Traitement tertiaire des micropolluants sur CarboPlus µG®

Evaluation de l'écotoxicité des effluents amont/aval à l'aide de bioessais

Rapport de l'étude R&D

–

2019-2020

Convention n°2019 0204

1 INTRODUCTION 8
2 PRESENTATION DE L'ETUDE 10
3 MATERIEL ET METHODES 13
3.1 LE PILOTE DE TRAITEMENT TERTIAIRE 13
3.2 BANCS D'ESSAIS MIS EN PLACE 15
3.2.1 Bancs d'essais physico-chimiques 15
3.2.2 Analyses des macropolluants en laboratoire 16
3.2.3 Bioessais 17
3.2.4 Analyses des micropolluants 34
4 RESULTATS 38
4.1 PERFORMANCES « MACROPOLLUANTS ET METAUX » 38
4.1.1 UV 254 nm 38
4.1.2 DCO 39
4.1.3 Ammonium 40
4.1.4 Nitrites 41
4.1.5 Matières en suspension 42
4.1.6 DBO5 43
4.1.8 Métaux 45
4.2 RESULTATS DES BIOESSAIS 48
4.2.1 Expérimentations ex-situ INRAE-Lyon 48
4.2.2 Résultats avec la station de biosurveillance Toxmate® 59
4.2.3 Résultats avec les biocapteurs NODE 72
4.3 PERFORMANCES SUR LES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES 76
4.3.1 Les analyses globales 76
4.3.2 Les performances globales 78
4.3.3 Les performances ciblées 79
5 CONCLUSION 84

Table des Illustrations

Figure 1: Schéma simplifié de la filière eau de la STEU 11

Figure 2: Pilote de traitement CarboPlus µG 14

Figure 3: Banc d'essai physico-chimique 15

Figure 4 : Schéma de l'approche banc ex-situ 18

Figure 5 : Expérimentations ex-situ de l'INRAE-Lyon 20

Figure 6 : Méthode de mesure du taux d'alimentation 22

Figure 7: Cycle de mue et critères d'identification des stades 23

Figure 8 : Procédure pour déterminer le stade de mue. Adaptée de Xuereb, 2009 24

Figure 9 : Mesure des paramètres biologiques de reproduction. Adapté de Xuereb, 2009 24

Figure 10 : Principe de fonctionnement des biocapteurs NODE® 29

Figure 11 : Exemple de signaux du biocapteurs NODE® 30

Figure 12 : Le biocapteur microbien NODE® 31

Figure 13: Biocapteur ToxMate® 33

Figure 14 : Performances d'abattement en UV 254 nm du CarboPlus µG® 38

Figure 15 : Abattement de la DCO par le CarboPlus µG® 39

Figure 16: Abattement en N-NH4 par le CarboPlus µG® 40

Figure 17 : Abattement en N-NO2 par le CarboPlus µG® 41

Figure 18 : Evolution des MeS à travers le CarboPlus µG® 42

Figure 19: Abattement en DBO_5 par le CarboPlus µG® 43

Figure 20: Evolution de la DBO5 au cours des campagnes 1 à 3 44

Figure 21 : Evolution de $N\text{-}NO_3$ à travers le CarboPlus µG® 47

Figure 22: Taux d'alimentation des campagnes 2,3 et 4 50

Figure 23 : Distribution des stades de mue chez les femelles exposées 51

Figure 24 : Fertilité des gammares femelles 52

Figure 25 : Fécondité des gammares femelles 52

Figure 26 : Résultats des biomarqueurs moléculaires 54

Figure 27 : Suivi Toxmate® et ammonium, février 2020 61

Figure 28 : Mortalité massive des gastéropodes de la STEU – Février 2020 62

Figure 29 : Taux de survie en fin de suivi Toxmate® 63

Figure 30 : Suivis Toxmate® de juillet à septembre 2019 65

Figure 31 : Suivis Toxmate® d'octobre à décembre 2019 67

Figure 32 : Suivis Toxmate® de février à mars 2020 69

Figure 33 : Suivis Toxmate® de juin à août 2020 71

Figure 34 : Signaux Capteurs NODE® - Extrait de septembre 2019 74

Figure 35 : Signaux Capteurs NODE® - Extrait de février 2020 74

Figure 36 : Incident pilote détecté par le biocapteur NODE® 75

Figure 37 : Pollution détectée : biocapteur NODE® et sonde pH sur eau brute STEU 75

Figure 38 : Projection ACP - Campagne 3 77

Figure 39 : ratio des molécules qui disparaissent totalement 78

Figure 40 : Exemple de répartition des molécules – Campagne 3 79

Figure 41 : Performances du Carboplus µG sur les micropolluants organiques – Campagne 1 82

Figure 42 : Performances du Carboplus µG sur les micropolluants organiques – Campagne 2 82

Figure 43 : Performances du Carboplus µG sur les micropolluants organiques – Campagne 3 83

Figure 44: Performances du Carboplus µG sur les micropolluants organiques - Campagne 4 83

Liste des tableaux

Tableau 1 : Normes de rejet de la station d'épuration de Saint-Fons 11

Tableau 2 : Campagnes des bancs tests ex-situ 28

Tableau 3: Résumé des analyses en laboratoire 37

Tableau 4 : Résultats sur les métaux (entrée STEU, entrée et sortie pilote) 46

Tableau 5 : Taux de survie des mâles 49

Tableau 6 : Taux de survie des femelles 49

Tableau 8 : Teneurs en métaux dans les gammares, exprimées en µg/g de poids frais 57

Tableau 9 : Teneurs en composés organiques dans les gammares, exprimées en ng/g de poids frais 58

Tableau 10 : Nombre et type d'événements Toxmate® détectés 60

Tableau 11 : Stress biologiques Toxmate® - Juillet à Septembre 2019 64

Tableau 12 : Stress biologiques Toxmate® - Octobre à Décembre 2019 66

Tableau 13 : Stress biologiques Toxmate® - Février à Mars 2020 68

Tableau 14 : Stress biologiques Toxmate® - Juillet à Août 2020 70

Tableau 15: Micropolluants organiques totalement abattues par la STEU 81

Liste des équations

Équation 1: Formule du taux d'alimentation 21

Abréviations

ACP : Analyse en Composante Principale

Ache : Acétylcholinestérase

AE RMC : Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse

CE : Carboxylestérases

µCAG ou µG : Charbon actif en micrograin

DBO : Demande Biologique en Oxygène ; DBO5 : DBO normalisée sur 5 jours.

DCO : Demande Chimique en Oxygène

EH : Equivalent Habitant

EEUT : Eau Usée Urbaine Traitée

GST : Gluthation-s-transférase

HAP : Hydrocarbure aromatique polycyclique

ICPE : Installations Classées pour la Protection de l'environnement

MeS : Matières en Suspension

µG : MicroGrain de charbon actig

PE : Pertubateur Endocrinen ou hormonal

PO : Phénoloxydase

RSDE : Rejet de Substances Dangereuses pour l'Environnement

R&D : Recherche et Développement

STEU : Station de Traitement des Eaux Usées

TE : Taille Effective

Remerciements

Nous tenons à remercier particulièrement :

- L'Agence de l'Eau RMC, très impliquée dans la recherche des nouveaux outils de surveillance des eaux, pour avoir contribué au financement de cette étude (phase 1), mais également sur la continuation de celle-ci (phase 2 en cours) ;
- La Métropole du Grand Lyon, en permanence à l'affut des innovations dans le domaine du traitement de l'eau, pour nous avoir donné l'opportunité de réaliser cette étude au sein de leur parc épuratoire ;
- Le personnel d'exploitation SAUR de la station d'épuration de Saint-Fons pour nous avoir accueillis (2019 à 2021) et aidés pour la mise en place de ces essais, dans le contexte difficile de la pandémie Covid-19 (2020 à 2021).
- Les équipes d'écotoxicologie de BIOMAE, INRAE-Lyon, VIEWPOINT et ENOVEO pour le montage de ce projet, leur travail sur la plate-forme d'essais et leurs expertises scientifiques dans le domaine des bioessais.
- Les équipes des laboratoires analytiques de LODIAG, CARSO, EUROFINS et IRH pour leurs prestations analytiques.

1 Introduction

La surveillance réglementaire des rejets de station d'épuration d'eaux usées urbaines (STEU) en France est-elle adaptée à la préservation de la biodiversité ? En 2020, la réponse est non en ce qui concerne les micropolluants, car les filières actuelles ne sont pas conçues pour traiter cette pollution dite diffuse. Les traitements tertiaires mis en place dans les STEU, pour cet objectif de réduction des pollutions diffuses, sont encore très peu développés en France et en Europe car la législation actuelle ne guide les pratiques opératoires que vers le traitement de la pollution due aux macropolluants : les matières en suspension (MeS), la demande chimique en oxygène (DCO) ou la demande biologique en oxygène sur 5 jours (DBO_5), l'azote (organique, ammoniacal, et celui contenu dans les nitrates et les nitrites) ou le phosphore. Il s'agit des polluants majoritaires des rejets de station d'épuration d'eaux usées (STEU), tous exprimés en mg/l.

L'usage en recyclage ou en réutilisation d'eau usée urbaine traitée (EEUT) ou le rejet des EUUT en zones à usages sensibles (zone de baignade, conchylicoles, …) impose parfois des réglementations plus contraignantes, sur les macropolluants précités, voire et surtout sur certains paramètres de qualité microbiologiques spécifiques. C'est ainsi que des solutions de traitements biologiques, physico-chimiques, de filtration et/ou de désinfection peuvent être mises en œuvre. Mais, ces procédés ne règlent pas le problème de la pollution diffuse due aux micropolluants, tous exprimés en µg/l ou en ng/l. Cette pollution n'est que partiellement ou pas du tout piégée par les filières classiques sans traitement dédié.

En ce qui concerne la lutte contre les micropolluants en France, seules les actions de recherche de réduction des rejets de substances dangereuses (RSDE) des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) motivent les épurateurs à rechercher l'origine de certaines pollutions et à devancer les futures normes de rejets des EUUT. La volonté actuelle, sociétale et politique, de protéger la biodiversité dans sa globalité va accélérer cet élan. Une prise de conscience environnementale est observée au niveau européen et pousse certaines métropoles ou pays à investir davantage dans la protection de la ressource et de la santé humaine. Le cas le plus emblématique est celui de la Suisse qui va équiper d'ici 2035, 135 de ses 700 stations d'épuration de traitements de micropolluants afin de limiter leur rejet dans l'environnement. L'Allemagne s'engage également dans cette direction en équipant 70 de leurs STEU de traitement tertiaire des micropolluants.

Les procédures d'évaluation réglementaires de la filière eau des STEU ne reposent que sur le socle des macropolluants et essentiellement sur des prélèvements proportionnels au débit ou à intervalles réguliers, sur des périodes fixées à 24h (échantillon moyenné sur bilan 24 heures). Ils impliquent, par ailleurs, des délais de retour de résultats parfois très longs, de quelques jours à plusieurs semaines. Ils ne permettent pas de rendre compte du fonctionnement d'une STEU sur une échelle de temps plus longue, comme une pollution chronique. Ils ne permettent que très rarement, par chance, d'observer des pics de pollution s'ils ne sont pas dilués dans ces prélèvements fortement moyennés. Malgré des progrès techniques très importants sur les chaînes analytiques de molécules organiques, l'obtention d'analyses exhaustives sur tous les micropolluants est très difficile pour plusieurs raisons : le coût, la logistique à mettre en place et la détection-quantification de molécules très diluées dans une matrice d'eau très chargée.

Comment peut-on mettre en lumière et discriminer les pollutions dues aux micropolluants ? Les analyseurs chimiques ou les sondes optiques et physico chimiques chargés d'assurer des analyses en continu des effluents traités en STEU ne sont pas adaptés pour détecter une pollution aussi discrète. Toutes les analyses chimiques réalisés en laboratoire, sur des prélèvements ponctuels ou moyennés, ne permettent pas d'identifier tous les risques écologiques. En effet, les écotoxicologues démontrent régulièrement les effets néfastes ou possiblement néfastes de l'accumulation de certains micropolluants dans certains organismes aquatiques les plus simples, puis dans toute la chaîne alimentaire jusqu'à l'homme. Certaines molécules classées comme perturbateurs endocriniens (PE ou perturbateurs hormonaux) sont fortement suspectés d'interagir avec des protéines régulatrices des cellules animales et d'induire de nombreuses pathologies, comme par exemple des troubles de la reproduction. De nombreux chercheurs ont montré également le possible « effet cocktail » de molécules prises individuellement qui peuvent être considérées sans danger, mais nocives lorsqu'elles sont mélangées à d'autres.

On observe un développement intense des biocapteurs ou bioessais, la plupart du temps sous forme de prototypes, afin d'évaluer les effets biologiques tels que la toxicité « globale » ou la génotoxicité. L'utilisation d'outils biologiques qui intègrent tous les facteurs physico-chimiques et chimiques de l'eau traitée d'une STEU et surtout la part biodisponible des contaminants présents dans le rejet semble prometteuse et complémentaire aux analyses chimiques. Les nouveaux biocapteurs ou bioessais peuvent-ils aider à détecter et discriminer les micropolluants, aider à l'évaluation de l'écotoxicité d'un effluent traité en sortie de STEU ? Peuvent-ils compléter les informations données par les analyses chimiques, les corroborer ou les infirmer ?

Quel est l'impact d'un traitement tertiaire dédié au traitement des micropolluants en termes d'écotoxicité ? Voilà l'objet de ce rapport qui présente une l'étude co-financée par l'Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse et piloté par le service R&D de SAUR.

2 Présentation de l'étude

Le projet a été réalisé du printemps 2019 au printemps 2020, pour une durée d'un an.

La collecte des résultats a été perturbée par les conséquences de la pandémie Covid 19, car certains laboratoires partenaires ou sous-traitants de cette étude ont dû soit fermer, soit s'impliquer prioritairement dans des protocoles d'analyses liés à la recherche sur le virus responsable de la pandémie. Les derniers résultats n'ont été disponibles qu'en janvier 2021.

Néanmoins, les expériences sur site ont pu être majoritairement conduites avec succès. Seule la dernière campagne d'analyse a été raccourcie à cause du premier confinement de mars 2020.

Les essais sur site ont été menés sur le site de la STEU de Saint-Fons (69 – France) de la collectivité du Grand Lyon, la plus grande STEU de la région lyonnaise. Elle traite les eaux usées (pluviales et ménagères) de la rive gauche du Rhône et de plusieurs communes extérieures du Grand Lyon (Métropole de Lyon). Elle traite un débit moyen journalier d'eaux usées de 200 000 m^3/ jour et sa capacité nominale est d'environ 1 000 000 Equivalent Habitant (EH). La filière de traitement de l'eau de cette STEU est organisée en 2 ou 4 files suivant les étapes de traitement et est composée des grandes étapes suivantes (Cf. Figure 1: Schéma simplifié de la filière eau de la STEU) :

- Prétraitement (dégrillage, déshuilage, dessablage)
- Décantation primaire
- Traitement biologique (boues activées)
- Décantation secondaire
- Coagulation-Floculation-Décantation lamellaire, de type Multiflo®, chargée de traiter le surplus de débit en cas d'événement pluvial important, surplus bypassant le traitement biologique et la décantation secondaire.
- Traitement secondaire final de nitrification par biofiltration, de type Biostyr®.

La STEU doit respecter des normes de rejet, imposés par l'arrêté du 21/07/2015, pour le rejet des eaux épurées dans le Rhône. Cf. Tableau 1 : Normes de rejet de la station d'épuration de Saint-Fons, ci-dessous.

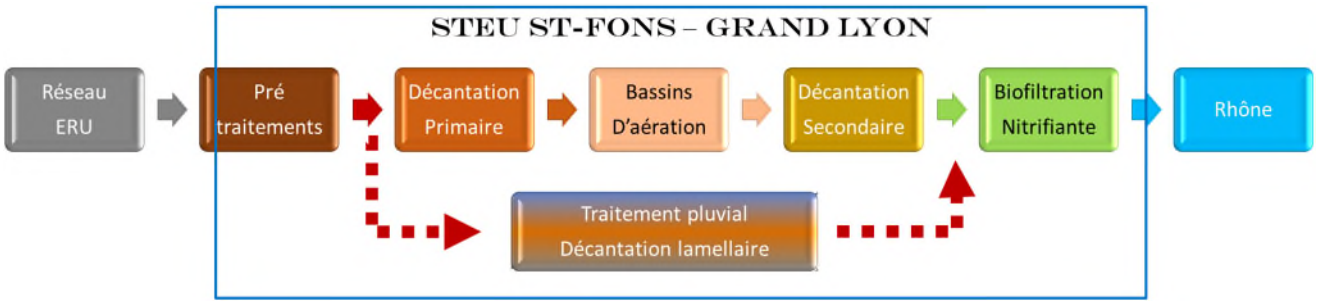


Figure 1: Schéma simplifié de la filière eau de la STEU

Tableau 1 : Normes de rejet de la station d'épuration de Saint-Fons

Paramètres	Concentration (mg/L)	Rendement (%)	Valeur rédhibitoire (mg/L)
MES	35	90	85
DBO_5	25	80	50
DCO	125	75	250
$N\text{-}NH4^+$ (Moyenne annuelle)	5	-	-
NTK (Moyenne annuelle)	10	75	-

Cette étude a été basée sur la mise en place :

- D'un pilote de traitement tertiaire afin d'évaluer les effets d'un tel traitement sur la toxicité des effluents :
    - Effluent traité par la STEU (amont pilote)
    - Effluent traité par la STEU puis par le traitement tertiaire (aval pilote) ;
- D'une batterie de capteurs physico-chimiques en continu installés sur les eaux traitées en amont et en aval du pilote ;
- D'un programme d'analyses chimiques, sur les eaux traitées en amont et en aval du pilote, ainsi que sur les eaux en entrée de la STEU
- De trois bancs tests de « bioessais », surveillant les eaux traitées en amont et en aval du pilote :

Le projet s'est articulé autour de trois objectifs principaux :

1. L'évaluation de l'impact d'une station d'épuration, ici la STEU de Saint-Fons, sur les micropolluants, autrement dit, l'évaluation de l'efficacité de traitement des micropolluants par une STEU.
2. L'évaluation de l'impact du procédé CarboPlus µG® sur les macropolluants et les micropolluants résiduels.
3. L'évaluation de l'écotoxicité des effluent amont et aval pilote à l'aide des sondes biologiques ou bioessais.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Le pilote de traitement tertiaire

Le procédé CarboPlus® a été développé et breveté par la société SAUR/STEREAU en France au travers de 2 brevets : FR 2874913 (Juillet 2005, charbon actif en micrograin) et FR 0953811 (Juin 2009, charbon actif en poudre). Il s'agit d'un procédé de traitement d'eau basé sur l'adsorption sur lit de charbon actif en poudre ou en micrograin à renouvellement continu, dans un réacteur à flux ascendant. Il est employé depuis une dizaine d'années, pour le traitement d'eau potable dans sa version poudre et micrograin, en traitement d'eaux usées urbaines dans sa version micrograin, et dans le traitement des eaux usées industrielles dans ses deux versions.

Dans le cas de l'étude R&D, un pilote de traitement CarboPlus® µG (MicroGrain de charbon actif) a été installé en sortie d'une des deux batteries de biofiltres nitrifiant de la STEU de la station d'épuration. Il est composé d'une colonne de 6 m de hauteur, ayant une surface interne de 0,22 m2. Cf. Figure 2: Pilote de traitement CarboPlus µG.

L'effluent à traiter (sortie STEU) entre dans le pilote par le bas à un débit de 3,3 m^3/h, et traverse le lit de charbon actif en micrograin, de taille effective de 0,42 mm. Cette alimentation par le bas de colonne maintient le lit de charbon actif en suspension qui optimise les contacts entre la surface des grains de charbon et l'eau à traiter. L'effluent traité est récupéré par surverse en haut du pilote. Une partie du charbon micrograin est renouvelée chaque jour, selon un dosage prédéfini, afin de garantir une performance de traitement optimale et durable du procédé CarboPlus® : la part de charbon neuf ajoutée est équivalente à la part de charbon usagé extraite régulièrement. Ainsi, le lit de charbon est de masse et d'efficacité constante. Pendant cette étude, la dose de charbon journalière injectée est déterminée selon le taux de traitement égal à 20 g de µCAG/m^3. Le charbon actif extrait pendant cette étude à l'échelle pilote est évacué en incinération alors qu'en application industrielle il est recyclé (charbon recyclé et recyclable).

L'exploitation du pilote de traitement se fait principalement par trois procédures, automatiques ou bien semi-automatiques :

- La procédure d'extraction de µCAG. La dose journalière à extraire se fait à l'aide d'une vanne d'extraction à ouverture temporisée réglable.
- La procédure d'injection de µCAG. Avant d'être injecté dans la colonne, le charbon subit une étape de mouillage et définage, permettant d'enlever les fines non désirables. La masse de µCAG est définée dans un bac dédié, puis est injectée dans la colonne.
- La procédure de lavage. Bien que le réacteur ne soit pas un filtre, le lit de charbon retient une partie des matières en suspension (MeS) de l'effluent à traiter et une biomasse peut également s'y installer. Avec le temps, la teneur en MeS augmente dans la colonne du pilote. Des lavages sont nécessaires pour maintenir le fonctionnement du procédé sans risquer un départ de charbon ou lit de MeS en surverse d'eau traitée. Le lavage du pilote se fait à l'aide d'une succession d'étapes d'insufflation d'air puis d'eau au pied de l'ouvrage. L'air permet de mettre en suspension les flocs au-dessus du lit de charbon. On les évacue ensuite en un point haut intermédiaire de la colonne en alimentant le bas de la colonne, soit avec de l'eau traitée, soit avec de l'eau à traiter. Les eaux sales des lavages sont récupérées dans un bac dédié et renvoyées dans la filière de traitement de la STEU.

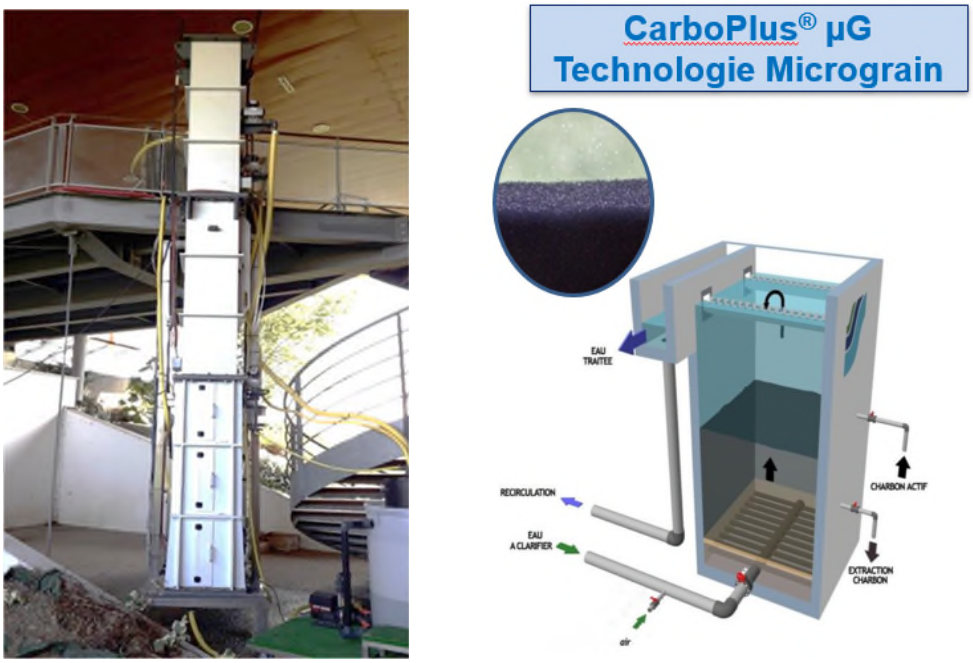


Figure 2: Pilote de traitement CarboPlus µG

3.2 Bancs d'essais mis en place

3.2.1 Bancs d'essais physico-chimiques

Afin de suivre les macropolluants en amont et en aval pilote CarboPlus®, des mesures en continu ont été réalisés avec la mise en place de sondes physico-chimiques dans deux bacs alimentés en continu, dédiés respectivement pour l'eau « amont » et l'eau « aval » du pilote. Cf. *Figure 3: Banc d'essai physico-chimique*. Ces sondes permettent d'observer la variabilité des paramètres globaux et l'impact possible de ces paramètres sur les bioessais mis en œuvre pour cette étude. Il s'agit des mesures suivantes :

- Le pH,
- La température,
- Le potentiel d'oxydoréduction,
- La conductivité,
- Les ions ammoniaque (NH_4^+), nitrate (NO_3^-), chlorure (Cl^-) et potassium (K^+).

Figure 3: Banc d'essai physico-chimique

3.2.2 Analyses des macropolluants en laboratoire

En parallèle des suivis en continu, des mesures en laboratoire prélèvements moyens 24h réfrigérés, asservis au débit d'eau traitée de la STEU, ont également été effectuées, à l'aide de préleveurs automatiques dédiés pour l'eau en entrée de STEU, les eaux traitées STEU « amont » et « avale » du pilote de traitement tertiaire

Des mesures de macropolluants en laboratoire ont été réalisés systématiquement sur ces prélèvements, à l'aide de kits d'analyses colorimétriques (a) ou bien de procédures normalisées de laboratoire (b), pour les paramètres suivants :

- MeS (b),
- DBO5 (b),
- DCO (a),
- Fer total et dissous (a),
- Les ions sulfates SO_4^{2-} (a),
- Formes phosphorées : Phosphore total (Pt) et ions phosphates PO_4^{3-}(a),
- Les formes azotées : l'azote Kjeldahl (NK), les ions nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-) (a),
- Les ions potassium (K^+) (a),
- Les ions chlorures (Cl^-) (a),
- L'absorbance UV 254 nm (b),
- Ainsi que le pH et la conductivité (b).

3.2.3 Bioessais

Afin d'évaluer l'écotoxicité des effluents amont et aval du traitement tertiaire, des tests, appelés Bioessais, sont réalisés sur des organismes vivants par l'INRAE-Lyon, et les sociétés Viewpoint et Hydreka-Enoveo. Trois types de bancs tests ont été mis en œuvre pour cette étude :

- Les **expériences ex-situ d'écotoxicité** du Laboratoire d'écotoxicologie de l'INRAE-Lyon : mesure de l'impact d'une eau sur différents traits de vie sur le crustacé amphipode Gammarus fossarum (alimentation, cycle de mue, reproduction, activité enzymatique). Ces tests permettent d'acquérir une information sur la toxicité globale des eaux testées et intégrée sur plusieurs jours ou semaines.
- Le **biocapteur microbien NODE®:** mesure en continu d'un signal électrique corrélé à l'activité métabolique de dégradation de la matière organique par une communauté bactérienne « indigène » installée sur le biocapteur, donnant ainsi une information en temps réel de la matière organique bio-assimilable.
- La **station de biosurveillance ToxMate®** qui par des méthodes de vidéo-tracking mesure en ligne de l'activité individuelle de 48 organismes appartenant à trois espèces d'invertébrés représentatifs des milieux récepteurs (le crustacé Gammarus fossarum, le mollusque gastéropode : l'escargot Radix auricularia et la sangsue Erpobdella testacea) permettent de détecter en temps réel des épisodes ou pics de contamination chimique ou biochimique de faible intensité.

Expérimentations ex-situ INRAE-Lyon

L'expérimentation ex-situ a eu lieu directement sur le site de Saint Fons à l'aide d'un laboratoire expérimental temporaire. A partir d'effluents dérivés (amont et aval du Carboplus µG®), des conditions expérimentales correspondant à plusieurs niveaux de dilutions ont été créés (Figure 4 : Schéma de l'approche banc ex-situ). Des individus calibrés de l'espèce *Gammarus fossarum* ont été exposés, en continu, aux différentes conditions. Il s'agit de crustacés amphipodes, des organismes détritivores, distribués dans toute l'Europe, de façon abondante et qui jouent un rôle écologique important, (décomposeur, source de nourriture…). Ils ont la particularité d'être sensibles à de nombreux micropolluants, ce qui en fait d'excellents candidats pour évaluer l'impact toxique des substances chimiques.

L'approche des bancs ex-situ combine l'intérêt des expositions en laboratoire, c'est-à-dire permettant le contrôle de la température, de la lumière et de l'oxygène, tout en intégrant la complexité des eaux usées et de leur évolution dans le temps via à une exposition en continu. Enfin, cette approche permet de réaliser des relations dose-réponse (0, 11, 33 et 100 % d'eau traitée), et ainsi de préciser la toxicité des effluents testés et de donner une gradation de la dangerosité de ces eaux. Les réponses obtenues pour les conditions testées sont comparées à celle d'un témoin d'exposition, réalisé exactement dans les mêmes conditions à partir d'eau de forage contrôle, disponible au laboratoire d'écotoxicologie de Lyon. Suite aux expositions, les gammares ont été utilisés pour mesurer des marqueurs moléculaires et traits biologiques individuels (alimentation et reproduction) précédemment développés chez cette espèce par l'équipe d'écotoxicologie de l'INRAE Lyon.

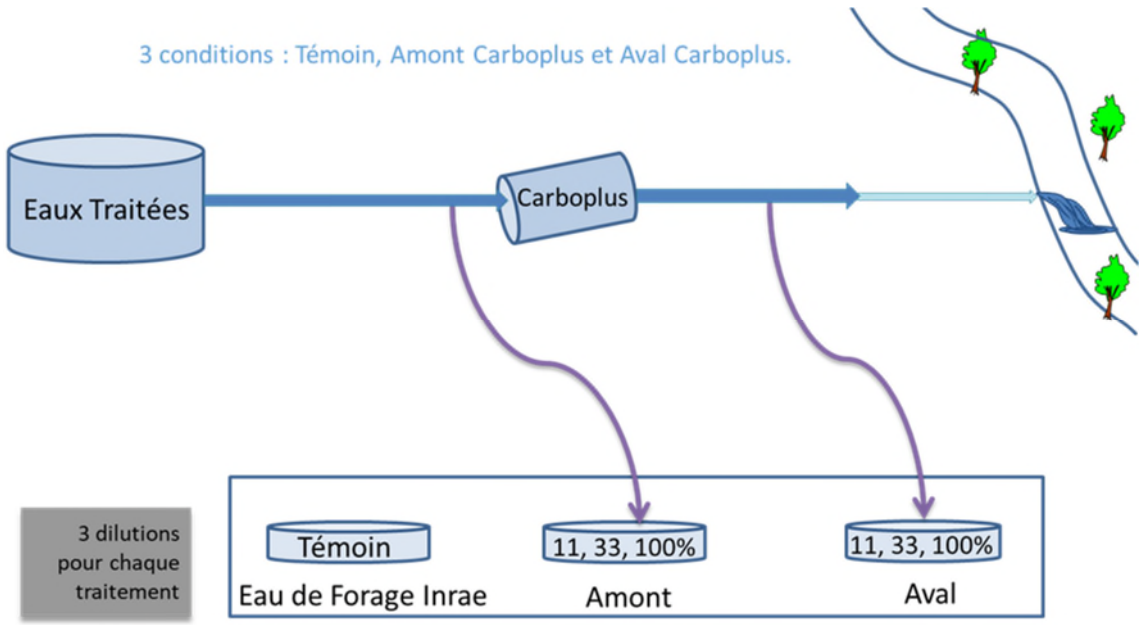


Figure 4 : Schéma de l'approche banc ex-situ

Prélèvements des organismes tests

Les gammares ont été prélevés à partir d'une population provenant d'une ancienne cressiculture, située à Saint-Maurice-de-Rémans (coordonnées : 5°17'45'' E, 45°58'09'' N) sur laquelle le laboratoire d'INRAE de Lyon, en collaboration avec la startup BIOMAE, assure la production de ces organismes. L'échantillonnage a été réalisé au filet troubleau permettant de piéger les individus emmenés par le courant. Ils sont ensuite passés sur une colonne de tamis et les organismes retenus entre les mailles d'ouverture 1,6 et 2 mm ont été ramenés au laboratoire. Ils ont ensuite été maintenus dans des aquariums de 20 litres (à raison de 2000 – 3000 individus par aquarium) renouvelés en continu avec l'eau contrôle du laboratoire de l'INRAE (2 renouvellements / jour) à 12°C et sous une photopériode de 16/8h jour/nuit. Les gammares ont été nourris ad libitum à l'aide de feuilles d'aulne et de larves du tubifex.

Méthodologie d'exposition des gammares

La Figure 5 illustre le montage de l'expérimentation *ex situ*. Les eaux traitées dérivées alimentent en continu des cuves tampons oxygénées, dans lesquelles un volume est prélevé en continu et apporté dans un seau thermorégulé à l'aide de pompes péristaltiques où ont été exposés les organismes. Deux effluents ont été étudiés, amont et aval du Carboplus µG®. Pour chacun d'eux, trois conditions ont été étudiées : 11, 33 et 100% (volume d'effluent). Les dilutions ont été réalisées en combinant des arrivées d'eaux usées et d'eau contrôle au niveau des pompes péristaltiques. L'eau contrôle est l'eau de forage du laboratoire d'écotoxicologie de Inrae Lyon utilisée pour le maintien et la stabulation des gammares avant expérimentation. L'installation en continue nécessite également de prévoir un collecteur d'évacuation des eaux de surverse. Une fois les dilutions créées, les organismes positionnés dans des cages en polypropylène percées, sont déposés dans les eaux maintenus dans le bain thermo-régulé à 15°C et à une photopériode de 16/8h jour/nuit. Des sondes autonomes de températures ont été placées dans chacune des conditions. L'exposition est réalisée avec un taux de renouvellement d'effluents de 4 fois par jour. Les gammares sont alimentés pendant l'exposition à l'aide de disques de feuilles d'aulne, de diamètre calibré.

Après exposition, les organismes sont ramenés vivants au laboratoire pour la mesure des divers marqueurs de toxicité.

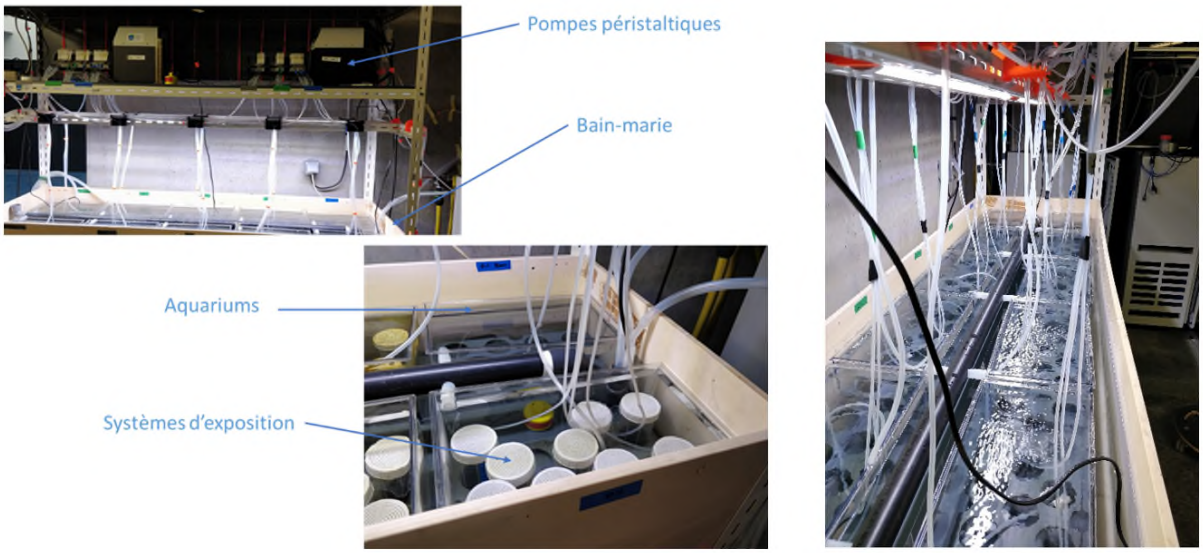


Figure 5 : Expérimentations ex-situ de l'INRAE-Lyon

Marqueurs de traits d'histoire de vie

Les différents traits d'histoire de vie observés chez les gammares sont le taux de survie, le taux d'alimentation et les paramètres biologiques liés à la reproduction.

Survie

Le nombre de gammares vivants a été déterminé après 7 jours pour les expositions des mâles et 15 jours pour les femelles. Lorsque la mortalité moyenne dépasse 50%, l'analyse des biomarqueurs n'a pas été réalisée.

Taux d'alimentation

L'alimentation chez le gammare est un marqueur reconnu pour être sensible à une large gamme de contaminants, aussi bien organiques que métalliques. La mesure du taux d'alimentation correspond à la surface consommée de feuille en une semaine. La Figure 6 illustre la méthodologie utilisée, décrite par Dedourge et al., 2009 et Coulaud et al., 2011.

En pratique, pour chaque condition, quatre réplicas de 20 disques de feuille d'aulne de 20 mm et 20 gammares mâles calibrés ont été exposés pendant une semaine au milieu testé. Un témoin de dix disques de feuille d'aulne sans organismes a été ajouté afin d'évaluer la dégradation éventuelle des feuilles par les micro-organismes présents dans les milieux testés. A la fin de l'exposition, le nombre de gammares vivants a été déterminé et les restes de feuilles ont été récupérés, scannés et la surface déterminée à l'aide du Logiciel SIGMA Scan Pro v5®. Par différence entre la surface initiale et la surface résiduelle, le taux d'alimentation est défini et exprimé en mm² consommés par gammare et par jour, selon la formule suivante :

$$Taux\ d'alimentation_i = \frac{(Sa_{contrôle} - Sa_i)/((l_{i,t0} + l_{i,t7})/2))}{\Delta t}$$

Équation 1: Formule du taux d'alimentation

Avec :

- Taux d'alimentation = taux d'alimentation calculé pour le réplicat i,
- $Sa_{contrôle}$ = surface de feuille à la fin d'exposition du lot contrôle sans gammares,
- Sa_i = surface de feuilles restant après exposition pour le réplicat i,
- $l_{i,t0}$ = nombre de gammare au début de l'exposition pour le réplicat i,
- $li_{,t7}$ = nombre de gammares vivants après 7 jours d'exposition pour le réplicat i
- Δt = durée en jours de l'exposition, ici 7 jours.

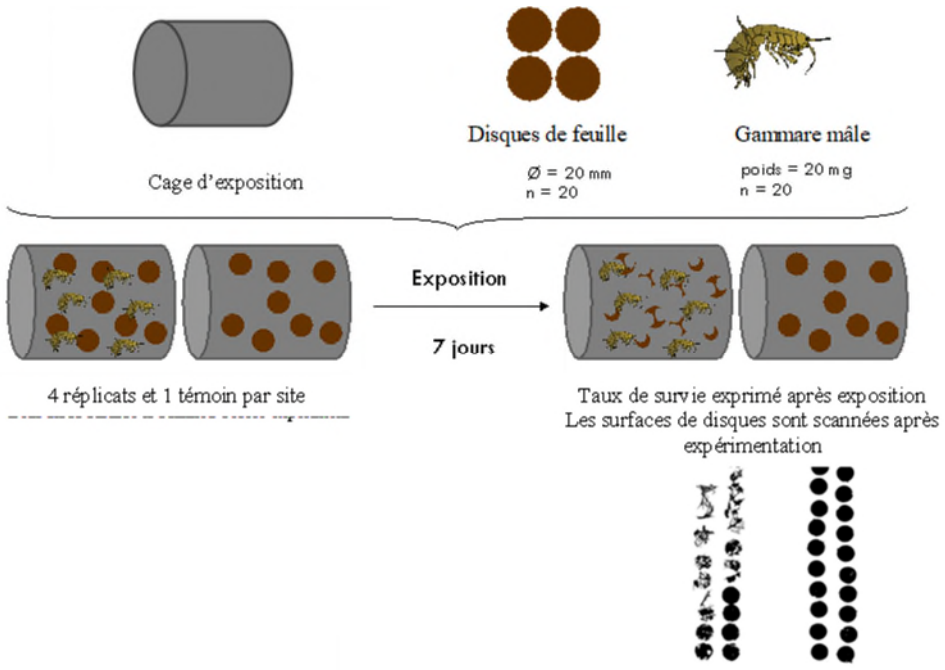


Figure 6 : Méthode de mesure du taux d'alimentation

Reproduction

Les paramètres biologiques étudiés sont la mue, la fertilité et la fécondité. Leur niveau est dépendant du déroulement du cycle de mue qui a été décrit par Geffard et al., 2010. Le cycle de mue est synchronisé avec le développement embryonnaire et la croissance des ovocytes (vitellogénèse). Pour chaque stade de mue, correspond une surface ovocytaire et un stade embryonnaire spécifique. Après avoir libéré les juvéniles du marsupium, la femelle mue puis pond une nouvelle série d'ovocytes dans sa poche marsupiale qui sont alors immédiatement fécondés par le mâle. A ce moment, la femelle est en stade de mue A et le développement embryonnaire peut commencer. Parallèlement, un nouveau lot d'ovocytes primaires rentre en maturation dans les gonades. Les stades C1 et C2 correspondent aux stades d'inter-mue. Au stade C2, la vitellogénèse secondaire est mise en place. C'est le stade ciblé dans le biotest de reproduction pour mesurer la fertilité et la fécondité. Les stades D1 et D2 correspondent aux stades de pré-mue.

La Figure 6 schématise la méthodologie du test de reproduction. Les femelles sont triées en stade D2, par observation de la présence de juvéniles dans le marsupium et de gonades développées. Elles sont ensuite maintenues trois jours à 12°C pour permettre la mue, la ponte des ovocytes et leur fécondation. Les femelles en stade A-B ont ensuite été utilisées et placées dans des chambres pour leur encagement dans le milieu. Après une exposition suffisante (15 jours à 15°C) les femelles ont atteint le stade C2, elles ont été récupérées et ramenées au laboratoire pour la mesure des paramètres de reproduction. Ces mesures se font sur 15 femelles. Les femelles sont photographiées pour mesurer la taille par analyse d'images (SIGMA Scan Pro v5®). Le cycle de mue, la fécondité et la fertilité sont déterminés pour chaque femelle sous loupe binoculaire et microscope selon les méthodes présentées par la Figure 7 et la Figure 9 (Geffard et al., 2010).

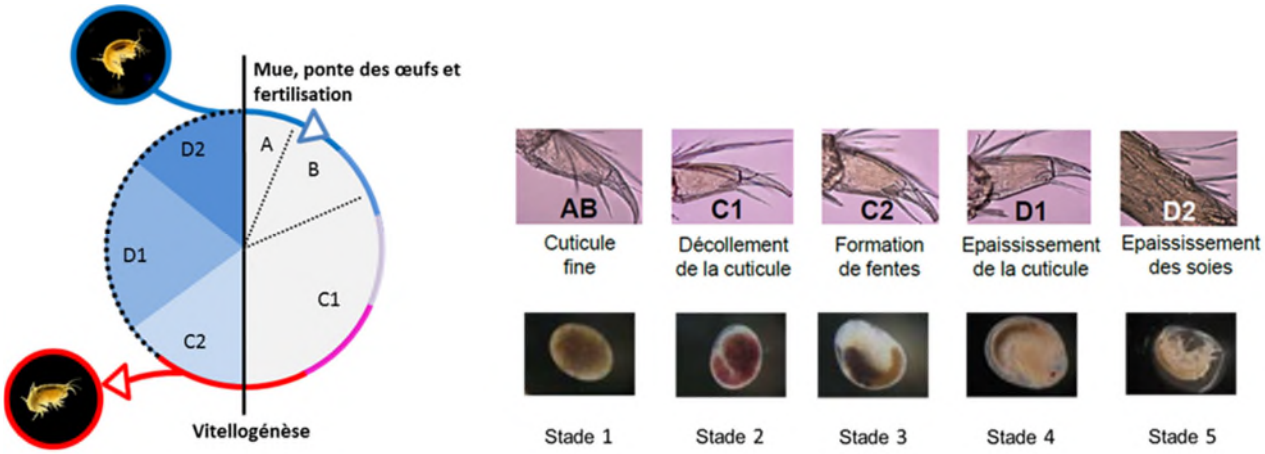


Figure 7: Cycle de mue et critères d'identification des stades

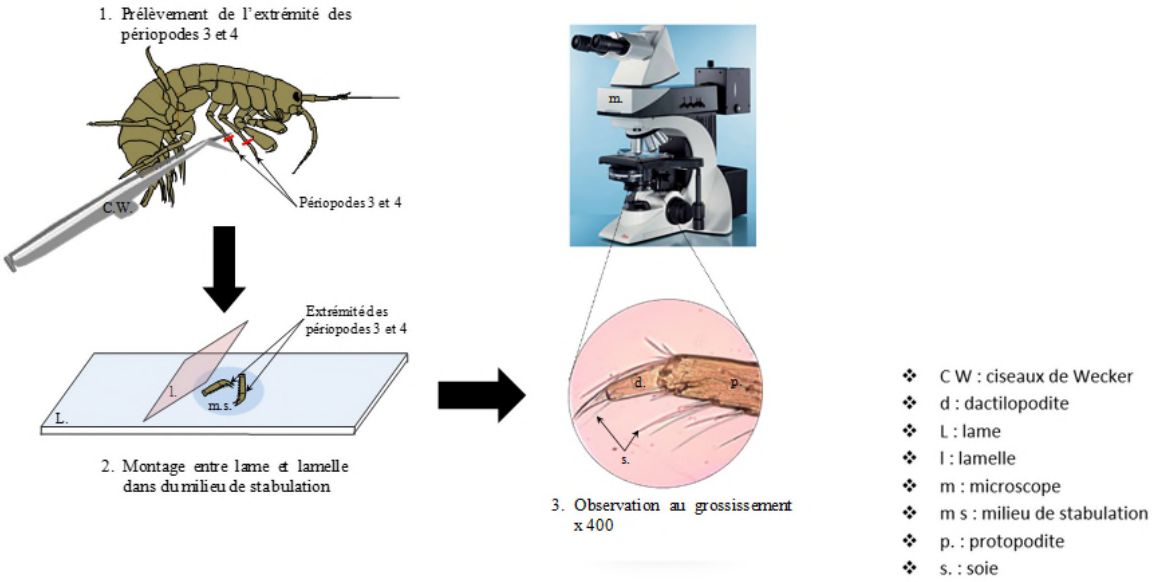


Figure 8 : Procédure pour déterminer le stade de mue. Adaptée de Xuereb, 2009

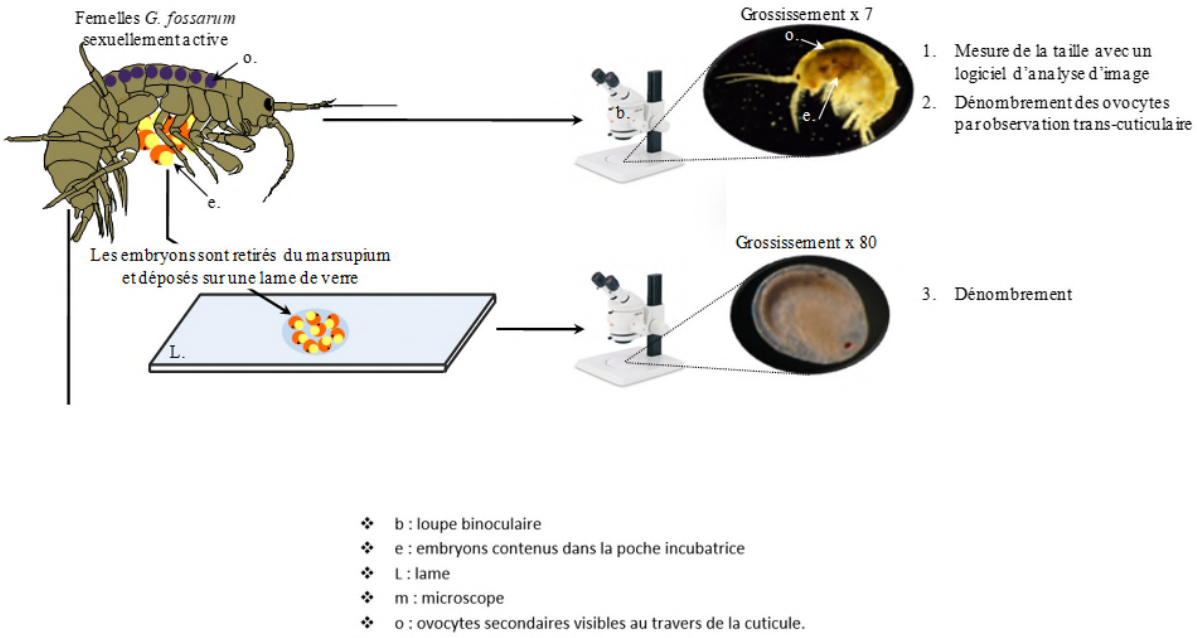


Figure 9 : Mesure des paramètres biologiques de reproduction. Adapté de Xuereb, 2009

Biomarqueurs

Les différents biomarqueurs mesurés chez les gammares sont les suivants :

- Ache : L'acétylcholinestérase est une enzyme qui joue un rôle clef dans le fonctionnement neuronal en régulant la concentration du neurotransmetteur acétylcholine au niveau des fentes synaptiques. Le mode d'action des insecticides de type organophosphorés et carbamates consiste à inhiber l'activité de l'enzyme Ache. La perturbation de l'activité Ache entraine une accumulation d'acétylcholine et donc une sur-stimulation du système nerveux, pouvant aller jusqu'à la mort de l'organisme. La mesure de l'acétylcholine est effectuée selon la méthode (norme AFNOR PR XP T90-722-1) décrite par Xuereb *et al.* (2009a et 2009b) et s'exprime en $nmol.min^{-1}$. L'inhibition de l'activité Ache observée chez le gammare peut être reliée directement à l'exposition aux insecticides type organophosphorés ou carbamates. Sa mesure permet ainsi de révéler la présence et de réaliser une évaluation quantitative de l'impact de ce type de polluants. L'inhibition de l'Ache est « dite » spécifique de ce type d'insecticides.

- CE : Les carboxylestérases sont une superfamille d'enzymes multifonctionnelles, omniprésentes chez les animaux, plantes et microbes (Yu *et al*., 2009 ; Wu *et al*., 2017), qui dégradent les groupements ester en alcool puis en acide. Les carboxylestérases sont divisées en huit sous-familles : α-estérases, β-estérases, hormone-juvénile-estérase (JHE), gliotactines, acétylcholinestérases, neurotactines, neuroligines et glutactines (Hilary et al., 2002). Parmi elles, la JHE est considérée comme l'enzyme prédominante impliquée dans la dégradation de l'hormone juvénile, qui est un groupe de composés sesquiterpénoïdes ayant des fonctions pléiotropes dans le développement, la métamorphose, la mue, la croissance et la reproduction et la biosynthèse des phéromones des insectes (Gilbert *et al*., 2000 ; Tobe *et al*., 2006). Cette particularité lui confère un intérêt comme marqueur en biosurveillance de l'environnement. La méthode de mesure de l'activité est adaptée de Ljungquist *et al.* (1971).

- GST : La gluthation-s-transférase est une enzyme aspécifique de conjugaison qui joue un rôle dans le processus de détoxification des xénobiotiques hydrophobes (HAP, pesticides, PCB). L'implication du glutathion relie aussi ce marqueur aux paramètres descripteurs d'état de stress oxydant. Marqueur d'une exposition aux contaminants, l'activité GST est généralement induite. Néanmoins, elle peut aussi être inhibée en cas d'effet toxique prononcé de ces substances. La mesure a été réalisée ici selon une méthodologie adaptée de Pabst *et al.,* (1974).

- PO : La phénoloxydase est une enzyme impliquée dans la réponse du système immunitaire chez les invertébrés. Son activité est un bon indicateur de l'immunocompétence des invertébrés (Cornet *et al.,* 2009). Elle est révélatrice d'une activité de défense cellulaire qui conduit par une cascade de réactions protéiques à la synthèse de mélanine qui encapsule notamment les agents pathogènes et facilite ainsi leur élimination. L'activité de ce biomarqueur peut ainsi être induite ou inhibée chez le gammare en cas d'infestation parasitaire. En outre, sans que le mode d'action soit à ce jour expliqué, des inductions suite à l'exposition à différentes contaminations chimiques chez les insectes ont déjà été mesurées (chironome, libellule). Le protocole de mesure a été adapté de Janssens et Stoks (2014).

Bioaccumulation de micropolluants

Les dosages de composés métalliques et organiques ont été effectués dans des gammares exposés dans les conditions témoin et la condition 100% d'effluent pour chaque campagne. Après une durée d'exposition de 7 jours, les gammares de chaque condition ont été poolés puis répartis de façon aléatoire dans un flaconnage adapté en fonction du type d'analyse : un réplica de 10 individus pour les analyses en composés métalliques et un réplica de 80 individus pour les analyses en composés organiques. La différence du nombre d'individus pris en compte s'explique par la différence de sensibilité des méthodes analytiques utilisées pour les mesures des métaux et des composés organiques. Les échantillons ont été stockés dans un congélateur -20°C jusqu'à leur expédition au laboratoire LDA 26 pour lyophilisation et dosage. Le laboratoire LDA 26 est certifié COFRAC pour les analyses demandées. Après minéralisation des échantillons par micro-ondes avec de l'acide nitrique, les composés métalliques ont été dosés par plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie de masse (ICPMS, Thermo série X7 II). Après extraction, l'analyse des composés organiques est effectuée par chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse en tandem (GCMS/MS).

Les données ont été exprimées en microgramme par gramme de masse sèche pour les métaux (µg/g MS) et en nanogrammes par gramme de masse sèche pour les composés organiques (ng/g de MS). Le facteur d'incertitude pour chaque micropolluant est compris entre 30 et 40% de la limite de quantification (LQ) atteinte.

Les composés chimiques recherchés sont principalement ceux inscrits comme substances prioritaires dans le cadre de la DCE, ainsi que les composés recherchés dans le cadre de la réglementation RSDE.

Expression des résultats

Les résultats des marqueurs de toxicité ont été comparés aux valeurs mesurées dans la condition témoin, par des tests unilatéraux de comparaison de moyenne au risque α de 5% (test de Wilcoxon). Le logiciel utilisé pour la réalisation des tests d'hypothèse est le logiciel R. Concernant le cycle de mue, la distribution de femelles ayant atteint ou non le stade C2 est directement comparée à la distribution obtenue dans la condition témoin, à l'aide du test du Khi-deux (fonction prop.test).

Campagnes de test

Quatre campagnes de test ont été menées sur site. Leur déroulement est synthétisé dans le Tableau 2 : Campagnes des bancs tests ex-situ.

Tableau 2 : Campagnes des bancs tests ex-situ

Campagne	Organismes tests	Marqueurs	Concentrations en effluent	Dates d'exposition
Juillet 2019	Mâles calibrés	Accumulation	0 et 100%	16 – 23 juillet
		Survie	0, 11, 33 et 100%	
		Taux d'alimentation		
		Moléculaires : Acétylcholinestérase (Ache) Carboxyestérase (CE) Glutathion-S-Transférase (GST) Phénoloxydase (PO)		
	Femelles en stade AB	Survie		16 juillet – 1er Août
		Reproduction : Stade de mue Fécondité Fertilité		
Octobre 2019	Mâles calibrés	Accumulation	0 et 100%	21 – 28 octobre
		Survie	0, 11, 33 et 100%	
		Taux d'alimentation		
		Moléculaires : Acétylcholinestérase (Ache) Carboxyestérase (CE) Glutathion-S-Transférase (GST) Phénoloxydase (PO)		
	Femelles en stade AB	Survie		21 octobre – 4 novembre
		Reproduction : Stade de mue Fécondité Fertilité		
Février 2020	Mâles calibrés	Accumulation	0 et 100%	3 – 10 février
		Survie	0, 11, 33 et 100%	
		Taux d'alimentation		
		Moléculaires : Acétylcholinestérase (Ache) Carboxyestérase (CE) Glutathion-S-Transférase (GST) Phénoloxydase (PO)		
	Femelles en stade AB	Survie		3 – 19 février
		Reproduction : Stade de mue Fécondité Fertilité		
Mars 2020	Mâles calibrés	Accumulation	0 et 100%	9 – 16 mars
		Survie	0, 11, 33 et 100%	
		Taux d'alimentation		
		Moléculaires : Acétylcholinestérase (Ache) Carboxyestérase (CE) Glutathion-S-Transférase (GST) Phénoloxydase (PO)		
	Femelles en stade AB	Survie		Annulation à cause du confinement Covid19
		Reproduction : Stade de mue Fécondité Fertilité		

Biocapteur microbien NODE®

Les biocapteurs NODE® développés par ENOVEO, et commercialisés par HYDREKA, proposent d'effectuer une mesure en ligne instantanée de la charge organique ou de la toxicité d'une eau via l'activité des communautés bactériennes indigènes.

Conceptuellement, les biocapteurs sont composés d'une chambre contenant deux électrodes colonisées par les bactéries naturellement présentes dans l'eau du site. D'une manière très schématique, la dégradation de molécules organiques par les bactéries conduit à la libération d'électrons (e^-) qui sont captés au niveau des électrodes pour générer un signal électrique, comme indiqué dans la Figure 10 ci-dessous. Les sondes colonisées par un consortium de bactéries naturellement présentes dans les effluents (fixées sous forme de biofilm) mesurent l'activité bactérienne au sein de l'effluent testé, puis la traduisent en signal électrique : la quantité d'électrons transférés est directement représentatif de l'activité des bactéries.

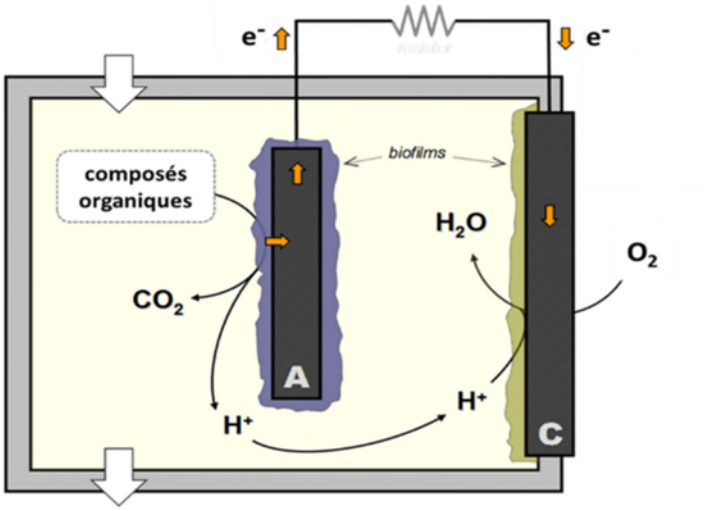


Figure 10 : Principe de fonctionnement des biocapteurs NODE®

Dans le cas où la concentration en composés organiques dans l'effluent évolue, l'activité des bactéries présentes sur le biocapteur évolue également, se traduisant par une augmentation ou une diminution rapide du signal (de l'ordre de quelques minutes). Comme le suggèrent les illustrations de la Figure 11 ci-dessous, il semble possible d'évaluer en temps réel la fluctuation des concentrations en charge organique présentes dans le milieu étudié ou bien de détecter des événements écotoxiques de l'effluent vis-à-vis des communautés microbiennes fixés sur le capteur.

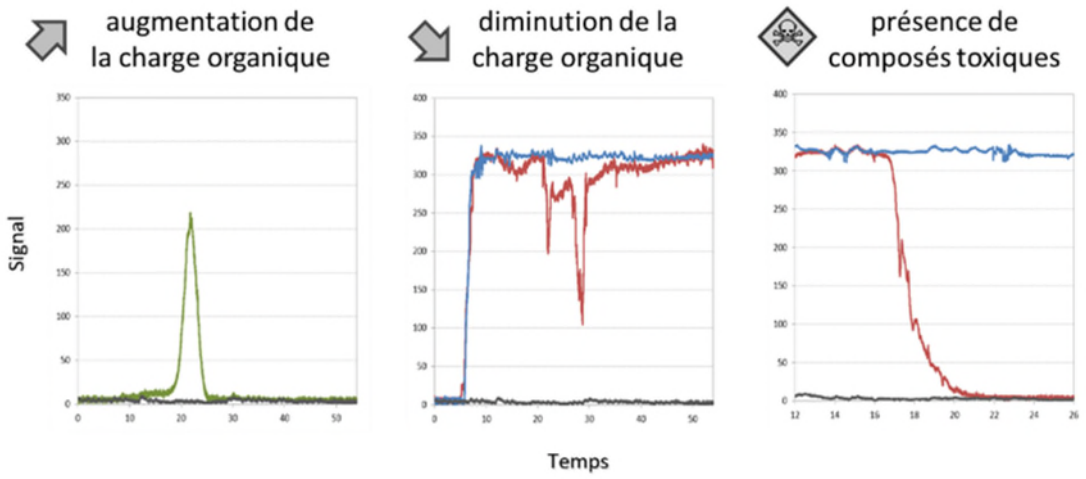


Figure 11 : Exemple de signaux du biocapteurs NODE®

Dans le cadre de cette étude, deux biocapteurs NODE® ont été installés en entrée et en sortie du pilote de traitement tertiaire. Ils ont mis été mis en place tout au long de l'étude, de juin 2019 à mars 2020.

Figure 12 : Le biocapteur microbien NODE®

Biosurveillance Toxmate®

Le laboratoire d'écotoxicologie de INRAE-Lyon et la société lyonnaise VIEWPOINT ont co-développé une station, dénommée ToxMate®, qui évalue sur site et en continu la variabilité de l'impact toxique d'une eau, notamment la présence de contaminants par pic, plus ou moins long. Cette station vient ainsi en complément des outils chimiques en mesurant en temps-réel l'impact de micropolluants dans le rejet étudié.

Le biocapteur est composé d'un système de vidéo-tracking connecté qui permet de mesurer le comportement locomoteur de trois espèces d'invertébrés aquatiques de façon individuelle et en temps réel. Pour cette étude, trois espèces de référence ont été sélectionnées, à savoir :

- *Gammarus fossarum* (crustacé amphipode)
- *Radix auricularia* (escargot gastéropode)
- *Et Erpobdella testacea* (sangsue)

Ces espèces, appartiennent à des groupes phylogénétiques différents, permettant ainsi d'intégrer une diversité de sensibilité entre les espèces tout en faisant appel à des organismes représentatifs des écosystèmes aquatiques français et européens.

La station (Cf. Figure 12) est composée d'une armoire cubique compacte. Le système est composé de trois panneaux, un par espèce étudiée (ou sonde biologique). Chaque panneau contient 16 organismes, soit 48 organismes présents en test au total. Chaque sonde délivre un signal de stress écologique par espèce ou « IGT » (Indice Global de Toxicité).

Le principal objectif de l'outil est de fournir aux gestionnaires des eaux un outil en ligne d'alerte/d'aide à la décision. Le critère sélectionné est le suivi du comportement du modèle animal, un critère connu dans la littérature pour être une des réponses les plus sensibles et modulées à des contaminants. La fourniture d'un signal de toxicité en continu et en temps réel, avec une détection d'anomalie de l'ordre de la minute permet donc de prendre des décisions rapidement.

Afin d'obtenir un signal de toxicité robuste, un effort d'exclusion de facteurs de confusion a été mené (vibrations, variations de température, de lumière et d'oxygène dissous) afin que les organismes ne soient sensibles uniquement à la présence de contaminants chimiques. L'absence de variation (conditionnement des effluents) et de nourriture va faire entrer les sondes biologiques en état dit de « léthargie ». Par olfaction, les sondes vont ressentir la présence d'une charge polluante et engendrer une augmentation du comportement locomoteur.

Cette stratégie permet d'avoir un niveau de détection faible (de l'ordre du microgramme), rapide (de l'ordre de la minute), reproductible et autonome durant 20-30 jours. Sur le site de Saint-Fons, les sondes biologiques ont été changées une fois par mois ou exceptionnellement après des pics de pollution ayant induit de fortes mortalités. La fréquence d'acquisition des données est d'une minute.

La pertinence de cet outil réside dans les verrous techniques levés lors de son développement :

- Un conditionnement du rejet (filtration, température et oxygène) permettant une autonomie non égalée de 30 jours et donc un vrai suivi en continu,
- Le suivi individuel toutes les 40ms de 48 organismes
- Une réponse comportementale (signal IGT) directement liée à la présence d'une charge en contaminants chimiques, ceci grâce à la prise en compte des facteurs autres que la contamination (dureté, O2 et température), dit de confusion et pouvant conduire à un artéfact.

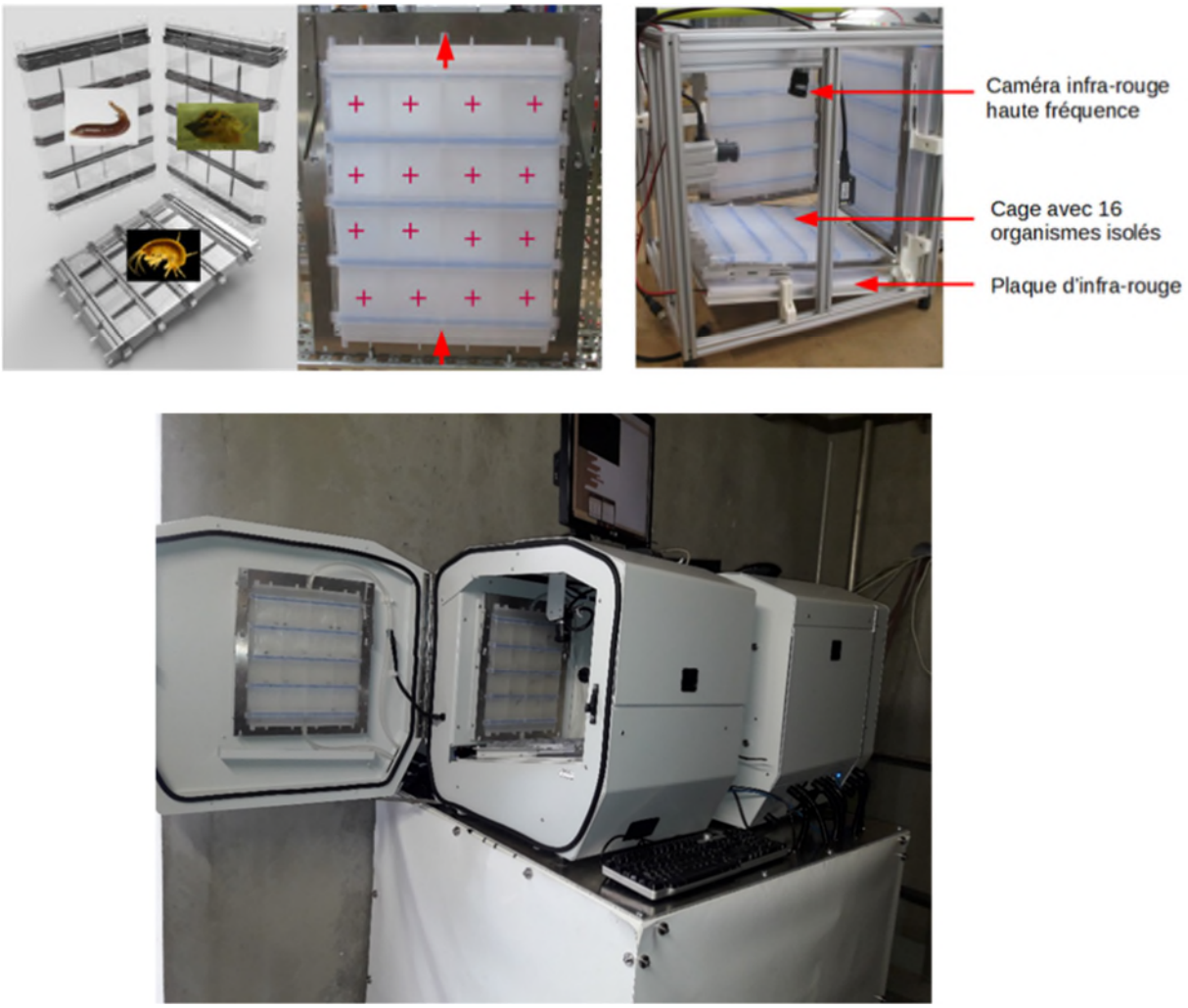


Figure 13: Biocapteur ToxMate®

Dans le cadre de cette étude, deux stations Toxmate® ont été installés, en entrée et en sortie du pilote de traitement tertiaire. Ils ont mis été mis en place tout au long de l'étude, de juin 2019 à mars 2020. Le mois de juin 2019 a permis de vérifier que l'ambiance du local d'accueil (vibration ou bruit) n'amenait pas de perturbations particulières. Les deux stations ont travaillé avec l'eau de forage de référence de l'INRAE sans montrer de signal de stress. Les signaux IGT sont restés plats.

3.2.4 Analyses des micropolluants

L'analyse chimique permet d'estimer la performance d'abattement en micropolluants de la STEU et du pilote de traitement tertiaire. Des analyses chimiques qualitatives ou quantitatives sont réalisées.

Des analyses de micropolluants métalliques ainsi que des analyses de micropolluants organiques ont été réalisés sur des prélèvements moyens 24h, asservis au débit d'eau traitée de la STEU, pendant des périodes de 21 jours, calées sur les périodes de mise en place des banc ex-situ de l'INRAE, ou bien sur des événements particuliers.

Le Tableau 3: Résumé des analyses en laboratoire résume toutes les analyses chimiques réalisées pendant cette étude. Elles concernent systématiquement les points de suivis Entrée STEU (E), sortie STEU (S = amont pilote) et sortie Pilote (P = aval pilote).

Empreintes spectrales et analyses ciblées

Les analyses chimiques sur les micropolluants organiques ont été réalisées par le laboratoire LODIAG (ex-Profilomic). Ce laboratoire s'intéresse essentiellement aux polluants « émergents » et possède une base de données de plus de 850 molécules. Les échantillons prélevés sont congelés à -20°C en trois réplicats, puis transmis au laboratoire LODIAG. Ils sont ensuite analysés sur une chaîne analytique automatisée, constituée d'un système d'extraction en phase solide (SPE online), d'un couplage de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et de spectrométrie de masse haute résolution (HRMS). Les analyses ne sont pas exhaustives, elles ne prennent pas en compte les molécules inorganiques, une grande partie des phtalates, les molécules apolaires, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), ou les petites molécules (ex. < 50 Da).

Le laboratoire LODIAG se base sur deux types d'analyses :

- L'analyse globale ou non ciblée d'un effluent. Il s'agit d'une analyse spectrale des échantillons, permettant de générer les données des échantillons sous forme de pics spectraux. Ces données sont ensuite traitées via des analyses statistiques, permettant de comparer l'état des échantillons en entrée et sortie de STEU. Si en fonction des résultats de ces analyses spectrales et statistiques, un ou plusieurs échantillons paraissent différents ou intéressants, il est possible de faire une analyse plus poussée, appelée putative. Cette analyse permet de déterminer un profil isotopique (correspondant au spectre de l'échantillon intéressant) et par conséquent d'en déduire une formule brute. En interrogeant leur base de données, ce laboratoire peut déterminer la molécule émergeante exacte ou bien la plus probable, dans le cas où la formule brute est connue. Dans le cas contraire, des analyses plus poussées sont nécessaires (recherches sur des pics d'intérêt particulier). Pour résumer, l'analyse globale ne permet pas l'identification et la quantification des micropolluants de manière formelle mais permet plutôt de donner une idée de l'état de l'échantillon, une « empreinte spectrale », et d'émettre des hypothèses concernant les micropolluants présents.
- L'analyse semi-quantitative et ciblée d'un effluent. Elle a pour but précis de déterminer les polluants présents et de les quantifier dans un effluent. La base de données de 850 molécules de Lodiag permet l'identification et la semi-quantification des micropolluants présents dans les échantillons. Le laboratoire donne une gamme de concentration des micropolluants présents. Dans le cas où le micropolluant ne fait pas partie de la base de données, une analyse ciblée avec un étalon témoin est possible. Dans les deux cas, une quantification précise peut être obtenue avec injection d'étalons spécifiques aux micropolluants recherchés. Il s'agit alors de déterminer les concentrations exactes de ces substances dans chaque échantillon.

  L'exploitation des analyses ciblées permet d'observer les différences entre les échantillons :
  - Cas 1 : les micropolluants se retrouvent plus ou moins éliminés par le traitement
  - Cas 2 : les micropolluants ne sont pas affectés par le traitement
  - Cas 3 : des micropolluants apparaissent après le traitement et pas ou peu en amont.

A chaque analyse, 8 étalons internes sont introduits à la même concentration dans chaque échantillon analysé ainsi que dans les blancs analytiques. Ces 8 étalons internes sont marqués isotopiquement (IIS : Isotopic Internal Standard) et le signal obtenu à chaque analyse et dans chaque échantillon permet de suivre la qualité des analyses rendues. Pour des raisons de confidentialité, les noms de ces étalons internes ne sont pas communiqués.

Analyses RSDE

Des prélèvements normalisés de type RSDE demandent une logistique assez lourde que nous avons confié à un prestataire. Il n'a pas été possible de faire coïncider la disponibilité des partenaires en bioesssais et les prestataires de prélèvement/analyse RSDE, pendant les deux premières campagnes. La priorité a été donné aux bioessais. Seules les deux dernières campagnes ont pu permettre une programmation pour un prélèvement type RSDE. Malheureusement, la dernière campagne a été écourtée par le premier confinement Covid19 et le prélèvement n'a pas pu avoir lieu. Finalement, une seule campagne, la troisième, a bénéficié d'une campagne type RSDE sur une journée.

Tableau 3: Résumé des analyses en laboratoire

Analyses	Fréquence ou dates	Laboratoire	Points de suivis
DBO_5	1/j Pendant les campagnes 1,2 et 3 Campagne 4 annulée (Covid 19)	STEU Pierre-Bénite	S et P
DCO	1/j Pendant les campagnes Et hors des campagnes	R&D SAUR	
pH			
Conductivité			
MeS			
Fer total et dissous			
Sulfates (SO_4^{2}) **Potassium (K^+)** **Chlorures (Cl^-)**			
Phosphore total (Pt) **Phosphates (PO_4^{3-})**			
Azote Global **Nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-)**			
Absorbance UV 254 nm			
Métaux	1/j Pendant les campagnes 2 et 3	CARSO	E, S et P
Molécules RSDE	1 lot Pendant la campagne 3 Autres = annulées 1,2 (Logistique) 4 (Covid 19)	EUROFINS IRH	
Micropolluants organiques émergents	1/j Pendant toutes les campagnes + quelques points d'intérêts	LODIAG (ex.PROFILOMIC)	

4 Résultats

4.1 Performances « Macropolluants et métaux »

4.1.1 UV 254 nm

La mesure de l'absorbance UV à 254 nm a été mesurée tout au long de l'étude afin de vérifier le bon fonctionnement du CarboPlus®. L'absorbance de la lumière UV étant corrélée à la matière organique dissoute de ce type d'effluent (sortie eau traitée de station d'épuration d'effluent urbain), ce paramètre est un bon indicateur de qualité pour estimer la performance globale d'un Carboplus µG®, sur la matière organique et par extension sur les micropolluants organiques. Cette corrélation a été observée sur tous les sites en sortie de STEU où un ouvrage Carboplus µG® a été implanté (France ou Suisse). Une dérive de la performance en UV 254 nm indique que le traitement en charbon µCAG n'est pas suffisant. L'abattement de ce paramètre obtenu sur le site de Saint-Fons indique une stabilisation autour de 25-30% lorsque le process est en régime de croisière (Figure 14). Ce niveau d'abattement en UV 254 nm nous permet de prédire, par expérience sur ce type d'eau, une performance globale sur l'ensemble des micropolluants organiques supérieure à 80%.

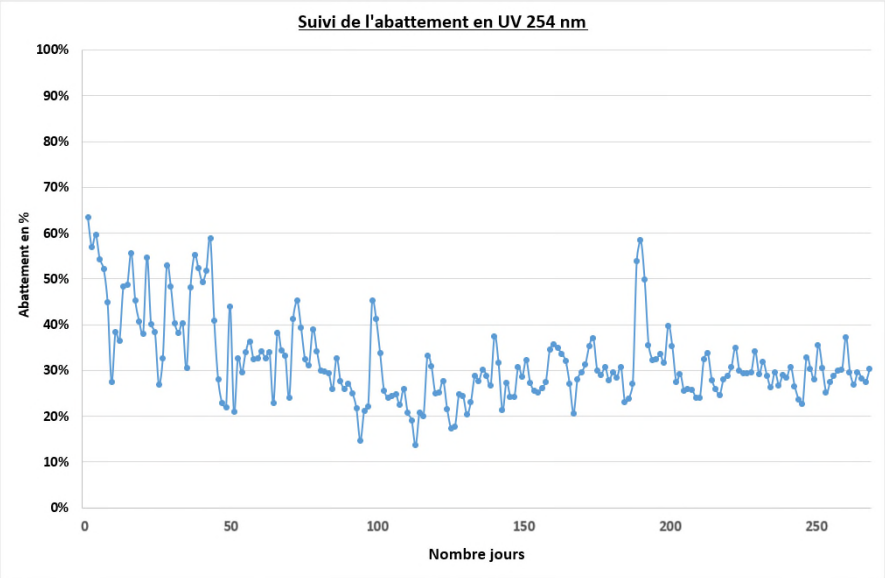


Figure 14 : Performances d'abattement en UV 254 nm du CarboPlus µG®

Abattement global des micropolluants organiques prévisible > 80%

4.1.2 DCO

Le procédé CarboPlus®, connu pour éliminer une partie de la charge organique dissoute adsorbable d'un effluent, a conduit à un abattement d'environ 20 % de la DCO, dans une gamme de quelques dizaines de mg/L en entrée de réacteur, comme le montre la Figure 15 ci-dessous.

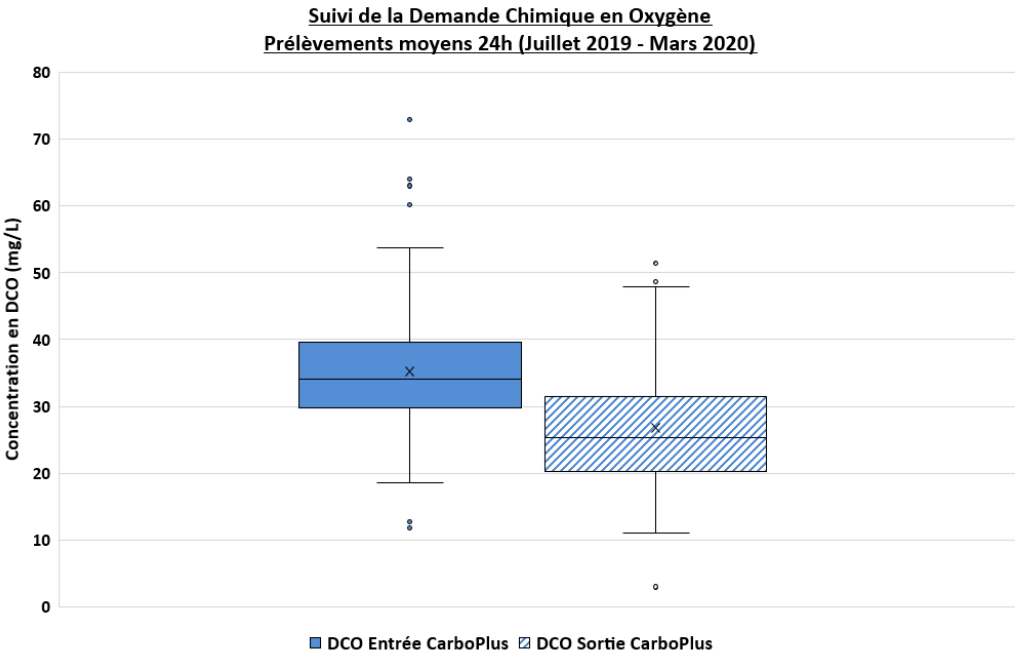


Figure 15 : Abattement de la DCO par le CarboPlus µG®

Abattement moyen observé sur la DCO = 20%

4.1.3 Ammonium

Les mesures en continu montrent une variabilité de la concentration en N-NH4 plus accentuée sur les prélèvements moyens 24h, car ces derniers tiennent compte des charges hydrauliques contrairement aux calculs réalisés à partir des mesures en continu qui sont basés sur des moyennes mathématiques. Ces deux types d'évaluation montrent néanmoins des résultats similaires avec un abattement moyen de 20 % de l'ion ammonium, dans une gamme de 1 à 15 mg/L N-NH4 en entrée de réacteur, ainsi qu'un lissage de la variabilité, comme le montre la Figure 16 ci-dessous.

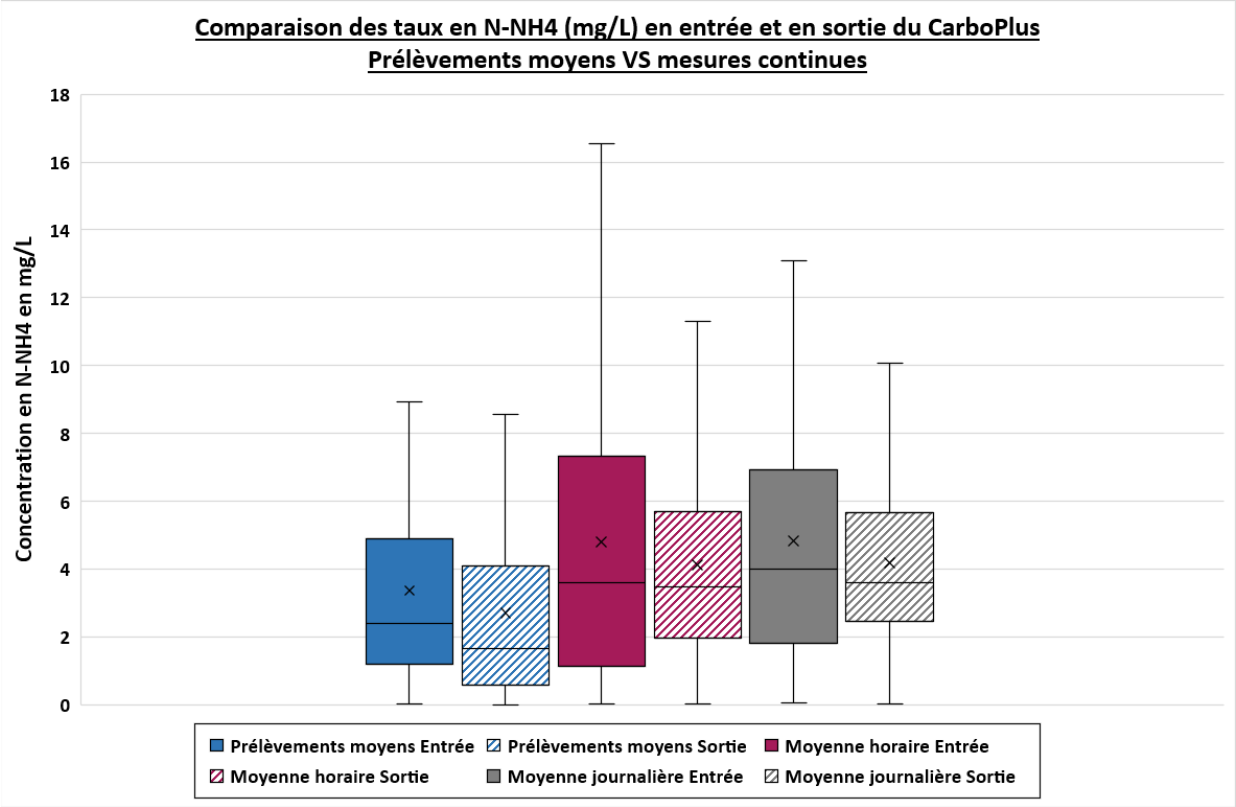


Figure 16: Abattement en N-NH4 par le CarboPlus µG®

Abattement moyen observé sur N-NH4 = 20%

Ecrêtement des grosses valeurs en entrées d'ouvrage

4.1.4 Nitrites

Les mesures de nitrites faites sur des prélèvements moyennés 24h en laboratoire montrent des concentrations en N-NO2 en sortie CarboPlus® systématiquement plus faibles que celles de l'entrée. L'abattement des ions nitrites par le CarboPlus® est autour de 40 % dans une gamme de 0 à 0,7 mg/L N-NO2, ainsi qu'un lissage de la variabilité, comme le montre la Cf. Figure 16

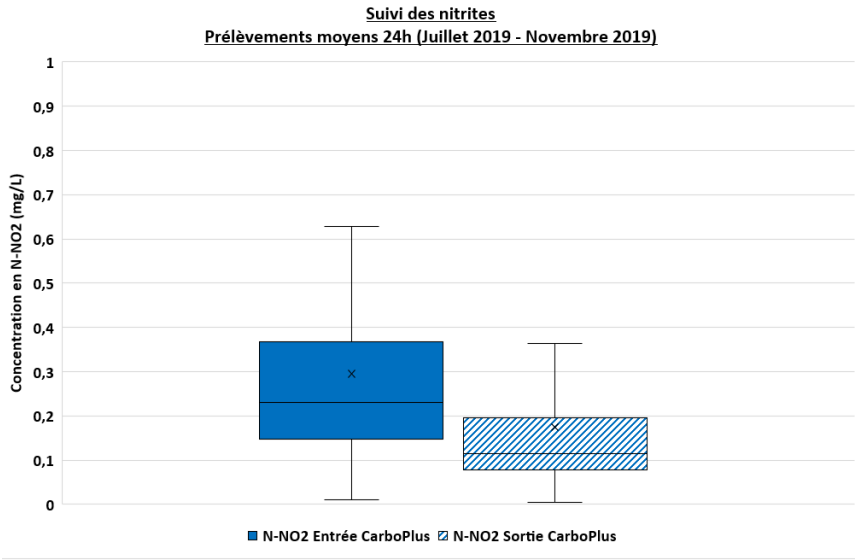


Figure 17 : Abattement en N-NO2 par le CarboPlus µG®

Abattement moyen observé sur N-NO2 = 40%

Lissage de la variabilité

4.1.5 Matières en suspension

Le CarboPlus® permet de piéger une partie des MeS de l'effluent amont lorsque la qualité de l'effluent se dégrade anormalement, mais globalement le bilan apparaît nul (Cf. Figure 18).

Les flocs entrant dans le réacteur apparaissent plus petits que ceux qui se retrouvent en sortie ou en sortie de colonne. Il semble qu'un phénomène d'agrégation de flocs s'opère dans le réacteur. Ces agrégats s'accumulent dans la colonne en plus de la biomasse susceptible de se développer au sein de la colonne. Des matières en suspension qui doivent être régulièrement évacués à l'aide de lavages hydrauliques automatiques.

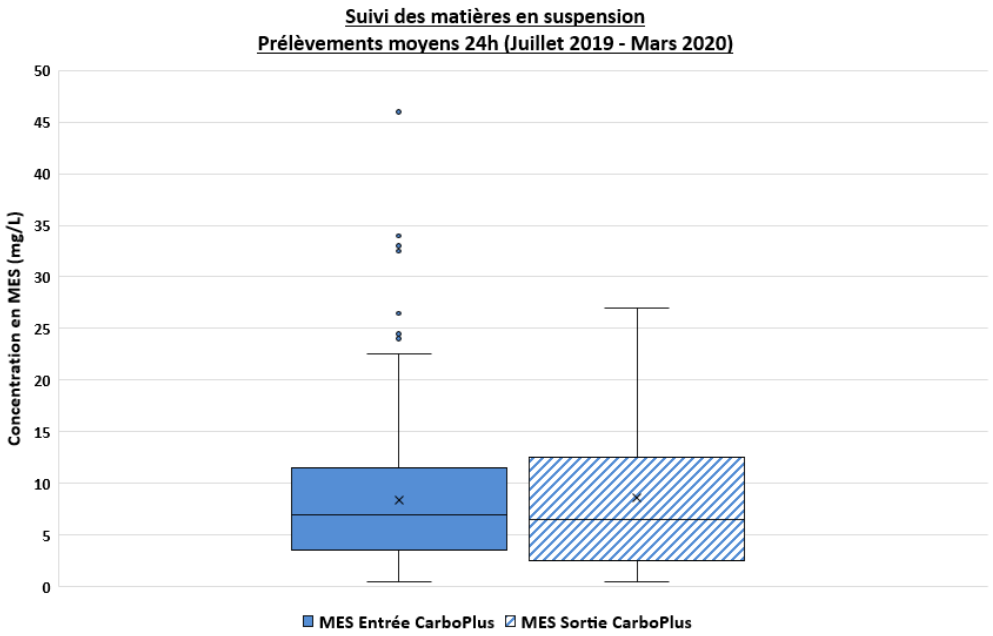


Figure 18 : Evolution des MeS à travers le CarboPlus µG®

Pas d'abattement de MeS observé globalement

Développement de biomasse dans l'ouvrage

Ecrêtement des grosses concentrations en entrée d'ouvrage

Maîtrise essentielle des protocoles de lavage pour éviter les départs de boue

---

4.1.6 DBO5

Les mesures de DBO5 n'ont concerné que les périodes des campagnes 1 à 3. Elles ne montrent pas de bénéfice particulier au travers du traitement tertiaire au regard des suivis au jour le jour (Cf. Figure 20). On observe néanmoins un léger abattement d'environ 15 % visible sur les données statistiques (Cf. Figure 19), une tendance également observée avec le capteur NODE® (Cf. Figure 34 et Figure 35) mais dont le bénéficie est difficilement quantifiable au regard de la limite de quantification (2 à 3 mg O_2/ l) et des incertitudes de ce type d'analyse, surtout sur les faibles valeurs mises en jeu, inférieures à 10 mg O_2/ l la plupart du temps.

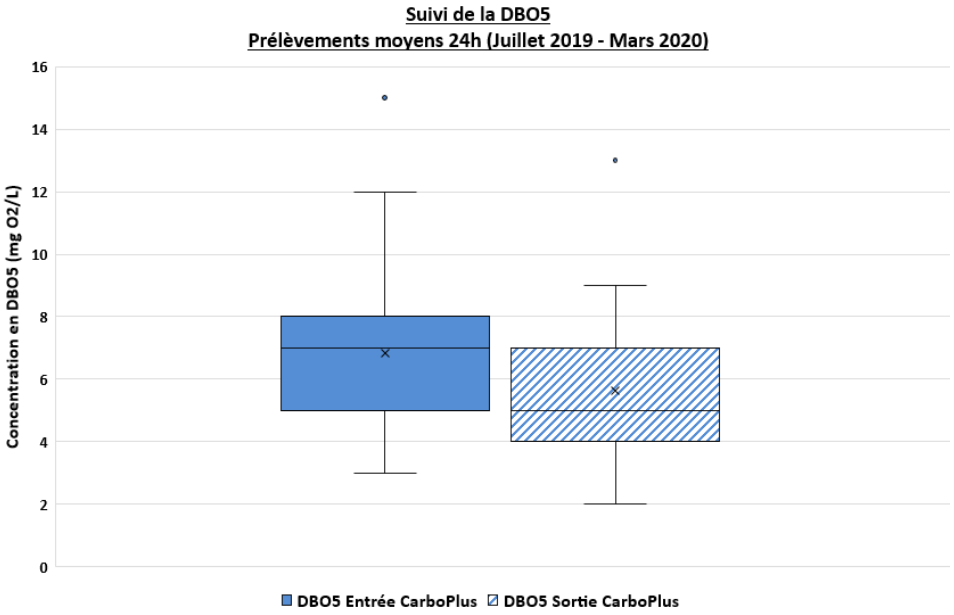


Figure 19: Abattement en DBO_5 par le CarboPlus µG®

Effet bénéfique visible sur la DBO_5 statistiquement

Mais difficilement observable et quantifiable au quotidien

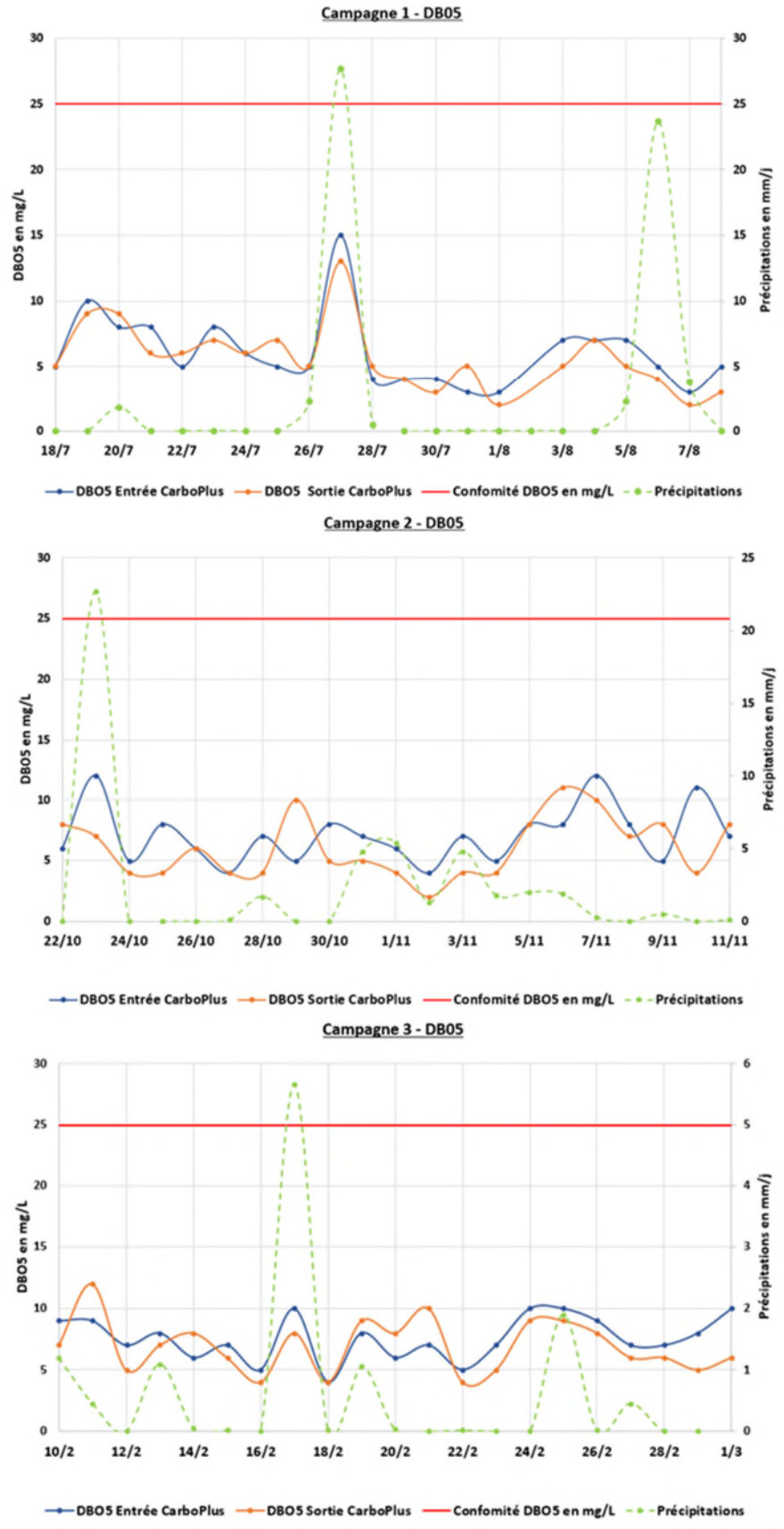


Figure 20: Evolution de la DBO5 au cours des campagnes 1 à 3

4.1.8 Métaux

Les observations faites sur les effluents en entrée de STEU, en sortie de STEU et sortie pilote tertiaire sont résumés dans le Tableau 4.

Les abattements sur le traitement tertiaire ne sont pas mesurables sur l'arsenic, le cadmium, le chrome, le cuivre, le cobalt, le nickel, le plomb et le titane.

Les abattements sur le fer, le manganèse et le zinc sont extrêmement variables et il n'y a aucune corrélation significative entre les abattements observés, les concentrations des éléments mises en jeu (entrée ou sortie pilote) ou bien les MeS en sortie pilote.

Tableau 4 : Résultats sur les métaux (entrée STEU, entrée et sortie pilote)

Paramètres	Entrée STEU (mg/l)	Entrée pilote (mg/l)	Sortie pilote (mg/l)	Abattement pilote
Arsenic total	< LQ (0,004)			Non mesurable
Cadmium total	< LQ (0,001)			
Chrome total	< LQ à 0,012	< LQ (0,005)		
Cobalt total	< LQ (0,003)	< LQ à 0,007	< LQ à 0,004	
Cuivre total	0,042 à 0,088	0,022 à 0,005	0,018 à 0,004	
Mercure total	0,05 à 0,20	LQ (0,05)		
Fer total	0,14 à 1,32	0,09 à 1,10	0,08 à 0,59	Très variable (-80% à +80%) Moyenne 20% (n Mn = 45 ; n Fe = 144)
Fe3+	Non mesuré	0,01 à 0,86	0,01 à 0,36	
Manganèse total	0,03 à 0,21	0,03 à 0,24	0,03 à 0,25	
Nickel total	< LQ à 0,005	< LQ (0,004)		Non mesurable
Plomb total	< LQ à 0,010	< LQ (0,002)		
Titane total	< LQ à 0,053	< LQ (0,010)		
Zinc total	0,023 à 0,307			Très variable (-80% à +80%) Moyenne 20% (n Zn = 45) Ponctuel RSDE 28% (n Zn = 1)

n : nombre d'analyses. Abattements négatifs observés = plus en sortie qu'en entrée.

Aucun abattement significatif sur les métaux observé sur le traitement tertiaire, à partir de prélèvements moyens 24h.

Pas de corrélation visible entre les abattements calculés et les concentrations en élément métallique ou bien en MeS.

Autres paramètres

Il n'y a pas ou très peu d'effets sur les paramètres suivants :

- La conductivité,
- Le phoshore total et les phosphates,
- Les nitrates (Cf. Figure 21) et l'azote global,
- Les chlorures, les sulphates et le potassium.

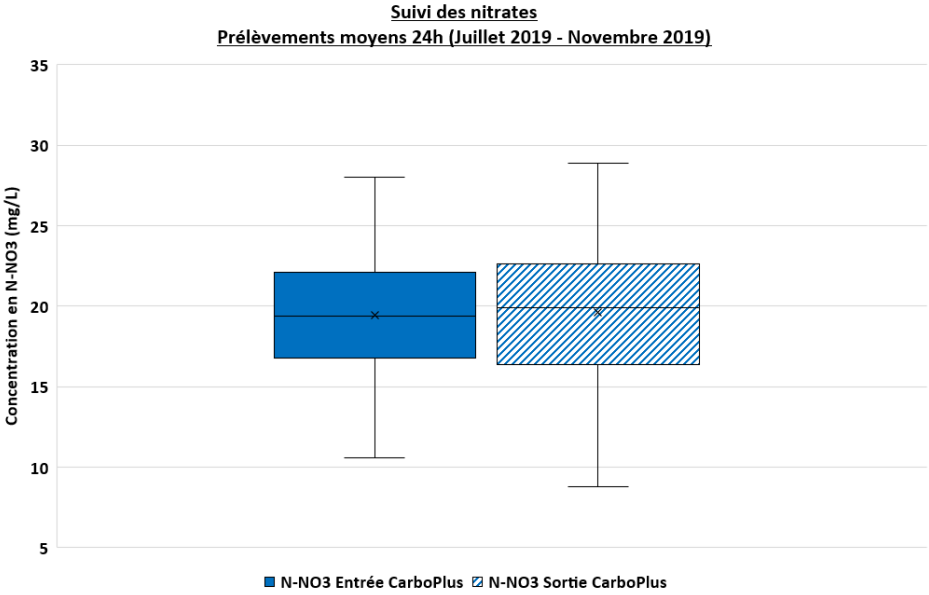


Figure 21 : Evolution de N-NO_3 à travers le CarboPlus µG®

4.2 Résultats des bioessais

4.2.1 Expérimentations ex-situ INRAE-Lyon

Il est à noter que les résultats de la campagne 1 (juillet 2019) ne seront pas présentés et exploités suite à un problème d'éclairage qui a conduit à un important développement d'algues et par conséquent des hypoxies importantes dans les chambres d'exposition. Enfin pour la campagne 4 et en raison du confinement lié au covid19, seules les données de survie et de taux d'alimentation ont pu être acquises.

Traits d'histoire de vie

Les (*) correspondent aux valeurs pour lesquelles un effet significatif a été mesuré et « NA » aux données non disponibles.

Survie des mâles et femelles

Le Tableau 5 et le Tableau 6 présentent les taux de survie observés chez les mâles et les femelles exposés aux différentes conditions testées. Ils sont exprimés en pourcentage du témoin pour les différentes conditions testées (11, 33 et 100% de l'effluent amont et aval du Carboplus µG®), au cours des quatre campagnes, après 7 jours d'exposition pour les mâles et 15 jours pour les femelles.

Pour les mâles, aucun effet sur la survie n'a été observé quel que soit la campagne considérée, avec des taux de survie compris entre 85 et 100%.

Chez les femelles, des données sont disponibles uniquement pour les campagnes d'octobre 2019 et de février 2020. Pour la première, aucun effet sur la survie n'a été observée. En revanche, pour la seconde campagne exploitable (février 2019), un effet très marqué a été observé à la concentration de 100% d'effluent à l'amont du Carboplus µG® avec 0% de survie. Pour les autres concentrations testées, aucun impact sur la survie a été observé.

Tableau 5 : Taux de survie des mâles

	Amont Carboplus µG®			Aval Carboplus µG®		
Campagne	**11 %**	**33 %**	**100 %**	**11 %**	**33 %**	**100 %**
Juillet 2019	NA					
Octobre 2019	98,7	93,5	94,8	94,8	97,4	98,7
Février 2020	85,9	91,5	95,8	88,7	93,0	95,8
Mars 2020	100,0	96,0	100,0	96,0	94,5	100,0

Tableau 6 : Taux de survie des femelles

	Amont Carboplus µG®			Aval Carboplus µG®		
Campagne	**11 %**	**33 %**	**100 %**	**11 %**	**33 %**	**100 %**
Juillet 2019	NA					
Octobre 2019	94,7	89,5	100,0	94,7	100,0	89,5
Février 2020	83,3	88,9	**0,0 (*)**	94,5	83,3	88,9
Mars 2020	NA					

Résultats des tests « Alimentation »

Les résultats des mesures du taux d'alimentation chez les gammares mâles sont présentés dans la Figure 22

En se basant sur les effets observés avec les effluents amont du CarboPlus®, les résultats de ces travaux montrent une variabilité de la toxicité des effluents dans le temps, avec une aggravation de l'impact au cours du projet. En octobre 2019, seule la concentration de 100% a conduit à une diminution significative du taux d'alimentation, alors que pour les campagnes de février et mars 2020, des inhibitions significatives ont respectivement été observées dès 33 et 11% d'effluent.

En comparant les taux d'alimentation obtenus avec les effluents en amont en en aval du CarboPlus®, ces travaux montrent clairement un effet bénéfique du traitement sur la toxicité des effluents, et par conséquent sur leur charge en contaminants chimiques toxiques. Une diminution de l'impact par le CarboPlus® est observée à la condition de 100 % pour les campagnes 2 et 3. Par exemple, pour la campagne 2, la consommation est de 23 mm²/gammare/jour en entrée et de 32 mm²/gammare/jour en sortie. Pour la campagne 4, des effets ont été observés dès la condition de 11% d'effluent amont. A l'aval du CarboPlus®, ces effets ont été fortement été atténués, seule la condition de 100% a eu un impact négatif sur le taux d'alimentation.

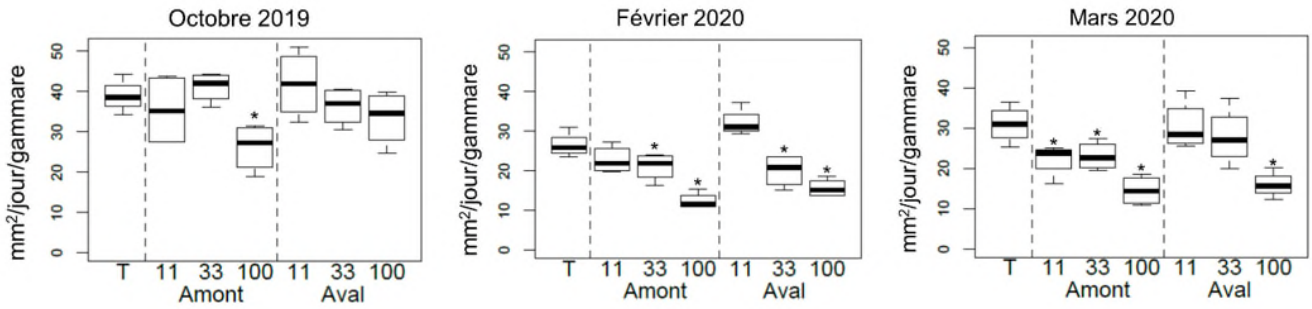


Figure 22: Taux d'alimentation des campagnes 2,3 et 4

Résultats des tests de reproduction « stades de mues »

L'occurrence de femelles ayant atteint ou pas le stade de mue C2 est présentée dans la Figure 23. Les barres grises de la figure représentent les pourcentages de femelles ayant atteint le stade de mue C2. Les barres noires représentent les pourcentages de femelles n'ayant pas atteint le stade de mue C2 (n=15).

Il n'y a pas de données disponibles pour la concentration 100% amont de la campagne de février 2020 à cause de la très forte mortalité observée, due à une pollution du 07 février 2020, qui a été détectée sur les autres bioessais.

Pour la campagne 4, la fermeture de l'Inrae en lien avec l'épidémie du Covid19 a été imposée une semaine après le démarrage de la campagne 4. Ainsi, il a été possible d'exploiter les organismes mâles, pour le test d'alimentation, mais pas les femelles.

Pour les campagnes 2 et 3, les résultats montrent que le nombre de femelles en retard de mue, c'est-à-dire n'ayant pas atteint le stade C2, augmente avec le pourcentage d'eau usée testé. Ces effets ont été constatés aussi bien en amont qu'en aval CarboPlus®, ne permettent pas de mettre en évidence une action bénéfique de ce traitement comme cela a pu être fait précédemment via la mesure du taux d'alimentation. Ces résultats questionnent sur la présence de composés chimiques spécifiques ayant un effet sur la mue et pas sur l'alimentation et n'étant pas retenus par le CarboPlus®. A noter que lors des campagnes, des mesures en continu ont montré des pics en ions ammonium dépassant parfois 10 mg/l. Il serait pertinent d'évaluer et étudier les effets de ce composé sur la mue du gammare.

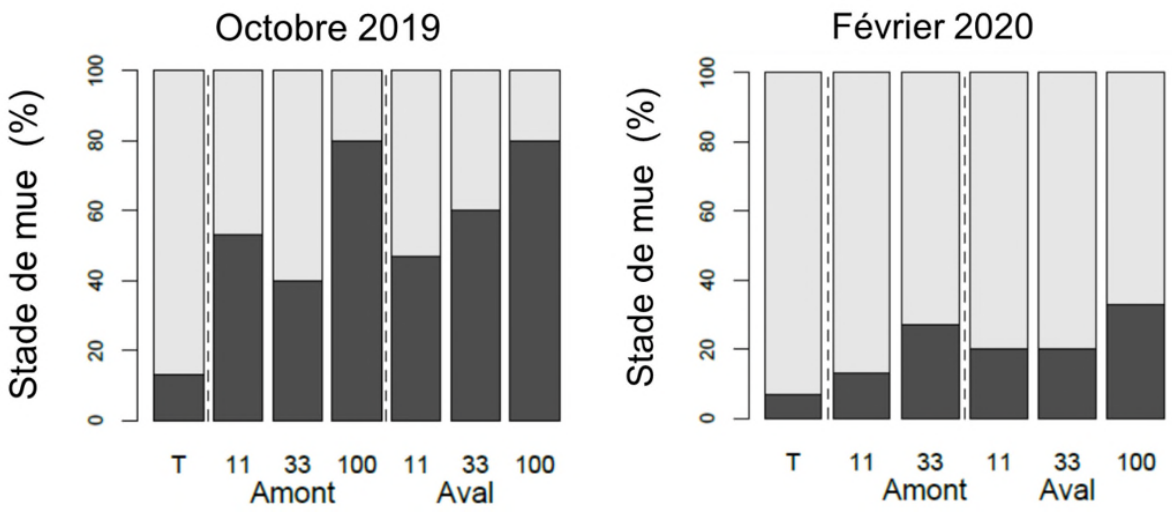


Figure 23 : Distribution des stades de mue chez les femelles exposées

Résultats des tests de reproduction « fertilité et fécondité »

Les résultats obtenus pour la fertilité et la fécondité chez les femelles exposées (n=15) aux différentes conditions testées sont respectivement présentés dans la Figure 24 et la Figure 25.

Pour les deux campagnes exploitables, aucun effet sur la fertilité n'a été observé dans le cadre de ce travail. De la même façon, les résultats de fécondité pour la campagne d'octobre 2019, ne montrent pas d'effets significatifs. En revanche pour la campagne de février 2020, un impact significatif a été observé pour la concentration de 100% d'effluent à l'aval du Carboplus µG®. Toutefois, bien que ces résultats montrent l'effet bénéfique du traitement, conduisant à diminuer fortement la mortalité des femelles entre l'amont et l'aval, l'absence de données de fécondité à l'amont ne permet pas de quantifier cet effet bénéfique.

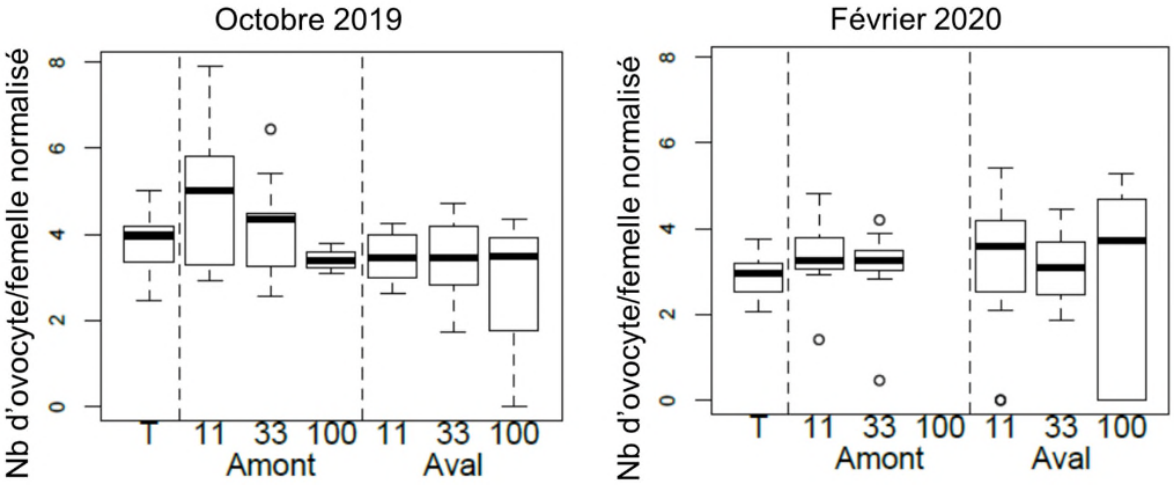


Figure 24 : Fertilité des gammares femelles

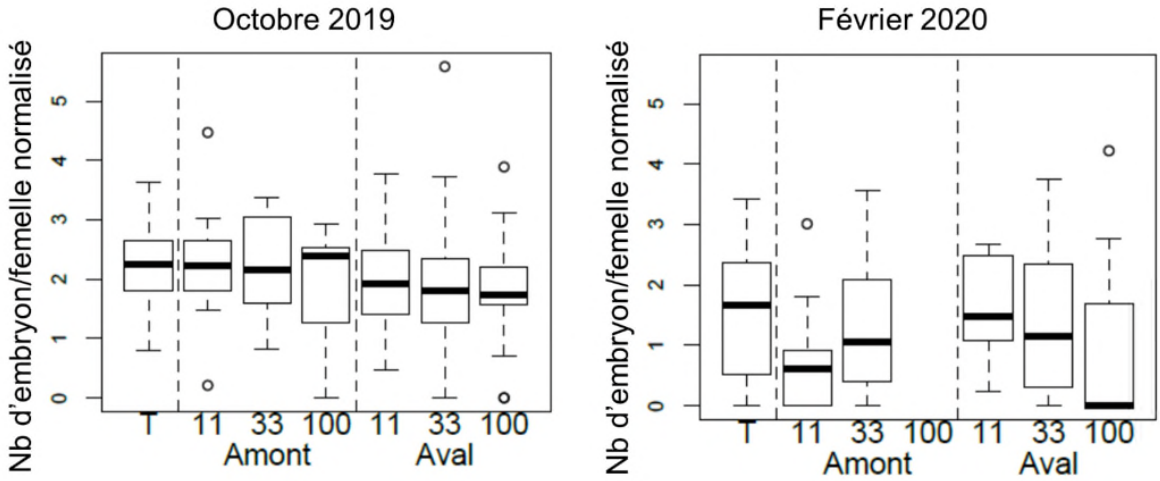
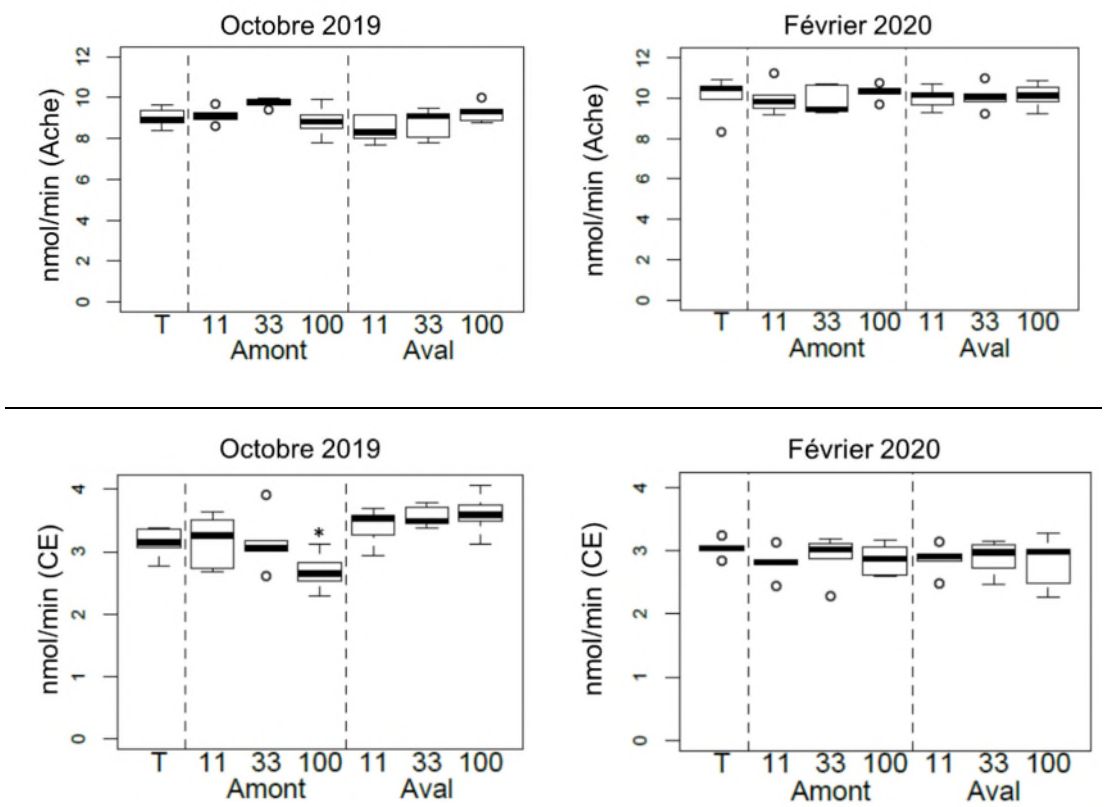


Figure 25 : Fécondité des gammares femelles

Résultats des tests de biomarqueurs moléculaires

Les résultats des mesures des biomarqueurs moléculaires sont présentés dans la Figure 26. Ces résultats montrent que les effluents étudiés ont eu aucun effet significatif sur l'ensemble de ces biomarqueurs, excepté l'activité CE. En effet, en octobre 2019, la concentration de 100% d'effluent amont conduit à une inhibition significative de l'activité CE qui disparait à l'aval du traitement, confirmant ainsi l'effet bénéfique du CarboPlus® sur la charge en contaminants de l'effluent. En accord avec l'absence d'effet avec l'Ache, les résultats montrent que l'inhibition de la CE ne peut pas être associée à la présence d'insecticides, mais à la présence de composés interagissant avec d'autres estérases, telles que celles impliqués dans la régulation hormonale, toutefois ce dernier point sera à confirmer.



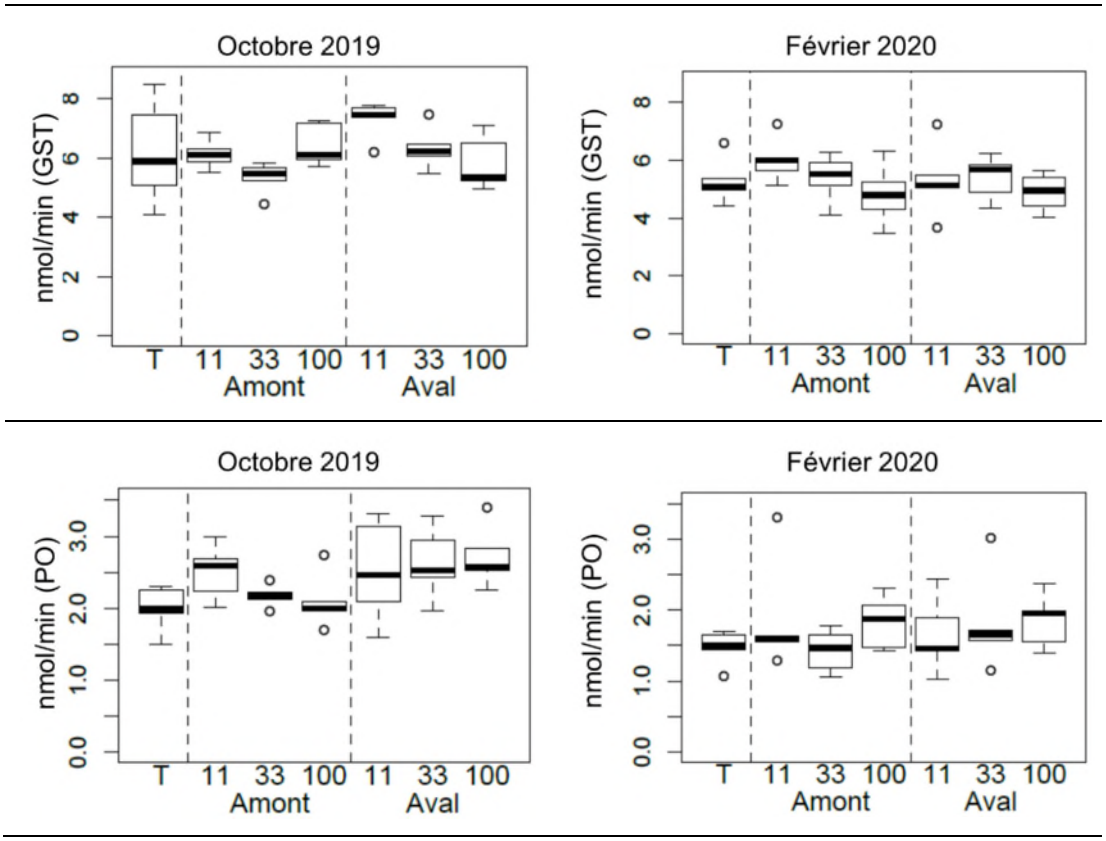


Figure 26 : Résultats des biomarqueurs moléculaires

Résultats des bioaccumulations de micropolluants

Les teneurs en métaux et composés organiques mesurées dans les gammares utilisés pour les expérimentations (T0) et exposés aux effluents amont et aval du Carboplus µG®, aux effluents 100%, après une semaine d'exposition, sont respectivement présentés dans le Tableau 7 et Tableau 8.

Par rapport à la liste des composés recherchés, les résultats de plusieurs composés (**Acénaphtylène, Anthracène, DEHP, Fluoranthène, Phénanthrène et Pyrène**) n'ont pas pu être exploités car les valeurs dans les T0 sont supérieures aux limites recommandées par la norme AFNOR XP T90-721, bien que celles-ci soient très faibles et contraignantes, ou supérieures aux valeurs seuils de contamination biodisponible (BBAC) définies par Besse *et al*. (2013). Ceci montre que les organismes utilisés pour ces travaux ont été exposés à de la contamination, notamment en HAPs, lors de leur stabulation au laboratoire de Lyon, avec des valeurs T0 supérieures à ce qui a été observé après exposition des organismes aux effluents. Toutefois et **pour l'ensemble de ces composés, les résultats montrent également que l'effluent étudié n'est pas une source importante en ces composés.** Enfin, dans ces conditions et pour ces composés, il n'est pas possible d'évaluer l'effet du traitement par le Carboplus µG®.

Concernant les métaux, les résultats du Tableau 7 montrent que l'effluent étudié n'est pas une source de contamination biodisponible pour ces composés, seules les teneurs en cobalt et en manganèse augmentent entre la condition T0 et les effluents, sans mettre en évidence un effet positif du traitement tertiaire sur ces composés. Toutefois, il est à noter que ces valeurs de contaminations biodisponibles observées pour le Co sont inférieures ou proches à la valeur BBAC associée (0,1 ug/g de poids frais, Besse *et al*., 2013). De la même façon, les teneurs mesurées en manganèse sont faibles (retour d'expérience de INRAE-Lyon). Bien que ces valeurs de BBAC aient été développées pour l'interprétation des niveaux de contamination biodisponible dans les milieux, elles permettent toutefois de mettre en évidence, pour l'ensemble des métaux étudiés, que les effluents testés ne constituent pas une source de contamination biodisponible.

Des résultats totalement similaires ont été observés pour les composés organiques, avec en majorité des niveaux de contamination dans les gammares inférieurs aux limites de quantifications. Seule une augmentation de la teneur en naphtalène a été observée entre les T0 et les effluents, mais avec des valeurs proches de la BBAC disponible pour ce composé (8 ng/g de poids frais, Besse et al., 2013)

En accord avec les précédents travaux sur les eaux usées de stations d'épuration de l'INRAE-Lyon (François et al., 2018), les résultats analytiques de cette étude confirment que **les effluents testés ne sont pas des sources de contamination biodisponible en métaux, et pour plusieurs familles de composés organiques telles que les HAPs et les PCBs.** Les teneurs observées dans les organismes exposés sont bien plus faibles que celles que l'on peut rencontrer en milieux naturels, pour les mêmes prises d'essai d'analyse et méthodes analytiques, ainsi que les limites de quantification associées. **Cette faible biodisponibilité peut être également liée aux caractéristiques physico-chimiques des eaux traitées** (riches en matière organique et ions majeurs). Les eaux traitées pourraient toutefois constituer une source de contamination une fois les composés présents dans les milieux naturels, bien qu'ils soient en général faiblement concentrés dans les eaux traitées.

Seule pour la famille des BDE, les limites de quantification proposées par les prestataires restent trop élevées pour suivre et quantifier correctement ces composés.

Comme pour les précédents travaux de l'INRAE-Lyon, ces résultats montrent que les méthodes disponibles pour le suivi et la quantification des contaminants dans les gammares dans le cadre de la surveillance des milieux naturels, ne sont pas adaptées à la spécificité des effluents de stations d'épuration et qu'**il est important de développer la mesure de composés plus émergents tels que les pesticides, les médicaments et les perfluorés**, dont le transfert vers les organismes vivants a été démontré (Miller et al., 2018 ; Simmonet-Laprade et al., 2020).

Tableau 7 : Teneurs en métaux dans les gammares, exprimées en µg/g de poids frais

	Octobre 2019			Février 2020			Mars 2020		
	T0	Amont	Aval	T0	Amont	Aval	T0	Amont	Aval
Aluminium	11,93	13,03	7,96	1,93	1,29	2,01	5,86	1,6	5,94
Antimoine	<0,01	0,011	0,011	<0,01	<0,01	0,014	<0,01	0,01	<0,01
Argent	0,007	0,013	0,01	0,009	0,008	0,009	0,007	0,011	0,011
Arsenic	0,366	0,341	0,359	0,465	0,397	0,362	0,441	0,478	0,451
Baryum	6,41	7,35	6,04	7,1	7,71	7,84	5,09	7,11	6,6
Bore	0,532	0,587	0,481	<0,4	0,496	0,587	<0,4	<0,4	0,421
Cadmium	0,015	0,019	0,019	0,012	0,008	0,01	0,013	0,016	0,017
Chrome	0,042	0,053	0,052	0,037	0,048	0,039	0,044	0,04	0,06
Cobalt	0,015	0,089	0,049	<0,01	0,08	0,087	<0,01	0,075	0,12
Etain	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	0,027	<0,02
Fer	12,08	14,84	10,22	5,75	6,46	7,59	7,14	5,82	9,98
Lithium	0,061	0,048	0,039	0,063	0,04	0,041	0,051	0,04	0,038
Manganèse	2,08	9,04	5,63	0,98	6,84	9,38	1,32	4,42	8,69
Mercure	<0,006	<0,006	<0,006	0,008	<0,006	<0,006	<0,006	<0,006	<0,006
Molybdène	0,082	0,084	0,095	0,052	0,062	0,067	0,05	0,054	0,063
Nickel	0,052	0,189	0,094	<0,02	0,04	0,146	0,05	0,046	0,055
Plomb	0,038	0,047	0,031	0,014	0,01	0,011	0,017	0,01	0,02
Titane	0,495	0,482	0,296	<0,2	<0,2	0,22	<0,2	0,202	0,46
Vanadium	0,048	0,026	0,035	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Zinc	12,03	13,52	12,72	12,29	11,59	11,89	11,78	12,17	13,23

Tableau 8 : Teneurs en composés organiques dans les gammares, exprimées en ng/g de poids frais

	Octobre 2019			Février 2020			Mars 2020		
	T0	Amont	Aval	T0	Amont	Aval	T0	Amont	Aval
Acenaphthene	0,59	0,57	0,57	0,61	0,52	<0,5	0,66	0,8	0,61
BDE28 - BDE47 - BDE99 - BDE100 - BDE153 - BDE154	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
BDE100	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
BDE119	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
BDE138	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
BDE153	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
BDE154	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
BDE183	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
BDE209	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5
BDE28	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
BDE47	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,2
BDE99	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,2
Benzo(a)anthracene	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Benzo(a)pyrene	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Benzo(b+j)fluoranthene	<0,5	0,71	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Benzo(g,h,i)perylene	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Benzo(k)fluoranthene	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Chrysene	<0,5	0,56	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
DDD-2,4'	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
DDD-4,4'	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
DDE-2,4'	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
DDE-4,4'	0,22	0,25	0,25	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	0,2	<0,2
DDT-2,4'	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
DDT-44'	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Dicofol	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
Heptachlore Epoxyde	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,00	<5,0	<5,0
Hexabromocyclododecane	< 10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Hexachlorobenzene	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<05
Hexachlorobutadiene	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Naphthalene	6,9	8	8	6,5	7,6	6,4	7,3	10,1	10,5
PCB-132	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
PCB-149	0,22	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
PCB-170	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
PCB-193	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
PCB-194	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
PCB-209	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
PCB-31	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
PCB-35	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
PCB-44	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
PCB-50	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Pendimethaline	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Perylene	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Pentachlorobenzene	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
PFOS	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2	<2,0
Triphenylene	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
4-tert-butylphenol	4,2	<2,5	4,9	2,9	3,1	<2,5	<0,5	<0,5	3,8

4.2.2 Résultats avec la station de biosurveillance Toxmate®

Evénements détectés

Durant cette étude, dix suivis Toxmate® ont été réalisés en partenariat avec la société VIEWPOINT, de juillet 2019 à mars 2020. Les essais avec cette station de biosurveillance ont repris à l'été 2020 juste après la première période de confinement, dans le cadre d'une seconde étude complémentaire également financée par l'AE RMC. Les suivis de l'été 2020 sont également présentés dans ce document. Ils sont présentés trimestre par trimestre dans les tableaux et figures suivantes :

- Tableau 10 : Stress biologiques Toxmate® - Juillet à Septembre 2019
- Tableau 11 : Stress biologiques Toxmate® - Octobre à Décembre 2019
- Tableau 12 : Stress biologiques Toxmate® - Février à Mars 2020
- Tableau 13 : Stress biologiques Toxmate® - Juillet à Août 2020

- Figure 30 : Suivis Toxmate® de juillet à septembre 2019
- Figure 31 : Suivis Toxmate® d'octobre à décembre 2019
- Figure 32 : Suivis Toxmate® de février à mars 2020
- Figure 33 : Suivis Toxmate® de juin à août 2020

Comme indiqué dans le « Tableau 9 : Nombre et type d'événements Toxmate® détectés », les différents suivis ont permis de collecter 24 épisodes de dégradation de la qualité des eaux sur 9 mois de périodes cumulées, soit entre 2 à 3 stress biologiques par mois. Ils sont souvent différentiés car chaque espèce ne réagit pas aux mêmes pollutions : les gammares sont impliqués dans les deux-tiers des événements (64%), les sangsues dans la moitié des événements (54%) et les gastéropodes pour un quart (25%).

Tableau 9 : Nombre et type d'événements Toxmate® détectés

Evénements Toxmate®					Effets observés du traitement tertiaire, à travers toutes les réponses du Toxmate®		
	Evénements	Réactions Gammares	Réactions Erpodella	Réactions Radix	Pas d'effet visible	Atténuation partielle du stress amont	Stress aval nul ou non significatif
Juil-Sept 2019	3	2	2	2	1	2	3
Oct-Déc 2019	8	6	2	0	0	1	7
Fev-Mars 2020	8	5	6	2	5	2	6
Juin-Sept 2020	10	4	6	3	2	1	10
Totaux	29	17	16	7	8	6	26
Proportions		**59%**	**55%**	**24%**	**20%**	**15%**	**65%**
						80%	

Deux suivis ont été écourtés à cause d'une soudaine mortalité, le 8 février et le 22 juillet 2020. Les organismes ont dû être remplacés après ces deux événements.

Recherche de corrélation

Aucun pic de stress biologique n'a pas pu être corrélé à une variation anormale d'un ou plusieurs paramètres physico-chimiques mesurés en continu ou bien à une analyse chimique sur des échantillons moyens 24h. Les capteurs physico-chimiques en surveillance continu de l'eau traitée par la STEU sont restés aveugles aux pollutions détectées, même lors des événements mortels des 8 février et 22 juillet 2020.

La période de février-mars 2020 montre des niveaux de pollutions plus importants que sur les autres périodes (été 2019, automne 2019 ou été 2020) en termes d'événements de stress détectés à partir des Toxmate®, de suivi des macropolluants (pics d'ammonium) et de résultats sur les tests d'alimentation des bancs ex-situ de l'INRAE (Cf. § 4.2.1). Parmi tous les événements répertoriés, un seul stress biologique, avec les gammares, semble coïncider avec un pic d'ammonium en sortie de STEU, supérieur à 10 mg/l N-NH4, mais la coïncidence ne s'est pas répétée et le Toxmate aval ne réagit pas à ces fortes valeurs détectées au mois de février 2020, mois où la nitrification sur la STEU a été particulièrement perturbée. Le pic de stress du 17 février 2020 a dû être provoqué soit par effet de seuil (seuil maximum admissible par les gammares), soit par un autre polluant, soit par une combinaison de polluants non déterminée (effet « cocktail »). Il est également possible qu'une arrivée de forte concentration en ammonium puisse diminuer la sensibilité des gammares pendant un certain temps (à déterminer) après l'événement.

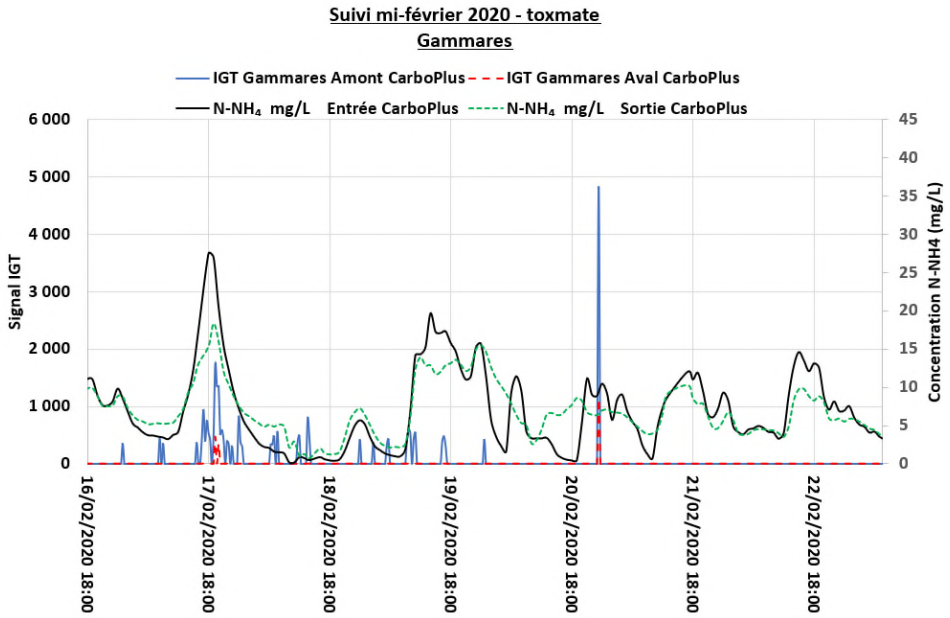


Figure 27 : Suivi Toxmate® et ammonium, février 2020

Fait marquant

Le pic de stress biologique détectée dans la nuit du vendredi 7 au samedi 8 février 2020 est le fait le plus marquant de cette étude. En effet, les signaux des Toxmate® ont montré une très forte perturbation sur la station de Saint-Fons sans aucun retour des autres suivis (macropolluants, suivis physico-chimiques de STEU). Le pic de toxicité a été observé sur les trois espèces et au même moment à 1h20 du matin, suivi d'une mortalité massive et totale des trois espèces. Au lundi 10 février 2020 matin, une mortalité massive a également été observée sur les gastéropodes (Physes) qui colonisent naturellement les canaux de sortie de la STEU ou des eaux sales de lavages des biofiltres (Cf. Figure 28)

A l'issue de la campagne 3 avec les bancs test ex-situ de l'INRAE-Lyon, les femelles gammares travaillant en amont du pilote sont toutes mortes mais pas celles qui travaillaient en aval du pilote (Cf. Tableau 6 : Taux de survie des femelles).

Au lundi 10 février 2020 matin, une forte odeur d'hydrocarbures a été décelée en fin de filière de traitement de la STEU. Pour compléter les mesures proposées par LODIAG, des analyses ont été réalisés sur des prélèvements vieillissants (4 jours après les prélèvements). Le laboratoire CARSO a permis de détecter la présence anormale d'un ensemble d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), dont le benzo(ghi)pérylène. La présence de ces HAP dans des échantillons très dilués et vieillissants ne permet pas d'établir de corrélation avec les mortalités observées. On ne peut que les soupçonner.

Figure 28 : Mortalité massive des gastéropodes de la STEU – Février 2020

Effets du traitement tertiaire

La très grande majorité des pics détectés sont atténués ou totalement supprimés par le pilote du CarboPlus®, dans une proportion de 80% des événements de stress biologiques. Cf. Tableau 9 : Nombre et type d'événements Toxmate® détectés, page 59 ainsi que les tableaux et figures ci-dessous.

Lorsqu'une pollution n'est pas arrêtée par le traitement tertiaire, une réponse du Toxmate peut apparaître un peu plus forte qu'en amont comme lors de l'événement du 6 juillet 2020 (Cf. Tableau 13 & Figure 33). Il est probable que les organismes soient moins accoutumés, en aval du traitement tertiaire, par rapport à ceux qui travaillent en amont, et proposent une réaction plus marquée. Mais les signaux amont et aval restent néanmoins dans le même ordre de grandeur (IGT > 5 000).

Le taux de survie en fin de suivi est aussi un paramètre qui permet d'apprécier la qualité de l'eau que les organismes ont vu passer au cours de chacune des périodes de test. On observe que la survie des organismes est bien meilleure en aval du pilote qu'en amont, comme le montre la Figure 29 ci-dessous.

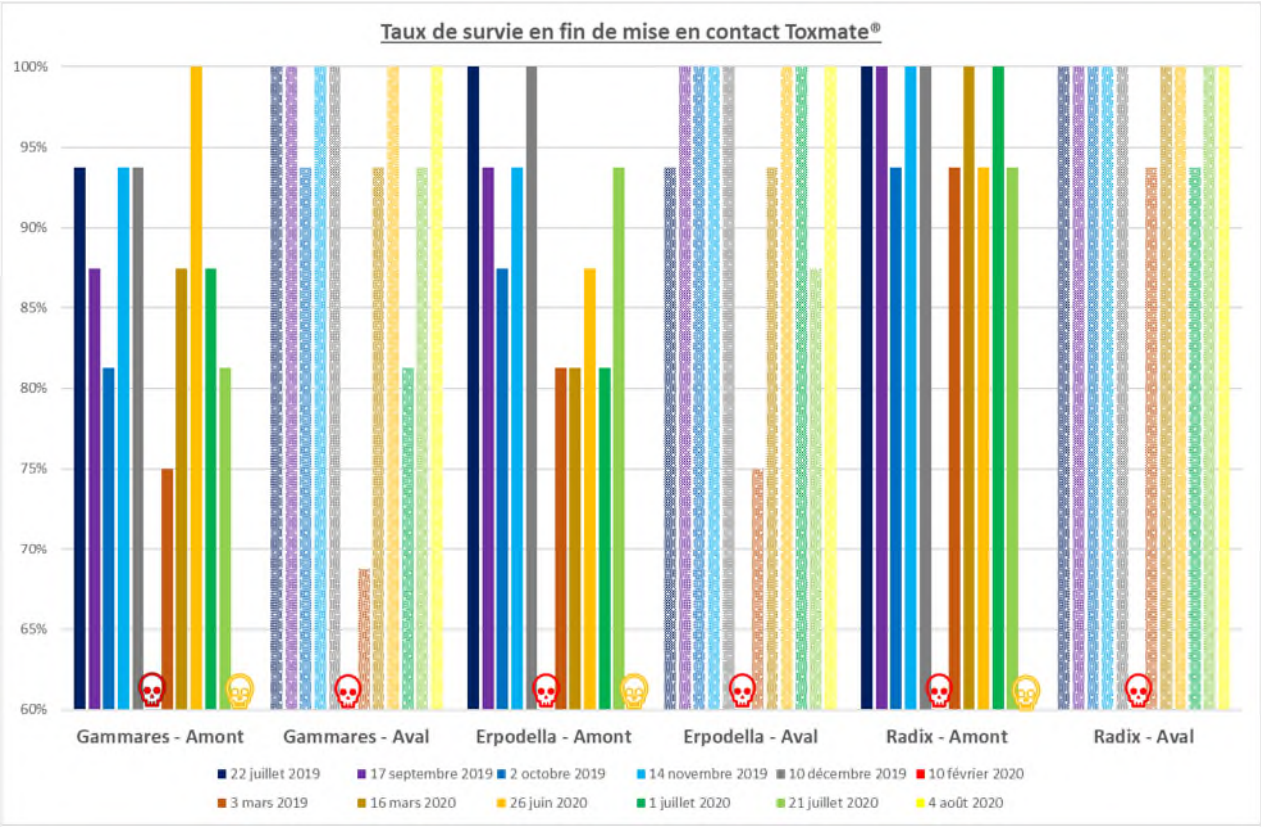
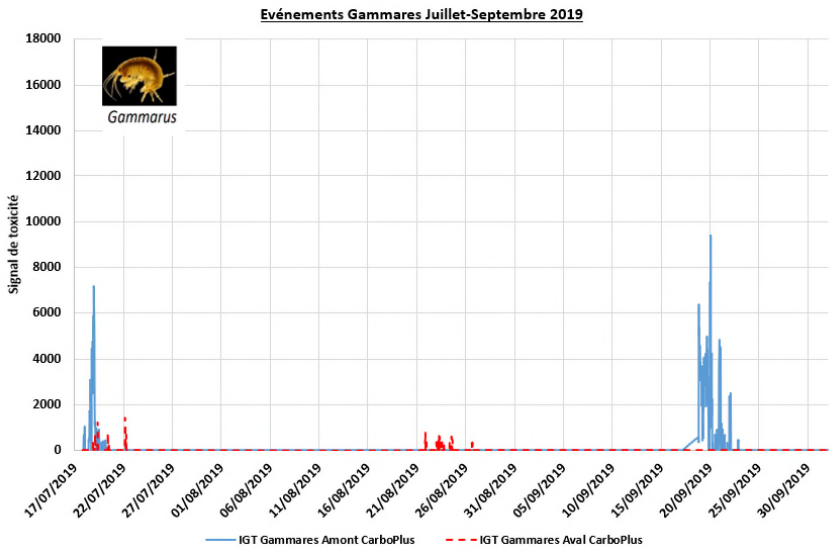
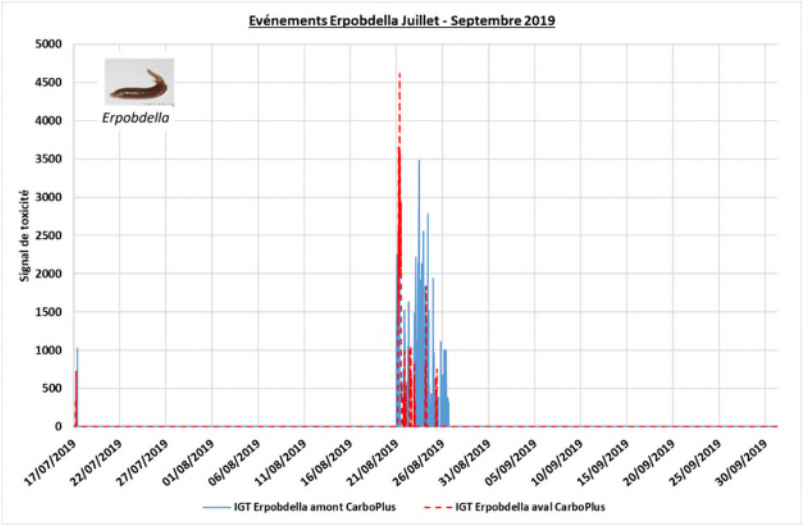


Figure 29 : Taux de survie en fin de suivi Toxmate®

Tableau 10 : Stress biologiques Toxmate® - Juillet à Septembre 2019

Gammarus fossarum (crustacé amphipode)	*Erpobdella testacea* (sangsue)	*Radix auricularia* (escargot gastéropode)
Pic violent au 18 juillet en amont et très léger en aval IGT amont ≅ 7 000 IGT aval < 1 500	Pic léger au 18 juillet en amont et en aval IGT amont ≅ 1 000 IGT aval ≅ 700	Petit stress sur 4 jours, du 18 juillet au 22 juillet, en amont et rien en aval IGT amont ≅ 100 à 200 IGT aval = 0
	6 jours de stress, du 21 au 27 sept en amont, et en stress en pointillé en aval IGT amont ≅ 1000 à 3 500 IGT aval = 600 à 4 500	Stress sur 3 jours, 22 au 25 juillet en amont et rien en aval IGT amont = 150 - 250 IGT aval = 0
3 jours de stress, du 19 au 22 sept en amont, rien en aval IGT amont ≅ 2500 à 9 500 IGT aval = 0		





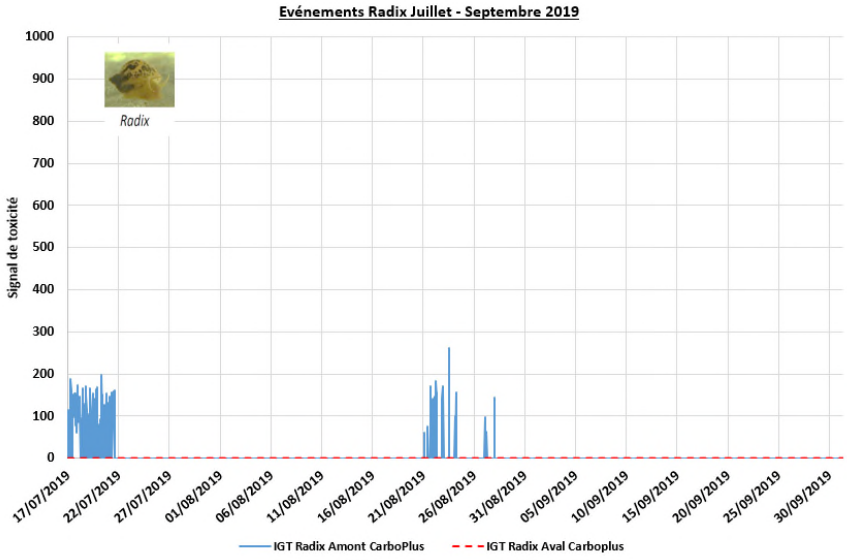


Figure 30 : Suivis Toxmate® de juillet à septembre 2019

Tableau 11 : Stress biologiques Toxmate® - Octobre à Décembre 2019

Gammarus fossarum (crustacé amphipode)	*Erpobdella testacea* (sangsue)	*Radix auricularia* (escargot gastéropode)
Pic violent au 18 octobre en amont et non significatif en aval IGT amont ≅ 16 500 IGT aval < 500		Aucun stress détecté sur la période
Petit pic au 19 octobre en amont et non significatif en aval IGT amont ≅ 2 000 IGT aval < 500		
Pic violent au 21 octobre en amont et non significatif en aval IGT amont ≅ 9 800 IGT aval < 500		
Petit pic au 03 novembre en amont et rien en aval IGT amont ≅ 1 700 IGT aval = 0		
Moyen pic au 01 décembre en amont et non significatif en aval IGT amont ≅ 3 500 IGT aval < 500		
	Pic violent au 02 décembre en amont et atténué en aval IGT amont ≅ 1 400 IGT aval ≅ 400	
	Pic violent au 04 décembre en amont et nul en aval IGT amont ≅ 1 900 IGT aval = 0	
Petit pic au 05 décembre en amont et rien en aval IGT amont ≅ 1 200 IGT aval = 0		

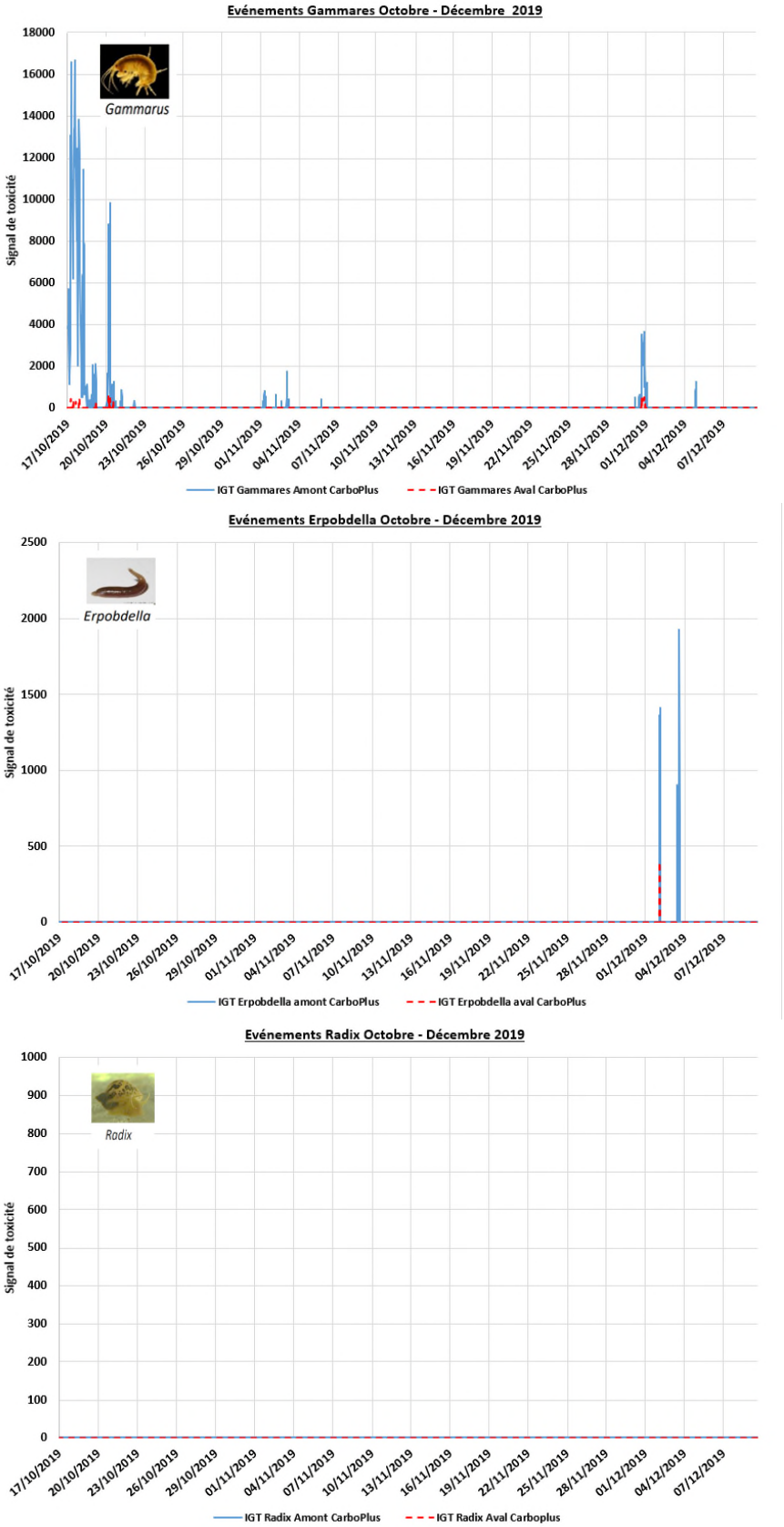


Figure 31 : Suivis Toxmate® d'octobre à décembre 2019

Tableau 12 : Stress biologiques Toxmate® - Février à Mars 2020

Gammarus fossarum (crustacé amphipode)	*Erpobdella testacea* (sangsue)	*Radix auricularia* (gastéropode)
Pic le 08 février 2020, suivi de la **mortalité de tous les gammares amont et aval** IGT amont = 3 100 et ☠ IGT aval = 2 100 et ☠	Pic le 08 février 2020, suivi de la **mortalité de toutes les sangsues amont et aval** IGT amont = 500 et ☠ IGT aval = 400 et ☠	Pic le 08 février 2020, suivi de la **mortalité de toutes les radix amont et aval** IGT amont = 500 et ☠ IGT aval = 400 et ☠
	Pic violent le 15 février en amont et rien en aval IGT amont = 700 à 900 IGT aval = 0	
Série de petits pics entre le 16 et le 18 février en amont, non significatifs en aval IGT amont = 1 000 à 1 700 IGT aval < 500	Pic violent le 18 février en amont et rien en aval IGT amont = 900 IGT aval = 0	
Pic violent le 20 février en amont, atténué en aval IGT amont = 4 800 IGT aval = 1 100	Moyen pic le 20 février en aval et rien en amont ? Résultat non cohérent IGT amont = 0 ? IGT aval = 400	
		Moyen Pic le 23 février en amont et rien en aval IGT amont = 200 IGT aval = 0
	2 Pic violents le 7 mars en amont et autant en aval IGT amont = 900 puis 400 IGT aval = 800 puis 400	
Moyen pic le 09 mars en amont, légèrement atténué en aval IGT amont = 3 200 IGT aval = 2 200	2 petits pics, le 8 et 9 mars en amont et rien en aval IGT amont < 300 IGT aval = 0	
Série de petits pics entre le 10 et le 11 mars en amont et rien en aval IGT amont = 1 000 à 2 200 IGT aval = 0		

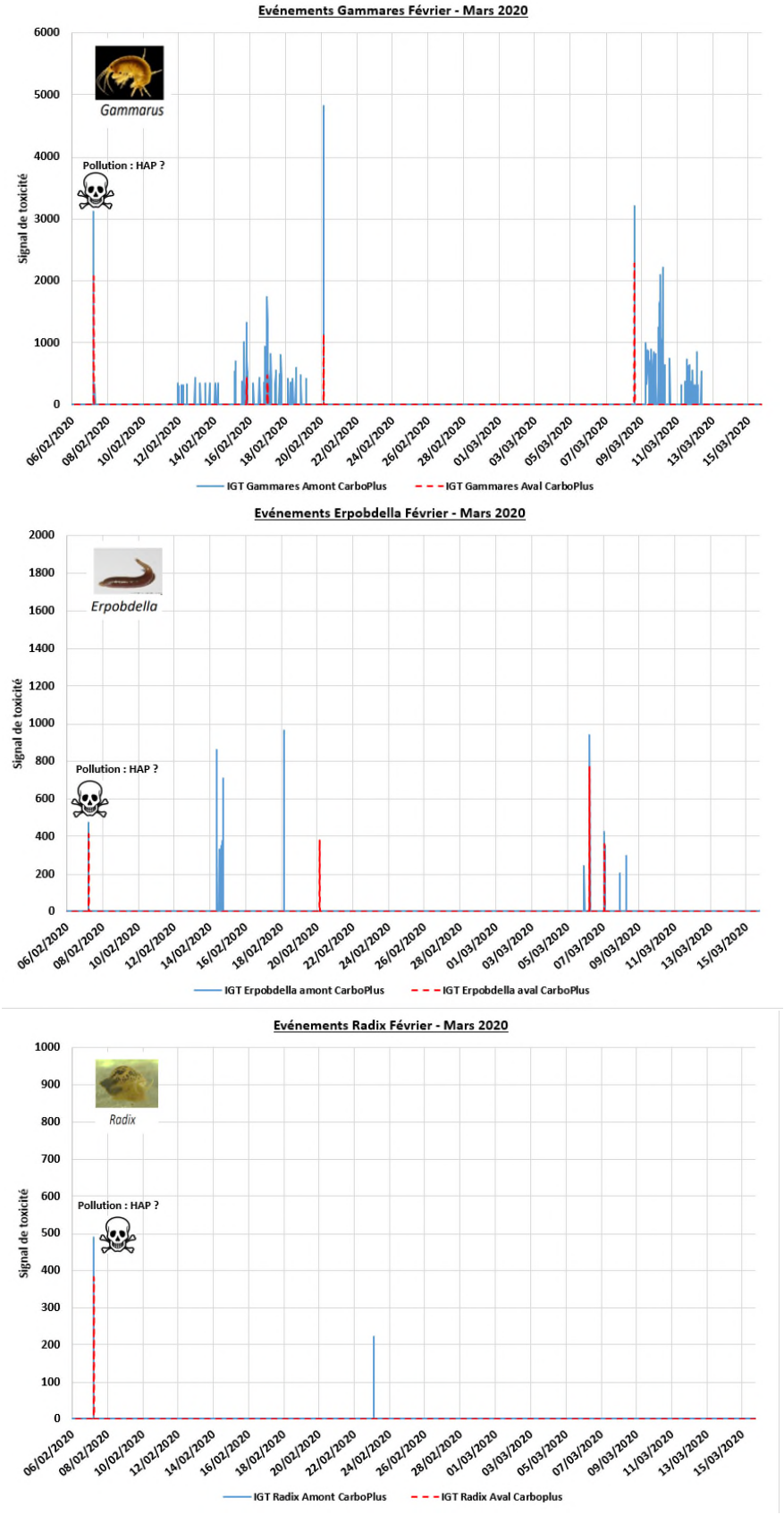


Figure 32 : Suivis Toxmate® de février à mars 2020

Tableau 13 : Stress biologiques Toxmate® - Juillet à Août 2020

Gammarus fossarum (crustacé amphipode)	*Erpobdella testacea* (sangsue)	*Radix auricularia* (escargot gastéropode)
Moyen pic le 2 juin, en amont et similaire en aval, Suivis de pics plus petits les jours suivants IGT amont = 1 600 IGT aval = 1 600		
		Pic violent le 12 juin, en amont et rien en aval IGT amont = 1 600 IGT aval = 0
		Pic violent le 14 juin, en amont et rien en aval IGT amont = 2 100 IGT aval = 0
Moyen pic le 28 juin, en amont et rien en aval IGT amont = 2 200 IGT aval = 0		
	Pic violent le 30 juin, en amont et rien en aval IGT amont = 1 600 IGT aval = 0	
Pics importants entre le 3 et le 6 juillet, en amont et similaire en aval, IGT amont = 2 000 à 6 000 IGT aval = 2 000 à 8 700	2 Pics violents le 4 juillet, en amont et rien en aval IGT amont = 1 100 à 1 300 IGT aval = 0	
	2 Pics violents le 6 juillet, en amont et rien en aval IGT amont = 1 400 IGT aval = 0	
	2 Moyens pics le 8 juillet, en amont et rien en aval IGT amont = 900 IGT aval = 0	
	Moyen pic le 13 juillet en amont et non significatif en aval IGT amont = 800 IGT aval <= 200	
Pic violent le 22 juillet en amont et rien en aval, ainsi qu'une **mortalité de 100% en amont et rien en aval**. IGT amont = 5 600 et ☠ IGT aval = 0	Pic ultra violent le 22 juillet, en amont et rien en aval, avec une **mortalité à 100% en amont et rien en aval.** IGT amont = 5 600 et ☠ IGT aval = 0	Pic violent le 22 juillet, en amont et rien en aval, avec une mortalité à 100% en amont et rien en aval. IGT amont = 400 et ☠ IGT aval = 0

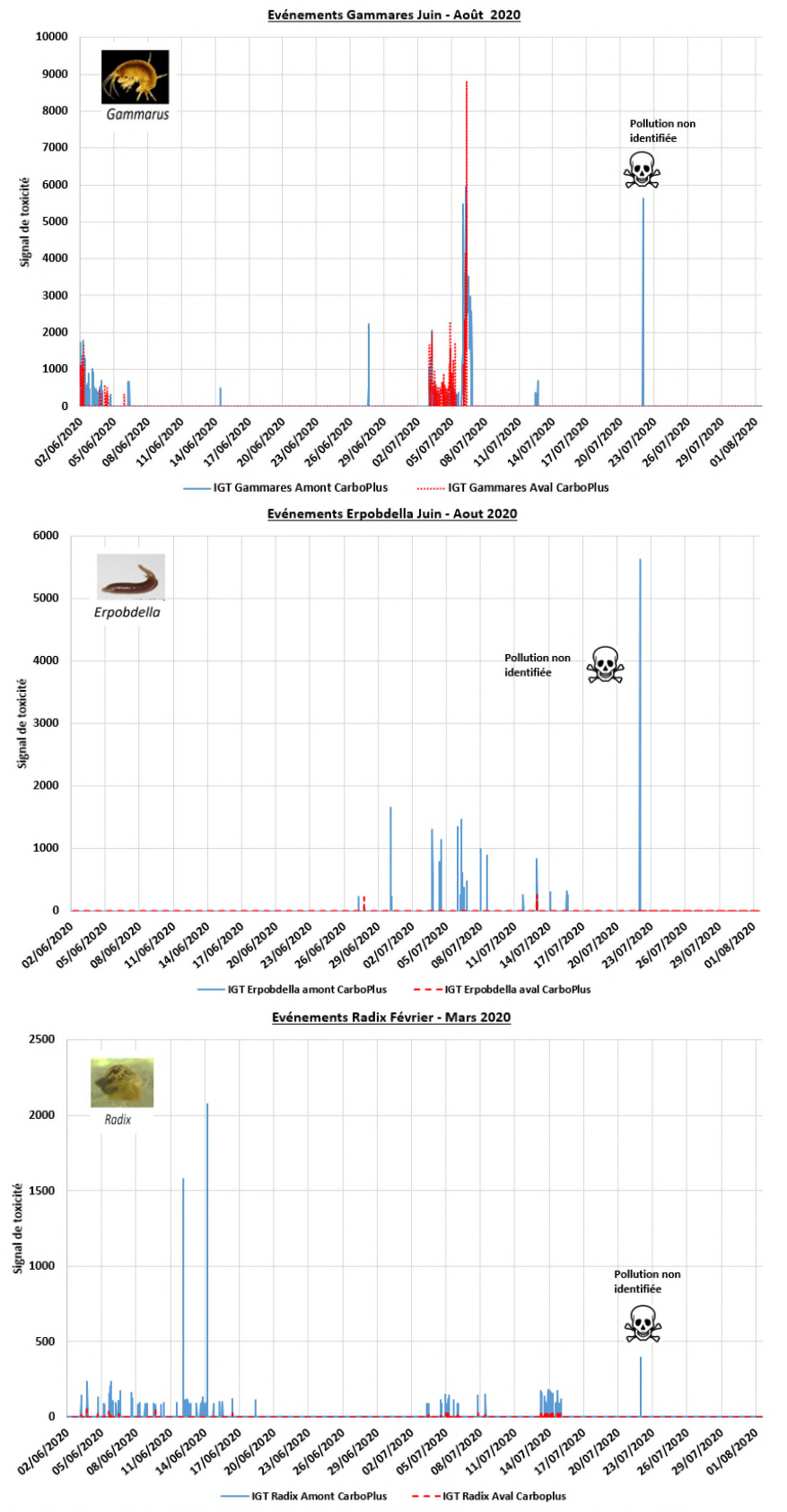


Figure 33 : Suivis Toxmate® de juin à août 2020

4.2.3 Résultats avec les biocapteurs NODE

La limite de quantification (LQ) du biocapteur microbien NODE® est de 10 mg/l en DBO_5 équivalente. En dessous de ce seuil, le biocapteur est en mesure de détecter les variations de charge organique sans pouvoir les corréler quantitativement avec une équivalence en DBO_5. Dans le cadre de cette étude, les concentrations en DBO_5 des effluents testés, en amont et en aval du CarboPlus®, sont très souvent inférieures à ce seuil. Néanmoins, il a été décidé de tester ces capteurs pour observer leurs réponses, en amont et en aval du CarboPlus®, lors d'événements écotoxiques.

La Figure 34 et la Figure 35 montrent deux exemples de signaux collectés pendant cette étude. Les résultats révèlent un abaissement d'environ 20 % et un lissage du signal électrique par le pilote de traitement. Le signal du capteur aval est plus lisse que celui en amont et la majorité des pics observés en amont le sont aussi en sortie mais avec une plus faible intensité, ce qui signifie que le CarboPlus® permet de diminuer les variations et la concentration de la charge organique assimilable. Les capteurs NODE® permettent de suivre l'évolution de la charge organique globale de manière relative même sur des effluents peu chargés, mais ils ne permettent pas de la quantifier.

Les biocapteurs microbiens NODE® apporte une réponse différente voire complémentaire aux autres outils testés (i.e. ToxMate®) dans la détection de pics de pollution dus à des micropolluants mais sur des concentrations beaucoup plus fortes, plus massives que celles qui ont été détectés par la station de biosurveillance Toxmate®. **Les biocapteurs NODE® se montrent beaucoup plus résistants et non réactifs à la pollution dite diffuse.**

Par exemple, lors de la pollution mortelle du 8 février 2020 (pollution qui a induit une mortalité de tous les organismes femelles amont des bancs ex-situ, de tous les organismes amont et aval des Toxmate®, ainsi que les gastéropodes indigènes des canaux en sortie de STEU : Cf. 0 Recherche de corrélation), les capteurs NODE® sont restés imperturbables. Cela met en évidence une différence de sensibilité entre les niveaux trophiques mis en jeu. En effet, le capteur NODE® utilise un ensemble de bactéries indigènes comme indicateur alors que le Toxmate® se sert de macro-invertébrés. Ces deux bioindicateurs ne travaillent pas avec les mêmes métabolismes et ne sont donc pas impactés de la même manière face à une même pollution.

Mais ils peuvent détecter des pollutions exceptionnelles comme un départ de boues.

Par exemple, au mois d'octobre 2019, la pompe de collecte en eau traitée a baissé en régime, le niveau de sécurité bas du bac d'alimentation en eau brute du pilote n'a pas été détecté et de grosses quantités d'air ont été envoyées en bas de la colonne du pilote. Cela a provoqué une remontée du lit de MeS mélangé à des micrograins et une réaction visible sur le capteur NODE® aval, mais rien sur la station biosurveillance. Le signal du capteur NODE® a évolué montrant une augmentation de la charge organique, sans qu'une écotoxicité n'ait été observée.

On notera que ce type d'événement n'est jamais observé sur des ouvrages de taille industrielle et qu'il est lié à la taille de la filière pilote et au ratio taille de bulle/section de colonne. En effet, les bulles étaient pratiquement aussi larges que la section de la colonne. Elles ont donc transporté les MeS ou micrograins qui se trouvaient sur leur passage.

D'autre part, on notera que les capteurs NODE® semblent plus pertinents sur des eaux plus chargées comme l'indique la réponse du 29 janvier 2021 d'un capteur NODE®, positionné sur le canal d'eau brute prétraitée de la STEU de Saint-Fons. Cf Figure 37 : Pollution détectée : biocapteur NODE® et sonde pH sur eau brute STEU avec la détection d'un effluent basique de couleur « violacée ».

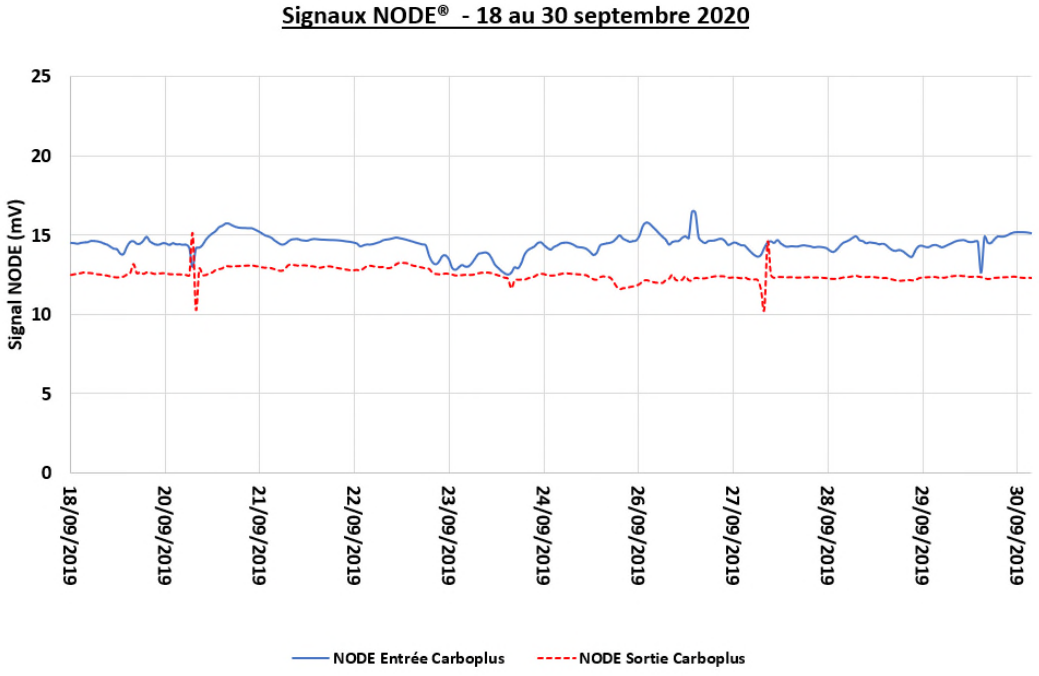


Figure 34 : Signaux Capteurs NODE® - Extrait de septembre 2019

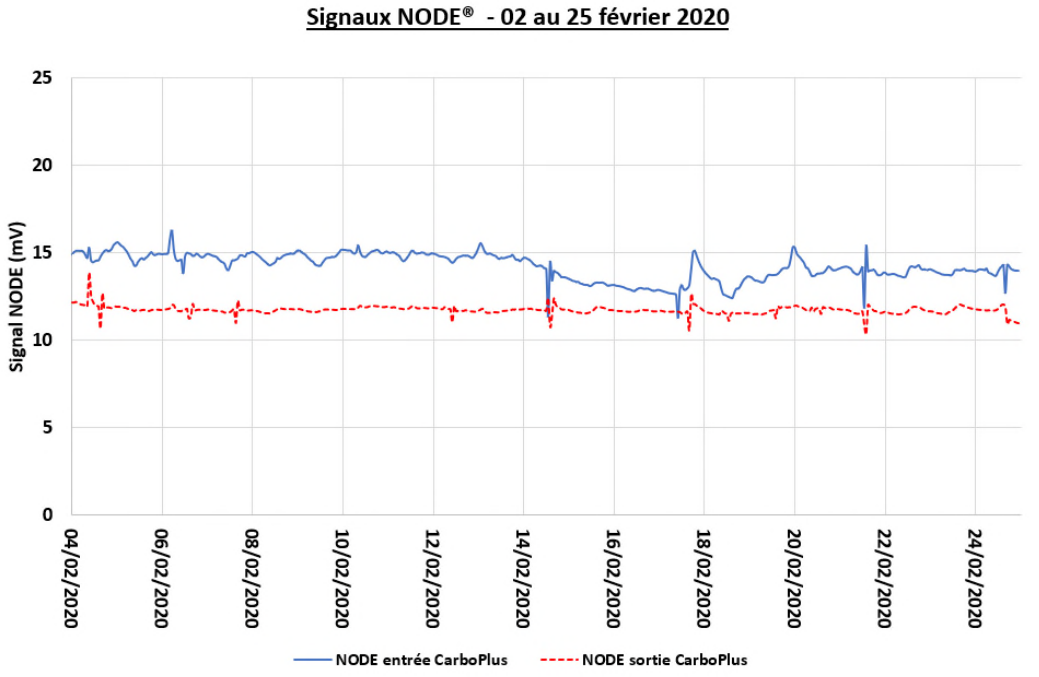


Figure 35 : Signaux Capteurs NODE® - Extrait de février 2020

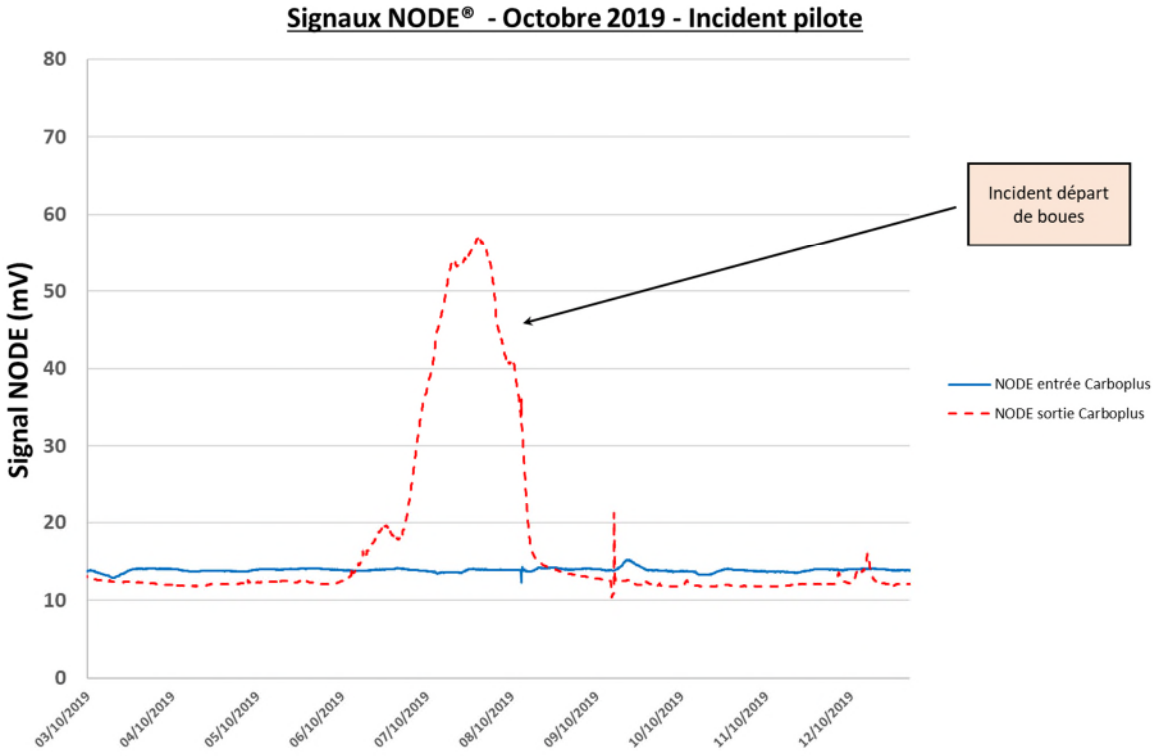


Figure 36 : Incident pilote détecté par le biocapteur NODE®

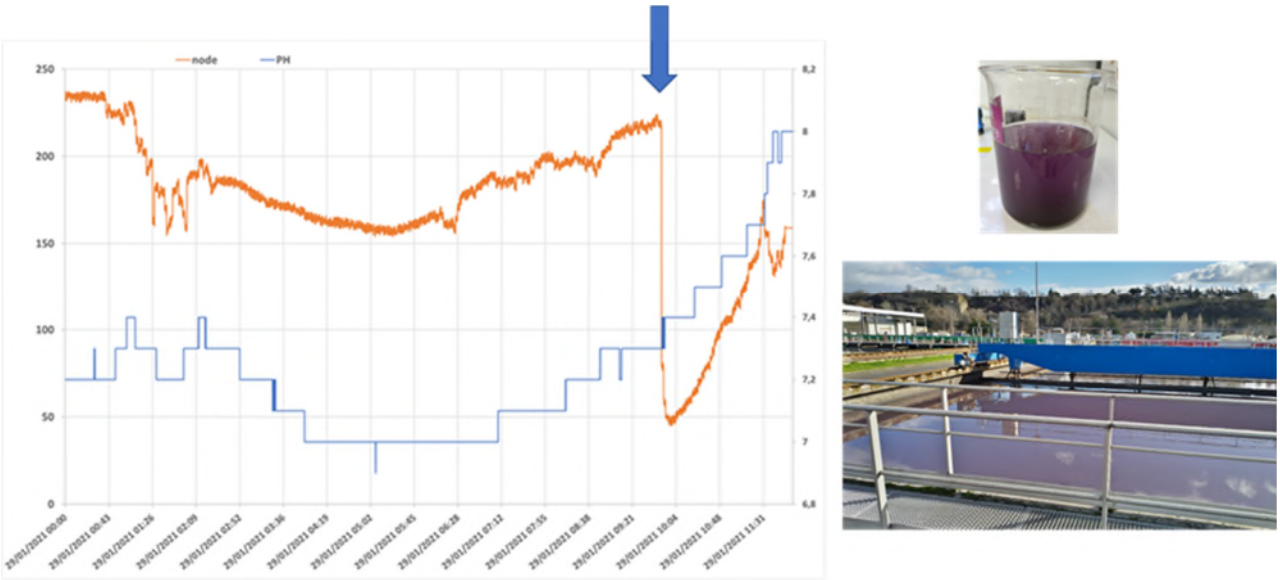


Figure 37 : Pollution détectée : biocapteur NODE® et sonde pH sur eau brute STEU

4.3 Performances sur les micropolluants organiques

Afin de chercher à identifier les micropolluants présents dans les effluents d'étude, des analyses globales ou « signatures spectrales » ont été réalisées en première approche, puis la quantification des molécules détectées, uniquement sur une sélection de prélèvements d'intérêts.

4.3.1 Les analyses globales

Les analyses des signatures ou empreintes spectrales des effluents n'ont pas permis de mettre en évidence une différence métabolique significative entre les échantillons en fonction des jours d'analyses (21 jours par campagne sur trois points, soit 63 échantillons par campagne).

L'analyse statistique multivariée dite analyse en composantes principales (ou ACP) ou la hiérarchisation statistique dite du clustering à partir de plus de 19 000 ions en mode positif, ions détectés en spectrométrie de masse pour chacune des campagnes, ne permettent pas de distinguer un échantillon particulier dans un groupe de même matrice d'eau (eau brute ou eau traitée STEU ou eau sortie pilote).

En revanche, sur la base des empreintes spectrales, on observe clairement un profil métabolique très hétérogène entre ces trois points de prélèvements. Ce qui a surtout l'avantage de montrer la différence de composition chimique entre l'amont et l'aval du traitement tertiaire.

On notera également que dans chaque type d'eau, on retrouve des profils métaboliques assez homogènes, une variabilité de composition chimique assez peu étendue pour chacune des matrices d'eau. Chaque représentation graphique de type ACP (projection des échantillons les uns par rapport aux autres dans un plan à deux dimensions, en maximisant la prise en compte des molécules détectées ou « métabolites » les plus discriminantes entre les échantillons) ne montre pas un prélèvement vraiment très éloigné des autres. La Figure 38 : Projection ACP - Campagne en donne un exemple pour la campagne 3.

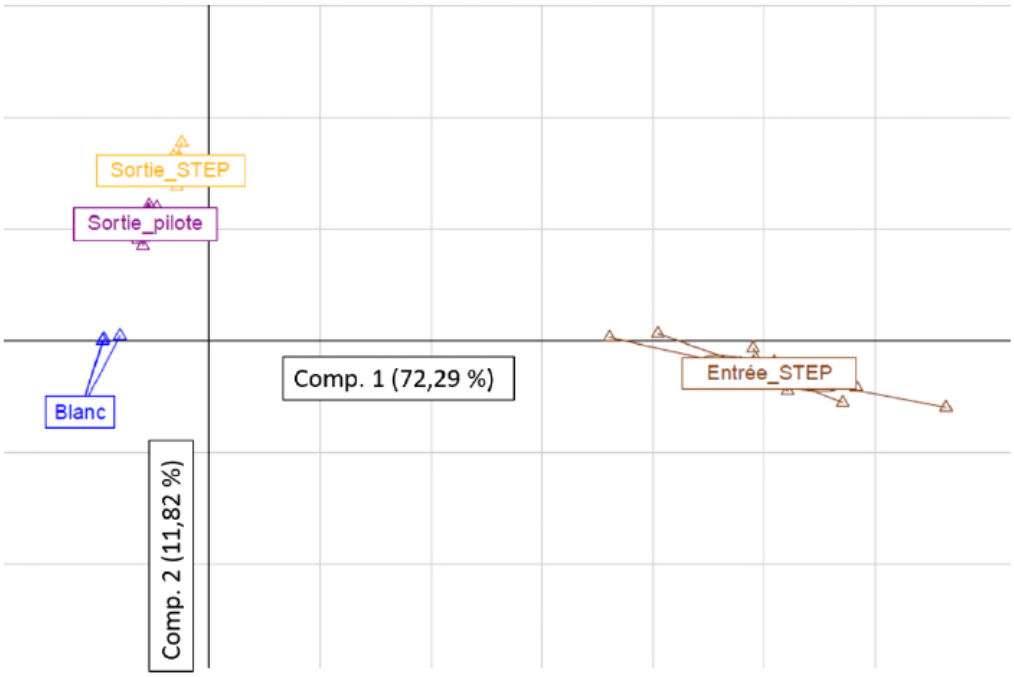


Figure 38 : Projection ACP - Campagne 3

Partant de ce constat systématique sur chaque campagne prise individuellement, la sélection de jours pour réaliser des analyses ciblées s'est faite en fonction des pics de toxicité identifiée par les suivis de biocapteur multi-espèces (le biocapteur le plus réactif) et sur des pools de jours sans pic de toxicité identifiée. Malgré cette sélection, **aucune différentiation nette sur une ou des molécules responsables de pic de toxicité a pu être mis en évidence**, entre les analyses faites les jours de pics de toxicité et les jours sans pic. Les données collectées de chaque analyse d'empreinte spectrale des jours où sont apparus les pics de stress biologiques ont été comparées avec les données des jours sans pics à l'aide de méthodes de machine learning ou de visualisation, mais aucune différentiation nette n'a pu être mis en évidence. Par exemple, le jour de stress du 18 juillet 2019 amène à un constat différentiant très peu significatif, sur quatre composés : le bromo-pyrrolopyridin-amine (antistress, antidépresseur), l'acétyloxy-hydroxy-methyl- pregnan-20-one (progestatif), le phenylethyl glucopyranoside (anticancéreux) et le Phosphorosooxyhexadecane (lubrifiant). Ce qui ne conduit pas à une réponse claire.

4.3.2 Les performances globales

Au cours des trois premières campagnes, 96 molécules ont pu être détectées avec certitude dans la bibliothèque des 850 micropolluants organiques de LODIAG. Les résultats des analyses ciblées de la quatrième campagne ne sont pas encore disponibles.

Performance de la STEU

30 % des molécules détectées en entrée de STEU semblent être éliminées totalement car elles ne sont plus détectables en sortie de STEU.

Les 70% des molécules résiduelles sont peu ou partiellement traitées par la STEU.

70% des molécules détectables en sortie STEU ne le sont plus en sortie du pilote de traitement tertiaire.

En considérant une filière existante plus un traitement tertiaire type Carboplus µG®, 80% des molécules ne sont plus détectables en sortie.

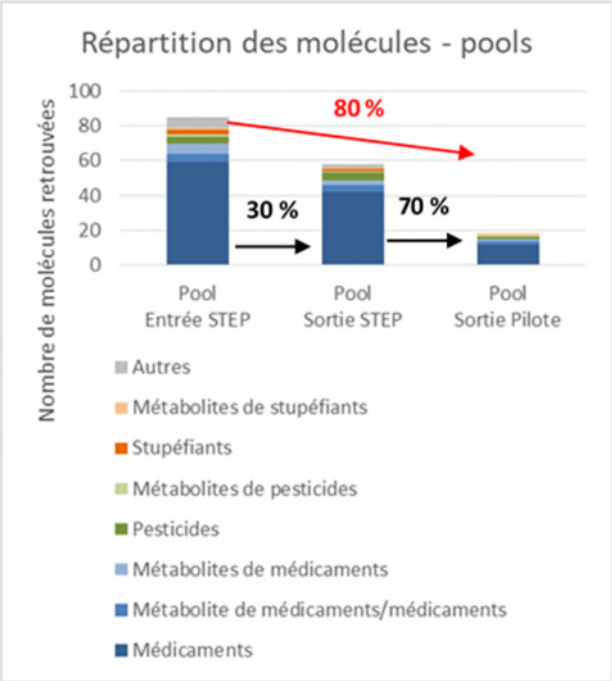


Figure 39 : ratio des molécules qui disparaissent totalement

Un exemple de répartition des molécules détectées dans les effluents est présenté dans la « Figure 40 : Exemple de répartition des molécules – Campagne 3 ». On n'observe pas de disparité entre des jours avec pics de stress biologique (Jours J+1 à 4 : 15 au 18 février 2020) et les jours sans (Jours J et J+5 ou le pool de tous les jours sans pic).

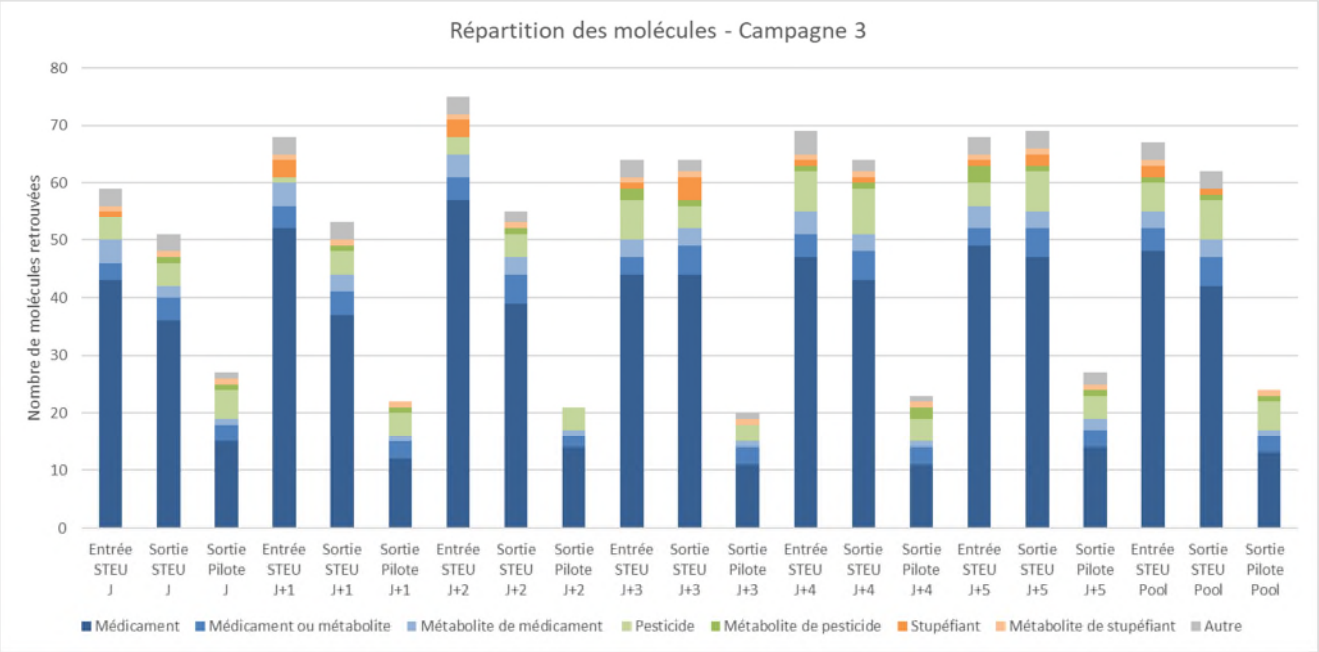


Figure 40 : Exemple de répartition des molécules – Campagne 3

4.3.3 Les performances ciblées

La méthodologie d'analyse du laboratoire LODIAG a imposé un taux de dilution identique pour tous les échantillons. Ainsi la quantification sur les molécules identifiées n'a pas pu être vraiment précise que lorsque les concentrations en molécules étaient inférieurs à 2 µg/l. Lorsque la concentration était mesurée supérieure à 2 µg/l, la valeur a été prise par défaut à 2 µg/l, ce qui conduit, dans ces cas-là, à des abattements calculés minimisés.

L'abattement moyen des molécules détectées (moyenne des abattements observés, molécule par molécule détectée avec certitude) par la STEU est très variable entre 35 et 50%, selon les campagnes.

Les molécules résiduelles en sortie de STEU sont traitées totalement ou partiellement par le traitement tertiaire. L'abattement moyen (moyenne des abattements observés, molécule par molécule détectée avec certitude) par le traitement tertiaire est assez homogène entre 81 et 92% selon les différentes campagnes.

Le Tableau 14 liste les molécules qui semblent disparaître complétement à travers la STEU actuelle. Les calculs sur les abattements en micropolluants à travers une filière complète de STEU sont toujours délicats à annoncer car ils sont basés sur des prélèvements moyens 24h qui ne prennent pas en compte le décalage temporel entre l'entrée et la sortie de la station qui est généralement de plusieurs heures. Le décalage temporel minimum et théorique, basé sur un calcul en flux piston, est largement éloigné de la réalité. Ce décalage théorique sur la STEU de Saint-Fons est au minium de 4 heures par temps de pluie et de 10 h par temps sec. Cela peut expliquer, en partie, les différences d'abattements, qui sont observés soit total soit partiel suivant les campagnes avec des concentrations en entrée similaires. Par exemple, on retrouve de forts décalages d'abattements sur les médicaments comme la metformine (de 1,7 à > 2 µg/l), le périndropilate (80 à 100 ng/l) ou le valsartan (> 2 µg/l).

Les calculs d'abattements sur un traitement tertiaire Carboplus µG® n'amènent pas ce biais de calcul car le temps de séjour hydraulique global est inférieur à 30 min et permet de déclarer des abattements plus proches de la réalité. Les abattements observés sur les molécules résiduelles en sortie de STEU sont illustrés dans la Figure 41, la Figure 42, la Figure 43Figure 43 et la Figure 44

On y retrouve quelques abattements négatifs à travers la STEU à cause des mécanismes de formation de métabolites dans la filière de traitement, sur les molécules suivantes :

- Le dextrophane, métabolite de médicament
- La mélamine, métabolite de pesticide
- L'o-desméthyltramadol, métabolite de médicament
- Le prothioconazole-desthio, métabolite de pesticide

On observe des abattements très variables selon les campagnes lorsque les concentrations sont proches voir inférieurs à 3 à 5 fois la LQ, induisant ainsi à de faibles abattements moyens. Alors qu'on s'éloigne de la LQ, les abattements moyens calculés sont moins variables et plus élevés. C'est le cas par exemple de l'antiviral « Amantadine » avec un abattement sur le traitement tertiaire inférieur à 17 % sur la campagne 1 et total sur la campagne 2.

Tableau 14: Micropolluants organiques totalement abattues par la STEU

Molécules totalement abattues par STEU (µg/l en entrée STEU)				
Molécules	Campagne 1	Campagne 2	Campagne 3	Campagne 4
2-4-Dihydroxybenzophénone	0,225	0,207	0,176	0,146
Aciclovir	1,325	1,280	1,429	1,88
Albendazole		0,004		0,0024
Androstènedione	0,253	0,375	0,456	0,46
Atorvastatine	0,510			
Azithromycine		0,760	0,649	0,084
Azoxystrobine				0,00864
Bétaxolol				0,00252
Boldénone	0,090			0,158
Bupivacaine	0,001			
Butoxide de pipéronyle	1,775	2,2 Abattement = 87,1%	1,714	1,6
Chlortoluron		0,011		
Cilastatine			0,005	0,0104
Ciprofloxacine	0,111	0,220	0,027	0,162
Cortisol	0,060	0,225		0,0704
Cortisone	0,061	0,177	0,019	0,072
Daidzéine	0,430	0,500		0,768
Diazinon				0,0182
Diltiazem	0,020	0,055 Abattement = 23,6%		0,0476
Diosmétine				0,4
Doxépine				0,00084
Enalaprilat				0,0852
Epinephrine			0,286	
Gabapentine	1,825 Abattement = 2%	> 2 Abattement = 0%	0,286 Abattement = 100%	> 2 Abattement = 0%
Metformine	> 2 Abattement = 100%	> 2 Abattement = 33%	1,714 Abattement = 100%	> 2 Abattement = 27%
Méthylprednisolone				0,0064
Naftidrofuryl				0,00108
Néostigmine			0,006	
Nicardipine				0,0118
Oméprazole		0,120		
Oseltamivir				0,0022
Paracétamol	> 2	> 2	> 2	> 2
Pristinamycine IIA	0,061	0,156	0,067	0,0196
Progestérone	0,193	0,233	0,367	0,428
Prothioconazole			0,286	0,4
Pseudoéphédrine			0,023	
Quétiapine		0,120		0,0904
Quinine				0,019
Quinmérac				0,006
Ramipril				0,052
Ritonavir		0,470	0,109	
Sertraline				0,0774
Spiramycine		0,443	0,720	
Sulfapyridine	0,105	0,180	0,019	0,214
Trimébutine		0,021		0,00336
Valaciclovir			0,143	

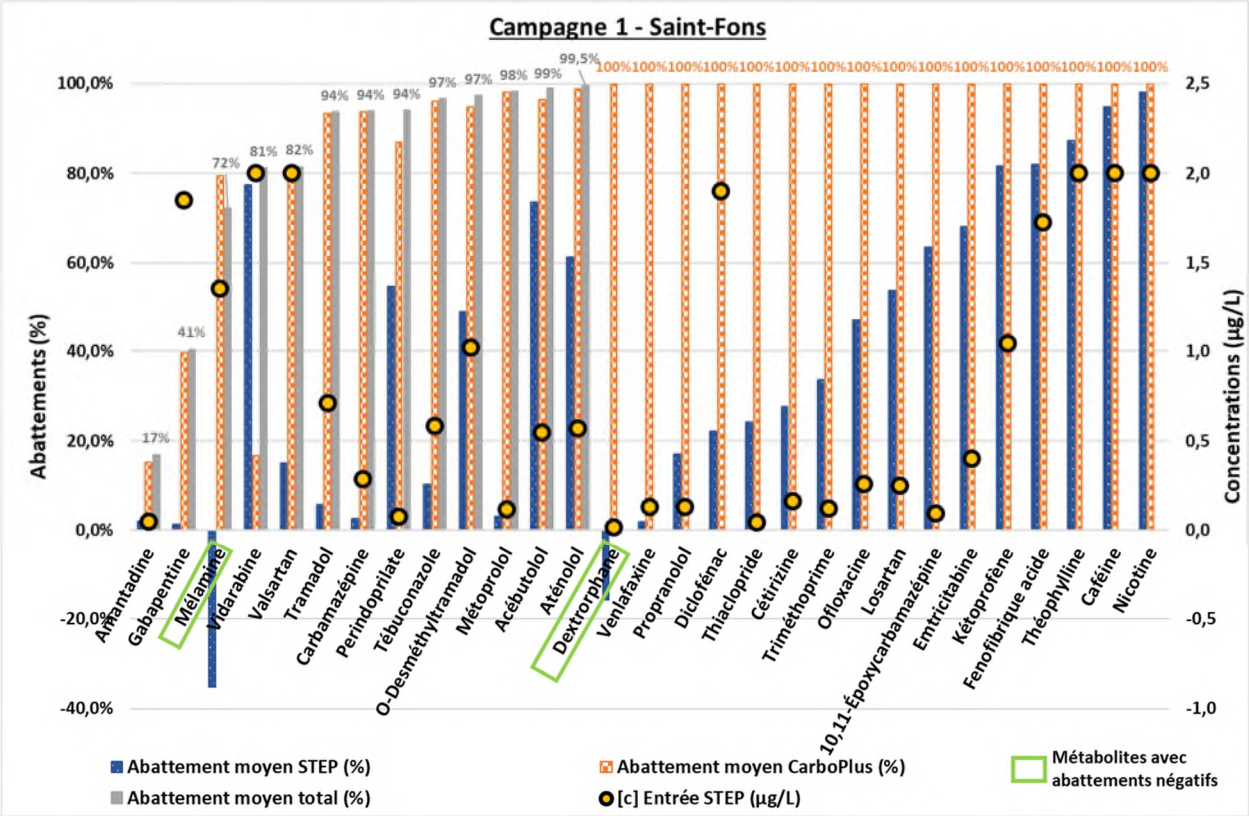


Figure 41 : Performances du Carboplus µG sur les micropolluants organiques – Campagne 1

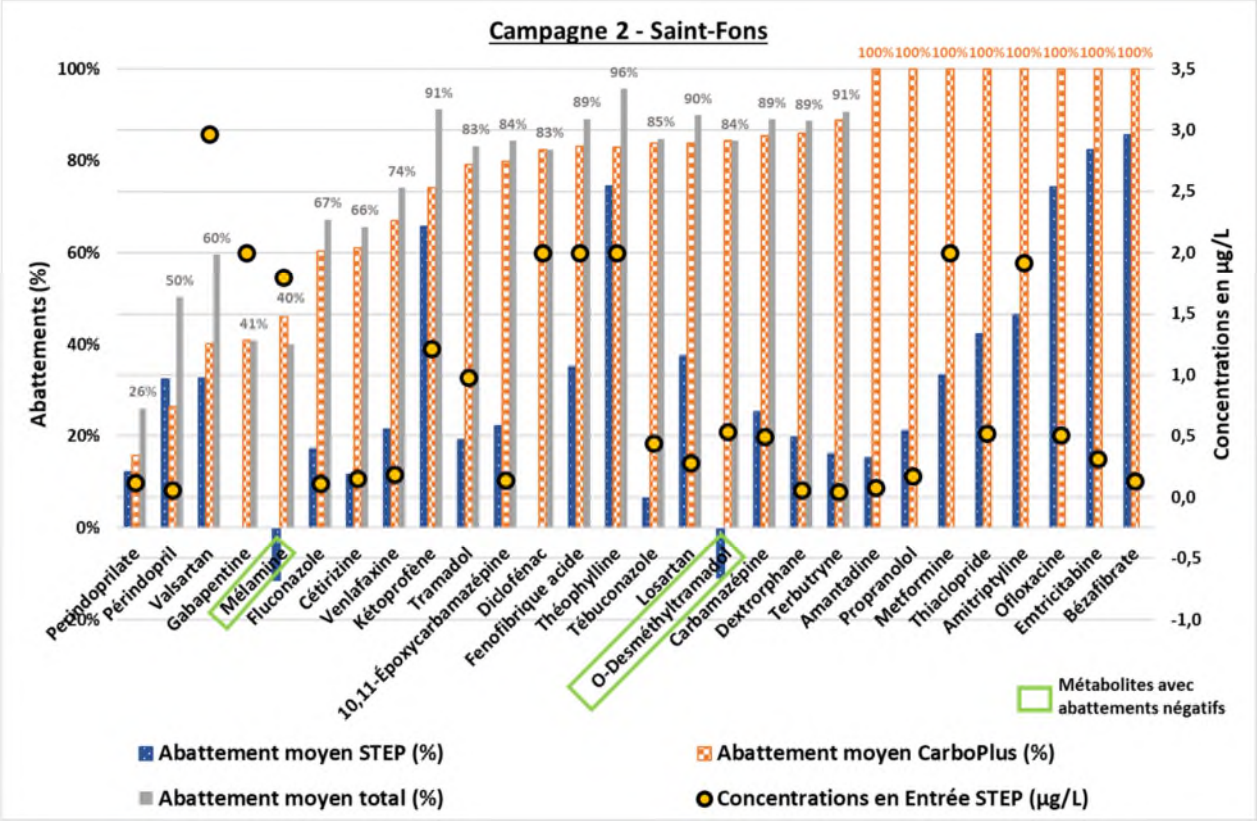


Figure 42 : Performances du Carboplus µG sur les micropolluants organiques – Campagne 2

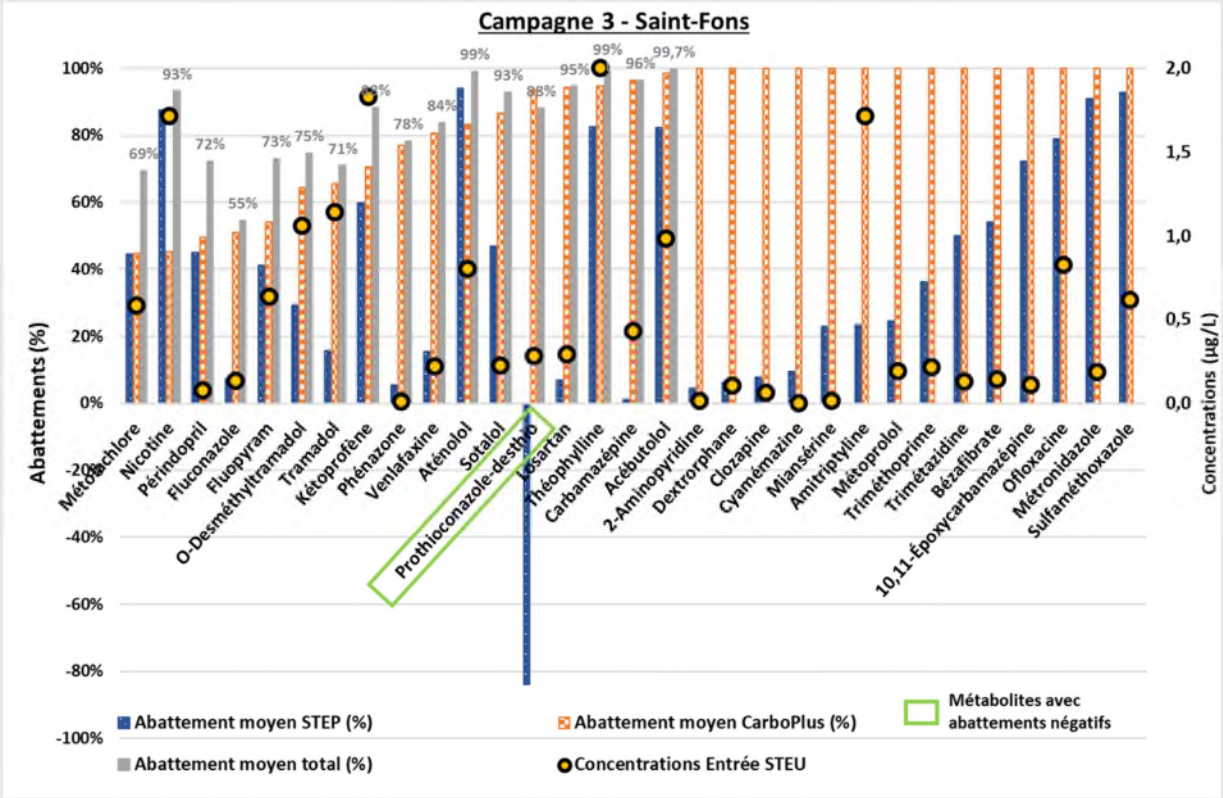


Figure 43 : Performances du Carboplus µG sur les micropolluants organiques – Campagne 3

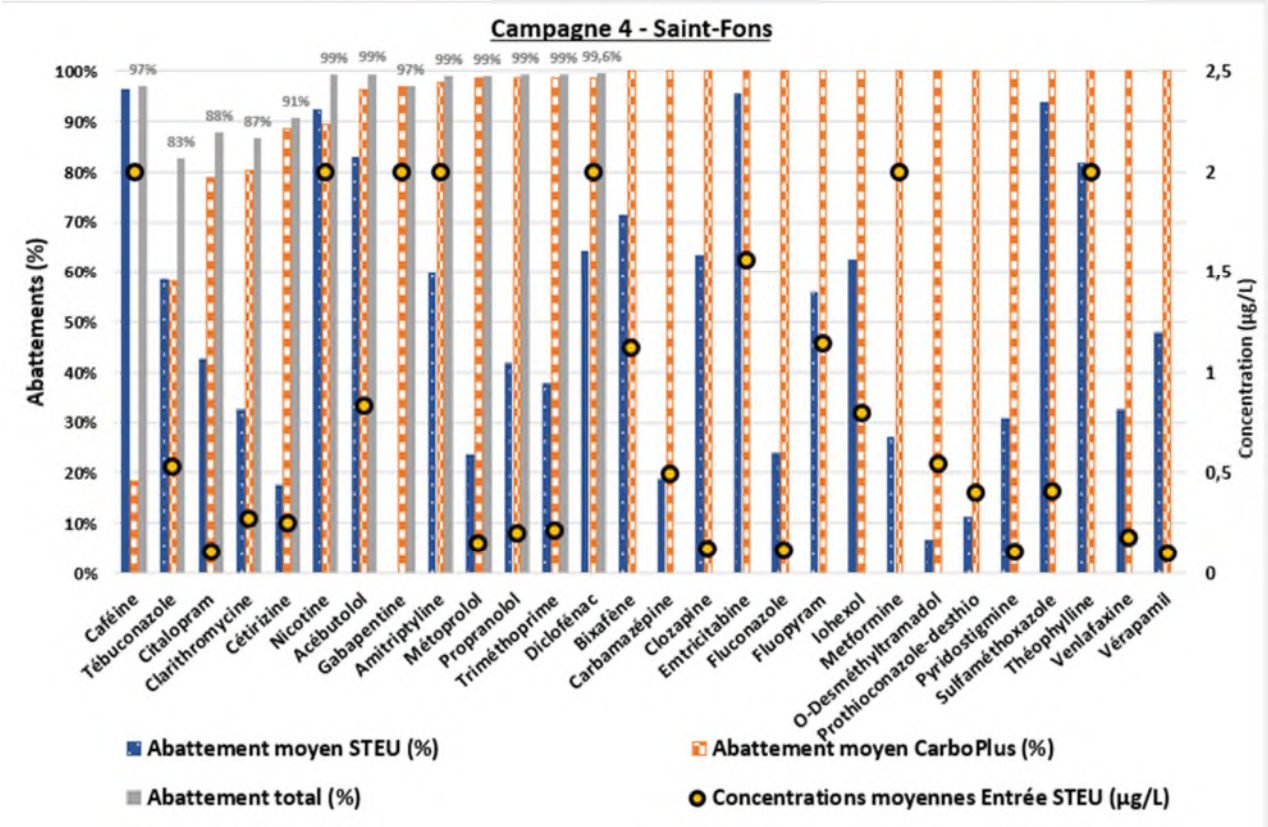


Figure 44: Performances du Carboplus µG sur les micropolluants organiques - Campagne 4

5 Conclusion

Les performances d'élimination des micropolluants organiques par la STEU et un procédé de traitement tertiaire d'affinage par adsorption sur micrograin fluidisé de type Carboplus µG® ont pu être évaluées à partir d'analyses chimiques mais également à partir de différents bioessais.

Les résultats des essais montrent le fort intérêt de la mise en place d'outils de surveillance biologique et la mise en place d'un traitement tertiaire dédié au traitement de micropolluants organiques, pour la protection de la vie aquatique, même sur une eau traitée STEU qui reste conforme aux attentes réglementaires.

Les analyses chimiques réalisées dans le cadre de cette étude ne sont pas exhaustives mais ont permis d'identifier avec certitude la présence d'une centaine de molécules dans les trois types d'effluents étudiés : entrée STEU, entrée et sortie du traitement tertiaire, parmi de nombreuses autres molécules certainement présentes mais « cachées » dans le bruit de fond analytique ou non analysées par la chaîne analytique mise en œuvre. Les analyses chimiques sur prélèvements moyens 24h ne présentent qu'un aspect lissé des pollutions auxquelles ont été confrontés les bioessais mis en place. Les concentrations analysées ne sont donc que des valeurs très minimisées des pics de pollution détectés par les bioessais en ligne.

Les outils biologiques, permettant d'intégrer l'ensemble des contaminants présents, ont montré leurs limites mais aussi leurs **capacités à réagir** face aux pollutions dues aux micropolluants alors que les capteurs en ligne et les analyses chimiques restent complétement aveugles. Ils montrent clairement leur **complémentarité** par rapport à des surveillances phycico-chimique ou optiques classiques, ou bien sur tous les types de campagnes d'analyses chimiques qui peuvent être menées sur site (prélèvements moyens 24h ou analyses ponctuelles). Les **sources des pics de contamination détectés restent cependant très difficiles à identifier**, car il a été impossible de corréler un pic avec la présence d'un micropolluant particulier, avec les protocoles mis en place.

L'écotoxicité des effluents a pu être étudiée et évaluée par les 3 outils biologiques mis en place durant cette étude.

- Les **bancs tests ex-situ de l'INRAE-Lyon**, :
  - Ces tests, exposant des populations de gammares en conditions de vie contrôlées, restent des bioessais réservés à la recherche sur l'écotoxicologie et n'auront pas de réalité industrielle en l'état. Mais les travaux menés dans le cadre de ce projet ont mis en évidence plusieurs sorties claires en lien avec le traitement des effluents par le Carboplus µG®
  - Concernant le niveau de contamination biodisponible des effluents et son abattement, les résultats obtenus montrent une nouvelle fois que les contaminants suivis actuellement pour la surveillance des milieux aquatiques et pour lesquels des méthodes analytiques sont aujourd'hui disponibles, ne sont pas les composés les plus pertinents à suivre dans les rejets, même si les caractéristiques physico-chimiques des eaux traitées peuvent également expliquer les faibles biodisponibilités observées. Les résultats confirment la nécessité d'élargir la recherche et les travaux sur la mesure dans le biote de composés plus émergents tels que les composés pharmaceutiques, les composés perfluorés ou encore certains pesticides.
  - L'utilisation des outils biologiques, permettant d'intégrer l'ensemble des contaminants présents a montré une nouvelle fois que le taux d'alimentation, comme réponse globale, répond de façon la plus sensible et le plus fréquemment. En accord avec ce que l'on observe en surveillance des milieux aquatiques, c'est la réponse biologique qui permet de discriminer le plus facilement les conditions testées. La mesure du taux d'alimentation a clairement permis de mettre en évidence l'impact des composés chimiques présents dans les eaux traitées, mais également l'action bénéfique du procédé Carboplus µG®.
  - Les réponses moléculaires, sont rarement modulées, avec une fréquence faible.
  - Enfin ces travaux, comme observé lors de précédentes études, ont montré un effet spécifique des eaux traitées en STEU sur le cycle de mue, sur lequel le traitement Carboplus µG® n'a pas d'effet. Ces résultats questionnent la présence de perturbateurs endocriniens des crustacés et sont à mettre en regard de la modulation observée de l'activité CE. Toutefois, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour écarter l'effet confondant de macropolluants ponctuellement présents à de fortes teneurs sur cette STEU.

- Les **biocapteurs microbiens de type NODE ®** ont montré un effet bénéfique du traitement tertiaire sur la charge organique assimilable et la variabilité de celle-ci, sans qu'on puisse la quantifier. Ils se sont montrés plus résistants aux grosses pollutions détectées car ils sont basés sur une population bactérienne endogène, moins réactifs aux pollutions peu marquées, diffuses ou bien celles qui n'affectent pas leur niveau trophique (les crustacés ou gastéropodes peuvent réagir sur de faibles pollutions jusqu'à mourir alors que la biomasse des capteurs microbiens résiste ou s'adapte). Ces biocapteurs semblent plus adaptés aux eaux plus chargées.
- Les **stations de biosurveillance multi-espèces par vidéo-tracking type Toxmate®** ont permis la détection de nombreuses dégradations de la qualité des effluents amont du traitement tertiaire, qui ont été très majoritairement atténués ou éliminés par le procédé de traitement tertiaire. Ils travaillent avec une réactivité similaire aux sondes physico-chimiques et une fréquence de maintenance compatible avec une exploitation de STEU (une fois par mois). Ce type de sonde biologique se montre être un **outil pertinent pour une biosurveillance en continu d'eaux usées traitées, d'alerte et d'aide à la décision.**

L'étude sur les micropolluants est prolongée sur le site de Saint-Fons, à l'occasion d'une **phase 2 de l'étude**, avec une participation financière de l'AE RMC afin de :

- Proposer un indicateur de contamination facilement interprétable par l'exploitant en supervision permettant de regrouper la réponse des trois espèces en **un seul signal global** et d'évaluer son niveau de gravité :
  - Niveau 1 = pas de risque d'écotoxicité ;
  - Niveau 2 = risque moyen d'écotoxicité ;
  - Niveau 3 = risque fort d'écotoxicité,
- Permettre la collecte systématique de prélèvements sur des événements importants, et non sur des prélèvements moyens, afin d'avoir plus de chance d'identifier les micropolluants responsables de stress, et ainsi, proposer une investigation plus poussée sur les origines possibles des pics de pollutions détectés
- Amener l'outil vers une solution d'alerte et de diagnostic transposable sur tout type de STEU.