l'ensemble, nos résultats confirment l'intérêt de l'approche EDA pour isoler les contaminants biologiquement actifs en vue de leur identification chimique. Ils révèlent aussi l'intérêt d'une telle démarche pour décrypter les effets de mélange au sein d'échantillons environnementaux complexes.

## **Les bioessais *in vivo* pour évaluer le bénéfice des traitements complémentaires des eaux usées et des boues**

Université de Bordeaux : C. Clérandeau, L. Landi, **J. Cachot\***

Irstea : A. François, H. Quéau, P. Noury, M.J. Capdeville, C. Miège, A. Chaumot, **O. Geffard\***

INERIS : L. Chabot, F. Gondelle, P. Pandard

### **\* Conférenciers**

Dans le cadre du programme ECHIBIOTEB, des bioessais *in vivo* ont été mis en œuvre pour évaluer l'efficacité de différents procédés de traitement complémentaires sur la qualité toxique des eaux en sortie et aussi de proposer des outils innovants pour l'évaluation de la qualité des eaux usées avant leur rejet en milieux aquatiques. Pour ceci, une large gamme d'espèces a été utilisée afin d'être le plus représentatif des divers phylums d'organismes aquatiques (bactéries, plantes, mollusques, crustacés et poissons). Des tests d'écotoxicité aigus et chroniques normalisés ont été réalisés en laboratoire à partir de prélèvements d'eau moyennés 2h (représentatifs des traitements étudiés). Parallèlement, des essais ont été réalisés en condition *ex situ* permettant une exposition chronique, en continu des organismes aux eaux de la station. Ces bioessais ont été mis en œuvre pour évaluer la charge toxique des effluents de station d'épuration en entrée et en sortie de traitement. Concernant les boues, ces mêmes bioessais ont été utilisés sur extraits aqueux en compléments d'essais terrestres sur végétaux supérieurs pour évaluer la toxicité des boues de station d'épuration avant et après traitement.

Les résultats obtenus montrent en règle générale des effets toxiques peu marqués pour l'ensemble des bioessais en amont des quatre traitements étudiés, à l'exception notable du site avec lagunes de finition. Parmi la batterie de bioessais mise en œuvre, l'essai chronique vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia* et le test d'inhibition de croissance sur microalgues se sont révélés les plus sensibles, permettant d'identifier des effets toxiques pour deux des six échantillons analysés. L'essai sur *C. dubia* a également mis en évidence, pour certains effluents, des courbes concentrations-réponses atypiques avec des effets d'hormèse importants (stimulations des pontes) aux plus fortes concentrations testées. L'essai Microtox® sur la bactérie bioluminescence *Vibrio fischeri*, a permis de mettre en évidence l'apparition de toxicité à la sortie des pilotes ozoneur, peroxyde et UV/péroxyde. Cette augmentation de toxicité pourrait être la conséquence : soit de la génération de sous-produits toxiques, soit de la persistance de résidus d'ozone dans les eaux. L'utilisation de méthodes chimiques d'extraction et de concentration a permis d'accroître significativement la détection de substances toxiques dans les eaux. Pour les essais en conditions *ex situ*, ce sont les embryons et les larves de poisson médaka qui se sont montrés les plus discriminants, avec une toxicité modérée à forte des eaux en entrée et en sortie de traitement pour trois des quatre campagnes réalisées. Une légère diminution de la charge toxique a été observée après ozonation et ozonation suivie de charbon actif. Enfin, pour un des temps de prélèvement sur trois, sur le site du lagunage, on observe un abattement significatif de la toxicité des effluents avec l'ensemble des bioessais utilisés, à l'exception du test sur embryons de poisson.

Toutes les boues testées avant et après traitement se sont révélées toxiques quelle que soit l'approche utilisée (approche directe : essais terrestres ; approche indirecte : essais aquatiques). Toutefois les effets toxiques mesurés sont apparus pour des doses supérieures à celles classiquement utilisées dans le cadre d'un épandage agricole.

Les effets toxiques observés n'ont pas été modifiés après passage dans un sécheur solaire. En revanche, une diminution significative de cette toxicité a été observée après compostage. Il apparaît toutefois difficile de relier cette réduction de l'écotoxicité à une réelle efficacité du traitement par rapport à la technique de compostage en elle-même, intégrant un complément

carboné (refus de criblage) et donc susceptible d'engendrer une dilution significative de l'échantillon de boues initial.

Dans cette présentation, sera discuté au regard de travaux antérieurs l'applicabilité de ces outils dans d'autres types de stations d'épuration et d'autre part la sensibilité, la pertinence et le cas échéant, les améliorations à apporter aux outils utilisés pour répondre à la question de l'évaluation des procédés de traitement complémentaires des eaux usées.