

Titre du projet : DETERMINATION DES CONTAMINANTS EMERGENTS ISSUS DES EAUX USEES DANS UN HYDROSYSTEME MEDITERRANEEN ANTHROPISE : APPROCHE ANALYTIQUE.

▪ **Responsable du Projet** : Chrystelle Bancon-Montigny
E-mail : bancon@msem.univ-montp2.fr - Tél :04.67.14.39.33 - Fax : 04.67.14.47.74

▪ **Unités participantes**

- **UMR 5569 HydroSciences Montpellier (HSM)- CNRS IRD Universités Montpellier I&II** - Chrystelle Bancon-Montigny bancon@msem.univ-montp2.fr et Françoise Elbaz-Poulichet felbaz@univ-montp2.fr
- **Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE)-INRA Montpellier** Guillermina Hernandez-Raquet hernandg@supagro.inra.fr
- **Centre de Recherche LGEI-Environnement et Risques- Ecole des Mines d'Alès** : Catherine Gonzalez catherine.gonzalez@ema.fr, Evelyne Touraud evelyne.touraud@ema.fr, Guillaume Junqua guillaume.junqua@ema.fr

▪ **Visas des responsables des unités impliquées**



HSM
UMR 5569 (CNRS-IRD-UM1-UM2)
Hydrosciences Montpellier

Dir. Eric Servat



LBE -Laboratoire INRA
Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

Dir. Jean-Philippe Delgenès



Centre de Recherche
LGEI-Environnement et Risques- Ecole des Mines d'Alès

Dir. Miguel LOPEZ-FERBER

Titre du projet : DETERMINATION DES CONTAMINANTS EMERGENTS ISSUS DES EAUX USEES DANS UN HYDROSYSTEME MEDITERRANEEN ANTHROPISE : APPROCHE ANALYTIQUE.

▪ **Unités participantes**

Liste des personnels par organisme :

	Nom	Fonction / organismes	Rôle	ETP
UMR 5569 HydroSciences Montpellier (HSM)- CNRS IRD Universités Montpellier I&II	Françoise Elbaz-Poulichet	Chercheur /DR2 CNRS	Biogéochimie des eaux, Participation aux campagnes de terrain. Interprétation des résultats	20%
	Chrystelle Bancon-Montigny	Maître de conférences / UM2	Etude des éléments, majeurs, traces, composés organostanniques, et des campagnes d'échantillonnage	40%
	Aurélie Vaillé	Stagiaire 2ème année IUT Chimie Option Environnement Sète	26 janvier au 10 avril 2009	
Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE)-INRA Montpellier	Guillermina Hernandez-Raquet	Chercheur / CR1-INRA	Responsable des analyses chimiques et de dégradation	20%
	Nadine Delgenès	Technicienne / INRA	Analyses chimiques	20%
	Valérie BRU	Technicienne / INRA	Analyses en PCRq	10%
Centre de Recherche LGEI- Environnement et Risques- Ecole des Mines d'Alès	Catherine Gonzalez	Professeur	Analyses polluants organiques et émergents Echantillonneurs passifs	20%
	Evelyne Touraud	Maître de recherche	Devenir des produits pharmaceutiques dans l'environnement	20%
	Guillaume Junqua	Ingénieur recherche	Méthodes de screening Evolution spatio-temporelle de la qualité des ressources en eau	20%

▪ **Contexte du projet de recherche :**

Ce projet s'inscrit dans le défi 5 : "Contamination des milieux et écotechnologies".

Les polluants organiques issus de l'activité humaine (urbaine, industrielle, agricole...) convergent vers les systèmes de traitement des eaux usées où ils sont plus ou moins dégradés. Il est fréquent de les trouver, eux ou leurs métabolites, en sortie des systèmes d'épuration dans les effluents et dans les boues. Ainsi, les rejets des effluents de stations d'épuration (STEP) dans les hydrosystèmes et le lessivage des boues épandues constituent un risque potentiel pour les

organismes aquatiques et pour la santé humaine. Ces risques doivent être évalués et des stratégies de limitation de ces risques doivent être développées.

La recherche environnementale a commencé à s'intéresser aux produits pharmaceutiques et autres contaminants organiques "émergents" des eaux usées tels les produits de soin personnel, les tensioactifs, les retardateurs de feu, les insecticides, les composés organostanniques, les antibiotiques et les désinfectants. Le projet Européen NORMAN a, notamment, établi une base de donnée sur les polluants émergents et a fait le point sur les recherches en cours dans ce domaine et les axes futurs de développement¹. Egalement, le projet KNAPPE (www.knappe-eu.org), portant sur la problématique des Produits Pharmaceutiques (PPs) dans les eaux environnementales, a identifié les actions prioritaires à mener dans le domaine scientifique (R&D), réglementaire et social pour limiter l'occurrence et l'impact des PPs dans l'environnement². Nombre de ces contaminants "émergents" ont été conçus pour être bioactifs et présentent donc un risque potentiel pour les organismes aquatiques. D'une manière générale, le risque de toxicité aiguë semble peu important, mais le risque d'effets sur des organismes non cibles existe réellement³. Certains contaminants organiques des eaux usées interfèrent avec les hormones naturelles et perturbent le fonctionnement normal du système endocrinien des organismes. C'est le cas des hormones naturelles et synthétiques, des tensioactifs (alkylphenols)⁴, des retardateurs de feu^{5, 6} et des insecticides qui sont très présents dans les effluents de STEP dans les bassins soumis à une agriculture intensive^{7, 8}. Les composés organostanniques bannis des peintures antifouling pour bateaux en raison de leurs effets sur la reproduction des organismes marins mais largement utilisés dans de nombreux autres secteurs d'activités (catalyseurs, agents stabilisants (PVC), pesticides...) ⁹⁻¹¹ sont très présents dans les eaux usées et/ou les boues de STEP¹². Les rejets de station d'épuration sont aussi des sources reconnues d'antibiotiques¹³⁻¹⁵. Ces derniers sont susceptibles de stimuler l'émergence de résistance chez les bactéries¹⁶ et certains auteurs considèrent les gènes de résistance aux antibiotiques comme des contaminants émergents¹⁷.

La dégradation des polluants émergents varie en fonction du type de traitement utilisé dans les STEPs. L'efficacité des différents systèmes de traitements est encore en cours d'évaluation car les processus sont complexes et leur efficacité varie selon les composés. De fait, ces contaminants sont de plus en plus fréquemment retrouvés dans les milieux récepteurs et dans les eaux potables de zones densément urbanisées aux USA^{18, 19}, en Allemagne²⁰, en Grande-Bretagne²¹, en France²²⁻²⁸

Le bassin de l'Hérault constitue une ressource en eau importante pour le département éponyme auquel il fournit 24,2 millions de m³ d'eau potable annuellement. Ce bassin est un bassin Méditerranéen typique de taille moyenne soumis à une pression anthropique modérée, principalement d'origine agricole et domestique. Cette pression s'accroît en liaison avec l'augmentation de la population. Le laboratoire HydroSciences y poursuit depuis quelques années des travaux portant sur l'identification des sources de pollution des ressources en eaux et des processus de transfert des polluants. Ces études ont permis d'identifier un apport d'eaux usées et une contamination par certaines substances pharmaceutiques dans un certain nombre **de forages pour la production d'eau potable**^{28, 29}. D'autre part, la présence systématique des composés organostanniques a été observée dans les eaux de surface et certains captages d'eau potable du bassin de l'Hérault²³. A ce jour, les tensioactifs, les hormones stéroïdes naturelles et synthétiques, les antibiotiques, les insecticides organophosphorés n'ont jamais été recherchés dans ce bassin versant, pas plus que la présence de gènes résistant aux antibiotiques.

Au vu des problèmes générés notamment par ces composés émergents, la mise en place de la Directive Cadre Européenne sur l'Eau induit de fortes exigences en matière de surveillance de qualité de l'eau et notamment l'identification des pressions anthropiques. Ainsi, le nombre de composés à considérer et les faibles concentrations nécessitent d'avoir à disposition des techniques analytiques performantes. Dans ce cadre, le projet SWIFT-WFD³⁰ (www.swift-

wfd.com) a testé durant 3 ans, en conditions réelles, des systèmes de mesure permettant une analyse sur site pour : identifier les sources de pollutions, établir une cartographie de la pollution, mettre en place des programmes de surveillances pertinents et adaptés aux exigences de la Directive Européenne. Ce projet a notamment démontré la nécessité d'avoir des systèmes compatibles avec une mesure sur site et avec les procédures analytiques développées en laboratoire^{31, 32}.

Ainsi, ce projet propose de réunir les compétences de trois laboratoires ayant l'expérience et la maîtrise de techniques analytiques de pointe englobant un large champ de composés émergents.

Les infiltrations d'effluents d'eaux usées dans la nappe alluviale de l'Hérault ainsi que le recyclage intensif de l'eau sur certains sous bassins font de ce bassin un site de choix pour réaliser une telle étude. Différents types d'eau seront analysés incluant des eaux de surface, des eaux de stations d'épuration (entrée-sortie) et des eaux souterraines (captage pour la production d'eau potable). Outre la détermination de l'importance et la diversité de la contamination dans différents contextes hydrologiques dans le bassin versant de l'Hérault, cette étude propose de confronter différents types de méthodes : analyses classiques de laboratoire et des méthodes de "screening" avec des préleveurs passifs. Grâce à l'utilisation des différentes techniques, l'ensemble des informations collectées pourrait permettre :

- d'identifier les points de pollution,
- de comprendre le devenir et l'impact (tests de toxicité) des composés émergents détectés.

De telles études pourraient à terme donner aux gestionnaires et exploitants des systèmes; des mesures rapides, adaptables sur site et conduisant à des mesures fiables et robustes.

▪ **Méthodologie :**

Des échantillons seront prélevés dans les eaux de surface (amont/aval de rejets de STEP), en entrée et sortie de STEP ainsi que dans des captages d'eau potable, dont ceux identifiés comme recyclant des quantités significatives d'eaux usées.

Les principaux paramètres physicochimiques (Température, pH, oxygène dissous) et les concentrations en éléments majeurs des eaux seront déterminés. Les concentrations totales en métaux (phases dissoute et particulaire) seront mesurées. L'empreinte de la qualité chimique de l'eau sera déterminée par spectrophotométrie UV (DCO, DBO, MES, détergeant). La présence de certains contaminants comme les pesticides sera recherchée par immunoessais.

Les contaminants que nous rechercherons en priorité appartiennent aux grandes catégories suivantes : tensioactifs, hormones stéroïdes naturelles et synthétiques, antibiotiques, produits pharmaceutiques les plus fréquemment détectés dans les effluents de STEP, pesticides, composés organostanniques dans les eaux et matières en suspension.

Pour un certain nombre de composés des "screening" des polluants seront également réalisés grâce à des échantillonneurs passifs, et comparés aux échantillons ponctuels ou moyens analysés au laboratoire. Un certain nombre d'échantillonneurs passifs développés à ce jour peuvent permettre de définir le niveau de contamination des ressources en eau par de nombreuses familles de polluants (pesticides, pharmaceutiques, HAP, métaux)^{33, 34}.

Afin d'évaluer la toxicité globale des effluents et des eaux de surface des tests d'oestrogénicité, de l'activité dioxine-like (AhR) et PXR seront également appliqués. Les composés organostanniques ayant été identifiés comme persistants dans les hydrosystèmes (STEP, eaux de surface), leur impact sur les récepteurs nucléaires PPARs (Proliferator peroxysome activated receptors) sera évalué à l'aide de lignées cellulaires bioluminescentes.

Ainsi, l'objectif de ce projet est de proposer une approche complémentaire par différentes techniques analytiques : méthodes de screening/méthodes d'analyse afin d'évaluer de façon pertinente l'impact de l'activité anthropique sur l'écosystème et les ressources en eau.

Le bassin versant de l'Hérault est un site d'étude du laboratoire HydroSciences depuis de nombreuses années, les accès aux différentes stations d'épuration et captages nous sont facilités grâce à la collaboration des communes , du Conseil Général de l'Hérault et des différents traiteurs d'eaux.

▪ **Complémentarité des équipes impliquées**

Une collaboration entre les laboratoires HSM et le LBE a déjà débuté en mars 2008 grâce à l'obtention d'un financement EC2CO-CYTRIX (50kEuros). Une première campagne d'échantillonnage a été réalisée afin de mettre au point les divers protocoles d'échantillonnage dans les matrices étudiées (STEP, eaux de surface et souterraines).

La présente étude propose de réunir les compétences de trois laboratoires membres de l'IFR :

- Laboratoire HydroSciences Montpellier: connaissance du site d'étude, analyses d'éléments traces, majeurs et spéciation des composés organostanniques,
- Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) : analyses chimiques, système de traitement,
- Centre de recherche LGEI (EMA) : méthodes de screening (échantillonneurs passifs) et mesures in situ (coordonnateur du programme SWIFT-WFD)

▪ **Résultats attendus**

Les résultats attendus d'une telle démarche sont une meilleure connaissance des risques liés à des rejets croissants d'effluents de STEP et à des épandages massifs de boues de STEP dans un bassin Méditerranéen typique. Une telle étude doit permettre d'améliorer les stratégies de rejet des eaux usées ou des épandages de boues pour une meilleure gestion des ressources en eau.

▪ **Plan de valorisation scientifique**

Les perspectives de valorisation de cette étude se fera au travers de publications scientifiques portant sur la caractérisation de composés émergents de la source à la mer de ce bassin anthropisé ainsi que sur les complémentarité des techniques analytiques de laboratoire et in situ.

▪ **Financement du projet : Durée totale du projet : 2 ans**

	Années	Fonctionnement	Missions	TOTAL	DEMANDE BUDGETAIRE A L'IFR (25%)
coût					
annuel du projet	2009	62 000 €	3 500 €	65 500 €	13125 €H.T.
	2010	62 000 €	3 500 €	65 500 €	13125 €H.T.
coût total du projet (durée totale 2 ans)		124 000 €	6 500 €	130 500 €	26500 €H.T.

Nous sollicitons une contribution financière de 26 500 €(soit 20,3 % du budget du projet) pour l'acquisition des petits équipements nécessaires à la réalisation de mesures sur sites, screening de polluants, analyses en laboratoire. Le financement entre les 2 années du projet, réparti 13 125 €pour l'année 1 et 13 125 €pour l'année 2, permettrait de mener à bien les campagnes d'échantillonnage prévues dans le projet, les analyses des polluants pour le comparaison des méthodes classiques et de screening ainsi que des mesures PPAR non comprises dans le projet EC2CO. D'autres équipements lourds déjà acquis par les équipes impliquées dans ce projet seront également utilisés, notamment LC/MS, Chromatographie liquide et gazeuse, spectrophotomètre de terrain, GC-ICP-MS.

Autres sources de financement demandées :

- Soumission au programme EC2CO –CYTRIX octobre 2007 (projet sur 3 ans) : DEVENIR DES CONTAMINANTS EMERGENTS ISSUS DES EAUX USEES DANS UN HYDROSYSTEME MEDITERRANEEN ANTHROPISE : IMPACT SUR LA RESSOURCE EN EAU POTABLE. (année 1/3) **MONTANT ACCORDE 50000€**
- Demande de dotation (50 keuros) au programme EC2CO–CYTRIX déposé en septembre 2008 année 2/3 en cours d'instruction

Une nouvelle demande de soutien a été effectuée pour le projet en cours débuté en 2008 au programme EC2CO. Le programme d'étude pour l'année 2009 sera l'étude de la dégradation en laboratoire des différents polluants et microflores identifiés grâce aux premières campagnes d'échantillonnage.

L'octroi du financement de l'IFR permettrait de réaliser des campagnes de terrain complémentaires (aucune campagne de prélèvement n'est prévue en 2009 dans le projet EC2CO) et des analyses non prévues dans le projet EC2CO. Cette étude se concentre sur la partie purement analytique des mesures environnementales et propose de comparer les méthodes de laboratoire et de terrain. Cette étude constitue donc une étude complémentaire qui pourrait être réalisée sans le financement EC2CO.

▪ **Détail des dépenses :**

Fonctionnement

**Equipe HSM Montpellier :4000
€an**

Analyses chimiques Petit matériel de prélèvement:

- éléments majeurs (Chromatographie ionique),
- éléments traces, bore, terres rares (ICP-MS),
- carbone organique (COT mètre),
- composés organostanniques (GC-PFPD),
- récepteurs nucléaires PPARs
- lignées cellulaires bioluminescentes.

**LBE : Equipe Ingénierie des Procédés4000
€an**

- Matériel de prélèvement
- Consommables, fournitures chromatographie,
- solvants et réactifs, standards deutérés
- hormones (GC-MS)
- Nonylphénol et LAS (HPLC-Fluo)
- Analyse des pharmaceutiques (sous contrat)
- Maintenance appareillage
- Incubateurs et matériel de microbiologie
- Kits biologie moléculaire
- Fonctionnement PCR et séquenceurs

**EMA : LGEI.....4000
€an**

- UV (DCO, DBO, MES, détergeant)
- immunoessais

**Missions :1125
€an**

Missions Montpellier/ site expérimental (Hérault)
Congrès internationaux
Réunions d'avancement du projet

▪ **Calendrier :**

Mois	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Réunions												
Calibration des échantillonneurs passifs												
Campagnes d'échantillonnage												
Analyses												
Interprétation des résultats												

Références bibliographiques :

Les publications sur le thème produites par les parties prenantes au projet sont surlignées en gris.

- (1) NORMAN (Contract N° 018486 - 1st September 2005-2008). "Network of reference laboratories for monitoring of emerging environmental pollutants", 6th Framework Programme — Priority 6.3 "Global Change and Ecosystems" _KNAPPE "Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental waters", FP6 European project Contract n°036864, Février 2007-Septembre 2008.
- (2) KNAPPE "Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental waters", FP6 European project Contract n°036864, Février 2007-Septembre 2008.
- (3) Ferrari, B.; Paxeus, N.; Giudice, R. L.; Pollio, A.; Garric, J. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2003**, 55, 359-370.
- (4) Ying, G.-G.; Williams, B.; Kookana, R. *Environment International* **2002**, 28, 215-226.
- (5) de Boer, J.; Wester, P. G.; van der Horst, A.; Leonards, P. E. G. *Environmental Pollution* **2003**, 122, 63-74.
- (6) Verslycke, T. A.; Vethaak, A. D.; Arijs, K.; Janssen, C. R. *Environmental Pollution* **2005**, 136, 19-31.
- (7) Gerecke, A. C.; Scharer, M.; Singer, H. P.; Muller, S. R.; Schwarzenbach, R. P.; Sagesser, M.; Ochsenein, U.; Popow, G. *Chemosphere* **2002**, 48, 307-315.
- (8) Neumann, M.; Schulz, R.; Schafer, K.; Muller, W.; Mannheller, W.; Liess, M. *Water Research* **2002**, 36, 835-842.
- (9) Becker Van Slooten, K.; Merlini, L.; Stemueller, A. M.; Felipe, L.; Taradellas, J. *Gaz Wasser Abwasser* **1994**, 2, 104-110.
- (10) Fent, K.; Hunn, J.; Renggli, D.; Siegrist, H. *Marine Environmental Research* **1991**, 32, 223-231.
- (11) Fent, K.; Mueller, M. D. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, 25, 489-493.
- (12) Palmquist, H.; Hanus, J. *Science of The Total Environment* **2005**, 348, 151-163.
- (13) Auerbach, E. A.; Seyfried, E. E.; McMahon, K. D. *Water Research* **2007**, 41, 1143-1151.
- (14) Coestier, C.; Lin, L.; Roig, B.; Touraud, E. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 387.
- (15) Coetsier, C., Montpellier II, Ecole des Mines d'Alès., décembre 2008.
- (16) Jorgensen, S. E.; Halling-Sorensen, B. *Chemosphere* **2000**, 40, 691-699.
- (17) Pei, R.; Kim, S.-C.; Carlson, K. H.; Pruden, A. *Water Research* **2006**, 40, 2427-2435.
- (18) Loraine, G. A.; Pettigrove, M. E. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 687-695.

- (19) Stackelberg, P. E.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Zaugg, S. D.; Henderson, A. K.; Reissman, D. B. *Science of The Total Environment* **2004**, 329, 99-113.
- (20) Heberer, T. *Journal of Hydrology* **2002**, 266, 175-189.
- (21) Ashton, D.; Hilton, M.; Thomas, K. V. *Science of The Total Environment* **2004**, 333, 167-184.
- (22) Bancon-Montigny, C.; Lespes, G.; Potin-Gautier, M. *Water Research* **2004**, 38, 933-946.
- (23) Bancon-Montigny, C.; Seidel, J.-L.; Brissaud, F.; Elbaz-Poulichet, F. *J. Environ. Monit.* **2008**, 10, 638-647.
- (24) Comoretto, L.; Chiron, S. *Science of The Total Environment* **2005**, 349, 201-210.
- (25) Elbaz-Poulichet, F.; Seidel, J.-L.; Othoniel, C. *Water Research* **2002**, 36, 1102-1105.
- (26) Lespes, G., Montigny, C. *Rapport d'étude Agence de l'eau Rhin Meuse/Université de Pau et des Pays de l'Adour* **1997**, 22304 RM, 31.
- (27) Pedersen, J. A.; Yeager, M. A.; Suffet, I. H. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 2120-2127.
- (28) Rabiet, M.; Togola, A.; Brissaud, F.; Seidel, J. L.; Budzinski, H.; Elbaz-Poulichet, F. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 5282-5288.
- (29) Rabiet, M., Thèse de Doctorat Université Montpellier 2, Montpellier, 2006.
- (30) SWIFT-WFD , J.-J. Janvier 2004 -Juin 2007, "Screening methods for Water data InformaTion in support of the Water Framework Directive", STREP, FP6, financé par la DG Recherche.
- (31) Allan, I. J.; Vrana, B.; Greenwood, R.; Mills, G. A.; Roig, B.; Gonzalez, C. *Talanta* **2006**, 69, 302-322.
- (32) Gonzalez, C.; Junqua, G.; Roig, B. *TSM* **2008**, 2.
- (33) Allan, I. J.; Knutsson, J.; Guigues, N.; Mills, G. A.; Fouillac, A.-M.; Greenwood, R. *J. Environ. Monit.* **2008**, 10, 821 - 829.
- (34) Budzinski, H.; Togola, A.; Lardy-Fontan, S. *Submitted to Journal of Environmental Monitoring*.