Université Aix Marseille

TITRE :

Traitement des effluents d'un service d'oncologie par bioréacteur à membranes : faisabilité d'acclimatation et gain apporté sur l'élimination de molécules médicamenteuses

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE AIX MARSEILLE

Faculté des Sciences et Techniques

Discipline : Génie des procédés

Pierre HAMON

Directeur de thèse : Benoît MARROT

Ecole Doctorale : Sciences de l'environnement

JURY

Marc DAUMAS	Responsable du site de production, Sanofi Aramon	(Invité)
Lionel ERCOLEI	Directeur, Société des Eaux de Marseille	(Invité)
Christelle GUIGUI	Maître de conférences HDR, INSA Toulouse	(Rapporteur)
Ivan MARC	Directeur de Recherche CNRS	(Examinateur)
Benoît MARROT	Professeur, Université Aix Marseille	(Directeur de thèse)
Philippe MOULIN	Professeur, Université Aix Marseille	(Examinateur)
Christelle WISNIEWSKI	Professeur, Université Montpellier I	(Rapporteur)

Remerciements

Cette thèse n'aurait probablement pas pu aboutir sans le soutien de nombreux intervenants que je souhaite remercier.

Mes remerciements vont tout d'abord à la Société des Eaux de Marseille et plus particulièrement à Lionel Ercolei, directeur à la Direction Générale, et Edouard Rouanet, directeur des Services Techniques, pour la confiance, le suivi régulier ainsi que l'appui logistique et moral qu'ils m'ont apporté tout au long du projet.

J'adresse mes plus profonds remerciements à Benoît Marrot, mon directeur de thèse. Au-delà de l'aspect scientifique sur lequel j'ai évidemment progressé grâce à sa maîtrise de la thématique, je tiens surtout à mentionner sa méthode d'encadrement. Benoît parvient parfaitement à allier relation de travail et le côté humain, il sensibilise au maximum le thésard à son travail, lui transmet sa confiance et est d'un soutien moral indispensable dans les moments critiques liés à l'exploitation continue du pilote. Je compte bien m'inspirer de lui dans le futur ! Je me remémorerai également avec un large sourire certaines de nos conversations !

Je remercie aussi vivement Philippe Moulin, responsable de l'équipe procédés membranaires. Je tiens à souligner les qualités humaines de Philippe, toujours présent pour apporter ses bonnes idées et son soutien dans les moments compliqués. Philippe a un véritable don pour transmettre son énergie à son équipe, un vrai moteur ! « A 'ment donné » sa vision optimiste m'a permis d'envisager les résultats obtenus lors de cette thèse sous un nouvel angle et ainsi de les apprécier et de mieux les valoriser.

Je souhaite également remercier Christelle Wisniewski et Christelle Guigui pour leurs rapports très intéressants qui vont me permettre d'affiner les interprétations des résultats sous de nouveaux aspects. Je remercie sincèrement Marc Daumas pour avoir apporté un jugement industriel à mon travail ainsi qu'Ivan Marc pour avoir accepté de présider mon jury.

Je tiens à remercier tous les membres de la Société des Eaux de Marseille et de l'hôpital de la Timone qui sont intervenus de près ou de loin sur ce projet. Un grand merci à Bruno

Lacarelle, responsable du laboratoire de pharmacocinétique et de toxicologie, et à Sylvie Quaranta, responsable de l'HPLC, pour avoir permis ma formation aux techniques analytiques et avoir mis à disposition les appareils.

Je remercie tous les membres du laboratoire M2P2 et, en particulier, Jean Paul Nisteron pour sa disponibilité, sa bonne humeur infaillible et ses bonnes idées pour réparer des situations compliquées. Je tiens à remercier spécifiquement quelques doctorants, devenus amis, que j'ai côtoyés au cours de ces 3 années et que je ne suis pas prêt d'oublier : Camille, Greg, John, Maud et Nico. Merci à vous pour avoir rendu ces trois années très plaisantes, merci pour le réconfort, les brainstormings (mais oui !), tout le reste et … à bientôt bien sûr! Bon courage à ceux qui sont entrain de conclure, c'est intense jusqu'à la fin (rassurant n'est-ce pas ?) !

Je tiens bien sûr à remercier ma famille qui a su me remonter le moral dans les moments difficiles et mes amis qui sont ravis de pouvoir m'appeler Dr ! Enfin, un grand merci à Delphine qui a su me supporter et me réconforter au cours de ces trois années parfois difficiles. Merci d'avoir fait les trajets en train puisque j'étais bloqué avec le pilote, merci pour ta patience et ton soutien infaillible !

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 7

I.1. LA PRESENCE DE RESIDUS MEDICAMENTEUX DANS L'ENVIRONNEMENT 8

I.1.1. LA FRANCE NE FAIT PAS EXCEPTION 8
I.1.2. RISQUES ASSOCIES A LA PRESENCE DE RESIDUS MEDICAMENTEUX DANS L'ENVIRONNEMENT 10
I.1.2.1. UNE EVALUATION DELICATE 10
I.1.2.2. RISQUES POUR L'HOMME 12
I.1.2.3. RISQUES POUR LA FAUNE 13
I.1.2.4. MANAGEMENT DES RISQUES SUR LE COURT ET LONG TERME 15
I.1.3. UNE THEMATIQUE DYNAMIQUE 17
I.1.3.1. UNE LEGISLATION EN EVOLUTION 17
I.1.3.2. LES ACTIONS MENEES A L'ECHELLE NATIONALE 18
I.1.3.3. LA RECHERCHE SUR TOUS LES FRONTS 19
I.1.4. PROVENANCE DES RESIDUS MEDICAMENTEUX DANS L'ENVIRONNEMENT 22
I.1.4.1. LES SOURCES DIFFUSES 23
I.1.4.2. LES SOURCES PONCTUELLES 23

I.2. LES EFFLUENTS HOSPITALIERS : CONTRIBUTION A LA POLLUTION MEDICAMENTEUSE ET SPECIFICITES 25

I.2.1. CONSOMMATION DE MEDICAMENTS DANS LES HOPITAUX 25
I.2.2. CARACTERISTIQUES DES EFFLUENTS HOSPITALIERS 25
I.2.2.1. CONSOMMATION EN EAU 26
I.2.2.2. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES 27
I.2.2.3. CARACTERISTIQUES MICROBIOLOGIQUES 27
I.2.2.4. MICROPOLLUANTS 28
I.2.3. ECOTOXICITE - RISQUES ENVIRONNEMENTAUX DES EFFLUENTS HOSPITALIERS 29
I.2.4. UNE LEGISLATION INSUFFISANTE 31
I.2.5. LE TRAITEMENT A LA SOURCE DES EFFLUENTS HOSPITALIERS : DES AVIS DIVERGENTS 32
I.2.6. VERS UN TRAITEMENT LOCALISE DES SUBSTANCES SPECIFIQUES AUX ETABLISSEMENTS DE SOINS ? 34

I.3. PERFORMANCES DES PROCEDES DE TRAITEMENT SUR L'ELIMINATION DES RESIDUS MEDICAMENTEUX 37

I.3.1. PROCEDES PHYSICO-CHIMIQUES 37
I.3.2. PROCEDES BIOLOGIQUES CONVENTIONNELS 37
I.3.2.1. BOUES ACTIVEES 37
I.3.2.2. LAGUNAGE / FILTRES PLANTES 39
I.3.3. BIOREACTEUR A MEMBRANE 40
I.3.3.1. GENERALITES 40
I.3.3.2. CONFIGURATIONS 41
I.3.3.3. COMPARAISON DES CONFIGURATIONS 43
I.3.3.4. COMPARAISON STEP / BAM SUR L'ELIMINATION DES RESIDUS MEDICAMENTEUX 44

I.4. ELIMINATION DES RESIDUS MEDICAMENTEUX PAR LES PROCEDES A BOUES ACTIVEES ET IMPACT SUR LA BIOMASSE EPURATRICE 48

I.4.1. MECANISMES D'ELIMINATION DES RESIDUS MEDICAMENTEUX DANS LES PROCEDES A BOUES ACTIVEES ... 48
I.4.1.1. BIOTRANSFORMATION ... 49
I.4.1.2. SORPTION ... 51
I.4.2. IMPACT DES RESIDUS MEDICAMENTEUX SUR LES PROCEDES A BOUES ACTIVEES ... 54

I.5. CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS 57

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES 61

II.1. SELECTION, METHODE D'ANALYSE ET PROPRIETES CHIMIQUES DES MEDICAMENTS D'INTERET POUR L'ETUDE 62

II.1.1. DEMARCHE SELECTIVE ... 62
II.1.2. CARACTERISTIQUES DES MEDICAMENTS CIBLES ... 63
II.1.2.1. FLUOROURACILE ... 63
II.1.2.2. CYCLOPHOSPHAMIDE ... 64
II.1.2.3. IFOSFAMIDE ... 65
II.1.2.4. SULFAMETHOXAZOLE ... 65
II.1.2.5. CODEINE ... 66
II.1.2.6. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES MEDICAMENTS SELECTIONNES ... 66
II.1.3. CONCENTRATIONS DANS DIFFERENTES MATRICES DES MEDICAMENTS SELECTIONNES ... 67
II.1.4. ANALYSE DES MEDICAMENTS SELECTIONNES ... 68
II.1.4.1. FLUOROURACILE ... 68
II.1.4.2. CYCLOPHOSPHAMIDE, IFOSFAMIDE, SULFAMETHOXAZOLE ET CODEINE ... 70

II.2. CARACTERISATION INITIALE DES EFFLUENTS HOSPITALIERS 70

II.2.1. ORIGINE DES EFFLUENTS HOSPITALIERS ET PRETRAITEMENTS ... 70
II.2.2. STRATEGIES DE PRELEVEMENTS DES EHO ... 71
II.2.2.1. 1ERE STRATEGIE – PERIODE DU 0 AU 40E JOUR DE LA 1ERE CAMPAGNE EXPERIMENTALE ... 71
II.2.2.2. 2NDE STRATEGIE DE PRELEVEMENT ... 74

II.3. LE BIOREACTEUR A MEMBRANE 74

II.3.1. FONCTIONNEMENT DU BAM PILOTE ... 74
II.3.2. ORIGINE DES BOUES ACTIVEES ... 79

II.4. LES EQUIPEMENTS ET PROCEDURES DE SECURITE 79

II.5. LES OUTILS ANALYTIQUES 80

II.5.1. LES OUTILS ANALYTIQUES POUR LE SUIVI DES ACCLIMATATIONS ... 80
II.5.1.1. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS ... 80
II.5.1.2. MESURE DES MES ET DES MVS ... 80
II.5.1.3. ANALYSE DE LA DCO ... 81
II.5.1.4. ANALYSE DE LA DBO_5 ... 81
II.5.1.5. ANALYSE DE L'AMMONIUM ET DES NITRATES ... 81
II.5.2. LES TESTS RESPIROMETRIQUES ... 82

II.5.3. ANTIBIOGRAMMES 83
II.5.3.1. PRINCIPE 83
II.5.3.2. PROTOCOLE ANALYTIQUE 84
II.5.3.3. INTERPRETATION DES RESULTATS 85

II.6. INHIBITION APPROPRIEE DES BOUES ACTIVEES POUR LA REALISATION DE TESTS DE SORPTION 86

II.6.1. AVANT-PROPOS 86
II.6.2. RESPIRATION DES BOUES INHIBEES 89
II.6.3. REACTIFS CHIMIQUES 89
II.6.4. METHODE THERMIQUE 89
II.6.5. TECHNIQUE DE LA PURGE A L'AZOTE 89
II.6.6. TESTS D'ELIMINATION DE LA DCO ET DE L'AMMONIUM 90
II.6.7. BIOREACTEUR ET DISPOSITIF POUR LA RHEOLOGIE 90
II.6.8. CARACTERISATION DES BOUES ACTIVEES 91

CHAPITRE III FAISABILITE DU TRAITEMENT DES EFFLUENTS D'UN SERVICE D'ONCOLOGIE PAR BIOREACTEUR A MEMBRANES : ACCLIMATATION DE BOUES ACTIVEES ET ELIMINATION DES MEDICAMENTS CIBLES. 93

III.1. ACCLIMATATION D'UNE BIOMASSE DE BAM_E AUX EFFLUENTS D'UN SERVICE D'ONCOLOGIE. CAS DE L'ANTICANCEREUX FLUOROURACILE. 94

III.1.1. CONDITIONS DE L'ACCLIMATATION 94
III.1.2. DEVELOPPEMENT DE LA BIOMASSE 97
III.1.3. PERFORMANCES EPURATOIRES 100
III.1.3.1. ELIMINATION DE LA DCO 100
III.1.3.2. ELIMINATION DE LA POLLUTION AZOTEE 101
III.1.3.2.1. Nitrification 101
III.1.3.2.2. Dénitrification 103
III.1.3.3. CONSOMMATION D'OXYGENE 106
III.1.3.4. COLMATAGE MEMBRANAIRE 108
III.1.4. QUANTIFICATION DE L'ACCLIMATATION 112
III.1.4.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES 112
III.1.4.2. ACQUISITION D'UNE RESISTANCE AUX MEDICAMENTS PAR LE TRAITEMENT A LA SOURCE DES EHO ? 114
III.1.5. PERFORMANCES DU BAM_E SUR L'ELIMINATION DU 5-FU 116
III.1.5.1. DETECTION DU 5-FU DANS LES EHO 116
III.1.5.2. ELIMINATION DU 5-FU PAR LE BAM_E 117
III.1.5.3. COMPARAISON BAM_E HOPITAL / STEP CONVENTIONNELLE SUR L'ELIMINATION DU 5-FU 120
III.1.6. CONCLUSION 123

III.2. ACCLIMATATION D'UNE BIOMASSE DE BAM_{IE} AUX EFFLUENTS D'UN SERVICE D'ONCOLOGIE. CAS DE L'IFOSFAMIDE, DU CYCLOPHOSPHAMIDE, DU SULFAMETHOXAZOLE ET DE LA CODEINE. 125

III.2.1. CONDITIONS DE L'ACCLIMATATION 125
III.2.2. PERFORMANCES GLOBALES DU BAM_{IE} 127
III.2.3. CONSOMMATION D'OXYGENE 135
III.2.4. COLMATAGE MEMBRANAIRE 138

III.2.5. ANTIBIORESISTANCE....142
III.2.6. QUANTIFICATION DE L'ACCLIMATATION....146
III.2.6.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES....146
III.2.6.2. INFLUENCE DE LA CHARGE MASSIQUE ET DU TYPE DE SUBSTRAT SUR LES PERFORMANCES DE LA BIOMASSE DU BaM_{IE} 147
III.2.7. PERFORMANCES DU BaM_{IE} HOPITAL SUR L'ELIMINATION DES MEDICAMENTS CIBLES....150
III.2.7.1. DETECTION DANS LES EHO....150
III.2.7.2. ELIMINATION PAR LE BaM_{IE} HOPITAL....152
III.2.7.2.1. Suivi de l'élimination des médicaments sélectionnés....152
III.2.7.2.2. Comparaison avec d'autres études....161
III.2.7.3. MECANISMES D'ELIMINATION DES MEDICAMENTS SELECTIONNES....165
III.2.7.3.1. Détermination de la technique d'inhibition des boues activées appropriée pour la réalisation des tests de sorption....165
III.2.7.3.2. Sorption....169
III.2.7.3.3. Biotransformation....175
III.2.8. CONCLUSION....184

III.3. SYNTHESE DES DEUX CAMPAGNES EXPERIMENTALES 186

III.3.1. CAPACITES D'ADAPTATION DE LA BIOMASSE EPURATRICE AUX EHO ET INHIBITION RESIDUELLE....186
III.3.1.1. LA CHARGE MASSIQUE, PARAMETRE CLE POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA BIOMASSE....186
III.3.1.2. DENITRIFICATION ET TENSIOACTIFS....190
III.3.2. GAIN APPORTE SUR L'ELIMINATION DES MEDICAMENTS....191
III.3.3. ACQUISITION D'UNE RESISTANCE DE LA BIOMASSE AUX MEDICAMENTS : QUELS ENJEUX ?....193

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 196

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 208

NOMENCLATURE 233

ANNEXES 236

ANNEXE II-1 : LISTE DES MEDICAMENTS HUMAINS ET DE LEURS METABOLITES ACTIFS PRIORITAIRES A RECHERCHER DANS LES EAUX (AFFSA, 2008)....237
ANNEXE II-2 : CONCENTRATIONS DES MEDICAMENTS SELECTIONNES DANS LES EFFLUENTS HOSPITALIERS....238
ANNEXE II-3 : CONCENTRATIONS DES MEDICAMENTS SELECTIONNES DANS LES EAUX USEES URBAINES....239
ANNEXE II-4 : CONCENTRATIONS DES MEDICAMENTS SELECTIONNES DANS LES EAUX DE SURFACE....240
ANNEXE II-5 : CONDITIONS DE FONCTIONNEMENT CHOISIES EN FONCTION DE LA CM....241
ANNEXE II-6 : EQUIPEMENTS DE PROTECTION INDIVIDUELLE ET SUR L'INSTALLATION....241
ANNEXE II-7 : COURBE D'ETALONNAGE DE LA DCO....242
ANNEXE II-8 : COURBE D'ETALONNAGE DE L'AMMONIUM....242
ANNEXE II-9 : COURBE D'ETALONNAGE DES NITRATES....242
ANNEXE II-10 : CORRELATION DIAMETRE D'INHIBITION / CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE....243
ANNEXE III-1 : DETERMINATION DE LA TECHNIQUE D'INHIBITION DES BOUES ACTIVEES APPROPRIE....244

Introduction générale

Les rejets de substances médicamenteuses dans l'environnement constituent un récent sujet de préoccupation, plus particulièrement dans le domaine de l'eau. Conçues pour être biologiquement actives, ces molécules peuvent interagir avec des cibles biologiques spécifiques ce qui suscite des interrogations sur les risques écotoxicologiques et sanitaires liés à leur présence dans l'environnement. Nombreuses études relatent des problèmes d'efficacité des stations d'épuration (STEP) vis-à-vis des résidus médicamenteux. Le développement de procédés de traitement adaptés à la spécificité des eaux usées rejetées par les différentes activités anthropiques doit être intensifié et s'inscrit au cœur d'un contexte économique et environnemental sensible.

La présence de substances pharmaceutiques dans l'environnement a été révélée dans les années 1970 par le développement des méthodes d'analyses physicochimiques de détection. Les recherches sur cette problématique se sont intensifiées depuis 20 ans et ont mis en évidence la contamination à l'échelle mondiale par les médicaments et leurs métabolites des eaux superficielles et souterraines, des eaux résiduaires, des sols et des boues d'épuration. Les résidus médicamenteux sont présents à des concentrations infimes, de quelques $ng.L^{-1}$ à quelques $\mu g.L^{-1}$ suivant les molécules et les compartiments aquatiques. Ils sont ainsi considérés comme des micropolluants, c'est-à-dire comme des substances présentes à l'état de traces dans l'environnement mais susceptibles d'avoir un impact notable sur les écosystèmes. Contrairement aux macropolluants, les micropolluants peuvent engendrer des effets néfastes chez les organismes à de très faibles concentrations en raison de leur toxicité, de leur persistance et de leur bioaccumulation. Parmi les micropolluants, les molécules médicamenteuses doivent être spécifiquement considérées puisqu'elles sont destinées à agir biologiquement sur leurs cibles. Les médicaments sont aujourd'hui reconnus comme représentant une part importante des produits chimiques présents à de faibles concentrations environnementales.

Les établissements de soins sont souvent perçus comme l'une des principales sources de dissémination dans l'environnement des résidus médicamenteux en raison des fortes concentrations relevées dans leurs effluents. Il n'existe actuellement aucune norme de rejets spécifique à ces établissements dont les effluents sont co-traités avec les eaux usées urbaines en stations d'épuration. Cependant, l'introduction récente de trois molécules

pharmaceutiques sur la liste de substances à surveiller dans tous les Etats membres de l'Union Européenne (Directive 2013/39/UE) pourrait laisser présager de l'instauration à moyen terme de normes de rejets sur certains médicaments.

Nombreuses études relatent la présence de résidus médicamenteux (à différentes concentrations) dans diverses ressources en eau, aussi bien en amont qu'en aval des STEP. Cette présence dans l'environnement traduit à minima leur élimination seulement partielle par les STEP. Celles-ci ont en effet uniquement été conçues pour traiter la macropollution carbonée, azotée et phosphorée, et se révèlent par conséquent inadaptées à l'élimination de polluants présents à l'état de traces. Bien que les conditions d'assainissement qui régissent les STEP ne formulent pas (encore) d'exigences réglementaires sur cette pollution, les risques liés à ces molécules ne sont plus discutables pour la communauté scientifique. Les différents programmes internationaux menés (PNETOX, POSEIDON, NORMAN…) et études sur le sujet montrent, au-delà de l'enjeu considérable, l'importance de traiter efficacement ces micropolluants : dans ce cadre le bioréacteur à membranes (BàM), procédé équipant les STEP de nouvelle génération, offre des perspectives intéressantes.

Deux approches de traitement sont généralement envisagées : l'optimisation des STEP existantes par un traitement tertiaire ou le traitement directement sur site de sources potentiellement importantes telles que les établissements de soins. Alors que la première stratégie consisterait à traiter des débits extrêmement importants à de faibles concentrations en médicaments la seconde permettrait le traitement de débits limités d'effluents très concentrés. Cette dernière approche a été retenue pour ce projet à finalité industrielle puisqu'elle permet le traitement d'effluents spécifiques et très concentrés par l'implantation d'unités réduites de traitement impliquant un coût d'investissement réaliste.

Cette étude porte ainsi sur la faisabilité du traitement directement sur site des effluents du service d'oncologie d'un hôpital par le procédé bioréacteur à membranes. L'acclimatation de boues activées provenant d'une STEP municipale à un effluent riche en composés à fort potentiel toxique susceptibles d'inhiber l'activité biologique et la quantification des performances épuratoires développées sur les molécules médicamenteuses sont les principaux verrous technologiques que ce travail essaie de lever.

Le manuscrit est composé en trois chapitres.

Le **chapitre 1** décrit dans un premier temps le contexte général lié à la problématique de la présence de résidus médicamenteux dans l'environnement et les connaissances actuelles sur les risques écotoxicologiques associés. Ce chapitre montre également le dynamisme de la thématique caractérisé par une recherche intense et pluridisciplinaire et par l'évolution de la réglementation témoignant de la prise de conscience de la problématique par les instances législatives. La spécificité des effluents hospitaliers est ensuite détaillée et les stratégies de traitement exposées afin de mettre en avant l'intérêt de se focaliser sur les composés représentant le risque le plus important. L'attention est alors portée sur un service bien particulier : le service d'oncologie. Enfin, les performances des procédés de traitement, conventionnels et avancés, sont discutées pour déterminer le traitement offrant une réduction significative des résidus médicamenteux et une empreinte énergétique réduite.

Le **chapitre 2** expose les différents matériels et méthodes utilisés lors de cette étude. Ce chapitre présente entre autres la sélection des médicaments d'intérêt pour l'étude, la méthode de prélèvement des effluents du service d'oncologie développée, le descriptif du BàM pilote spécialement conçu pour le présent travail et bien évidemment les techniques analytiques étudiées.

Le **chapitre 3** est consacré à l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse. Les deux campagnes d'acclimatation de boues activées aux effluents du service d'oncologie d'une durée totale d'une année sont décrites et analysées dans les deux premières sections. Ces deux campagnes ont été réalisées avec des configurations différentes de BàM afin d'évaluer l'influence de la configuration. Les performances atteintes sur l'acclimatation aux effluents du service d'oncologie et l'élimination des résidus médicamenteux sont systématiquement comparées à celles obtenues par des boues activées non acclimatées provenant de STEP municipale afin de trancher sur la faisabilité du traitement par BàM des effluents d'un service d'oncologie et d'argumenter sur la pertinence de la stratégie d'un traitement sur site des effluents d'un service hospitalier.

La **conclusion générale** résume les principaux résultats obtenus lors de cette étude et répond ainsi à la question de faisabilité du traitement des effluents du service d'oncologie pour finalement exposer les perspectives de recherche offertes par ce travail.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1. La présence de résidus médicamenteux dans l'environnement

I.1.1. La France ne fait pas exception

La problématique de la présence de résidus médicamenteux dans l'environnement est mondiale et **touche l'ensemble des compartiments puisque des substances pharmaceutiques ont été détectées dans les eaux superficielles et souterraines, les eaux résiduaires, les sols et les boues d'épuration** (Halling-Sorensen et al., 1998 ; Ternes, 1998 ; Daughton et Ternes , 1999 ; Zuccato et al., 2000 ; Golet et al., 2003 ; Calamari et al., 2003 ; Miège et al., 2006 ; Kosjek et Heath., 2011 ; Ferreira da Silva et al., 2011 ; Fram et al., 2011 ; Ying et al., 2013 ; Chen et al., 2013 ; Petrović et al ., 2014). La France n'est évidemment pas épargnée par la problématique. L'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé), devenue Anses (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation-Environnement-Travail), a réalisé une « campagne d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine » basée sur une liste de 76 médicaments et métabolites prioritaires, humains et vétérinaires, établie à cet effet (Afssaps, 2008). La méthode analytique mise au point a permis de doser 45 des 76 molécules prioritaires avec des limites de quantification allant de 1 à 50 $ng.L^{-1}$ selon les molécules. Cette campagne couvrant 24 % de la population française consommatrice d'eau a abouti à la publication d'un rapport en janvier 2011 (Anses, 2011). En voici les principaux résultats :

- 25% des échantillons d'eau potable se sont avérés contenir des molécules médicamenteuses, dont 90% ont présenté des concentrations cumulées inférieures à 25 $ng.L^{-1}$. Les molécules les plus fréquemment retrouvées sont les neuroleptiques (oxazépam, carbamazépine et son métabolite époxycarbamazépine), ainsi qu'un métabolite de l'anti-inflammatoire non stéroïdien ibuprofène (hydroxyibuprofène) ;
- Environ 65 % des eaux brutes d'origine superficielle et 30 % des eaux brutes d'origine souterraine renferment des molécules analysées à des teneurs supérieures à la limite de quantification. Les concentrations cumulées des eaux brutes superficielles s'avèrent généralement supérieures à celles des eaux brutes souterraines.

Les eaux brutes renferment évidemment plus de molécules que les eaux traitées et à des concentrations cumulées sensiblement plus élevées mais qui ne dépassent généralement pas 25 $ng.L^{-1}$. Cette étude a également révélé la présence de métabolites puisque les 6 métabolites recherchés parmi les 45 molécules analysables ont été « souvent » détectés dans les échantillons analysés.

Une autre étude récente, effectuée en janvier 2013, menée par le journal 60 Millions de consommateurs et la Fondation France Libertés a révélé la présence de résidus médicamenteux et de pesticides dans 10 eaux en bouteille sur 47 testées (60 Millions de consommateurs, 2013). 10 % des eaux en bouteille testées renfermaient des traces de tamoxifène, hormone de synthèse la plus vendue pour traiter les cancers du sein et dont les effets secondaires sont nombreux. 8 des 10 prélèvements d'eau du robinet contenaient entre une et quatre des 85 molécules recherchées dans l'étude, dont le tamoxifène. Il est à noter la présence, dans certaines eaux de bouteille, d'atrazine et d'hydroxyatrazine, désherbants interdits en 2001, montrant ainsi la persistance inquiétante de certains polluants. Il convient toutefois de préciser que la présence de résidus médicamenteux dans les eaux en bouteille a été immédiatement contestée par la Chambre Syndicale des Eaux Minérales s'appuyant sur des contre-expertises réalisées par un laboratoire indépendant.

Les produits pharmaceutiques disponibles sont très diversifiés puisque 2800 substances actives différentes, correspondant à 11 000 spécialités pharmaceutiques (médicaments), ont été commercialisées en France en 2012 (Ansm, 2013).

En forte croissance lors de la dernière décennie le marché du médicament a connu ensuite un ralentissement de sa progression et, pour la première fois, un léger recul de - 1.5 % en 2012 (Figure I-1). Cette récession du marché du médicament concerne uniquement les ventes aux officines (- 2.8 %) puisque le chiffre d'affaires des ventes aux hôpitaux a progressé de 3 %. Le marché du médicament aux officines (21.1 milliards d'euros) reste toutefois nettement supérieur à celui des hôpitaux (6.1 milliards d'euros).

En 2012, le marché français du médicament représentait 4.3 % du marché mondial. La France est le cinquième marché au Monde et le deuxième marché européen derrière l'Allemagne (leem, 2013). Cependant, à l'échelle européenne, la France est en tête des

dépenses de médicaments par habitant. En 2012, un français consommait en moyenne 48 boîtes de médicaments par an (Ansm, 2013).

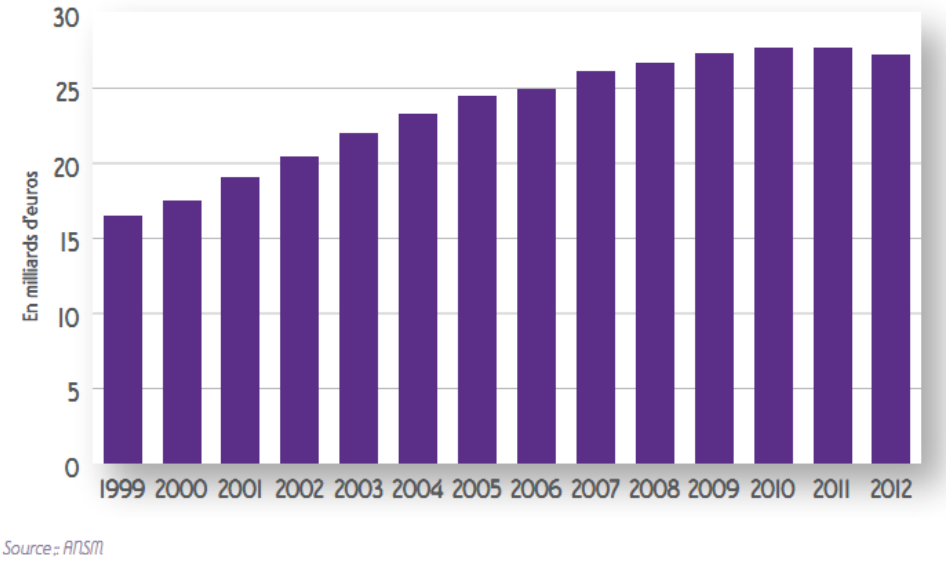


Figure I-1 : Evolution temporelle du chiffre d'affaires des spécialités pharmaceutiques en France (ANSM, 2013)

Une étude récente analysant les ventes de médicaments en Europe entre 2000 et 2011 note que l'exception française est finie (LIR, 2012). En 2000, la France se classait parmi les 3 pays européens les plus consommateurs de 7 des 8 grandes classes thérapeutiques. En 2012, elle figure parmi les 3 premiers pour seulement 2 classes de médicaments : les antibiotiques et les anxiolytiques. Ces données sont corroborées par un taux d'évolution du marché du médicament qui est le plus faible en Europe en 2012.

I.1.2. Risques associés à la présence de résidus médicamenteux dans l'environnement

I.1.2.1. Une évaluation délicate

Les médicaments sont généralement des molécules polaires aux propriétés physicochimiques peu favorables à la bioaccumulation. Cependant, les micropolluants n'auraient pas besoin de persister dans l'environnement pour provoquer des effets négatifs puisque leur transformation et/ou élimination serait compensée par leur introduction continue dans l'environnement (Barceló, 2003).

La présence de résidus médicamenteux dans l'environnement représente un risque potentiel pour la faune, la flore et l'Homme. De nombreuses études ont été consacrées à l'évaluation de l'écotoxicité des résidus médicamenteux mais les risques demeurent encore méconnus, principalement en raison de la complexité de reproduire fidèlement les conditions environnementales. La méthodologie adoptée est ainsi déterminante dans les tests d'écotoxicité. Afin de ne pas surestimer le risque, il est important d'effectuer ces tests à des concentrations réalistes, à savoir les très faibles concentrations relevées dans l'environnement. Cependant, 70 % des études réalisées porte sur l'évaluation de la toxicité aigüe (Santos et al., 2010) qui ne s'avère pourtant pertinente que lors de décharges accidentelles de grandes quantités de médicaments dans l'environnement. Les données de toxicité chronique, renseignant les risques à faible concentration sur le long terme, sont considérées plus représentatives de la situation environnementale mais sont malheureusement marginales en raison de leurs mises au point complexes. Elles sont généralement effectuées en mesurant les taux de croissance et/ou de reproduction des espèces cibles à différentes concentrations de polluant.

Aussi, l'évaluation des risques a été basée quasi-exclusivement sur l'étude de composés seuls alors que les médicaments devraient être considérés en tant qu'ensemble chimique multi-composé : molécule mère, métabolites et produits de transformation (Kümmerer, 2009). De plus, ils ne sont pas isolés puisqu'ils coexistent dans l'environnement avec d'autres substances susceptibles d'agir sur les mêmes cibles : hydrocarbures, plastifiants, insecticides, herbicides, désinfectants, détergents... Les connaissances sur les effets des mélanges apparaissent aujourd'hui très limitées et difficiles à anticiper puisqu'il a été démontré que les mélanges pouvaient exhiber des effets additif, synergique ou antagoniste (Silva et al., 2002 ; Cleuvers, 2004 ; Backhaus et al., 2004, 2008 ; Pomati et al., 2007). Cleuvers (2004) précise par exemple qu'un mélange peut s'avérer beaucoup plus toxique qu'un composé seul, et ce, même à des concentrations où une substance seule n'engendre aucun ou très peu d'effets. Kümmerer (2009) note que des effets additifs sont attendus pour les médicaments ayant un mode d'action très similaire et partageant les mêmes récepteurs. De même, concernant l'antibiorésistance, il précise qu'il est connu, via la littérature médicale, qu'une résistance acquise contre un antibiotique peut être également efficace contre un antibiotique de la même classe et parfois d'autres classes. Enfin, le choix des espèces sur lesquelles ces tests sont effectués constitue également un critère primordial puisqu'il y a

vraisemblablement des espèces sensibles et d'autres insensibles à une substance ou à un mélange. Actuellement, le document guide de l'EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) fixe une concentration seuil de 10 $ng.L^{-1}$ dans le milieu aquatique avant d'engager une évaluation du risque environnemental (EMEA, 2006). **Il s'avère cependant indispensable d'étudier les effets sur le long terme de mélanges à de faibles concentrations pour une évaluation fiable des risques écotoxicologiques.** De nombreux auteurs ont d'ailleurs émis cette recommandation (Kümmerer, 2009 ; Santos et al., 2010 ; Zounkova et al., 2010 ; Orias et Perrodin, 2013 ; Backhaus et Karlsson, 2014).

I.1.2.2. Risques pour l'homme

Il existe très peu d'informations concernant les risques encourus par l'homme dus à la présence de résidus médicamenteux dans l'environnement. Les données de relation dose-effet des médicaments ne concernent que l'usage thérapeutique et ne sont donc pas pertinentes concernant une exposition à de faibles concentrations sur le long terme. De plus, il existe encore moins de données concernant les risques liés aux mélanges de médicaments. Diverses voies de pénétration et d'exposition humaine aux résidus médicamenteux sont à prendre en compte (Académie Nationale de Pharmacie, 2008) :

- l'inhalation ;
- le contact cutanéo-muqueux ;
- la consommation d'eau ;
- la consommation d'aliments contaminés.

L'inhalation et le contact cutanéo-muqueux peuvent être considérés comme négligeable sauf pour les risques professionnels notamment dans les domaines du traitement des eaux résiduaires et de l'élevage d'animaux. Les doses de médicaments consommés par l'intermédiaire d'aliments contaminés demeurent inconnues. La quantité de médicaments ingérés par consommation d'eau, en particulier du robinet, peut être estimée à partir des concentrations détectées. Webb et al. (2003) ont effectué une étude portant sur 63 molécules représentatives des classes thérapeutiques les plus largement utilisées. Pour ce faire, les auteurs se sont basés sur les concentrations précédemment relevées en résidus médicamenteux dans les eaux destinées à la consommation humaine en Allemagne (Ternes, 2001a et 2001b). Une consommation de 2 litres d'eau du robinet par jour a été retenue pour

estimer les doses journalières et cumulées de résidus médicamenteux ingérés sur une vie de 70 ans. Les limites de quantification des techniques analytiques employées ont servi de concentrations pour les molécules n'ayant pas été détectées. Les doses quotidiennes calculées sont ainsi très largement inférieures à la dose thérapeutique puisque le rapport des deux est compris entre 10^{-4} et 10^{-9}. Le cumul de dose sur 70 ans reste généralement très inférieur à la dose thérapeutique, à l'exception de 5 molécules dont l'exposition sur une vie entière est supérieure à une prise unique (Tableau I-1) :

Tableau I-1 : Médicaments dont l'exposition est supérieure à une prise unique sur une vie de 70 ans (Webb et al., 2003).

Principes actifs	Exposition cumulée sur 70 ans / Dose thérapeutiques journalière
clembutérol	25.5
cyclophosphamide salibutamol 17α-éthinylestradiol	2.5
terbutaline	2.1

Il convient de préciser que ces 5 molécules n'avaient pas été détectées dans les travaux de Ternes 2 ans plus tôt. Une marge de sécurité confortable par rapport aux doses entraînant un effet pharmacologique apparaît ainsi de premier abord.

Une étude plus récente réalisée sur 44 composés pharmaceutiques a confirmé ces résultats : « la présence de résidus médicamenteux dans l'environnement aquatique et la transmission subséquente à l'eau potable et aux poissons constitue un risque négligeable à la santé humaine » (Cunningham et al., 2009). Ces études ont cependant certaines limitations puisque la dose thérapeutique ne joue pas le rôle de valeur toxicologique de référence et les effets des mélanges ne sont pas pris en compte. **Il est ainsi nécessaire d'étudier les effets chroniques de consommation d'eau potable sur l'homme et également de se concentrer sur certains individus pouvant être plus sensibles comme des personnes très affaiblies ou immunosuppressives.**

I.1.2.3. Risques pour la faune

Les risques sur la faune de la présence de résidus médicamenteux dans l'environnement sont d'ores et déjà avérés. Deux cas aujourd'hui bien connus concernent la féminisation des

poissons due aux nombreux perturbateurs endocriniens présents dans les eaux de surface et la disparition de 3 espèces de vautours en Asie du Sud mise en relation avec l'utilisation de l'anti-inflammatoire diclofénac pour soigner le bétail domestique.

Selon l'Union Européenne un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien, induisant des effets nocifs sur le fonctionnement d'un organisme (Union Européenne, 1999). Le système endocrinien est impliqué dans de nombreuses fonctions régulatrices de l'organisme. Il contrôle entre autres la formation des organes et leur régulation, les équilibres ioniques ou encore la reproduction. Ainsi, le champ d'action des perturbateurs endocriniens est relativement large. Les premières perturbations endocrines sont observées en 1994 sur des truites exposées à un effluent de STEP (Purdom et al., 1994). De nombreuses espèces de poissons féminisées ont depuis été détectées en aval de STEP (Jobling et al., 1998 ; Solé et al., 2000 ; Thorpe et al., 2008), dans des rivières urbanisées (Vigano et al ., 2001 ; Johnson et al., 2008) et dans le milieu marin (Allen et al., 1999 ; De Metrio et al., 2003). Les perturbations endocrines se traduisent par l'apparition plus ou moins marquée de caractéristiques femelles dans les testicules mâles qui peuvent engendrer une baisse de la fertilité voire une stérilité des poissons mâles, ralentissant ainsi le taux de reproduction des poissons. Les cours d'eau sont en effet porteurs de nombreux perturbateurs endocriniens puisque des polluants présents comme certains médicaments (antibiotiques, analgésiques…), des substances à activité hormonale de synthèse et une multitude de substances chimiques (détergents, pesticides…) peuvent engendrer des perturbations endocriniennes. Les oestrogènes naturels (estrone, 17β-estradiol et estriol) et l'hormone synthétique 17α-éthinylestradiol, principal constituant des pilules contraceptives, sont reconnus comme les principaux responsables de l'oestrogénicité des eaux de surface (Bicchi et al., 2009) malgré des concentrations environnementales bien moins élevées que d'autres perturbateurs endocriniens tels que le nonylphénol, l'octylphénol, le bisphénol A ou certains pesticides. Les hormones ont ainsi un pouvoir oestrogénique bien supérieur aux autres perturbateurs endocriniens ; à elle seule l'hormone 17α-éthinylestradiol serait responsable de 35 à 50 % de l'oestrogénicité des eaux de surface (Cargouet et al., 2004).

Le second cas concret lié à la présence de résidus médicamenteux dans l'environnement concerne la disparition de 99 % de la population de trois espèces de vautours (Gyps bengalensis, Gysps indicus, Gyps tenuirostris) depuis le début des années 1990 attribuée à

l'anti inflammatoire non stéroïdien diclofénac (Green et al., 2004 ; Oaks et al., 2004). Ces trois espèces, qui se comptaient auparavant en dizaines de millions, sont aujourd'hui menacées d'extinction et sont classées « danger critique » puisqu'elles continuent à décroître de 30 à 50 % par an. Le diclofénac était largement utilisé pour soulager le bétail domestique souffrant d'une inflammation, d'une fièvre, d'une douleur ou d'une blessure. Il était délivré sans ordonnance en Inde, au Pakistan et au Népal. Sans diagnostic préalable le médicament est inefficace et les bêtes succombent à leur souffrance en dépit du traitement. Les vautours sont contaminés lorsqu'ils mangent les carcasses de ces animaux soignés par le diclofénac. Les vautours Gysps sont particulièrement sensibles au diclofénac et de faibles quantités ingérées suffisent à causer leur mort. La fabrication du diclofénac a été interdite en 2006 en Inde, au Pakistan et au Népal alors que l'usage vétérinaire était déjà interdit en Europe et en Amérique du Nord. Cependant, l'introduction récente du diclofénac en Afrique est préoccupante pour les espèces de vautours dont certaines sont déjà menacées d'extinction. Cette mise en exergue montre que des effets indirects très nocifs peuvent subvenir si des résidus médicamenteux entrent dans la chaîne alimentaire.

I.1.2.4. Management des risques sur le court et long terme

Les nombreuses actions de recherche et l'évolution de la législation sont étroitement liées puisque ce sont les données collectées sur la détection et l'écotoxicité qui pourraient permettre sur le long terme la mise en place de normes de rejet sur certaines molécules médicamenteuses. Différents scénarii de gestion et de management des risques ont été abordés (Doerr-MacEwen et Haight, 2006 ; Kümmerer, 2007 ; Kümmerer, 2009 ; Académie Nationale de Pharmacie, 2008). Une concertation entre les différents acteurs concernés (industrie pharmaceutique, politique, académique) a mis en exergue les stratégies les plus prometteuses : traitement des eaux usées par des procédés innovants, formation des professionnels de la santé pour réduire les surprescriptions et promouvoir les programmes de retour des médicaments non utilisés couplés à la formation du public (Doerr-MacEwen et Haight, 2006). Kümmerer (2007) identifie ainsi, d'un point de vue temporel, 3 classes de mesures à associer, situées en amont et en aval de la problématique, qui devraient permettre une réduction efficace du rejet des résidus médicamenteux dans l'environnement :

- L'approche technique avec le développement de procédés innovants de traitement, sur le court et moyen terme ;
- L'éducation et la formation des usagers et du personnel de santé, sur le moyen terme ;
- La substitution des substances critiques par des molécules aux effets bénins, sur le long terme.

La deuxième mesure doit comprendre des collaborations entre les différents acteurs afin d'adopter une stratégie efficace. La dernière mesure concerne le principe de pharmacie verte, peu abordé jusqu'à présent mais qui semble le plus prometteur pour régler la situation sur le long terme (Kümmerer, 2009). Le principe est d'intensifier les recherches dans le secteur pharmaceutique pour favoriser la création de médicaments fortement biodégradables.

La première mesure a été la plus étudiée (Kümmerer, 2009). **Face au constat de la contamination environnementale et des premiers effets avérés il apparaît en effet nécessaire de développer des procédés de traitement innovants dans le but de proposer dès le court terme des solutions efficaces.** Cela permettrait d'anticiper d'éventuelles normes de rejets qui finiront par s'imposer dans le cas de nouvelles découvertes concernant l'écotoxicité des résidus médicamenteux. Deux stratégies sont communément évoquées concernant le développement de procédés de traitement capables d'éliminer les traces de médicaments : l'optimisation des STEP existantes, par l'ajout d'un traitement tertiaire, et le traitement directement à la source des effluents d'importants pollueurs potentiels (établissements de soins, industries pharmaceutiques).

Alors que l'optimisation des STEP existantes permettrait de traiter le flux médicamenteux global le débit colossal d'eaux usées à traiter représente un frein majeur à la faisabilité économique de cette stratégie. De plus, l'intérêt environnemental pourrait finalement s'avérer limité en raison de l'aspect énergivore des technologies de pointe à déployer (Kümmerer, 2009). A l'inverse, le traitement directement sur site d'effluents potentiellement très chargés en résidus médicamenteux pourrait représenter un compromis judicieux. **L'implantation d'unités réduites de traitement permettrait en effet de limiter des coûts d'investissement et de traiter des effluents plus concentrées en résidus médicamenteux.**

I.1.3. Une thématique dynamique

I.1.3.1. Une législation en évolution

En raison de la méconnaissance des effets des résidus médicamenteux sur les organismes non cibles les réglementations européenne et française ne contiennent actuellement pas de normes sur les rejets des molécules pharmaceutiques. Cependant, le 12 août 2013, le Parlement Européen et le Conseil ont adopté la Directive 2013/39/UE modifiant la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et imposant la création d'une liste de surveillance des polluants émergents. Cette liste, devant être établie d'ici le 14 septembre 2014, contiendra au maximum 12 substances dont trois molécules pharmaceutiques : l'antidouleur diclofénac et les hormones 17-bêta-estradiol et 17-alpha-éthinylestradiol, constituants des pilules contraceptives.

Malgré l'absence de normes de rejets sur les molécules pharmaceutiques, l'Union Européenne a instauré différentes Directives concernant la pollution engendrée par les micropolluants en général. Les états membres se doivent d'atteindre dans les délais les objectifs fixés par ces Directives sous peine de condamnation.

- La Directive 2006/11/CE, version codifiée de la directive 76/464/CEE, concernant spécifiquement la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté, définit deux listes de substances dangereuses. La liste I comprend 18 substances dont les rejets aqueux doivent être supprimés. Ces substances sont toxiques, persistantes et bioaccumulables. La liste II comprend 139 substances qui ont un effet nuisible et dont les rejets aqueux doivent être diminués. Ces objectifs doivent être atteints par l'instauration de valeurs limites d'émission ou d'objectifs de qualité pour le milieu aquatique. Cette Directive a été abrogée par la DCE le 22 décembre 2013.

- La Directive 2000/60/CE ou Directive cadre sur l'eau (DCE) modifiée par sa Directive fille 2008/105/CE comporte une liste de 33 substances prioritaires constituant un risque important pour ou via le milieu aquatique. 11 substances sont qualifiées « prioritaires dangereuses» et leurs émissions et pertes doivent être totalement supprimées d'ici 2021. Les émissions et les pertes des 22 autres substances prioritaires doivent être fortement diminuées. L'objectif général de la DCE est

d'atteindre un bon état chimique et écologique des masses d'eau d'ici 2015 sur tout le territoire européen, ainsi que la non dégradation de la situation.

- La Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 (modifiant les Directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau) a ajouté 12 nouvelles substances à la liste initiale de 33 substances prioritaires pour lesquelles les Etats membres doivent respecter des normes de qualité environnementale. De plus, des normes plus strictes ont été instaurées pour 7 des 33 substances déjà sur la liste. Surtout, la Commission a décidé d'établir une liste supplémentaire de substances à surveiller dans tous les Etats membres. **Cette liste comprendra dix substances au maximum dont, pour la première fois, trois substances pharmaceutiques : l'antidouleur diclofénac et les hormones 17-bêta-estradiol et 17-alpha-éthinylestradiol.** Ces substances pourraient par la suite être ajoutées à la liste de substances prioritaires si cela s'avère nécessaire.

Ce n'est donc que très récemment que des produits pharmaceutiques ont été inscrits sur une liste de surveillance inclue dans la DCE.

I.1.3.2. Les actions menées à l'échelle nationale

Le Ministère de la Santé a lancé en 2004 le Plan National Santé Environnement (PNSE, 2004) avec pour objectifs d'inventorier et de gérer l'ensemble des risques sanitaires liés aux agents chimiques, biologiques, physiques présents dans l'environnement de vie et de travail. Le PNSE 2 (2009-2013) s'intéresse prioritairement aux répercussions sur l'Homme de la dégradation de l'environnement et de ses milieux de vie. **L'action 47 de ce plan prévoit d'améliorer la connaissance et réduire les risques liés aux rejets de médicaments dans l'environnement. Il est clairement affiché la volonté de réduire l'émission de certaines substances dans le milieu aquatique.**

Afin de respecter les objectifs des textes européens et dans le cadre du Grenelle de l'environnement et du PNSE 2, l'Etat français a mis en œuvre le « plan national d'action contre la pollution des milieux aquatiques par les micropolluants pour la période 2010-

2013 » et le « Plan National sur les Résidus de Médicaments dans les eaux » (PNRM) pour la période 2011-2015. Le PNRM comprend 3 axes :

- Evaluation des risques environnementaux et sanitaires : acquérir des connaissances scientifiques et techniques relatives à la présence, au devenir et aux effets des médicaments sur l'environnement et sur la santé humaine.
- Gestion des risques environnementaux et sanitaires : contrôler et réduire les émissions de résidus de médicaments dans l'environnement.
- Renforcer et structurer les actions de recherche : lancer des appels à projets de recherche et des expertises scientifiques collectives sur des sujets ciblés prioritaires tels que les données manquantes en matière de toxicité environnementale, de problématique des mélanges et de l'exposition chronique à faibles concentrations.

Le PNRM vise également à établir une liste de substances médicamenteuses prioritaires afin de concentrer les études sur les molécules les plus dangereuses. Cette liste prioritaire portera sur les médicaments humains, vétérinaires et leurs métabolites. Le but de cette liste est aussi d'harmoniser les critères de priorisation à l'échelle nationale.

I.1.3.3. La recherche sur tous les fronts

Depuis 20 ans d'importants efforts ont été faits pour étudier la présence, le devenir et les risques potentiels des résidus médicamenteux dans l'environnement. Les premiers résultats révélant la présence systématique de résidus de médicaments dans l'ensemble des compartiments aquatiques ont forcé les recherches à se focaliser également sur l'évaluation et le développement de procédés de traitement.

De nombreux programmes de recherche européens ont été initiés depuis (liste non exhaustive)… :

- POSEIDON (2001 - 2004) : *Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse.* Ce projet Européen a évalué un certain nombre de traitement de potabilisation et d'assainissement vis-à-vis de l'élimination des résidus médicamenteux et des produits d'hygiène.

- ERAPHARM (2004 – 2007) : *Environmental Risk Assessment of PHARMaceuticals.* Association de plusieurs pays européens et du Canada pour ce projet sur l'évaluation des risques écotoxicologiques.
- NORMAN (2005 - 2008) : *Network of reference laboratories for monitoring of emerging environmental pollutants*.
- KNAPPE (2007 – 2009) : *Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental Waters*. Identification des actions prioritaires à prendre en vue de réduire la présence, les impacts et les risques des produits pharmaceutiques dans les eaux de l'environnement.
- PILLS (2007-2012) : *Pharmaceutical Input and Elimination from Local Sources*. Ce projet de collaboration ente 6 pays européens vise à caractériser différents effluents hospitaliers, identifier les médicaments à prendre en compte et caractériser les bactéries antibiorésistantes dans les eaux usées. Le projet dispose de 4 sites pilotes de traitement d'effluents hospitaliers dont 2 installations à l'échelle réelle.
- PHARMAS (2011-2013) : Evaluation des risques de l'exposition environnementale aux médicaments sur les animaux sauvages et l'Homme. Ce projet se focalise sur deux classes de médicaments : les antibiotiques et les anticancéreux.
- CytoThreat (2011-2014) : Devenir et effets des médicaments anticancéreux dans l'environnement et identification des biomarqueurs pour améliorer l'évaluation de l'exposition environnementale.
- noPILLS (2013-2015) : Le but de ce projet est d'étudier la faisabilité de stratégies en amont, alternatives au traitement en « bout du tuyau ». La volonté est de réduire les installations de traitement des eaux au sein desquelles les coûts de l'implémentation de techniques de pointe seraient minimisés et supportables par l'identification des actions à mettre en œuvre pour changer le comportement du consommateur.

…de même qu'en France (liste non exhaustive) :

- PNETOX (1996 - 2005) : *Programme National d'Ecotoxicologie*. Evaluation de l'impact sur l'environnement des substances médicamenteuses, abordée dans le projet ENIMED (Effets Non Intentionnels de MEDicaments) du programme PNETOX. Ses objectifs sont l'identification et la quantification de substances à visée thérapeutique

dans les stations d'épuration et l'évaluation des effets potentiels sur des organismes non cibles.

- AMPERES (2006 - 2009) : *Analyse des Micropolluants Prioritaires et Emergents dans les Rejets de station d'épuration et les Eaux Superficielles.* Evaluation des performances d'élimination des filières d'épuration conventionnelles pour les eaux et les boues, ainsi que de filières avancées pour le traitement de l'eau.
- ANR TOXEAUBAM (2006 – 2009) : Quantification de la génotoxicité des molécules anticancéreuses dans les effluents hospitaliers et de l'aptitude du bioréacteur à membrane couplé à la nanofiltration pour l'élimination de ces molécules.
- ANR Biomedboue (2009 – 2012) : Etude de la biodisponibilité de médicaments anticancéreux dans les boues de station d'épuration.
- SIPIBEL (2011 – 2015) : *Site Pilote de Bellecombe.* Le projet a bénéficié de la construction d'un nouvel hôpital afin d'évaluer, sur 2 filières différentes dans une STEP permettant l'isolement des EH, la traitabilité des effluents hospitaliers et leur impact sur leur co-traitement avec les EUU.
- PANACEE (2011 – 2014) : Traitement des effluents d'un service d'oncologie d'un hôpital de Toulouse par le procédé bioréacteur à membrane.

Aussi, de nombreuses revues sont parues récemment et attestent du dynamisme et de l'aspect pluridisciplinaire de la thématique (Tableau I-2) :

Tableau I-2 : Revues récentes sur la thématique des résidus médicamenteux.

Thématique	Références
Problématique générale et perspectives	Kümmerer, 2009
La situation précise d'une région	Bu et al., 2013 ; Liu et Wong, 2013 ; Ortiz de Garcia et al., 2013
Ecotoxicité des médicaments	Crane et al., 2006 ; Fent et al., 2006 ; Santos et al., 2010
Caractérisation des effluents hospitaliers	Verlicchi et al., 2010
Ecotoxicité des effluents hospitaliers	Orias et Perrodin, 2013
Les médicaments anticancéreux	Kosjek et al., 2011 ; Zhang et al., 2013
Les antibiotiques et l'antibiorésistance	Bouki et al., 2013 ; Michael et al., 2013 ; Rizzo et al., 2013
Procédés de traitement	Sipma et al., 2010 ; Rivera-Utrilla et al., 2013 ; Li et al., 2014 ; Verlicchi et Zambello., 2014 ; Zhang et al ., 2014

Liste non exhaustive

I.1.4. Provenance des résidus médicamenteux dans l'environnement

Les résidus médicamenteux retrouvés dans l'environnement sont issus de différentes sources liées aux médecines humaine et vétérinaire (Figure I-2). D'après l'Académie Nationale de Pharmacie (2008) il convient de distinguer 2 types de sources de contamination : les sources diffuses, liées aux populations humaines et animales, et les sources ponctuelles à l'origine d'émissions beaucoup plus concentrées et localisées.

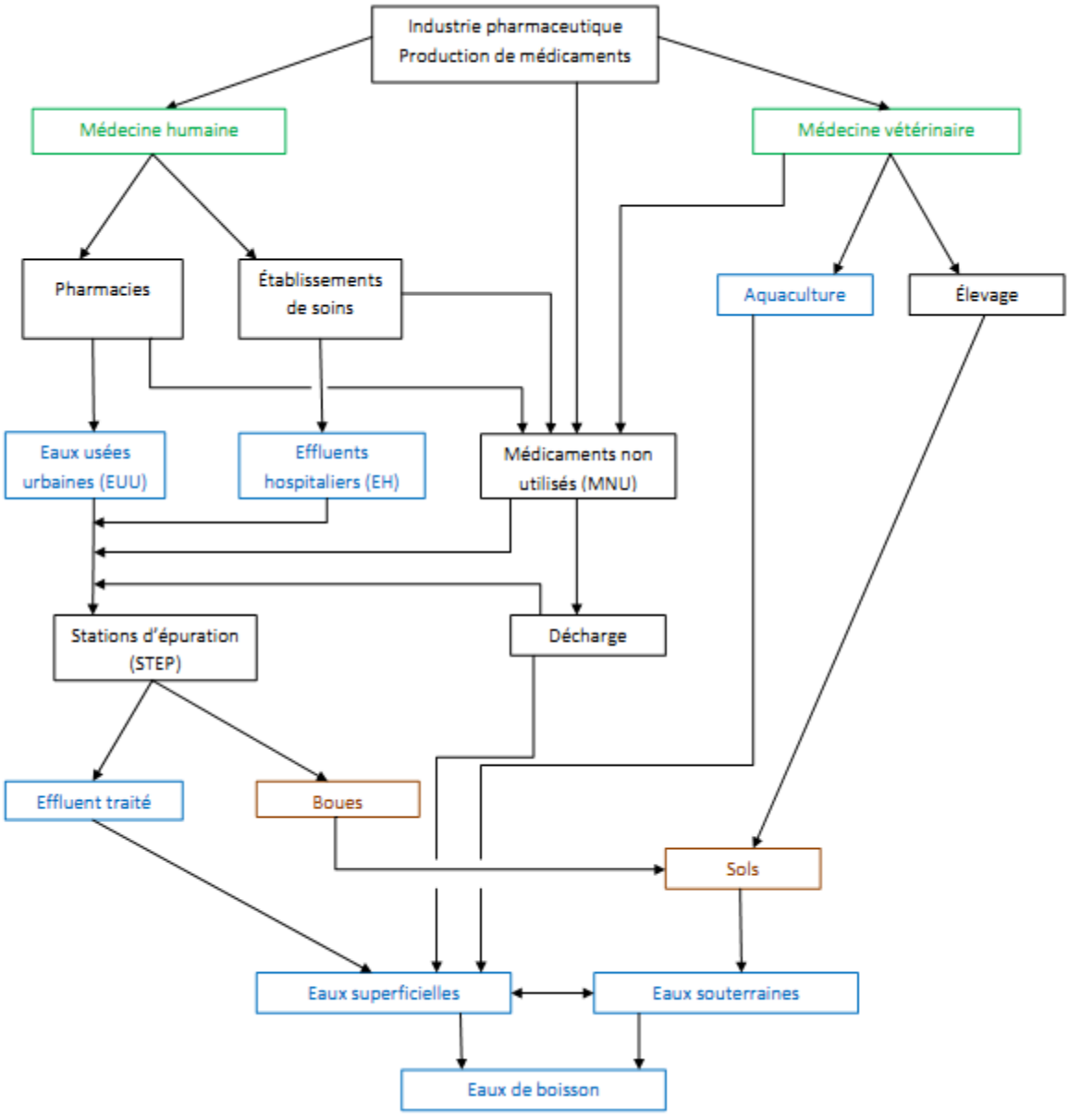


Figure I-2 : Sources et voies de dissémination dans les différents compartiments de l'environnement des résidus médicamenteux (d'après Mullot, 2009)

Chez l'Homme et les animaux, le degré de métabolisation et la voie principale d'excrétion d'un médicament sont spécifiques à chaque molécule. L'excrétion d'une molécule médicamenteuse peut s'effectuer par voie pulmonaire (pour quelques médicaments volatils), digestive et/ou urinaire. Le processus de métabolisation totale ou partielle implique ainsi la présence simultanée dans l'environnement des molécules mères et de leurs métabolites.

I.1.4.1. Les sources diffuses

Elles comprennent les rejets médicamenteux des Hommes en traitement ambulatoire et des animaux domestiques ainsi que la pollution engendrée par la mise Centre de Stockage des Déchets Ultimes (CSDU) des médicaments non utilisés. Les traitements ambulatoires représentent la plus grande partie de la pollution médicamenteuse humaine. Les médicaments vendus en France en 2012 aux officines représentaient en effet 78% du chiffre d'affaires global du marché pharmaceutique (Ansm, 2013).

Les médicaments non utilisés sont communément disposés par 3 voies différentes par les consommateurs : dans les ordures ménagères, directement dans le réseau des eaux usées ou dans le meilleur des cas ils sont rapportés à la pharmacie. Les campagnes de sensibilisation effectuées ont une influence sur le comportement des consommateurs mais demeurent clairement insuffisantes et doivent être renforcées pour inciter le retour systématique des médicaments non utilisés en pharmacie. En effet, l'élimination dans les égouts contribue à la pollution des eaux usées et l'élimination dans les ordures ménagères peut conduire à une pollution du sol et des eaux superficielles en cas de mise en CSDU des ordures via les eaux de ruissellement (lixiviat). En France, la loi n°2007-248 interdit la réutilisation des médicaments non utilisés. Ils sont donc destinés à l'incinération après leur collecte en pharmacie afin de limiter tout risque pour l'homme ou l'environnement.

I.1.4.2. Les sources ponctuelles

Elles sont à l'origine de pollutions plus concentrées mais localisées géographiquement (établissements de soins, industries chimie fine et pharmaceutique, les élevages industriels d'animaux et de poissons).

Il existe très peu de données concernant la pollution médicamenteuse générée par les industries de chimie fine et pharmaceutique. Ces entreprises se doivent de respecter les normes environnementales ainsi que les règles de bonne conduite et sont sujettes à contrôles. Cependant, seuls les paramètres de pollution globaux sont vérifiés alors que la pollution spécifique médicamenteuse, les produits utilisés lors de la synthèse et les sous-produits formés ne sont pas contrôlés et pourraient être rejetés en grande quantité. Une étude américaine a analysé régulièrement sur 5 ans les rejets de trois STEP, dont deux étant en partie alimentées par des usines pharmaceutiques. Les résultats ont montré que les pratiques actuelles des industries pharmaceutiques peuvent conduire à des concentrations en médicaments de 100 à 1000 fois supérieures que dans les Eaux Usées Urbaines (EUU) (Phillips et al., 2010).

Les élevages industriels d'animaux sont sources de rejets d'antibiotiques, d'antiparasitaires, d'hormones et de promoteurs de croissance. Les élevages industriels piscicoles sont sources de pollution d'antibiotiques largement utilisés dans l'alimentation des poissons.

Les hôpitaux sont souvent perçus comme une des sources principales de rejets de résidus médicamenteux et différentes activités de soins spécifiques les composent. Mais qu'en est-il vraiment de leur contribution au flux global médicamenteux ? Quelle est la législation associée aux effluents hospitaliers ? La stratégie du traitement à la source des effluents hospitaliers à la source est-elle pertinente ?

I.2. Les effluents hospitaliers : contribution à la pollution médicamenteuse et spécificités

I.2.1. Consommation de médicaments dans les hôpitaux

Comme énoncé précédemment le chiffre d'affaires des ventes de médicaments au sein des hôpitaux (6.1 milliards €) représente un peu moins du quart du marché global (27.2 milliards €) (ANSM, 2013). **Bien que ce marché s'avère plus faible il reste cependant très spécifique.** Alors qu'ils ne sont pas présents dans la liste des 20 classes de médicaments les plus consommées et qu'ils ne représentent que le 14^{e} chiffre d'affaires aux officines **les antinéoplasiques constituent la classe de médicaments représentant le chiffre d'affaires le plus important pour l'hôpital** (ANSM, 2013) (Tableau I-3). Malgré cela, le chiffre d'affaires des ventes d'antinéoplasiques à l'hôpital (1558 M€) n'est que 2,5 fois supérieur à celui des villes (613 M€) indiquant que la consommation en ville n'est pas à négliger. La part de marché des antinéoplasiques est en nette augmentation depuis 2002 pour la ville et l'hôpital. Quasi nulle pour les villes en 2002, elle a atteint 2.9 % en 2012 montrant ainsi une évolution de l'utilisation de certains anticancéreux en ville. A l'hôpital, le plus grand chiffre d'affaires pour un médicament est l'antinéoplasique avastine. 4 des 5 premiers médicaments réalisant le chiffre d'affaires le plus important sont d'ailleurs des antinéoplasiques.

Tableau I-3 : Vente d'antinéoplasiques en France en 2012 (ANSM, 2013).

	Rang quantité consommée	Rang chiffre d'affaires	Chiffres d'affaires 2012 (millions d'euros)	Part de marché 2012 (%)	Part de marché 2002 (%)
Officines	>20	14	613	2.9	0.1
Hôpitaux	NC	1	1558	25.6	17

I.2.2. Caractéristiques des effluents hospitaliers

Les effluents hospitaliers (EH) sont issus de l'ensemble des activités de l'hôpital et peuvent ainsi être qualitativement divisés en trois catégories (Deloffre-Bonnamour, 1995 ; Emmanuel, 2004) :

- les rejets domestiques (cuisine, hygiène du personnel et des patients non contagieux) ;

- les rejets industriels (blanchisserie, chaufferies…) ;
- les rejets des activités de soins, d'analyses et de recherches.

Cette dernière catégorie est à l'origine de la spécificité des effluents hospitaliers puisqu'ils contiennent, entre autres, des résidus médicamenteux, des détergents, des désinfectants… Les établissements de soins constituent la principale source de rejets de produits radiopharmaceutiques et d'anticancéreux (Académie Nationale de Pharmacie, 2008). Dans leur revue, Verlicchi et al. (2010) ont synthétisé une multitude de données provenant de nombreux pays de différents niveaux de développement pour caractériser les effluents hospitaliers et effectuer une comparaison des EH avec les EUU. Leurs principales observations sont reprises dans les parties suivantes (I.2.2.1 à I.2.2.4).

I.2.2.1. Consommation en eau

La consommation d'eau varie de 200 à 1200 $L.lit^{-1}.jour^{-1}$ selon les hôpitaux (Verlicchi et al., 2010). Les plus fortes consommations d'eau concernent les pays industrialisés et les plus faibles les pays en développement. Ainsi, bien plus d'eau est consommée pour un patient qu'un équivalent-habitant puisque la consommation urbaine est généralement estimée entre 50 et 100 $L.eq\text{-}hab^{-1}.jour^{-1}$ pour les pays en voie de développement et entre 150 et 300 $L.eq\text{-}hab^{-1}.jour^{-1}$ pour les pays industrialisés (Metcalf et Eddy, 1991).

La consommation en eau d'un hôpital dépend d'une multitude de facteurs tels que le nombre de lits, l'âge de l'hôpital, le nombre et le type de services, la politique de qualité environnementale et les facteurs climatiques, culturels et géographiques. A l'image des EUU la consommation en eau varie beaucoup au cours d'une journée puisqu'elle est directement liée à l'activité de l'hôpital. Le débit des EH est généralement élevé du début de matinée jusqu'au milieu d'après-midi puis diminue progressivement jusqu'à atteindre son minimum au cours de la nuit. Les auteurs notent que par rapport au débit journalier moyen, la consommation en eau entre 8 h et 16 h est plus élevée de 20 % alors qu'elle est plus faible de 30 % entre 1 h et 8 h.

I.2.2.2. Caractéristiques biochimiques

Verlicchi et al. (2010) ont relevé les valeurs des paramètres classiques de pollution (DCO, DBO, MES) d'hôpitaux de différentes tailles et de divers pays (Tableau I-4). Ces valeurs sont confrontées à celles des EUU afin de comparer la pollution générée par un patient à celle générée par un équivalent-habitant.

Tableau I-4 : Comparaison de la pollution en DCO, DBO et MES des EH et des EUU rapportée à un patient (Verlicchi et al., 2010) et à un équivalent-habitant (Metcalf et Eddy, 1991).

Paramètre	EH ($mg.L^{-1}$)	EUU ($mg.L^{-1}$)	Ratio EH/EUU	Patient ($g.jour^{-1}$)	Éq-hab ($g.jour^{-1}$)
DBO	200	90	2.2	160	60
DCO	500	170	3	260-300	100-120
MES	160	60	2.7	120-150	70-90

La synthèse de ces résultats montre que la pollution conventionnelle des EH est de 2 à 3 fois plus concentrée que les EUU. Cependant, il est notable que la variabilité de concentrations est très importante selon les hôpitaux. La pollution liée à un patient apparaît ainsi environ 2 fois supérieure à celle d'un équivalent-habitant. Concernant les autres paramètres de macropollution, la synthèse des données montre que les EH sont légèrement moins chargés que les EUU à l'exception de la teneur en chlorure (Verlicchi et al., 2010).

I.2.2.3. Caractéristiques microbiologiques

Les EH sont moins chargés de plusieurs ordres de grandeur que les EUU sur le plan microbiologique (Tableau I-5) :

Tableau I-5 : Concentration en bactéries dans les EH et les EUU (Verlicchi et al., 2010).

Paramètre	EH		EUU	
	Intervalle	Moyenne	Intervalle	Moyenne
E. Coli (UFC/100mL)	10^3-10^6	10^4	10^6-10^7	10^5
Coliformes fécaux (UFC/100mL)	10^3-10^7	10^5	10^6-10^8	10^7
Coliformes totaux (UFC/100mL)	10^5-10^8	10^6	10^7-10^{10}	10^8

Cependant, **les bactéries contenues dans les EH apparaissent plus résistantes aux antibiotiques que celles contenues dans les EUU.** Certaines études mettent en avant la présence dans les effluents hospitaliers de bactéries multirésistantes aux antibiotiques et de

certaines souches typiquement hospitalières (Leprat, 1998; Schwartz et al., 2003; Emmanuel et al., 2005; Hartemann et al., 2005). 71% des souches d'E.coli testées provenant d'EH d'un hôpital français ont montré une résistance à au moins un antibiotique contre seulement 44 % pour les EUU (Passerat et al., 2010). De plus, le niveau de multirésistance atteint est plus élevé pour les bactéries contenues dans les EH. Passerat et al. (2010) précisent toutefois que la proportion de bactéries fécales antibiorésistantes apportée par les EH dans le bassin de la Seine est négligeable en comparaison à l'apport des EUU.

I.2.2.4. Micropolluants

La pollution en micropolluants contenue dans les EH ne comprend pas seulement des résidus médicamenteux mais également des agents de diagnostiques et des désinfectants. La composition en micropolluants peut fortement varier selon les spécialités de l'hôpital, le pays et les lois en vigueur. De plus, l'apparition de nouveaux médicaments et la disparition d'anciens impliquent des changements réguliers de composition des EH. Bien que certains médicaments, comme les anticancéreux, soient majoritairement administrés en traitement ambulatoire une grande quantité peut être retrouvée dans les EH suivant le temps passé par les patients à l'hôpital et les hospitalisations à plein temps. Aussi, les métabolites humains, parfois excrétés dans des proportions très importantes vis-à-vis de leur molécule mère, ne sont que très rarement quantifiés dans les EH en raison du manque de développement de techniques analytiques sur ces molécules. Une comparaison sur les concentrations en micropolluants des EH et EUU a également été effectuée dans la revue de Verlicchi et al. (2010) (Tableau I-6).

Les concentrations moyennes dans les EH apparaissent de 2 à 150 fois plus élevées que dans les EUU selon les micropolluants. A noter que le principal métal lourd retrouvé dans les EH est le platine dû à la consommation des anticancéreux cisplatine, carboplatine et oxaliplatine. Les AOX (composés organiques adsorbables) sont très présents dans les EH et sont les plus persistants dans l'environnement. Ils sont de plus très souvent toxiques pour les humains et les organismes aquatiques. Certains médicaments contiennent des halogènes liés et contribuent aux émissions d'AOX. Les agents de contraste iodés (ICM) sont utilisés pour l'imagerie par rayon X. Ils sont ainsi détectés sans surprise dans des proportions bien supérieures dans les EH que dans les EUU. Les ICM sont également sources d'AOX. Verlicchi

et al. (2012) annoncent **un rapport moyen sur les concentrations de médicaments dans les EH et les EUU reliées de 7**. Les rapports les plus élevés concernent surtout des antibiotiques et des analgésiques.

Tableau I-6 : Comparaison des concentrations des principales classes de micropolluants des EH et des EUU (Verlicchi et al., 2010).

Classe thérapeutique	Moyennes EH ($\mu g.L^{-1}$)	Moyennes EUU ($\mu g.L^{-1}$)	EH/EUU
Analgésiques	100	11.9	8-15
Antibiotiques	11	1.17	5-10
Cytostatiques	24	2.97	4-10
β-bloquants	5.9	3.21	1-4
Hormones	0.16	0.1	1-3
ICM	1008	6.99	70-150
AOX	1371	150	7-15
Gadolinium	32	0.7	35-55
Platine	13	0.155	60-90
Mercure	1.65	0.54	3-5

I.2.3. Ecotoxicité - Risques environnementaux des effluents hospitaliers

L'activité des différents services des hôpitaux requiert l'utilisation de produits très diversifiés tels que des tensioactifs, des désinfectants, des médicaments... qui sont potentiellement écotoxiques. Auteurs d'une revue sur la caractérisation de l'écotoxicité des EH, Orias et Perrodin (2013) soulignent **leur grande complexité avec des variations qualitative et quantitative considérables indiquant que l'écotoxicité des EH dépend fortement du cas considéré.** Ainsi, la grande variabilité de produits utilisés, la taille de l'hôpital, sa position géographique ainsi que la période de l'année influencent l'écotoxicité des EH. La toxicité des EH étant directement liée à l'activité de l'hôpital, celle-ci apparaît être fortement variable au cours de la journée. Une étude sur un hôpital français relève ainsi le pic quotidien de toxicité sur la plage horaire 9 h – 13 h (Boillot et al., 2008).

Orias et Perrodin (2013) ont évalué les deux approches communément employées pour caractériser l'écotoxicité : substance seule et mélange. Ces deux méthodologies ont montré le potentiel écotoxicologique des EH. **L'approche substance seule a mis en évidence la présence de composés très toxiques, à court et long termes**, avec une PNEC (Predicted No Effect Concentration : concentration en dessous laquelle il n'y a pas d'effet prévisible) minimale proche de 0.01 $pg.L^{-1}$. **L'approche mélange, conduisant à une importante**

variabilité de résultats, montre aussi une forte écotoxicité des EH globaux dans certains cas. La forte variabilité des données obtenues est liée, comme pour beaucoup d'effluents, à l'espèce des organismes testés, la toxicité pouvant être jusqu'à 20 fois supérieure pour les mêmes EH sur différents organismes (Orias et Perrodin, 2013).

Une étude effectuée sur les 100 médicaments les plus utilisés en hôpital a permis de mettre en avant que les médicaments représentant potentiellement un risque écotoxicologique élevé ne sont pas les plus utilisés dans l'hôpital (Escher et al., 2011). Les 10 médicaments les plus consommés représentent 89 % du total des PEC (Predicted Environmental Concentration : concentration prévisible dans l'environnement) des 100 médicaments les plus utilisés tandis que leur risque cumulatif associé ne représente que 0.4 % du risque total. Seul le risque du diclofénac est lié à la fois à son exposition et à sa toxicité. Cette étude a également mis en avant que 90 des 100 médicaments les plus utilisés à l'hôpital peuvent avoir une action toxique sur des organismes aquatiques non cibles. Le tonnage n'apparaît ainsi plus comme un critère de priorisation pertinent. Orias et Perrodin (2013) proposent de retenir également le taux d'excrétion, le lieu d'excrétion, les contraintes analytiques, l'écotoxicité, la cytotoxicité, la biodégradabilité, la solublité et la photodégradation.

Les EH apparaissent plus toxiques que les EUU, Leprat (1998) annonçant une écotoxicité des EH du CHU de Limoges de 5 à 15 fois supérieure de celle des EUU vis-à-vis de la bactérie *Vibrio fischeri*. Verlicchi et al. (2012) notent que 9 des 73 médicaments étudiés posent un risque élevé aux concentrations détectées dans les EH. Seulement 5 de ces 9 médicaments, dont 4 antibiotiques, représentent un risque élevé dans les EUU. La fraction particulaire des EH semble particulièrement toxique. Boillot et al. (2008) notent que, similairement à d'autres types d'effluents, l'écotoxicité des EH non filtrés est supérieure à celle des EH filtrés. Escher et al. (2011) corroborent ce constat en indiquant que les médicaments à risque important utilisés en hôpitaux sont principalement excrétés dans les fèces.

Ces auteurs déplorent le manque de données écotoxicologiques disponibles sur les cytostatiques et les antibiotiques alors que ces médicaments constituent l'une des principales préoccupations liée aux effluents hospitaliers. Orias et Perrodin (2013) notent ainsi l'absence totale de données écotoxicologiques concernant l'anticancéreux ifosfamide bien que celui-ci ait été détecté dans les EH et dans l'environnement. De même, ils ajoutent que les données expérimentales d'écotoxicité sont manquantes pour plus de 100 médicaments ayant déjà été détectés dans les EH. Alors que les médicaments focalisent

souvent l'attention il apparaît important de ne pas sous-estimer les autres polluants. Certains composés désinfectants et détergents sont utilisés en grande quantité et apportent une importante contribution à la toxicité des EH (Boillot et al., 2008). Les produits de diagnostiques (ICM) sont présents en très grande quantité dans les EH et l'environnement (Santos et al., 2010) et quasiment aucunes données écotoxicologiques ne sont disponibles.

I.2.4. Une législation insuffisante

Les rejets liquides des établissements de soins sont généralement considérés en tant qu'eaux usées industrielles au regard du code de la santé publique et sont ainsi sujets à une autorisation préalable de la collectivité propriétaire du réseau. Le code de la santé publique impose au minimum un dégrillage avant tout rejet d'eaux usées autre que domestique dans le réseau d'assainissement. Certains établissements de soins sont tenus à l'auto surveillance de leurs rejets en faisant effectuer périodiquement des analyses de leurs effluents. Les rejets des établissements de soins peuvent être contrôlés de manière inopinée et aléatoirement, comme à Paris (Mouy, 2008), par les responsables de l'assainissement. Une amende de 10 000 € a été instaurée par la loi sur l'eau et les milieux aquatiques (Lema, 2006) en cas de non-respect de l'autorisation de rejet. Aussi, la circulaire DGS/SD 7 D/Dhos/E 4 n° 2001-323 du 9 juillet 2001 stipule que le plan de gestion interne des établissements de soins doit être conforme à l'autorisation de déversement délivrée.

Certains établissements de soins français ont été classés ICPE (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement) en raison de leurs activités. Ils sont alors soumis aux normes de rejets imposées aux ICPE qui concernent uniquement des paramètres conventionnels de pollution (DCO, DBO, N, métaux lourds…) et non des polluants spécifiques aux établissements de soins. Pourtant, l'arrêté du 22 juin 2007 stipule que l'autorisation de déversement d'effluents non domestiques dans le réseau d'assainissement public peut seulement être délivrée si la STEP est capable de les traiter, or l'inaptitude des STEP conventionnelles à éliminer les résidus médicamenteux est aujourd'hui bien connue.

Il existe cependant quelques réglementations plus spécifiques concernant l'utilisation et le rejet de certains produits spécifiques aux établissements de soins tels que les produits radioactifs, les composés cytostatiques et les détergents.

Le rejet des EH dans le réseau d'EUU apparaît encadré comme tout effluent industriel quelconque. La spécificité des activités des établissements de soins ne semble pas prise en compte à l'exception de la médecine nucléaire et des déchets solides contaminés. Plusieurs ambiguïtés sont par exemple notables concernant les médicaments anticancéreux. Les risques liés à leur manipulation et le devenir des déchets semblent assimilés en raison des précautions particulières mises en œuvre mais les excrétions des patients sont totalement ignorées par la législation en vigueur. Les médicaments anticancéreux rejoignent ainsi le réseau d'assainissement alors que la communauté européenne interdit la décharge de produits chimiques et de métabolites ayant des propriétés cancérigènes ou mutagènes potentiels dans les eaux usées (Directive du Conseil 80/68, 1991 ; Directive du Conseil 76/464, 2000), des propriétés caractéristiques des médicaments anticancéreux. Ainsi, la législation actuelle concernant les rejets des établissements de soins apparaît bien insuffisante au regard des premières données d'écotoxicité collectées et des risques supposés. Il est de plus particulièrement inquiétant de constater l'absence totale de réglementation sur les effluents hospitaliers à l'échelle européenne.

I.2.5. Le traitement à la source des effluents hospitaliers : des avis divergents

Comme précisé précédemment, les EH sont communément traités avec les EUU dans les STEP municipales. Cette pratique du co-traitement est considérée comme une solution inadéquate car la dilution des différents rejets ne permet pas d'obtenir une bonne ségrégation/séparation des polluants de la phase liquide, et en particulier des micropolluants et des substances toxiques, qui sont ainsi rejetés dans l'environnement (Verlicchi et al., 2010). Les STEP conventionnelles ont été conçues pour traiter la macropollution et ne sont pas adaptées au traitement de molécules présentes à l'état de traces. De plus, certaines substances contenues dans les EH peuvent avoir un effet inhibiteur sur la biomasse et réduire l'efficacité globale de traitement. Leprat (1999) montre en effet que les EH sont susceptibles d'induire une inhibition des boues activées de STEP comprise entre 7 et 8 % et donc, de générer indirectement une augmentation de la pollution. Le pic d'inhibition se situe entre 6 et 12 h lorsque l'activité de l'hôpital est la plus importante (Leprat, 1998).

Parmi les aspects positifs d'un traitement à la source des EH l'élimination des substances spécifiquement utilisées dans les hôpitaux et les petits volumes associés apparaissent comme les arguments les plus intéressants. Les médicaments représentant les plus fortes dépenses des hôpitaux (antinéoplasiques et immunosuppresseurs) leurs sont en effet exclusifs.

Cependant, l'Académie Nationale de Pharmacie (2008) précise que bien que les rejets hospitaliers devraient être plus faciles à prévenir et à traiter directement sur site la tendance à limiter les séjours hospitaliers a pour conséquence d'augmenter la prise ambulatoire et donc les rejets domestiques. Kümmerer (2009) ajoute que **les hôpitaux ne représentent qu'une fraction minoritaire de la charge totale médicamenteuse, en dessous de 10% pour la plupart des médicaments** et même inférieur à 3% pour certains, alors qu'ils sont généralement perçus comme un des objectifs stratégiques pour la réduction des émissions. Il considère ainsi le traitement à la source des EH comme étant une solution non efficace et que les émissions hospitalières pourraient être réduites par une formation et une information appropriées du personnel et des patients.

D'autres auteurs ont d'ailleurs quelque peu rejoint ce point de vue en analysant les compositions des EH et des EUU correspondantes. En général, la contribution en pollution médicamenteuse des hôpitaux aux EUU n'a pas un impact important (Verlicchi et al., 2012 ; Santos et al., 2013), la majorité de la charge totale étant issue des eaux usées d'habitation. La contribution des hôpitaux dépend très fortement de leur taille et du nombre de lits associé, laissant supposer qu'une évaluation au cas par cas de la pertinence d'un traitement à la source serait judicieuse. Dans le même esprit, Le Corre et al. (2012) ont montré que la contribution de 6 hôpitaux au flux total de médicaments dans les eaux usées urbaines est en moyenne de 6% et apparaît ainsi négligeable. Dans ces conditions, les auteurs précisent que le traitement à la source des effluents hospitaliers ne constituerait pas une solution efficace pour réduire le flux global de médicaments. **Cependant, la contribution des hôpitaux dans les EUU varie considérablement selon les médicaments.** Verlicchi et al. (2012) notent ainsi qu'entre 16 et 67 % de 12 des 73 médicaments analysés dans les EUU proviennent des EH. Santos et al. (2013) indiquent que les analgésiques, les antibiotiques et les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont les 3 classes thérapeutiques les plus apportées par les hôpitaux dans les EUU dans leur étude, avec un taux pouvant atteindre 50 %.

Enfin, la séparation de l'urine à la source est considérée comme une stratégie alternative intéressante par certains auteurs (Lienert et al., 2007 ; Larsen et al., 2009 ; Lienert et Larsen, 2010). Cependant, bien qu'une réduction quantitative de la charge de micropolluants serait atteinte cette stratégie ne permettrait pas d'éliminer les molécules très hydrophobes majoritairement excrétées dans les fèces et qui sont particulièrement toxiques (Escher et al., 2011).

La stratégie de traitement à la source semble ainsi soulever des opinions partagées au sein de la communauté scientifique. Celle-ci reconnaît bien la spécificité des EH mais souligne la faible contribution médicamenteuse globale des EH au flux médicamenteux des EUU, laissant supposer que si traitement il doit y avoir il serait au moins aussi judicieux de moderniser les STEP municipales. De plus, elle s'interroge sur les coûts engendrés par la mise en place de technologies de traitement de pointe et de l'intérêt environnemental de telles technologies énergivores pour éliminer des traces polluantes (Kümmerer, 2009). Il n'est cependant pas possible d'ignorer la spécificité des EH. **Orias et Perrodin (2013) vont dans ce sens en affirmant la nécessité d'évaluer l'écotoxicité des effluents de chaque service hospitalier afin de définir la politique de gestion environnementale appropriée.** Ce type d'études pourrait permettre de trouver un compromis et de se focaliser sur le traitement des effluents des services particulièrement néfastes à l'environnement. C'est d'ailleurs ce que suggère l'action 47 du PNSE2 qui prévoit d'«**analyser la faisabilité et mettre en place dans les services des établissements de soins les plus concernés, des mesures de réduction à la source des rejets médicamenteux et autres produits de santé, afin de limiter leur dispersion dans l'environnement, s'assurer de l'absence d'impacts dangereux des installations de production» (PNSE2, 2009).**

I.2.6. Vers un traitement localisé des substances spécifiques aux établissements de soins ?

Certaines activités des hôpitaux sont émettrices de polluants très spécifiques qu'il pourrait être intéressant de traiter à la source par l'implantation d'unités réduites de traitement directement sur site. De par l'augmentation de leur utilisation ces dernières années en raison du développement du système de soins et de l'allongement de l'espérance de vie, les médicaments anticancéreux constituent une problématique émergente de recherche

environnementale et par conséquent des polluants d'intérêts pour cette étude. En 2011, 365 500 nouveaux cas de cancers ont été recensés en France, correspondant à 2 250 000 hospitalisations (Institut National du Cancer, 2012).

Quelques études ont été consacrées à la présence dans l'environnement des médicaments anticancéreux et de leurs risques associés (Kümmerer et Al-Ahmad, 1997 ; Johnson et al., 2008 ; Straub, 2010 ; Zounkova et al., 2010 ; Kosjek et al., 2011). Cependant, peu de molécules ont été étudiées et il n'y a pas eu d'efforts particuliers permettant d'établir les molécules représentant un risque pour l'environnement aquatique (Besse et al., 2012). Orias et Perrodin (2013) notent également que peu d'attention a été jusqu'à présent accordée aux médicaments anticancéreux lors des études portant sur les risques écotoxicologiques des EH malgré des rapports « concentration maximale mesurée dans les eaux usées / concentration prévisible sans effet » élevés (244 000 pour le fluorouracile). Aussi, aucune donnée expérimentale sur l'écotoxicité de l'ifosfamide n'est disponible bien que celui-ci ait été détecté dans 6 études entre 1997 et 2012 (Orias et Perrodin, 2013). Dans les études précédemment citées de Verlicchi et al. (2012) et Santos et al. (2013) sur la contribution des EH dans les EUU seul un anticancéreux, le tamoxifen, a été étudié sur plus de 70 molécules analysées.

Ceci est particulièrement regrettable puisqu'en raison de leur mode spécifique d'action **(cytotoxicité, génotoxicité, mutagénicité et tératogénicité) pouvant impacter la structure et les fonctions de l'ADN, les anticancéreux peuvent être toxiques envers tout organisme eucaryote** (Johnson et al., 2008). Ainsi, Besse et al. (2008) n'incluent pas les médicaments anticancéreux à leur méthodologie de priorisation des molécules pharmaceutiques puisque « ceux-ci devraient faire l'objet d'une stratégie de priorisation spécifique en raison de leurs propriétés toxiques spécifiques ». **La présence de résidus de médicaments anticancéreux dans l'environnement pourrait conduire à des effets écotoxicologiques généraux, augmenter les cas de cancers, baisser la fertilité et augmenter les malformations chez les nouveaux nés** (CytoThreat, 2013). Selon Webb et al. (2003), le risque de cancer dû aux médicaments anticancéreux existe à tout niveau d'exposition, c'est-à-dire **qu'il n'existe pas de concentration seuil en dessous laquelle il n'y a pas d'effet cancérigène.**

Les risques liés aux anticancéreux apparaissent bien réels. Zounkova et al. (2010) l'ont montré pour le fluorouracile, l'un des anticancéreux les plus consommés. Les valeurs de la plus faible concentration à laquelle les effets sont observables et de la concentration où 50%

de l'effet maximal sur la bactérie *Pseudomonas putida* sont en dessous des concentrations détectées dans les effluents d'un service d'oncologie (Mahnik et al., 2007). Aussi, Giuliani et al. (1996) ont attribué l'activité génotoxique mesurée dans 13 % des échantillons d'EH recueillis sur 2 ans aux médicaments anticancéreux. Ferk et al. (2009) ont montré les effets génotoxiques d'effluents d'un service d'oncologie. Ceux-ci ont causé des dommages significatifs à l'ADN dans les hépatocytes primaires de rats. Une relation dose-effet a clairement été mise en évidence.

La présence dans l'environnement de résidus de médicaments anticancéreux apparaît comme une problématique émergente au sein même de la problématique récente liée à l'ensemble des résidus médicamenteux. Les risques potentiels annoncés précédemment sont alarmants et doivent conduire à la multiplication des études sur le sujet, d'autant que la consommation des médicaments anticancéreux va augmenter au cours des années. C'est dans ce cadre que ce travail se positionne sur le traitement à la source des effluents issus des services d'oncologie. **Un traitement dédié au service d'oncologie pourrait permettre de travailler sur le flux global d'anticancéreux encore présents à de fortes concentrations avant leur dilution dans les effluents hospitaliers globaux.** De plus, il est surprenant de remarquer qu'une séparation des déchets contaminés par les médicaments anticancéreux ait été imposée, signe de la prise de conscience de leur dangerosité, et que rien n'ait été prévu concernant les excrétions des patients.

Il est toutefois nécessaire de souligner que les hôpitaux ne constituent pas l'unique source de rejets de médicaments anticancéreux dans l'environnement en raison de la disponibilité de certains anticancéreux dans les officines et de la proportion très importante des hospitalisations de jour (91.8 % en 2011) qui a pour conséquence qu'une partie non négligeable des anticancéreux administrés est excrétée à domicile suivant la pharmacocinétique propre à chaque molécule et à chaque patient.

Le choix de l'effluent effectué, il convient désormais de retenir le procédé de traitement le plus approprié à l'élimination des résidus médicamenteux.

I.3. Performances des procédés de traitement sur l'élimination des résidus médicamenteux

I.3.1. Procédés physico-chimiques

Très peu d'études relatent les performances de procédés physico-chimiques sur l'élimination de résidus médicamenteux, probablement car ceux-ci ne sont pas performants. Le traitement par coagulation-floculation est en effet considéré inefficace sur les résidus médicamenteux (Ternes et Joss, 2006). Suarez et al. (2009) ont relevé de bonnes performances sur l'élimination des matières en suspension et des muscs synthétiques d'effluents hospitaliers par coagulation-floculation et flottation mais seulement une élimination partielle de 3 des 13 médicaments analysés.

I.3.2. Procédés biologiques conventionnels

I.3.2.1. Boues activées

La présence de résidus médicamenteux et de leurs métabolites dans l'environnement implique leur non élimination totale par les stations d'épuration (STEP) conventionnelles à boues activées. Les STEP classiques ont en effet été conçues pour traiter la macropollution carbonée, azotée et phosphorée et ne sont pas adaptées pour l'élimination de micropolluants. Ainsi, 160 composés pharmaceutiques ont d'ores et déjà été détectés dans les effluents traités de STEP dans plusieurs pays (Kümmerer, 2009). **Leur destin lors de leur passage en STEP semble bien hétéroclite** comme en atteste les données collectées de 117 études par Miège et al. (2009) (Figure I-3). Certaines molécules comme le paracétamol et l'acide salicylique apparaissent ainsi totalement éliminées par les STEP à boues activées alors que d'autres molécules, telles que l'iopromide ou l'iopamidol, en ressortent intactes. Aussi, les abattements peuvent être très variables au sein d'une même classe thérapeutique, pour exemple les anti-inflammatoires non stéroïdiens indométacine et ibuprofène éliminés respectivement à 15 et 93.5 % (valeurs Sipma et al., 2010).

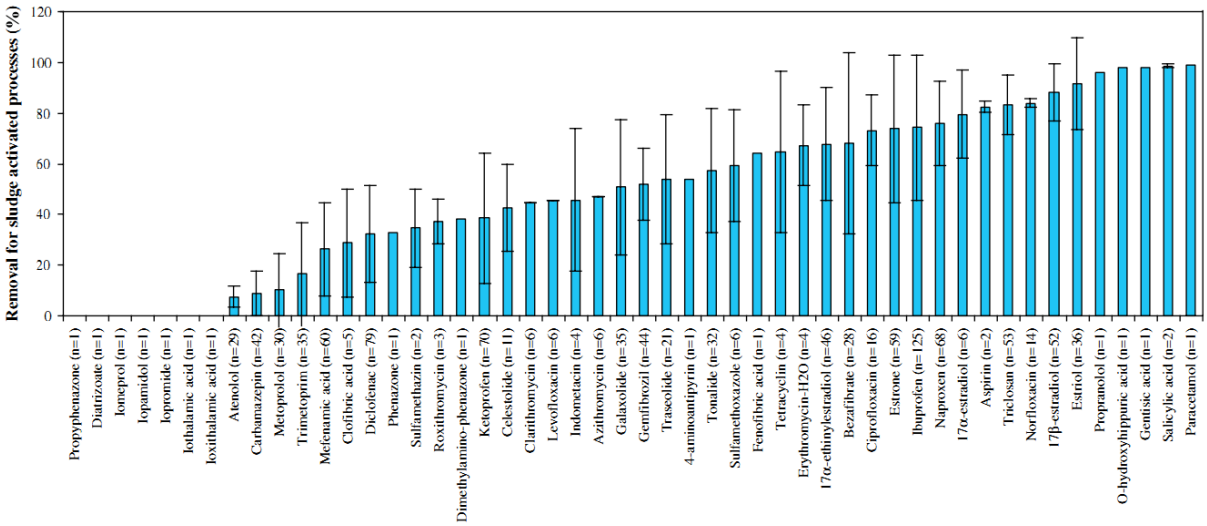


Figure I-3 : Eliminations moyennes de médicaments par des STEP à boues activées – Données collectées sur 117 études (Miège et al., 2009)

Le rôle de l'âge de boues, ou Temps de Séjour des Boues (TSB), a largement été démontré sur l'élimination des molécules médicamenteuses. Ce paramètre correspond au temps de séjour des microorganismes au sein du réacteur. Il est contrôlé par le débit de purge des boues en excès (Eq. I-1) :

$$TSB = \frac{V_{Réacteur}}{Q_{purge}} \qquad \text{(Eq. I-1)}$$

Le TSB sélectionne les microorganismes en fonction de leur taux de croissance. Seuls les organismes capables de se reproduire pendant ce temps peuvent subsister et se développer dans le réacteur. Ainsi, un TSB élevé permet le développement des bactéries à croissance lente et l'établissement d'une biomasse plus diversifiée avec des capacités étendues. Si la dégradation d'une substance dépend du TSB alors une valeur minimale de l'âge de boues peut être déterminée (Clara et al., 2005). **Il est reconnu que les STEP comprenant un traitement de l'azote sont plus efficaces que les STEP éliminant seulement la pollution carbonée ; pour cela un TSB supérieur à 10 jours doit être appliqué pour permettre le développement des bactéries nitrifiantes** (Clara et al., 2005 ; Miège et al, 2009). Les bactéries nitrifiantes sont en effet capables de co-métaboliser un large éventail de micropolluants organiques récalcitrants (Batt et al., 2006) qui pourrait être lié à la grande variété de substrats utilisés par l'enzyme principale de la réaction de nitrification : l'ammonium monooxygénase (Berthe-Corti et Fetzner., 2002). Certains micropolluants peuvent uniquement être dégradés si le traitement comprend la nitrification (Perez et al.,

2005). Le TSB de 10 jours requis au développement des bactéries nitrifiantes correspond aux standards établis par la Directive Européenne Eaux Résiduaires Urbaines 91/271/EEC de 1991 qui impose un traitement de l'azote pour les zones sensibles. Ainsi, les STEP comprenant un traitement de l'azote sont majoritaires en Europe et représentaient 75 % des STEP en France en 2009 (Miège et al, 2009).

I.3.2.2. Lagunage / filtres plantés

L'épuration par lagunage ou par filtres plantés est parfois utilisée pour le traitement des eaux usées en zone rurale. Contrairement aux procédés à boues activées qui ont jusqu'à présent focalisé l'essentiel des recherches peu d'études ont relaté les performances des lagunes sur l'élimination des résidus médicamenteux. MacLeod et Wong (2010) notent que les flux médicamenteux par habitant sont équivalents en zones rurale et urbaine. Les concentrations médicamenteuses en sortie d'une lagune fonctionnant à un Temps de Séjour Hydraulique (TSH) de 90 jours sont semblables à celles en sortie de 2 STEP à boues activées équipées de désinfection UV (MacLeod et Wong, 2010). Sans préciser de paramètres opératoires, Li et al. (2013) font le même constat entre une lagune et plusieurs STEP à boues activées sans traitement tertiaire. Cependant, ces deux auteurs ont relevé de fortes variations saisonnières pour les lagunes. En hiver, la baisse de température ralentit l'activité des microorganismes, la glace peut parfois recouvrir la lagune, empêchant la photolyse, et la consommation de médicaments varie (MacLeod et Wong, 2010 ; Li et al., 2013).

Des revues sont récemment parues concernant les performances des filtres plantés sur l'élimination des résidus médicamenteux (Li et al., 2014 ; Verlicchi et Zambello, 2014 ; Zhang et al., 2014). Les procédés à filtres plantés permettent la combinaison de zones aérobie, anoxie et anaérobie et l'établissement de temps de séjour hydrauliques bien plus long qu'en STEP. Bien que certaines études notent des performances plus faibles atteintes par les filtres plantés en comparaison aux traitements conventionnels à boues activées (Camacho-Munoz et al., 2012) la majorité des études observent des performances similaires (Maramaros et Bayona, 2006). Peu d'études notent une légère amélioration de l'élimination de molécules récalcitrantes au traitement conventionnel par boues activées, telles que la carbamazépine et l'acide clofibrique respectivement éliminées à 39 et 34 % (Conkle et al., 2008 ; Llorens et al., 2009). Ces auteurs attribuent cette amélioration par l'application de TSH plus élevé (1

mois) et par une plus grande exposition au soleil. Ainsi, les auteurs des revues précédemment citées concluent que les filtres plantés pourraient représenter une bonne alternative aux procédés à boues activées conventionnels. **Cependant, il convient de préciser que l'élimination demeure loin d'être complète pour certaines molécules comme pour les procédés conventionnels à boues activées.**

Les procédés biologiques conventionnels de traitement fournissent ainsi des performances très variables sur l'élimination des résidus médicamenteux qui peuvent, pour certains, ressortir intacts des STEP conventionnelles. Les rares améliorations obtenues par les filtres plantés restent très limitées et nécessitent l'application de TSH bien plus importants impliquant un plus grand encombrement au sol. L'âge de boues apparaît comme le paramètre clé de l'élimination de micropolluants par les procédés à boues activées. La rétention quasi totale de la biomasse dans le procédé bioréacteur à membrane (BàM) permet de travailler à un âge de boues beaucoup plus élevé que dans les STEP à boues activées conventionnelles. Ainsi, une biomasse de BàM peut théoriquement développer de nouvelles capacités, notamment l'adaptation et la dégradation des polluants récalcitrants.

I.3.3. Bioréacteur à membrane

I.3.3.1. Généralités

Le bioréacteur à membrane (BàM) consiste en un procédé conventionnel à boues activées couplé à un procédé de filtration membranaire. Les membranes permettent de retenir la biomasse au sein du réacteur et de s'affranchir d'un clarificateur, compactant ainsi les installations. Les membranes poreuses utilisées sont généralement de microfiltration ou d'ultrafiltration. La taille des pores étant par conséquent inférieure à 1 µm, le perméat obtenu est considérablement désinfecté, très peu chargé en matières en suspension, de meilleure qualité générale que l'effluent traité d'une STEP conventionnelle offrant ainsi des perspectives de réutilisation de l'eau traitée. **La rétention quasi totale de la biomasse autorise le fonctionnement à des âges de boues élevés permettant l'apparition des bactéries à croissance lente dont les bactéries nitrifiantes.** Contrairement aux STEP à boues activées classiques le BàM permet de dissocier totalement le temps de séjour hydraulique

(TSH) du temps de séjour des boues (TSB). La concentration en boues de la liqueur mixte est également plus élevée que dans les STEP conventionnelles. Les bactéries de la biomasse très concentrée du BàM utilisent davantage les substrats pour leur maintenance que pour leur croissance ce qui réduit la production de boues en excès (Witzig et al., 2002) et en conséquence les coûts de traitement associés.

Le principal inconvénient du procédé BàM provient du phénomène de colmatage de la membrane. Au cours de la filtration, le dépôt de la biomasse, des matières en suspension et de débris cellulaires à la surface ou à l'intérieur de la membrane augmentent la résistance hydraulique à la filtration. Le colmatage doit être contrôlé pour maintenir la productivité et une exploitation à faible flux est requise. Différentes techniques sont ainsi mises en œuvre suivant la configuration de BàM pour contrôler le colmatage. Après une baisse trop importante de la perméabilité un nettoyage chimique doit être effectué.

Le nombre de publications scientifiques concernant le procédé BàM augmente exponentiellement d'environ 20 % chaque année (Santos et al., 2011). Depuis 2000, de nombreuses publications ont porté sur l'élimination des micropolluants par BàM. Ce thème de recherche est d'ailleurs celui qui évolue le plus rapidement.

I.3.3.2. Configurations

Le bioréacteur à membrane externe ($BàM_E$) (Figure I-4) permet des installations compactes et des interventions de maintenance facilitées au niveau des membranes. Les membranes utilisées sont généralement de type tubulaire céramique. Les flux obtenus peuvent atteindre 170 $L.h^{-1}.m^{-2}$ (Gander et al., 2000 ; Xing et al., 2000). Afin de limiter le colmatage de la membrane de fortes vitesses tangentielles, comprises entre 2 et 5 $m.s^{-1}$, sont appliquées (Tardieu et al., 1999 ; Xing et al., 2000 ; Clouzot et al., 2011), tout en contrôlant le débit de perméat par une vanne de contrepression.

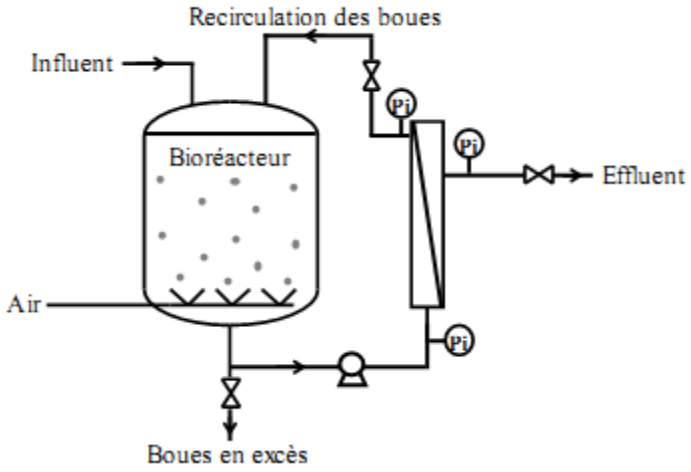


Figure I-4 : Schéma d'un BàM$_E$

Une nouvelle configuration est introduite en 1989 : le bioréacteur à membranes immergées BàM$_I$ (Yamamoto et al., 1989) (Figure I-5). Les membranes sont directement immergées dans le réacteur biologique avec pour objectif de réduire les coûts énergétiques et d'investissement. Dans cette configuration la PTM est inférieure à 1 bar et le perméat est aspiré par une pompe de succion. Des bulles d'air sont injectés pour contrôler le colmatage des membranes.

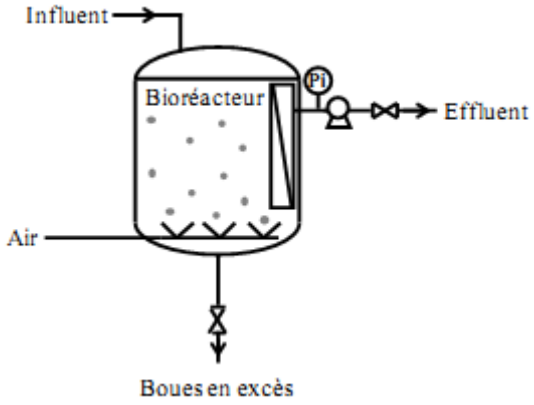


Figure I-5 : Schéma d'un BàM$_I$

Une troisième configuration est apparue plus récemment : le bioréacteur à membranes immergées externes (BàM$_{IE}$) (Lesjean et al., 2002). Le BàM$_{IE}$ consiste en une configuration hybride du BàM$_E$ et du BàM$_I$ (Figure I-6). Les modules membranaires sont en effet situés à l'extérieur du bassin biologique mais comme pour un BàM$_I$ ils sont immergés et la dépression nécessaire à la filtration est assurée par une pompe de succion. La filtration est

réalisée sur des membranes planes organiques ou fibres creuses. Le flux de perméat est du même ordre de grandeur que celui obtenu avec un BàM$_I$.

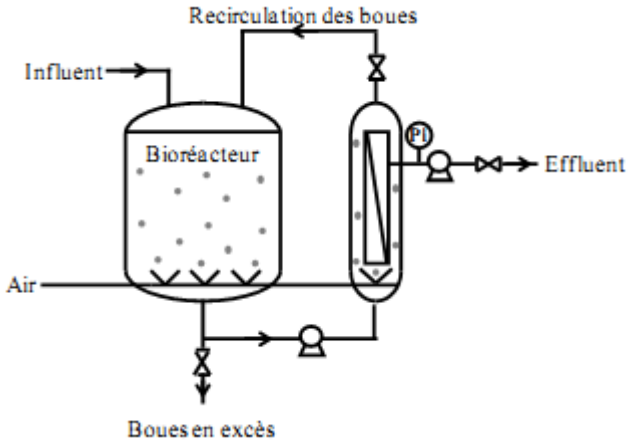


Figure I-6 : Schéma d'un BàM$_{IE}$

I.3.3.3. Comparaison des configurations

Le coût d'équipement plus faible des BàM$_I$ et BàM$_{IE}$ explique l'essor actuel des configurations immergées pour les installations municipales. La configuration BàM$_E$, généralement équipée de membranes céramiques, est peu commercialisée en raison d'importants coûts d'investissement et d'exploitation **mais elle s'avère toutefois adaptée au traitement d'effluents industriels car elle offre la possibilité d'appliquer des lavages chimiques agressifs à de fortes températures** (pH 2 à 13, température jusqu'à 80 °C). Cette configuration permet également des installations compactes même pour des effluents très concentrés (Grasmick et al., 2007) alors que les configurations immergées requièrent un encombrement au sol supérieur en raison de la faible PTM applicable, le flux de perméat ne dépassant généralement pas 50 $L.h^{-1}.m^{-2}$ (Gander et al., 2000 ; Yoon et al., 2004). Si les membranes céramiques sont plus coûteuses que les membranes organiques utilisées dans les configurations immergées, la surface membranaire requise est plus faible et leur durée de vie plus importante.

Les modes de filtration des différentes configurations sont énergivores puisque la filtration tangentielle en BàM$_E$ requière l'application de fortes vitesses tangentielles et la maîtrise du colmatage dans les configurations immergées nécessite l'injection de bulles d'air. Aussi, la

maintenance sur les membranes dans la configuration $BàM_I$ est difficile et peut nécessiter de vider entièrement le compartiment membranaire. Malgré ses limitations le $BàM_I$ est souvent préféré pour les installations à grande échelle et a permis une augmentation des installations de BàM depuis les quinze dernières années surtout pour le traitement des eaux usées urbaines. La configuration $BàM_{IE}$ a pour intérêt de regrouper certains avantages des deux configurations : les coûts énergétiques et d'investissements limités du $BàM_I$ et les opérations de maintenance facilitées par l'isolement des modules du $BàM_E$ grâce au mode de filtration tangentiel. De plus, l'aération apportée pour les besoins des microorganismes et pour le contrôle du colmatage des membranes est découplée dans cette configuration et peut ainsi être optimisée.

La configuration de BàM peut provoquer des modifications des propriétés de la biomasse. Le cisaillement subi dans les $BàM_E$ limite le développement des bactéries filamenteuses et la taille des flocs bactériens est diminuée (Defrance et al., 2000 ; Wisniewski et al., 2000). **Cette diminution a pour conséquence d'augmenter la surface d'échange, d'accroître ainsi l'activité biologique et également de favoriser la sorption des polluants sur les boues.** Cependant, des flocs plus petits génèrent un colmatage membranaire plus important dans les $BàM_E$ (Kwon et al., 2000 ; Kim et al., 2001 ; Le-Clech et al., 2004). Clouzot et al. (2010) ont observé une acclimatation plus rapide de la biomasse à leur effluent dans un $BàM_{IE}$ en raison des conditions hydrodynamiques plus douces mais aucune différence n'a été constatée concernant les performances épuratoires entre les 2 configurations.

I.3.3.4. Comparaison STEP / BàM sur l'élimination des résidus médicamenteux

Une comparaison des performances des STEP conventionnelles et des BàM a été réalisée par Sipma et al. (2010) à partir des nombreuses données désormais disponibles. Sur les 30 médicaments sélectionnés dans leur étude, il est remarquable que seulement trois molécules (solatol, famotidine, hydrochlorotiazide) soient mieux éliminées par les STEP conventionnelles que par des BàM. **L'abattement des 27 autres molécules a été soit similaire soit meilleur par BàM,** bien qu'il convienne de préciser que certaines molécules demeurent peu éliminées :

- les performances sont relativement semblables concernant les molécules facilement éliminables ;

- de meilleures performances sont atteintes par BàM pour les molécules modérément et difficilement éliminables, bien que l'élimination demeure incomplète.

L'étude de Radjenovic et al. (2009) comparant l'élimination de 22 médicaments par BàM et STEP conventionnelle montre bien ce constat (Figure I-7). L'abattement des molécules modérément éliminées en STEP conventionnelle (entre 10 et 60 %) est sensiblement amélioré par BàM et peut même être supérieur à 90 % pour certaines.

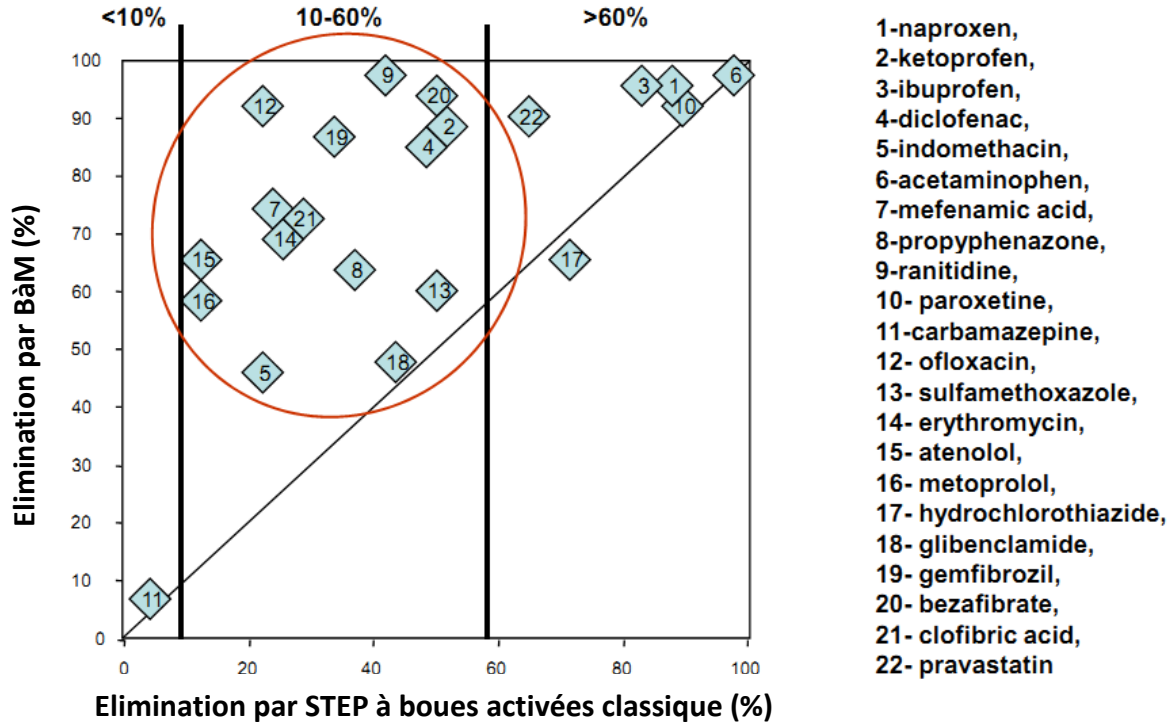


Figure I-7 : Comparaison des abattements de 22 médicaments par STEP conventionnelle et BàM (Radjenovic et al., 2009)

Pour les micropolluants peu biodégradables, polaires et persistants ce qui est le cas de nombreuses molécules pharmaceutiques, Bernhard et al. (2006) précisent que de meilleures éliminations sont obtenues par BàM. Certaines molécules avec une structure chimique complexe non éliminées en STEP conventionnelles peuvent être éliminées par BàM (Kimura et al., 2005). Le BàM améliore l'élimination des molécules modérément biodégradables et hydrophobes (De Wever et al., 2007). De plus, le BàM s'avère plus constant dans l'élimination de micropolluants (Radjenovic et al., 2007 & 2009).

Il est notable qu'à TSB identiques des abattements similaires aient été atteints par BàM et STEP conventionnelles sur divers micropolluants, confirmant le rôle majeur du TSB dans l'abattement de micropolluants (Clara et al., 2004). **Ainsi, le principal avantage du BàM semble être la possibilité de définir indépendamment le TSB du TSH.** Tambosi et al. (2010) confirment le rôle du TSB en obtenant une amélioration de l'élimination de 6 molécules pharmaceutiques par une augmentation du TSB de 15 à 30 jours dans un BàM. Aussi, un TSB élevé permet de préserver un potentiel métabolique lorsqu'un substrat particulier n'est plus présent dans l'effluent. Le BàM possède donc un « effet de mémoire » ce qui lui permet d'être plus souple lors d'importantes fluctuations de concentrations (De Wever et al., 2007).
Malgré l'évidence du rôle de l'âge de boues il n'a pas été possible d'établir de corrélations claires entre le TSB et l'élimination des composés pharmaceutiques (Zhang et al., 2008 ; Vieno et al., 2007 ; Lishman et al., 2006). Clara et al. (2005) suggèrent qu'une valeur critique du TSB peut toutefois être déterminée si la biodégradation d'un composé est dépendante du TSB. De même, une limitation aux effets positifs du TSB sur l'élimination de la plupart des médicaments semble se situer pour un âge de boues au-delà de 30 jours (Suarez et al., 2008).
L'âge de boues est limité par la concentration de la biomasse qu'il est nécessaire de maintenir relativement constante. La plus forte concentration de biomasse dans les BàM engendre une diminution de la charge massique et donc de la quantité de matière organique disponible par quantité de microorganismes, ce qui renforce les conditions de substrats limitant. **L'épuisement du carbone et / ou de l'azote augmente ainsi la dégradation de certaines molécules pharmaceutiques (Drillia et al., 2005) car ces conditions forceraient les microorganismes à dégrader les substances faiblement biodégradables.** Ce métabolisme oligotrophe (milieu à faible concentration en nutriments) favoriserait ainsi la dégradation des composés pharmaceutiques aux concentrations environnementales (Suarez et al., 2008).
Il est également supposé que la forte concentration de la biomasse des BàM a un effet positif sur l'élimination par sorption des micropolluants en raison de la plus grande quantité disponible de matière adsorbante (Sipma et al., 2010). De plus, une plus forte concentration de biomasse fournit une meilleure stabilité et résistance aux pics de substances toxiques (Lee et al., 2003 ; Melin et al., 2006). D'un point de vue plus général, cette plus forte concentration de biomasse permet de diminuer le volume de boues produites, réduisant ainsi les coûts de traitement.

Des abattements similaires à TSB identiques indiquent aussi que les membranes utilisées dans les BàM ne constituent pas de barrière physique efficace dans l'élimination des micropolluants. **Les molécules pharmaceutiques sont en effet de petites tailles, généralement comprises entre 200 et 300 Da, et donc sont donc au moins 100 fois plus petites que le seuil de coupure des membranes de microfiltration et d'ultrafiltration utilisées en BàM (Joss et al., 2005).** Cependant, la membrane permettant la rétention quasi complète des matières en suspension retient en conséquence les molécules pharmaceutiques hydrophobes s'adsorbant sur les boues qui résident plus longuement dans les BàM que dans les STEP conventionnelles pouvant ainsi augmenter leur élimination (Clara et al., 2004).

Malgré le consensus apparent de la communauté scientifique sur les meilleures performances obtenues par BàM il convient de préciser que Cirja et al. (2008) n'ont pas observé d'améliorations par rapport aux procédés conventionnels, bien qu'ils notent des variations selon les molécules étudiées. Aussi, certaines molécules comme la carbamazépine demeurent récalcitrantes aux deux types de traitement (Bernhard et al., 2006).

I.4. Elimination des résidus médicamenteux par les procédés à boues activées et impact sur la biomasse épuratrice

I.4.1. Mécanismes d'élimination des résidus médicamenteux dans les procédés à boues activées

L'élimination de polluants dans les STEP à boues activées peut théoriquement se faire par 4 mécanismes : la biodégradation, la sorption sur les boues, la phototransformation et l'air-stripping. Les chercheurs du projet POSEIDON (2006) ont déterminé que l'air-stripping était négligeable puisque la plupart des composés pharmaceutiques ont des coefficients de Henry très faibles ($K_H < 10^{-5}$) alors qu'il est considéré qu'un K_H d'au moins 10^{-3} est requis pour prendre en compte l'air-stripping dans le cas d'une aération fine bulles. Cependant, ils n'excluent pas l'apparition de ce phénomène dans les $BàM_I$ en raison des larges bulles utilisées pour contrôler le colmatage de la membrane (POSEIDON, 2006). De même, la phototransformation peut être négligée dans les STEP malgré leur fonctionnement à ciel ouvert. La turbidité élevée de la liqueur mixte bloque en effet les rayons du soleil. Cependant, la phototransformation ne peut pas être exclue dans les clarificateurs où les molécules les plus sensibles pourraient être dégradées (POSEIDON, 2006). **La biodégradation et la sorption sur les boues sont ainsi considérées comme les deux mécanismes principaux d'élimination des composés pharmaceutiques dans les procédés de traitement à boues activées.**

La disparition d'un composé de la phase liquide ne signifie pas forcément que celui-ci a été entièrement éliminé biologiquement ou sorbé sur les boues puisque la molécule mère a pu être transformée en métabolite lors du processus de biodégradation. Kümmerer (2009) insiste ainsi sur l'importance de bien différencier les termes biodégradation et biotransformation puisque la dégradation d'une molécule mère peut conduire à la formation de métabolites généralement méconnus et peu analysés dont il serait cependant nécessaire de se préoccuper (Kümmerer, 2009). Ainsi, le terme biotransformation sera utilisé dans la suite du manuscrit et désigne à la fois l'élimination biologique et la métabolisation de la molécule mère.

I.4.1.1. Biotransformation

Les bactéries composant les boues activées utilisent les polluants des eaux usées pour leurs besoins de croissance et de maintenance. Logiquement, l'élimination d'une certaine quantité de polluants par voie métabolique engendre une production proportionnelle de biomasse. Cependant, l'élimination de micropolluants ne génère pas une production de boue significative puisque ceux-ci ne sont présents qu'à l'état de traces (µg.L^{-1} – ng.L^{-1}). Ces composés sont généralement transformés par cométabolisme (Clara et al., 2005).

Joss et al. (2006) ont observé une diminution exponentielle de la concentration de molécules pharmaceutiques au cours du temps lors de tests en réacteur batch. La biotransformation des composés pharmaceutiques suit ainsi un modèle de pseudo-premier ordre (Eq. I-2) :

$$\frac{dC_i}{dt} = k_i, biol \,.\, MES \,.\, C_i \qquad \text{(Eq. I-2)}$$

avec :

C_i : concentration soluble du composé i (µg.L^{-1})

$k_i, biol$: constante cinétique de transformation de pseudo 1er ordre du composé i (L.gMES^{-1}.j^{-1})

MES : concentration en matières en suspension dans le réacteur (gMES.L^{-1})

La cinétique de transformation est donc proportionnelle à la concentration initiale du composé (premier ordre) et à la concentration de boues (pseudo). **Ainsi, plus le composé est initialement concentré et meilleur devrait être son taux de biodégradation** (dans une gamme de concentration n'inhibant pas la biomasse). Le TSH peut ainsi être optimisé en fonction des concentrations en entrée de procédé et de la valeur de la constante k_i,*biol*. La constante k_i,*biol* dépend ainsi de la dégradabilité du composé mais également de la composition des boues qui exerce différents types d'influence sur le mécanisme de biodégradation des composés pharmaceutiques :

- l'âge de boues ;
- la fraction de biomasse active dans les matières en suspension. Plus l'âge de boues est élevé et plus la fraction de matières inertes et inorganiques augmente ce qui provoque une baisse relative de k_i,*biol* ;
- la taille des flocs bactériens pour les composés propices à la biotranformation (Joss et al., 2004).

L'influence de la température sur l'activité biologique est largement connue et il est donc logiquement supposé que celle-ci devrait influencer l'élimination des micropolluants. Cependant, il n'a pas été possible de conclure sur son effet en raison de résultats contradictoires (Sipma et al., 2010).

Joss et al. (2006) ont classé les composés pharmaceutiques en 3 groupes selon leurs constantes $k_i,biol$ (Figure I-8) :

- $k_i,biol$ < 0,1 L.gMES^{-1}.j^{-1} : pas de transformation-élimination significative due à la biodégradation ;
- 0,1 < $k_i,biol$ < 10 L.gMES^{-1}.j^{-1} : élimination partielle (entre 20 % et 90 %) ;
- $k_i,biol$ > 10 L.gMES^{-1}.j^{-1} : plus de 90 % de transformation-élimination due à la biodégradation.

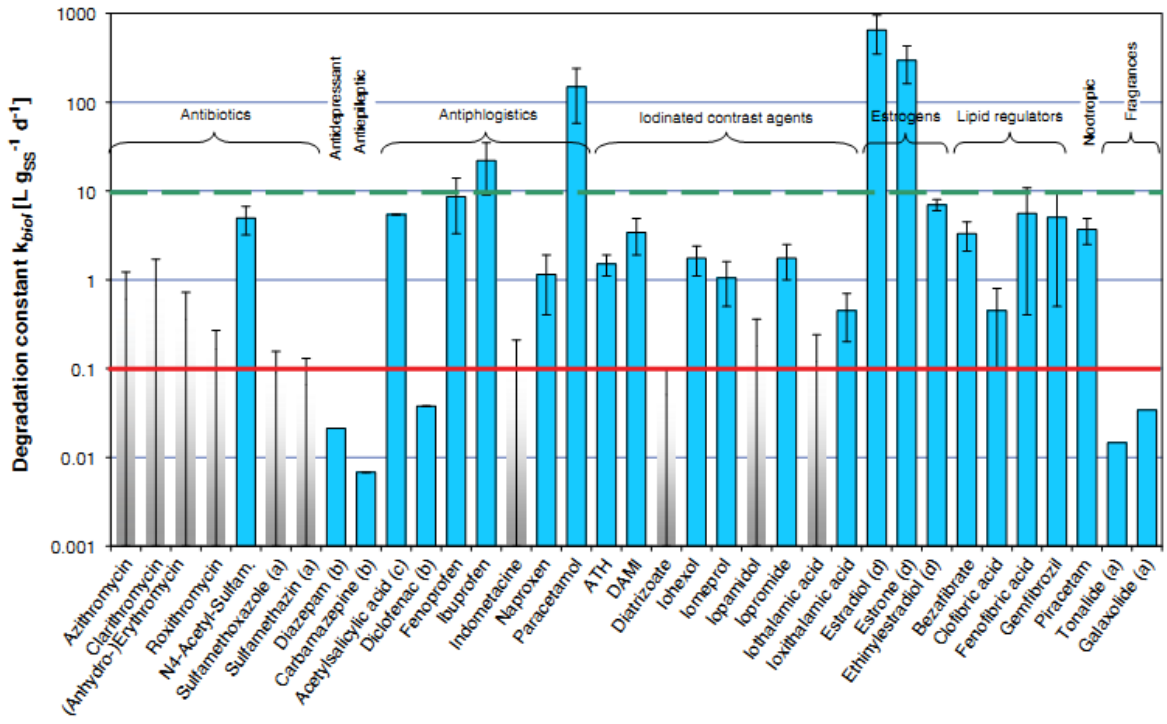


Figure I-8 : Constante de transformation $k_i,biol$ de 35 médicaments (Joss et al., 2006)

Leurs résultats montrent que seulement 4 des 35 molécules médicamenteuses étudiées (estrone, estradiol, ibuprofène et paracétamol) devraient être éliminées par biotransformation à plus de 90 % alors que ce mécanisme peut être négligé pour un tiers des composés étudiés ($k_i,biol$ inférieur à 0.1 L.gMES^{-1}.j^{-1}). Bien qu'il semble y avoir des

similitudes de comportement au sein des classes thérapeutiques il ne semble pas possible de conclure sur la biotransformabilité d'une spécialité particulière en raison de quelques exceptions pour les antibiotiques et les anti-inflammatoires. La constante $k_i, biol$ doit donc être déterminée expérimentalement.

I.4.1.2. Sorption

Deux mécanismes de sorption existent :

- l'absorption : interactions hydrophobes des groupes aromatiques et aliphatiques d'un composé avec la cellule membranaire lipophile des microorganismes et de la fraction lipide des boues.

- l'adsorption : interactions électrostatiques des groupes chargés positivement d'une molécule avec les surfaces des microorganismes chargées négativement.

Deux types de coefficients ont par le passé été souvent utilisés pour caractériser les capacités de sorption de molécules : le coefficient de partage octanol-eau K_{ow} et le coefficient de partage carbone organique-eau K_{oc}. Ces coefficients, représentant uniquement l'hydrophobicité d'une molécule, se sont depuis révélés inappropriés pour représenter les affinités de sorption des molécules pharmaceutiques, pour l'essentiel ionisables impliquant ainsi l'influence du milieu (Lai et al., 2000 ; Holbrook et al., 2004). La sorption de certains médicaments s'est ainsi révélée significative en dépit de leurs coefficients K_{ow} très faibles (Golet et al., 2003). Le pH, le potentiel redox, la structure stéréochimique et la nature chimique du sorbant et de la molécule sorbée peuvent influencer le mécanisme de sorption sur les boues activées (Kümmerer, 2009). L'influence du pH sur l'élimination de micropolluants ionisables dans un BàM a ainsi été confirmée par l'application d'un pH acide modifiant l'hydrophobicité de certains composés peu propices à la sorption sur les flocs bactériens à pH neutre (Urase et al., 2005 ; Tadkaew et al., 2010). En fonction de son pKa un composé peut en effet exister sous différents états de protonation, modifiant ainsi son hydrophobicité (Cirja et al., 2008).

Le coefficient de distribution solide-eau K_D, appelé également coefficient de Nernst, a ensuite été introduit comme le paramètre représentant le plus fidèlement la fraction sorbée

d'une molécule sur les matières en suspension (Schwarzenbach et al., 2003 ;Ternes et al., 2004). Ce coefficient tient en effet compte des deux mécanismes principaux de sorption : l'absorption (interactions hydrophobes caractérisées par K_{ow}) et l'adsorption (interactions électrostatiques caractérisées par la constante de dissociation pK_a). Ainsi, l'effet du pH sur les propriétés de sorption d'une molécule est pris en compte par le coefficient K_D, ce qui n'est pas le cas du coefficient K_{ow} non adapté aux espèces ionisables. Le coefficient de distribution solide-eau K_D est défini comme le rapport entre les concentrations d'une molécule dans la phase solide et dans la phase aqueuse à l'équilibre (Eq. I-3) :

$$K_D = \frac{C_{s\,(eq)}}{C_{aq\,(eq)}} \text{ (Eq. I-3)}$$

avec :

K_D : coefficient de distribution solide-eau ($L.kg^{-1}_{MES}$) ;

$C_{s\,(eq)}$: quantité de substance dans la phase solide à l'équilibre ($mg.kg^{-1}_{MES}$) ;

$C_{aq\,(eq)}$: concentration en masse de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre ($mg.L^{-1}$).

La valeur de K_D est dépendante des multiples propriétés du composé et du milieu :

- la solubilité de la molécule est inversement proportionnelle à sa capacité de sorption ;

- la polarité joue un rôle majeur dans la mobilité d'un composé. Les substances polaires se dissolvent mieux dans l'eau que les composés apolaires et ont donc des capacités de sorption plus faibles ;

- le coefficient de partage octanol / eau Kow indique le caractère hydrophile ou hydrophobe d'un composé organique. Plus ce coefficient est élevé et plus le composé est hydrophobe et a ainsi de bonnes capacités de sorption ;

- le pH peut modifier la solubilité d'un composé en raison de la présence de groupes fonctionnels ionisables. Par exemple, les acides organiques s'adsorbent mieux en milieu acide et les composés amines s'adsorbent mieux en milieu basique ;

- la température ;

- le type de boues (primaire ou secondaire) des STEP.

Le coefficient K_D dépend ainsi des caractéristiques de la molécule et du type de boues. K_D doit donc être déterminé expérimentalement pour chaque composé et pour chaque type de boues.

Seuls les composés hydrophobes ou chargés positivement ont des valeurs de K_D suffisamment élevées pour que la sorption soit considérée comme un mécanisme d'élimination significatif (POSEIDON, 2006). **La sorption d'un composé est considérée négligeable pour des boues de STEP municipale si K_D est inférieur à 500 L.kg$_{MES}^{-1}$ car elle représenterait moins de 10 % d'élimination (Ternes et al., 2004). Joss et al. (2005) annoncent une valeur seuil plus faible à 300 L.kg$_{MES}^{-1}$ avant de prendre en compte le mécanisme de sorption.** Sipma et al. (2010) précisent que la sorption des composés pharmaceutiques sur les boues activées est généralement un mécanisme mineur d'élimination en raison des faibles valeurs de K_D des médicaments. De nombreuses molécules pharmaceutiques sont en effet hydrophiles ce qui limite à priori les phénomènes de sorption. Des molécules très hydrophiles, telles que les antibiotiques de la classe fluoroquinolone, sont toutefois fortement éliminées par sorption dû à des interactions électrostatiques (Göbel et al., 2007 ; Vieno et al., 2007). Pour les composés très hydrophobes, la sorption peut constituer un mécanisme d'élimination majeur. Sur 40 micropolluants étudiés dans un BàM, les 14 molécules très hydrophobes ont toutes été éliminées à plus de 85 % (Tadkaew et al., 2011) (Figure I-9).

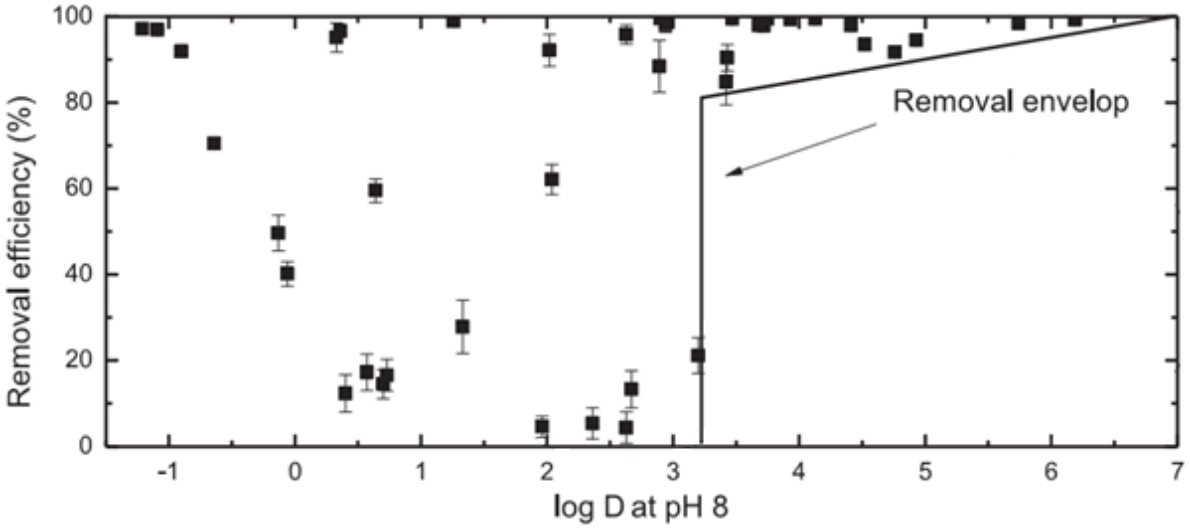


Figure I-9 : Relation entre l'abattement de micropolluants et leur hydrophobicité efffective (Log D)[1] (Tadkaew et al., 2011)

[1] Le coefficient de distribution D_{ow} est une version corrigée du coefficient K_{ow} par le pH et le pKa pour les espèces ionisables qui a plus rarement été utilisé (Wells 2006 ; Alturki et al., 2010 ; Tadkaew et al., 2011) mais sa fiabilité reste à confirmer (Yamamoto et al., 2009).

Les auteurs relèvent également que la présence et le type de groupes fonctionnels électro-attracteur ou électro-donneur semblent ensuite gouverner l'élimination des autres molécules hydrophiles et modérément hydrophobes. Les propriétés physicochimiques des molécules s'avèrent donc décisives dans leur élimination par biotransformation et par sorption dans les procédés à boues activées.

Bien que la sorption d'un composé sur les flocs des boues activées engendre une dépollution apparente de l'effluent en sortie de STEP ce mécanisme correspond à un transfert de pollution de la phase liquide vers la phase solide et non à une élimination définitive. Alors qu'il apparaît primordial d'étudier les risques liés aux différentes filières de traitement et valorisation des boues en excès issues d'un traitement à la source des effluents hospitaliers, la question se pose également pour les boues issues des STEP municipales pouvant contenir de nombreux micropolluants dont des résidus médicamenteux. La valorisation des boues par épandage agricole est la voie privilégiée de disposition des boues en France (plus de 70 % en 2007). **Il s'avère ainsi nécessaire de différencier les 2 mécanismes d'élimination de résidus médicamenteux afin d'estimer la fraction transférée aux boues ce qui permettrait d'évaluer la pertinence environnementale de la filière d'élimination / disposition des boues de STEP en excès.**

I.4.2. Impact des résidus médicamenteux sur les procédés à boues activées

La présence de substances toxiques peut causer un stress aux bactéries composant les boues activées. Un stress chimique est défini comme l'exposition d'une cellule à un polluant chimique présent à une concentration sublétale mais suffisamment forte pour provoquer des réponses d'adaptation et de protection. La présence de composés toxiques peut provoquer une détérioration des propriétés et des capacités épuratoires des boues activées (Bitton et al., 1994 ; Henriques et al., 2005), parmi lesquelles :

- Diminution de l'abattement de la DCO et/ou de la DBO ;
- Inhibition de la nitrification ;
- Efficacité réduite dans la séparation de solides ;
- Modification des propriétés de compression de la boue.

L'inhibition diffère évidemment selon les molécules médicamenteuses étudiées et leurs concentrations. Aubenneau et al. (2010) et Delgado et al. (2010) n'ont pas observé d'altération sur l'élimination de la DCO dans un BàM après ajout respectif de carbamazépine et de cyclophosphamide mais ont noté des réponses différentes de la biomasse. Alors que la carbamazépine n'a pas induit d'altérations sur les performances biologiques l'injection de cyclophosphamide a ralenti la croissance bactérienne. Ce médicament a également provoqué une diminution de la respiration exogène qui ne s'est cependant pas traduite par une baisse d'élimination de la DCO et de l'azote (Delgado et al., 2010). **Les auteurs suggèrent que l'effet inhibiteur serait compensé par les conditions de substrat limitant caractéristiques du BàM permettant aux microorganismes demeurant actifs d'éliminer efficacement la pollution.** Cet effet du cyclophosphamide sur la respiration endogène et exogène a uniquement été observé sur le long terme. L'augmentation de la respiration endogène correspondrait à des besoins énergétiques de maintenance plus élevés des microorganismes pour s'acclimater à la présence du micropolluant. La diminution de la respiration exogène traduirait le détournement des ressources en carbone et en énergie du substrat qui ne sont plus utilisées pour la croissance bactérienne mais pour la gestion du stress et la protection face au micropolluant. Aubenneau et al. (2010) proposent deux explications au changement de besoins en oxygène des microorganismes en présence de carbamazépine :

- La présence d'une communauté bactérienne différente avec des besoins en oxygène différents pour éliminer le substrat exogène ;
- La présence de carbamazépine implique un changement de voie métabolique du substrat.

La structure de la biomasse peut également être affectée par la présence de substances médicamenteuses. Ainsi, une diminution du diamètre moyen des flocs, après ajout respectif de carbamazépine et d'érythromycine, a été observée (Aubenneau et al., 2010 ; Louvet et al., 2009). Aubenneau et al. (2010) notent toutefois que l'écart avec le réacteur témoin tend à se réduire au cours du temps, indiquant éventuellement une acclimatation en cours. Louvet et al. (2009) précisent que la concentration d'érythromycine influe sur la vitesse de dégradation des flocs et qu'un phénomène de moussage est apparu dans les premières

minutes de l'expérience après introduction de l'érythromycine. De plus, tous les paramètres témoignant de la toxicité de l'érythromycine ont augmenté au cours du temps.

Contrairement à ces 2 études, Delgado et al. (2009) ont observé une augmentation de la taille moyenne des flocs en présence de cyclophosphamide qu'ils attribuent à la production de polymères extracellulaires par les microorganismes. Les polymères extracellulaires produits aux extrémités des flocs permettraient ainsi de protéger les microorganismes face à la toxicité du cyclophosphamide et favoriseraient l'agglomération des flocs, augmentant ainsi leur taille.

Le procédé de traitement utilisé peut avoir une influence sur la capacité à résister face à une charge toxique puisque Henriques et al. (2005) notent que les procédés à boues activées favorisant la formation de petits agrégats, comme les BàM, et les procédés comportant un fort cisaillement sont plus sensibles à l'inhibition. Dans cette étude, les tests respirométriques sur les biomasses de 2 BàM ont révélées une inhibition 1.25 et 2 fois supérieures à celle d'un procédé conventionnel à boues activées, les flocs bactériens composant les BàM étant plus petits de 41 %. Ainsi, **le choix de la configuration de BàM pourrait s'avérer crucial dans la capacité à supporter la présence de substances toxiques puisque le degré de cisaillement est différent selon la configuration.** Henriques et Love (2007) précisent que la taille et la structure du floc ne sont pas des paramètres influençant le comportement de la biomasse face à des toxines hydrophiles alors qu'ils sont déterminants pour les toxines hydrophobes.

L'exposition continue aux micropolluants peut augmenter l'inhibition ou au contraire favoriser l'acclimatation (sélection) de la biomasse (Dionisi et al., 2007). Ceci est confirmé par Sahinkaya et al. (2005) qui notent une forte diminution de la toxicité après une phase d'acclimatation tandis que Louvet et al. (2009) observent un ralentissement de la vitesse de nitratation de plus en plus prononcée au cours du temps.

Enfin, la présence de composés toxiques peut réduire le nombre d'organismes multicellulaires. Certains groupes, plus affectés, vont diminuer en présence de substances toxiques et d'autres vont croître une fois la phase de détoxication effectuée. Kraigher et al. (2008) observent très peu de changements structurels des boues activées mais constatent la disparition de certains groupes bactériens comme les Nitrospira (nitrification), pouvant ainsi altérer les performances épuratrices du procédé.

I.5. Conclusion de l'étude bibliographique et objectifs

Cette étude bibliographique a exposé la problématique liée à la présence de résidus médicamenteux dans l'environnement. La contamination touche l'ensemble des compartiments aquatiques et des traces de médicaments ont ainsi été retrouvées dans de l'eau destinée à la consommation humaine. Bien que les risques environnementaux et humains associés demeurent largement méconnus les premiers cas concrets ont très récemment amené l'Union Européenne à inclure trois substances pharmaceutiques sur une liste de surveillance.

La présence dans l'environnement de résidus médicamenteux traduit leur mauvaise élimination par les stations d'épuration (STEP) non conçues pour traiter des polluants à l'état de traces. La communauté scientifique se doit d'ores et déjà de développer des procédés de traitement capables d'éliminer cette pollution. Elle doit également évaluer la pertinence des différentes stratégies de traitement envisagées. Ces stratégies communément évoquées reposent généralement sur (i) la modernisation des stations d'épuration (STEP) municipales par l'ajout de traitement tertiaire et (ii) sur le traitement localisé d'importantes sources émettrices telles que les établissements de soins. Ces derniers ne constituent qu'une source mineure au flux médicamenteux global des eaux usées urbaines (EUU) mais sont toutefois émetteurs de polluants très concentrés qui leur sont spécifiques. L'identification des polluants spécifiques aux hôpitaux et de leurs écotoxicités associées permettrait de cibler les services émetteurs afin de proposer l'implantation d'unités réduites de traitement des effluents permettant d'éliminer les polluants à risque tout en minimisant les coûts d'investissement et de fonctionnement vis-à-vis d'une installation à grande échelle.

C'est dans cet esprit que le choix s'est porté sur les effluents du service d'oncologie, émetteur entre autres de médicaments anticancéreux dont les propriétés écotoxicologiques ont trop rarement été étudiées mais qui, par leurs modes spécifiques d'action bien singuliers, représentent un potentiel risque pour l'environnement. L'augmentation chaque année du nombre de séances de chimiothérapie et d'hospitalisation engendre une consommation croissante de médicaments anticancéreux, susceptibles eux-mêmes d'être cancérigènes à n'importe quelle concentration (Webb et al., 2003).

Le bioréacteur à membranes (BàM) s'est imposé au cours des dernières années comme le procédé de nouvelle génération pour les STEP. Ce procédé, aujourd'hui bien maîtrisé, permet entre autres des installations plus compactes, la production d'un effluent de meilleure qualité offrant des perspectives de réutilisation pour des coûts d'investissement et de fonctionnement pouvant concurrencer les procédés conventionnels à boues activées. Le BàM est reconnu comme un procédé prometteur pour l'élimination de micropolluants comme en atteste le dynamisme des recherches sur ce domaine. Son principal avantage provient de la possibilité de fonctionner à un âge de boues choisi indépendamment du temps de séjour hydraulique permettant de spécifier la biomasse à l'effluent en présence. Les différentes configurations de BàM, externes et immergées, exercent une influence sur la structure de la biomasse et peut ainsi s'avérer déterminante sur l'acclimatation à un effluent spécifique. Le rôle de la taille des flocs semble crucial : des flocs plus petits offriraient une surface d'échange plus importante mais seraient en contrepartie plus sensibles aux pics de toxicité de l'effluent (Henriques et al., 2005). Malgré son succès commercial plus limité que les configurations immergées, la configuration $BàM_E$ apparaît plus robuste que la configuration immergée en raison des membranes céramiques utilisées permettant des lavages chimiques agressifs. Cette configuration est donc retenue pour la première campagne expérimentale d'acclimatation de la biomasse aux effluents du service d'oncologie. La configuration immergée évaluée lors de la seconde campagne expérimentale est le $BàM_{IE}$ en raison des facilités de maintenance offertes par l'externalisation du module membranaire en comparaison à la configuration $BàM_I$.

Les objectifs de ce projet et les verrous scientifiques sont multiples :

- Déterminer la faisabilité du traitement des effluents du service d'oncologie, sur les molécules d'intérêt pour l'étude, en suivant les performances du BàM sur les paramètres conventionnels de pollution ainsi que l'évolution des matières en suspension (MES) dans le bioréacteur.

- Evaluer l'influence des configurations $BàM_E$ et $BàM_{IE}$ sur l'acclimatation aux effluents du service d'oncologie.

- Améliorer l'élimination des médicaments retenus grâce au traitement à la source par BàM. Les performances sur les médicaments sont comparées aux données de la

littérature et à des tests de dégradation en réacteur batch avec des boues provenant d'une STEP municipale.

- Quantifier la part de sorption et la part de biotransformation dans l'élimination des médicaments retenus.

Bien que les EH aient été reportés comme étant de 2 à 3 fois plus concentrés en pollution conventionnelle que les eaux usées urbaines (Verlicchi et al., 2010) une caractérisation préalable des effluents du service d'oncologie s'avère nécessaire afin d'appliquer les conditions optimales à l'acclimatation de la biomasse. Il est par ailleurs très difficile de prévoir la vitesse d'acclimatation de boues activées à un effluent chargé en résidus médicamenteux de différentes classes thérapeutiques pouvant être sujet à de fortes variations de types de médicaments et de concentrations, puisque directement lié à l'activité du service d'oncologie. Des protocoles de sécurité seront établis et tiendront compte de la spécificité de l'effluent et de la biomasse susceptible de devenir antibiorésistante. Enfin, alors que la détection de résidus médicamenteux demeure à ce jour un savoir-faire très spécifique dont disposent peu de laboratoires l'analyse de médicaments anticancéreux est encore plus exclusive.

Chapitre II

Matériels et méthodes

II.1. Sélection, méthode d'analyse et propriétés chimiques des médicaments d'intérêt pour l'étude

II.1.1. Démarche sélective

Le grand nombre de substances actives commercialisées en France, plus de 2800 en 2012 (Ansm, 2013), rend impossible la surveillance de chacun dans l'environnement. Une hiérarchisation des médicaments prioritaires s'est donc avérée indispensable afin de focaliser l'attention sur les médicaments les plus dangereux. A l'échelle nationale deux listes de hiérarchisation ont ainsi été établies dans cette perspective (Affsa, 2008 ; Besse et Garic, 2008). Cependant, la question sur la pertinence de ces listes demeure en raison du manque de données écotoxicologiques appropriées.

C'est dans ce contexte que le Plan National sur les Résidus de Médicaments dans les eaux (PNRM), actuellement en cours, prévoit comme action transversale de « prioriser les différentes molécules et métabolites pour lesquels les travaux doivent être engagés en prenant en compte les différents programmes nationaux et européens ». L'objectif est clairement d'établir la liste la plus fiable possible qui servira de base à toutes les recherches. Le PNRM précise que l'accès aux données confidentielles doit être facilité et que des experts industriels seront associés.

La liste établie par Besse et Garic (2008) n'a pas été retenue pour notre étude puisque les anticancéreux, de même que les hormones, n'y figurent pas en raison de leur mode spécifique d'action. Ainsi, la liste établie par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Affsa) a servi de base à la sélection des médicaments d'intérêt pour le projet. Cette liste (Annexe II-1) a été élaborée dans le cadre de la campagne d'analyses effectuée sur le territoire français en 2011 (voir partie I.1.2.1). Elle se base sur trois critères de priorisation : le tonnage, l'affinité pour l'eau et l'activité (posologie minimale : dose minimale qui fait effet sur le patient). Ces paramètres permettent de calculer de l'indice de criticité (Eq. II-1) :

$$Criticité = \frac{Quantité\ consommée}{Posologie\ minimale} \times Solubilité \qquad \text{Eq. II-1}$$

Ainsi, 42 molécules mères et 11 métabolites humains appartenant aux différentes classes thérapeutiques ont été retenus par l'Affsa en raison de leur criticité élevée. Pour notre étude la sélection des médicaments a été effectuée en concordance avec les anticancéreux consommés dans l'unité du service oncologie sur laquelle le BàM pilote est raccordé. **Les 3 médicaments anticancéreux les plus consommés de l'unité font partis des 7 anticancéreux présents sur la liste de l'Affsa : l'ifosfamide, le fluorouracile et le cyclophosphamide.** Alors que le fluorouracile est analysé au laboratoire de pharmacocinétique et de toxicologie de l'hôpital de la Timone, le cyclophosphamide et l'ifosfamide sont analysés au laboratoire Ianesco (Poitiers). Ce laboratoire dispose également du savoir-faire sur l'analyse de **l'antidouleur codéine et de l'antibiotique sulfaméthoxazole**. Ces deux médicaments ont ainsi été ajoutés à la liste des médicaments suivis pour le projet.

Dans l'unité sur laquelle le BàM est raccordée, l'ifosfamide, le fluorouracile et le cyclophosphamide sont, par ordre décroissant, les anticancéreux les plus consommés. Le sulfaméthoxazole est le 11^{e} antibiotique le plus consommé dans l'unité. Il n'y pas de suivi précis de la consommation de la codéine dans l'unité.

II.1.2. Caractéristiques des médicaments ciblés

II.1.2.1. Fluorouracile

Le fluorouracile (5-FU) (Figure II-1) est un médicament anticancéreux appartenant à la classe des antimétabolites. Le 5-FU est transformé en métabolites actifs qui perturbent la synthèse de l'ADN et, à moindre ampleur, inhibent la formation de l'ARN en provoquant des erreurs de lecture du code génétique. Il peut être utilisé seul ou en association avec d'autres chimiothérapies dans le traitement de nombreux cancers (colon, rectum, estomac, sein...).

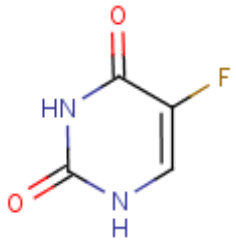


Figure II-1 : Structure chimique du fluorouracile

Sa pharmacocinétique est caractérisée par une grande variabilité interindividuelle. Cette propriété est vérifiée par les différentes études menées. Ainsi, de 2 à 35 % de la dose administrée est excrétée dans les urines sous forme non métabolisée dans les 24 premières heures (Diassio and Harris, 1989 ; Schalhorn and Kuhl, 1992). Le 5-FU s'avère cependant fortement métabolisé puisque 60 à 90 % de la quantité de 5-FU dans les urines est présente sous la forme de catabolites, principalement sous forme de alpha-fluoro-béta-alanine (FBAL, 70 %) et en moindre quantité sous forme d'acide 5-fluorouréidopropionique (5-FUPA, 10 %) (Heggie et al., 1987).

II.1.2.2. Cyclophosphamide

Le cyclophosphamide (CP) (Figure II-2) est un médicament anticancéreux appartenant à la famille des agents alkylants. Le CP permet la création de ponts inter et intrabrins au sein de l'ADN pour éviter la réplication cellulaire. Le CP est notamment utilisé pour le traitement du cancer du vagin et du sein.

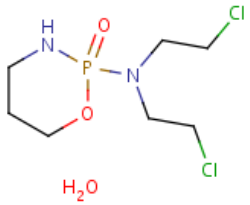


Figure II-2 : Structure chimique du cyclophosphamide

De 15 à 36 % de la dose administrée est retrouvée dans les urines après 24h. Entre 60 et 80 % de la dose est excrétée après 72 h et jusqu'à 20 % sous forme inchangée (Gilard et al., 1994 ; Steger-Hartmann et al., 1997). Le cyclophosphamide est partiellement transformé par le corps humain en métabolites alkylants : 4-hydroxycyclophosphamide, aldophosphamide, l'acroléine et moutarde phosphoramide (Joqueviel et al., 1998). L'acroléine est responsable des effets urotoxiques du cyclophosphamide.

II.1.2.3. Ifosfamide

L'ifosfamide (IF) est un médicament anticancéreux utilisé pour le traitement de divers cancers tels que le cancer des testicules et du sein. Il appartient également à la famille des agents alkylants. L'ifosfamide, isomère positionnel du cyclophosphamide (Figure II-3), agit de manière identique en empêchant la croissance des cellules tumorales par la création de ponts inter et intrabrins au sein de l'ADN.

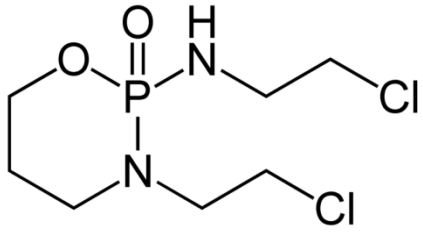


Figure II-3 : Structure chimique de l'ifosfamide

L'excrétion de l'ifosfamide est essentiellement rénale, 60 à 80 % de la dose injectée étant retrouvée dans les urines dans les 72 h sous forme inchangée (de 14 à 50 %) ou métabolisée (de 15 à 41 %). Les métabolites principaux sont le 3-dechloroethylifosfamide et le 2-dechloroethylifosfamide retrouvés dans les urines à des doses correspondant respectivement à 11 % et 4 % de la dose initiale en IF injectée. D'autres métabolites secondaires sont retrouvés à de plus faibles proportions (carboxyifosfamide 3 %, alcoifosfamide 0.8 %, isophosphoramide mustard 0.2 %) et des composés phosphorés inconnus représentant 14 % de la dose initiale (Gilard et al., 1993). La pharmacocinétique de l'ifosfamide est également caractérisée par une importante variabilité interindividuelle concernant les excrétions de l'IF et de ses métabolites.

II.1.2.4. Sulfaméthoxazole

Le sulfaméthoxazole (SM) (Figure II-4) est un antibiotique qui est le plus souvent utilisé en association avec l'antibiotique triméthoprime (ratio 5 : 1) sous le nom co-trimoxazole. Le SM a une activité bactériostatique et est principalement utilisé contre les bactéries Streptococcus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Haemophilus et des bactéries anaérobies de la flore orale.

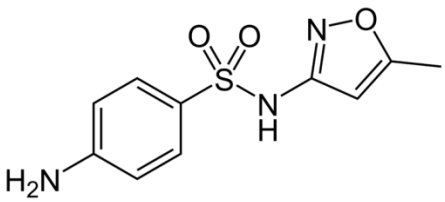


Figure II-4 : Structure chimique du sulfaméthoxazole

54 % de la dose injectée est excrétée dans les 24 h (Cribb et Spielberg, 1992). 16.5 ± 5 % de la dose injectée est excrétée dans les urines après 96 h sous forme inchangée, 46.2 ± 6.6 % de N^4-acetylsulfamethoxazole et 2.4 ± 0.8 % en hydroxylamine (Van der Ven et al., 1994). Comme les anticancéreux sélectionnés le SM est exclusivement excrété par voie urinaire.

II.1.2.5. Codéine

La codéine (CD) (Figure II-5) est un antalgique de niveau II recommandé pour traiter les douleurs d'intensité modérée. La CD est considéré comme un morphinique mineur puisque son dosage à effet comparable est de 6 à 10 fois supérieur à celui de la morphine.

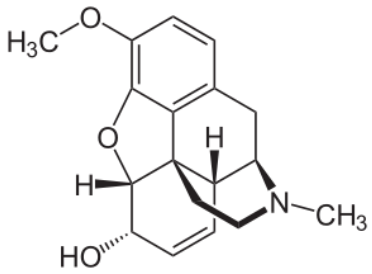


Figure (II-5) : Structure chimique de la codéine

La codéine et ses métabolites sont excrétés quasi intégralement dans les urines dans les 6 premières heures suivant l'ingestion. Ainsi, la prise de codéine peut être renouvelée toutes les 6 heures. De 40 à 60 % de la codéine est excrétée sous forme inchangée, 5 à 15 % est métabolisée en morphine et environ 10 à 20 % en norcodéine (medsafe.govt.nz).

II.1.2.6. Propriétés physicochimiques des médicaments sélectionnés

D'après leurs propriétés physicochimiques (Tableau II-1) les principaux médicaments **anticancéreux utilisés apparaissent pour la plupart persistants avec une forte mobilité dans l'eau** (Kosjek et al., 2011). Ce constat est valable pour le 5-FU, le CP et l'IF mais

également pour la CD et le SM. Les valeurs très faibles du coefficient de partage eau-octanol Kow des 5 médicaments sélectionnés indiquent en effet que ces molécules sont très peu hydrophobes et fortement polaires. Comme vu précédemment, la sorption sur les solides ne peut être négligée en raison de possibles interactions ioniques. La gamme de pH environnemental, pouvant être comprise entre 5 et 9, indique que le 5-FU, le SM et la CD peuvent exister sous différentes formes dans l'environnement, ionisée et non ionisée, tandis que le CP et l'IF sont rapidement dissociés. Le degré de dissociation d'un composé modifie sa mobilité dans l'eau et son devenir environnemental.

Tableau II-1 : Propriétés physico-chimiques des médicaments sélectionnés

Médicament	Formule brute	Approbation (FDA)	N° CAS	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Solubilité à 25°C ($mg.mL^{-1}$)	pKa	Log Kow
Ifosfamide (IF)	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	1988	3778-73-2	260.024	3.78	2.84[d]	0.86
Fluorouracile (5-FU)	$C_4H_3FN_2O_2$	1962	51-21-8	130.017	11.1 (à 22°C)	8.0 - 13[c]	-0.89
Cyclophosphamide (CP)	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	1959	50-18-0	260.024	40 (à 20°C)	1.45[d]	0.63
Sulfamethoxazole (SM)	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	1973	723-46-6	253.278	0.61 (à 37°C)	1.6 - 5.7	0.89
Codéine (CD)	$C_{18}H_{21}NO_3$	1950	76-57-3	299.364	9 (à 20°C)	8.21[b] - 10.60[a]	1.14[a] - 1.19[b]

a : toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB ; b : http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ ; http://www.chemspider.com/ ; c : Kosjek et al., 2011 ; d : Zhang et al., 2013

II.1.3. Concentrations dans différentes matrices des médicaments sélectionnés

Les concentrations détectées de ces 5 médicaments dans les effluents hospitaliers les eaux usées urbaines et les eaux de surfaces sont respectivement en annexe II-2, II-3 et II-4.

Dans les effluents d'un service d'oncologie (EHO) d'un hôpital autrichien, le 5-FU a été détecté jusqu'à 124 $\mu g.L^{-1}$ (Mahnik et al., 2007). **La dilution des EHO dans les EH globaux apparaît importante, de l'ordre d'un facteur 1000**, puisque le 5-FU n'a été détecté qu'à quelques $ng.L^{-1}$ dans les différentes études menées (Fürhacker et al., 2006 ; Tauxe-Wuersch et al., 2006 ; Kovalova et al., 2009). Le cyclophosphamide et l'ifosfamide n'ont jusqu'à présent jamais pas fait l'objet d'analyses dans les EHO. Ils ont été détectés dans les EH globaux à des concentrations allant de quelques $ng.L^{-1}$ à quelques $\mu g.L^{-1}$ et apparaissent, au vu de ces quelques études, plus concentrés dans les EH globaux que le 5-FU. Peu d'études

concernent la détection de la codéine et du sulfaméthoxazole dans les EH. Les concentrations de SM apparaissent du même ordre de grandeur que le CP et IF alors que la CD a été détectée à une moyenne de 50 $\mu g.L^{-1}$ (Foster et al., 2007).

Les trois anticancéreux ont été détectés dans les EUU à des concentrations très faibles, de seulement quelques $ng.L^{-1}$. Sur 4 études le 5-FU n'a été détecté qu'une seule fois dans les EUU (Kosjek et al., 2013) tandis que l'IF a pu être détecté dans 3 des études menées. **La dilution des anticancéreux CP et IF des EH vers les EUU apparaît être d'un facteur 1000** ce qui est en cohérence avec les observations de Kümmerer et Helmers (1997, 2000) qui annoncent un facteur bien supérieur à 100. La CD est le médicament sélectionné pour l'étude le plus concentré dans les EUU avec des concentrations atteignant plusieurs $\mu g.L^{-1}$ pour 4 des 8 études. De nombreux travaux ont été conduits sur la détection du SM dans les EUU. Sa concentration est fréquemment de quelques centaines de $ng.L^{-1}$, elle peut atteindre quelques $\mu g.L^{-1}$ (Peng et al., 2006 ; Watkinson et al., 2009). Les concentrations en CD et SM de quelques études montrerait, à première vue, une dilution très limitée des EH dans les EUU (Peng et al., 2006 ; Gomez et al., 2007 ; Kasprzyck-Horder et al., 2009). Cela doit être la conséquence de l'utilisation non négligeable de SM et de CD par les particuliers contrairement aux anticancéreux, plus spécifiques aux hôpitaux.

Le CP apparaît comme l'anticancéreux le plus concentré dans les eaux de surface puisqu'il a été détecté à plusieurs dizaines de $ng.L^{-1}$ dans des rivières (Zuccato et al., 2010 ; Moldovan et al., 2006). La CD et le SM sont plus présents dans les eaux de surface à des concentrations atteignant parfois plusieurs centaines de $ng.L^{-1}$.

II.1.4. Analyse des médicaments sélectionnés

Les analyses du fluorouracile sont effectuées au laboratoire de phamacologie et toxicocinétique de l'hôpital de la Timone à Marseille. Les analyses du cyclophosphamide, ifosfamide, codéine et sulfaméthoxazole ont été réalisées par le laboratoire Ianesco (Institut d'Analyses et d'Essais en Chimie de l'Ouest) de Poitiers.

II.1.4.1. Fluorouracile

Le protocole du laboratoire de de phamacologie et toxicocinétique du dosage du 5-FU dans le plasma sanguin a été repris avec succès pour le dosage dans les effluents hospitaliers et

les eaux traitées. L'analyse du 5-FU est effectuée par HPLC-UV. La limite de quantification est de 5 $\mu g.L^{-1}$. L'analyse du 5-FU s'effectue en 2 étapes : extraction puis analyse chromatographique (Figure II-6).

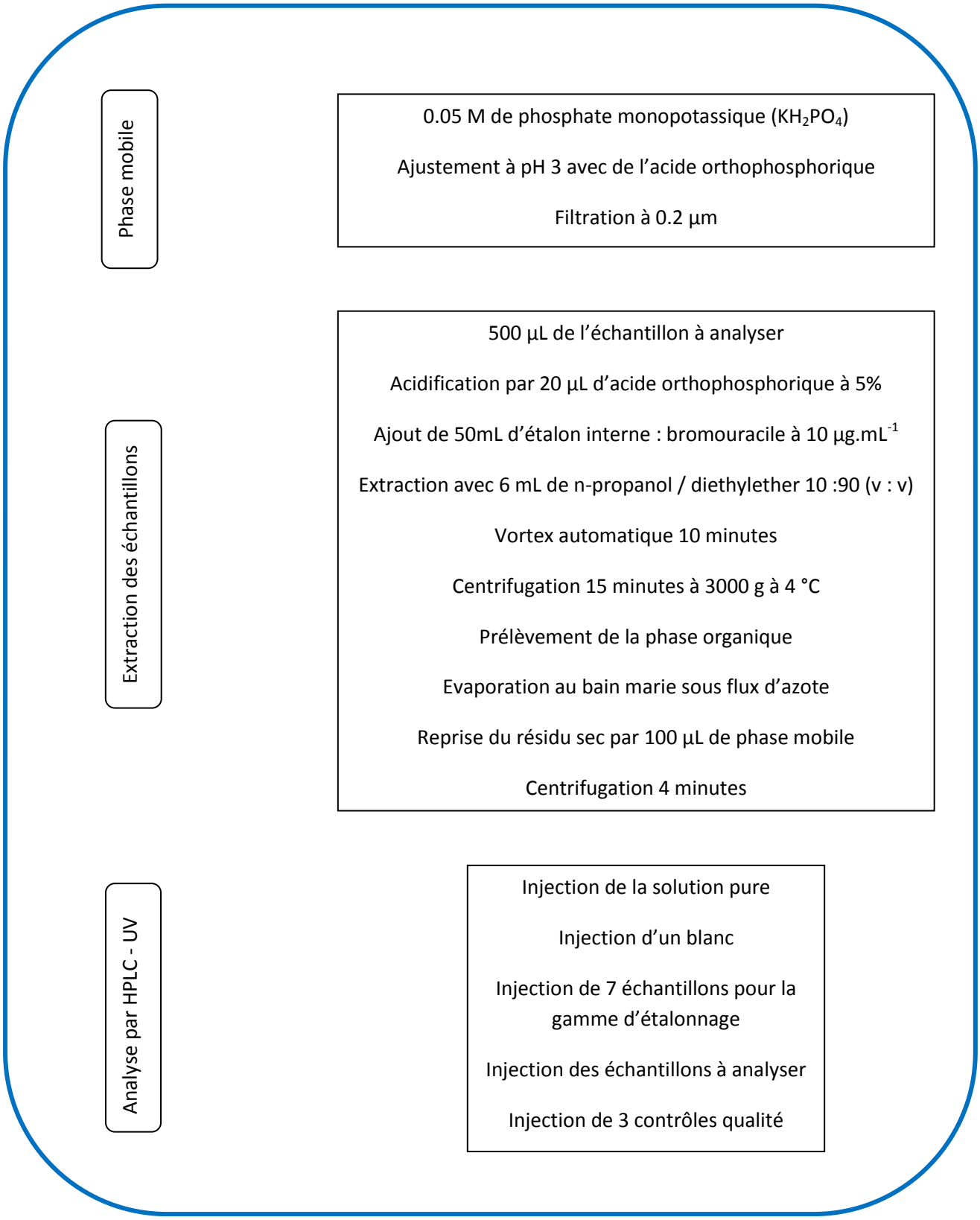


Figure II-6 : Protocole du dosage du 5-FU par HPLC-UV

II.1.4.2. Cyclophosphamide, ifosfamide, sulfaméthoxazole et codéine

Les 4 molécules sont analysées simultanément par chromatographie liquide associée à une spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS). La limite de quantification de la méthode est de 2.5 $\mu g.L^{-1}$. Les eaux brutes sont décantées puis filtrées sur un filtre de porosité 0.45 µm avant l'analyse. L'élimination des matières solides les plus grossières ne constitue à priori pas un problème de sous-estimation de la concentration des médicaments dans les EH puisque les médicaments sélectionnés sont en effet excrétés uniquement par voie urinaire et sont hydrophiles ce qui permet de négliger la sorption sur les MES des EH.

II.2. Caractérisation initiale des effluents hospitaliers

II.2.1. Origine des effluents hospitaliers et prétraitements

Les effluents étudiés proviennent du service d'oncologie de l'hôpital de la Timone (Marseille, France). Les travaux de piquage (Figure II-7) ont été réalisés sur une conduite recueillant les eaux usées (lavabo, douche, toilettes) de 6 chambres soit au maximum 9 patients présents simultanément. Les 3 chambres simples concernent des hospitalisations de longue durée tandis que les 3 chambres doubles accueillent des patients pour des hospitalisations de courte durée, généralement comprises entre 2 et 4 jours. **Il est très important de noter que l'une des spécificités de cette étude est de travailler sur un effluent uniquement issu des chambres de patients sans dilution par les autres activités du service.**



Figure II-7 : Piquage sur la conduite d'eaux usées du service d'oncologie et prétraitements

Les effluents du service d'oncologie (EHO) sont prélevés de manière discontinue vers une cuve tampon en actionnant des vannes manuelles. Le choix de prélever manuellement les EHO est délibéré et lié à la fiabilité du système. Un dysfonctionnement d'un actionneur automatique (bouchon, non réouverture) pourrait avoir de trop lourdes conséquences. Les prétraitements sont composés d'un sanibroyeur et d'une grille de seuil de coupure 0.5 mm. Le sanibroyeur (Plus Silence, SFA) permet de déchiqueter les plus gros solides et alimente la cuve de stockage. La grille, de seuil de coupure 0.5 mm, est placée dans la conduite d'aspiration des EHO par la pompe d'alimentation : elle permet de tamiser finement les effluents.

II.2.2. Stratégies de prélèvements des EHO

II.2.2.1. 1ère stratégie – période du 0 au 40e jour de la 1ère campagne expérimentale

Une caractérisation des EH en pollution conventionnelle (DCO, DBO_5 et NH_4^+) a été effectuée sur deux semaines afin de mettre en place la stratégie de prélèvement. Le but est d'assurer, pour un TSH d'environ 24 heures et une concentration en MES typique de BàM (8-10 $g.L^{-1}$), l'obtention d'une charge massique (Cm) minimale de 0.07 $kgDCO.kgMVS.j^{-1}$ correspondant aux conditions limites de fonctionnement régulièrement choisies pour un effluent urbain (Grasmick et al., 2007, Annexe II-5). Il a été décidé d'effectuer cette caractérisation le matin car l'activité du service y est maximale. Les échantillons de la première semaine montrent une évolution importante de la DCO dans les EHO au cours de la matinée (Figure II-8).

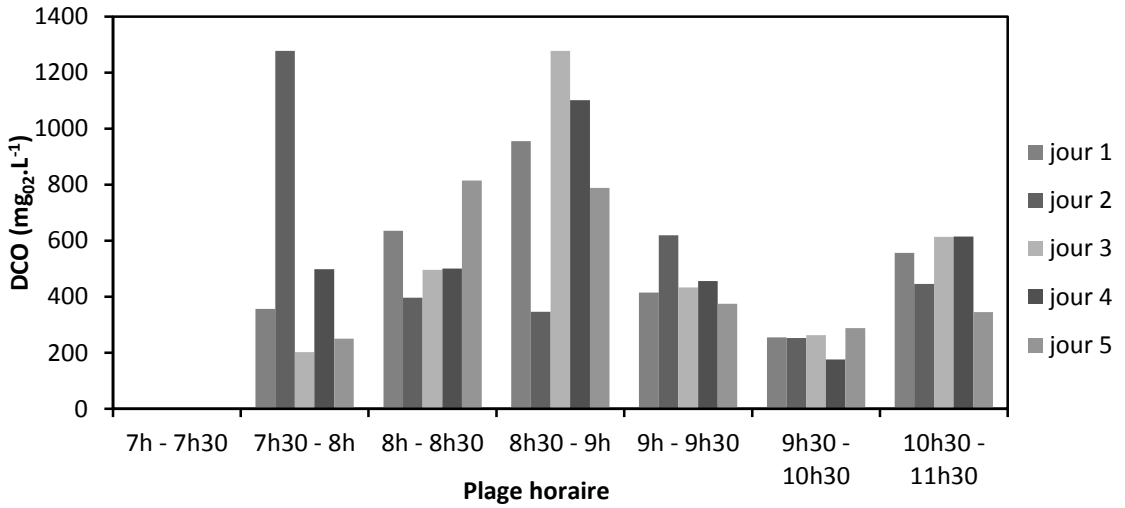


Figure II-8 : Evolution de la concentration de la DCO dans les EH le matin, semaine 1

L'évolution du rapport DBO_5/DCO (Figure II-9) montre que l'effluent est biodégradable puisque le rapport est toujours supérieur à 30 %. Ce rapport semble relativement stable, compris entre 29 et 48 %.

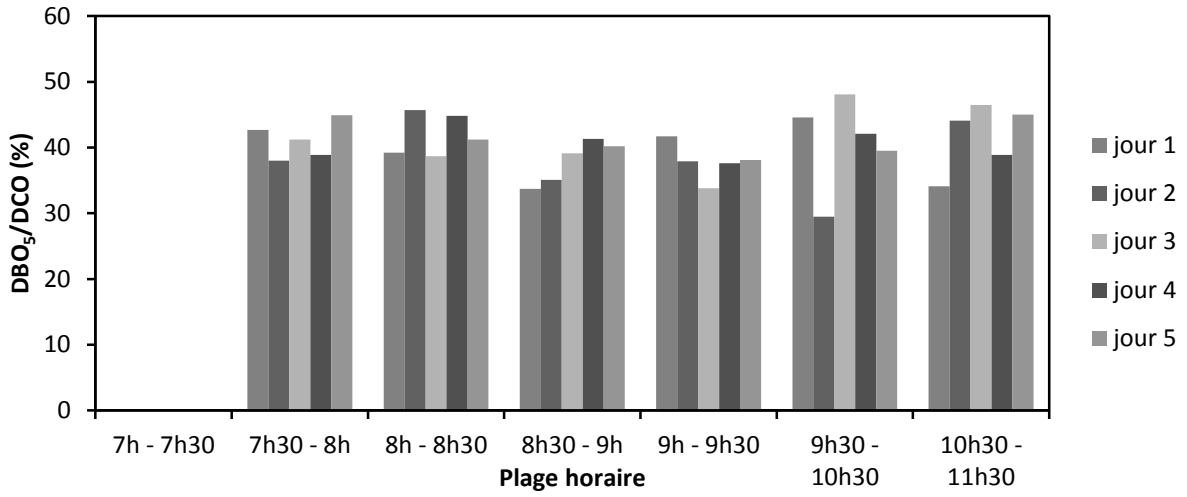


Figure II-9 : Evolution du rapport DBO_5/DCO dans les EH le matin, semaine 1

La représentation de l'évolution du flux massique en DCO (Figure II-10) montre que l'essentiel de la pollution carbonée intervient entre 8h et 9h30 avec un pic se situant entre 8h30 et 9h.

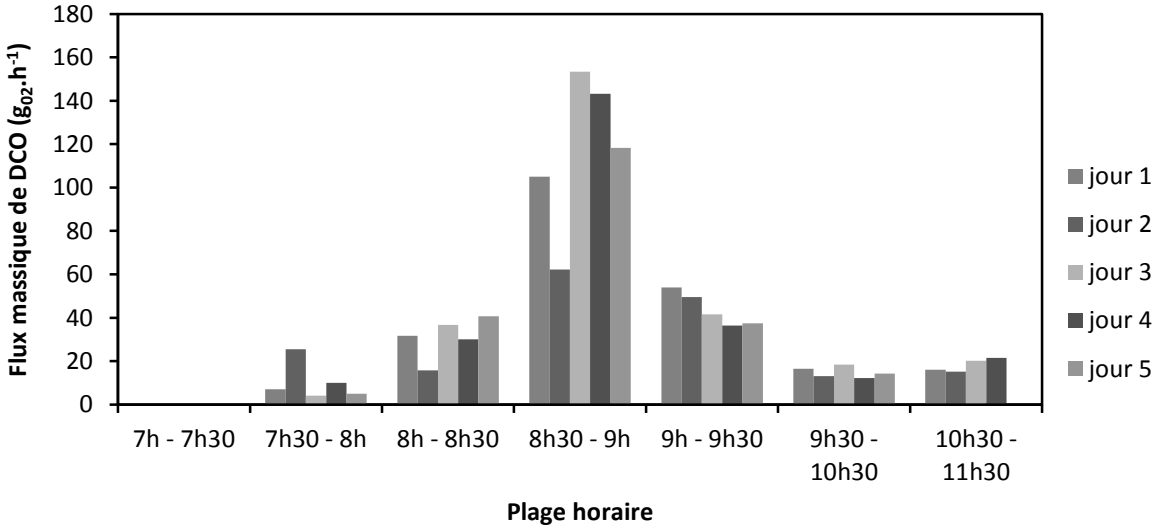


Figure II-10 : Evolution du flux massique de DCO le matin, semaine 1

La charge massique en DCO associée à cette plage horaire est supérieure à 0.07 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} pour les 5 jours étudiés ce qui est satisfaisant (Figure II-11). Ce calcul de la Cm a été effectué en fixant le débit d'alimentation à 1.5 L.h^{-1} et la concentration en MVS à 6.4 g.L^{-1} (à partir d'un rapport MVS/MES de 80 %).

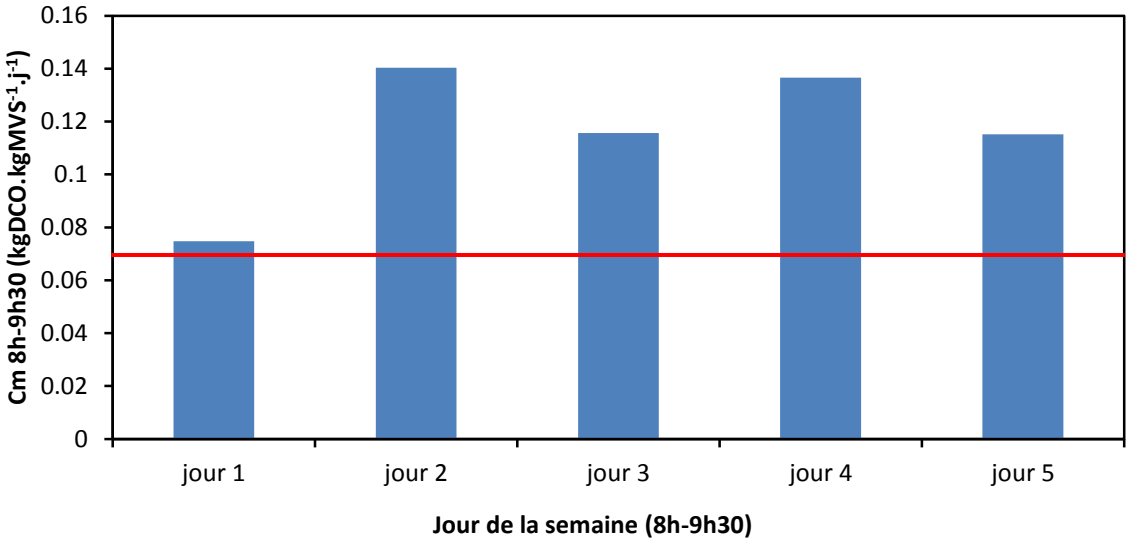


Figure II-11 : Charge massique en DCO entre 8h et 9h30 sur 5 jours, semaine 1

L'opération est alors répétée sur une deuxième semaine avec la mesure de la DCO uniquement sur l'échantillon correspondant au créneau horaire 8h – 9h30. La Cm en DCO calculée avec les mêmes paramètres que précédemment est à nouveau supérieur à 0.07 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} pour la semaine entière (Figure II-12). A noter que le rapport DCO/DBO$_5$ est à nouveau compris entre 30 et 40 % pour l'ensemble des échantillons.

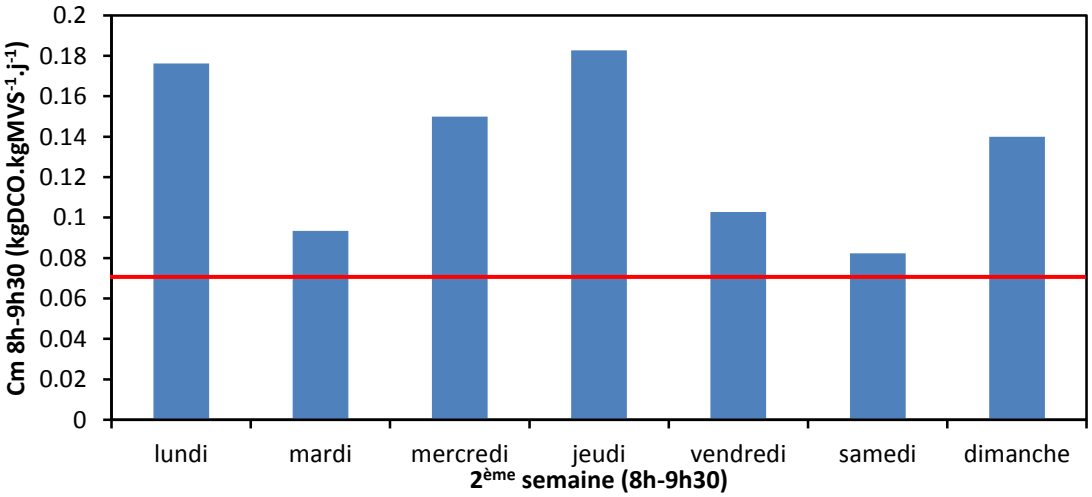


Figure II-12 : Charge massique en DCO entre 8h et 9h30, semaine 2

II.2.2.2. 2nde stratégie de prélèvement

Un changement de l'activité routinière du service a engendré de trop faibles concentrations en DCO au début de la première campagne expérimentale (Cf III.1.1). La charge massique trop faible et la présence de nombreux tensioactifs ont imposé une modification de la méthode de prélèvement des EHO. A partir du 40e jour d'étude, **il a été décidé de prélever les EHO uniquement durant la nuit afin d'éviter au maximum les eaux de douche et d'obtenir une concentration plus importante et satisfaisante en DCO** (Cf III.1.1 et III.2.1). Cette méthode de prélèvement a été appliquée jusqu'à la fin de l'étude.

II.3. Le bioréacteur à membrane

II.3.1. Fonctionnement du BàM pilote

Un bioréacteur à membrane à l'échelle pilote a été dimensionné puis construit pour le projet. Il a été implanté à proximité du service d'oncologie de l'hôpital de la Timone (Marseille, France) (Figure II-13).

Le dimensionnement du BàM pilote a été basé sur le traitement d'un débit d'EHO compris entre 1 et 2 $L.h^{-1}$. **Le pilote a été conçu afin de permettre facilement le changement de configuration de $BàM_E$ à $BàM_{IE}$** par simple interversion de carter membranaire puis raccordements à la pompe de succion et à l'injection d'air. Le pilote dispose d'une capacité maximale de 60 L, le volume de travail étant fixé à 32 L. Lors des saisons les plus chaudes un groupe froid de puissance 3.1 kW permet de réguler la température des boues activées à 25 ± 2°C via 2 échangeurs placés au niveau des boucles de recirculation des 2 cuves biologiques. Les EHO sont contenus dans une cuve de stockage de capacité maximale de 200 L et sont renouvelés tous les 2 jours. Les EHO sont prélevés continuellement au cours de la nuit à partir du 40e jour de la première campagne expérimentale (Cf Chapitre III). Un sanibroyeur (Plus Silence, SFA) permet de déchiqueter les matières solides et alimente la cuve de stockage. Afin d'éviter le débordement de cette cuve un trop-plein situé à 160 L a été installé afin de rejeter la surverse dans la conduite d'eaux usées. Les prétraitements sont complétés par une grille de seuil de coupure 0.5 mm placée dans la conduite d'aspiration des EHO par la pompe d'alimentation.

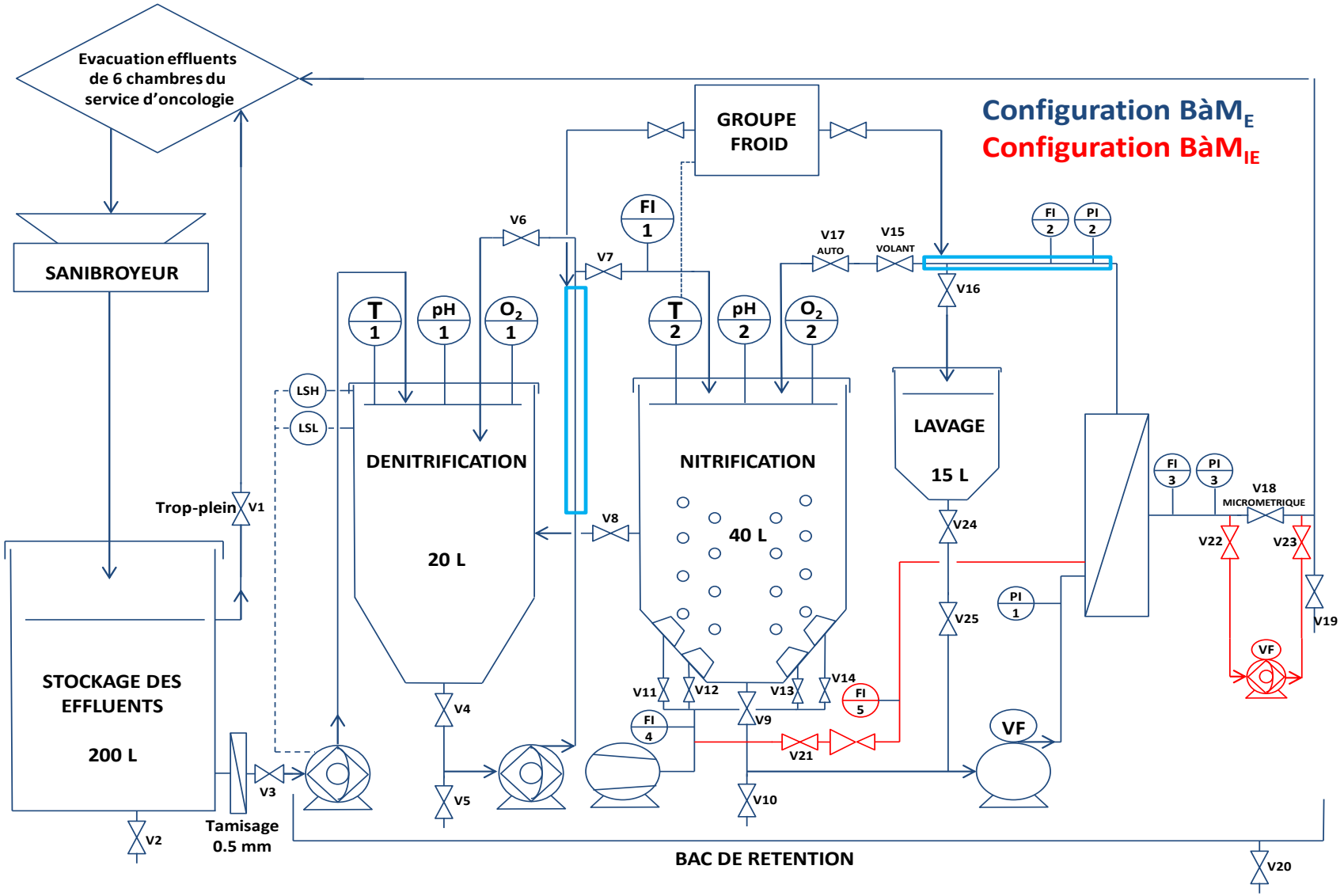


Figure II-13 : Schéma du bioréacteur à membranes pilote

Dans un premier temps, les EHO sont envoyés dans la cuve de dénitrification par la pompe d'alimentation asservie à des tiges de niveau. Cette cuve, de volume utile d'environ 10.5 L, est brassée par une recirculation des boues assurée par une pompe péristaltique. Les flocs bactériens sont maintenus en suspension tout en évitant l'aération de la zone anoxique permettant la réaction de dénitrification. Une fraction des boues recirculées est transférée vers la cuve aérobie de volume utile 21.5 L, où se déroule la réaction de nitrification. Le TSH dans les deux cuves est assuré par le réglage des vannes V6 et V7 permettant l'établissement de cycles 1 h / 2 h respectivement dans les cuves anoxie et aérobie. Le débit des boues transférées est contrôlé par lecture sur le débitmètre électromagnétique FI_1 (Proline Promag 10H, Endress Hauser). L'aération, faite sous forme de fines bulles grâce à quatre poreux alimentés par un compresseur, permet de maintenir la concentration en oxygène supérieure à 2 $mg.L^{-1}$ et d'assurer le brassage de la cuve aérobie. Le débit d'air est contrôlé par un débitmètre à billes (0-800 $NL.h^{-1}$, DK37, Khrone). L'aspiration des boues activées vers le carter membranaire se fait au pied de la cuve de nitrification par une pompe centrifuge (B3, Motovario). Les conditions de circulation de la boue au sein du carter membranaire dépendent de la configuration de BàM. Pour la configuration $BàM_E$ le circuit est mis sous une pression d'environ 2 bar. Une vitesse tangentielle d'environ 4 $m.s^{-1}$ est imposée au sein de la seule membrane inclue dans le carter. Cette vitesse est fixée grâce à la vanne V15 et à la lecture du débit de recirculation des boues sur le débitmètre électromagnétique FI_2 (Proline Promag 10H, Endress Hauser). Une vanne micrométrique de contre-pression (V18) située à la sortie du perméat permet de régler très précisément le débit de perméat. Par ailleurs, ce pilote offre la possibilité d'effectuer la filtration en mode manuel ou automatique par la vanne de contre pression V17 dont le degré d'ouverture est automatisée de manière à atteindre la consigne de perméat. Les caractéristiques de la membrane utilisée dans la configuration $BàM_E$ sont indiquées dans le Tableau II-2.

Tableau II-2 : Caractéristiques des membranes d'ultrafiltration pour la configuration BàM$_E$

Fabricant	CTI
Type	Carbosep® M1
Configuration	Tubulaire-monocanal
Matériau	ZrO_2-TiO_2
Perméabilité initiale (L .h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1})	110
Seuil de coupure (kDa)	150
Surface totale de filtration (m²)	0.0222
Longueur (m)	1.20
Diamètre interne/externe (mm)	6/10

Pour la configuration BàM$_{IE}$ la vitesse de recirculation des boues est très faible en comparaison à la configuration externe. La filtration est assurée par une pompe péristaltique équipée d'un variateur de fréquence. Sa fréquence est augmentée au fur et à mesure de l'acclimatation pour compenser la baisse progressive de la perméabilité due au colmatage des fibres creuses. La filtration peut également être effectuée en mode automatique par l'asservissement de la fréquence de la pompe périlstatique au débit de perméat. De l'air comprimé est injecté sous forme de grosses bulles afin de limiter le colmatage par cisaillement. Le débit d'air est contrôlé à 9 L.min^{-1} par un débitmètre à bille (Fisher Bioblock). En complément, une relaxation et un rétrolavage sont effectués 2 fois par jour. Les caractéristiques des fibres creuses utilisées dans la configuration BàM$_E$ sont indiquées dans le Tableau II-3.

Tableau II-3 : Caractéristiques des membranes d'ultrafiltration pour la configuration BàM$_{IE}$

Fabricant	Polymem
Type	M2
Filtration	Frontale externe-interne
Densité de fibres	260 fibres
Matériau	Polysulfone
Perméabilité initiale (L .h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1})	130
Seuil de coupure (kDa)	100
Surface totale de filtration (m²)	0.4
Diamètre interne/externe	0,85 mm / 1,44 mm

Dans les 2 configurations de BàM, le rétentat est refoulé dans la cuve de nitrification alors que le perméat est envoyé dans la conduite d'eaux usées du service d'oncologie.

Des sécurités ont été prévues sur le fonctionnement du pilote et provoquent, lorsqu'elles sont activées, l'arrêt de l'installation à l'exception du compresseur :

- des tiges de niveau très bas présentes dans la cuve d'anoxie ;
- une pression supérieure à 4 bar en entrée du carter membranaire.

De plus, un bac de rétention en dessous du BàM a été prévu pour récupérer la biomasse en cas de dysfonctionnement ou de casse mécanique.

Le récapitulatif des caractéristiques de fonctionnement des 2 configurations est présenté dans le Tableau II-4.

Tableau II-4 : Caractéristiques de fonctionnement des deux configurations de BàM

	$BàM_E$			$BàM_{IE}$		
	min	max	moy	min	max	moy
Débit de perméat ($L.h^{-1}$)	1	2	1.42 ± 0.22	0.8	2	1.13 ± 0.27
Temps de séjour hydraulique (h)	16	32	23.0 ± 3.6	16	40	29 ± 8
Pression transmembranaire (bar)	0.8	2.2	1.30 ± 0.23	0.06	0.75	0.39 ± 0.18
Temps de séjour des boues	Infini			Infini		
Cycle aéré / non aéré (h)	2 / 1			2 / 1		

Un lavage chimique des membranes est effectué lorsque la baisse progressive de la perméabilité due au colmatage ne permet plus d'obtenir un débit suffisant de perméat. Les membranes sont directement lavées sur le BàM pilote via le réseau de lavage permettant d'isoler les cuves biologiques en actionnant les vannes V9, V15, V16, V24 et V25. Dans un premier temps, les membranes sont rincées à l'eau puis lavées avec une base permettant d'éliminer préférentiellement la fraction organique du colmatage puis elles sont lavées avec un acide permettant d'éliminer la fraction inorganique. Après chaque lavage chimique le pH du perméat est neutralisé avec plusieurs lavages à l'eau du robinet.

Pour la configuration $BàM_E$, le premier lavage est effectué pendant 45 min avec une solution de NaOH concentrée à 40 $g.L^{-1}$ chauffée à 80 °C. Le second lavage est réalisé, après rinçage du pilote jusqu'à la neutralité du pH, avec une solution d'acide nitrique à 15 $g.L^{-1}$ pendant 45 min. Si besoin, un dernier lavage basique est réalisé. Pour la configuration $BàM_{IE}$, un mélange alcalin chloré de NaOH à 4$g.L^{-1}$ et de 200 ppm de NaOCl est d'abord utilisé puis le second lavage est effectué avec une solution d'acide oxalique à 5 $g.L^{-1}$. Pour ces 2 étapes, le temps de contact minimal est de 2 heures et la température maximale est de 30 °C.

II.3.2. Origine des boues activées

Les boues activées utilisées pour les ensemencements du BàM pilote proviennent de la station d'épuration municipale de la ville de Rousset (Bouches du Rhône). Cette STEP d'une capacité de 12 000 équivalents habitants est dotée du procédé $BàM_{IE}$. La STEP est composée de trois bassins concentriques. Le bassin du milieu contient les eaux usées et alimente par surverse le plus petit bassin contenant la biomasse en condition anaérobie. Le bassin extérieur contient la biomasse successivement placée en conditions aérobie et anoxie par des cycles d'aération – non aération de 10 min – 40 min. Les boues activées qui ont servi à l'ensemencement du BàM pilote ont été prélevées dans ce bassin (8.2 $gMES.L^{-1}$ pour la première campagne expérimentale et de 6.8 $gMES.L^{-1}$ pour la seconde). Le volume total du bassin biologique de la STEP est de 1900 m^3, la surface totale de filtration est de 3000 m^2 répartie en 8 modules fibres creuses (Puron). La STEP peut assurer un débit maximal de traitement de 1800 $m^3.j^{-1}$.

II.4. Les équipements et procédures de sécurité

Les différents équipements de sécurité adoptés pour la manipulation sur site des effluents du service d'oncologie et des boues activées sont en annexe II-6.

L'acclimatation de bactéries à un effluent susceptible de contenir de multiples antibiotiques à de très fortes concentrations a imposé une réflexion quant à la dangerosité de développer des bactéries multirésistantes aux antibiotiques pour le manipulateur et dans le contexte hospitalier. Le Professeur Pierre Edouard Fournier, président du CLIN (Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales) des hôpitaux de Marseille, spécialiste reconnu en microbiologie et membre de l'équipe de recherche du Professeur Didier Raoult, a été consulté. Le Professeur Fournier précise que les boues activées présentaient un risque infectieux quasi nul pour l'opérateur. Le risque d'infection à partir d'une colonisation est extrêmement faible puisque l'opérateur ne présente pas de déficience immunitaire. Cependant, le Professeur Fournier a confirmé le risque environnemental que représente le devenir des boues en excès générées par une installation à l'échelle industrielle.

Afin de supprimer tout risque de prolifération de bactéries antibiorésistantes des procédures pour la manipulation, le transport et la destruction des boues ont été établies (Tableau II-5).

Tableau II-5 : Procédures concernant la manipulation, le transport et la destruction des boues activées

Procédure de manipulation des boues activées
• Lavage à la javel en fin de manipulation des différents récipients ayant contenus des boues ou des effluents • Vestiaire situé à l'extérieur de l'installation
Procédure de transport et destruction des boues activées
• Nettoyage à la javel de l'extérieur du flacon après la prise d'échantillon • Conditionnement du flacon dans une glacière pour le transport • Les boues sont inactivées thermiquement à une température de 150°C pendant 2 h Les résidus secs inertes sont finalement jetés avec les déchets ménagers • Les boues en excès générées par le BàM sont pareillement acheminées vers le laboratoire M2P2 et sont détruites par incinération

Par ailleurs, l'exploitant du BàM pilote a été vacciné contre la diphtérie, le tétanos et la poliomyélite (DTP), l'hépatite B, l'hépatite A et le typhim.

II.5. Les outils analytiques

II.5.1. Les outils analytiques pour le suivi des acclimatations

II.5.1.1. Prélèvement des échantillons

Un suivi quotidien des concentrations des MES et MVS est effectué pour connaître l'évolution de la biomasse dans le BàM. Les concentrations en NH_4^+ et en NO_3^- sont analysées une à deux fois par semaine dans les EHO et le perméat. La DCO est également analysée une à deux fois par semaine dans les EH, le surnageant des boues activées et le perméat. Les échantillons de perméat et de boues ont été prélevés le lendemain du prélèvement des EH afin de respecter le TSH relativement long permettant ainsi de calculer les rendements d'épuration correspondants. Les échantillons de boues sont centrifugés pendant 15 min à 13500 $tr.min^{-1}$ (centrifugeuse 2-16, Sigma) puis la phase liquide est ensuite filtrée sur filtre à café (taille moyenne des pores 100 µm) pour enlever toutes les particules. La DCO des EHO est analysée sur l'échantillon brut après passage par la grille de prétraitement.

II.5.1.2. Mesure des MES et des MVS

La phase solide issue de la centrifugation est récupérée dans une coupelle en aluminium qui est placée dans un four (Nabertherm) à 105 °C pendant 24 h. La masse des MES est obtenue

à partir de la pesée du solide sec. La température du four est ensuite fixée à 550 °C pendant 2 h pour éliminer la matière organique et obtenir la concentration en MVS par différence de pesée entre le séchage à 105°C et le passage au four à 550 °C.

II.5.1.3. Analyse de la DCO

La DCO correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder les substances réductrices contenues dans la solution. La DCO est analysée à partir de kits Aqua Lytic (20-150mg.L^{-1}, Aqual Lytic) basés sur une réaction d'oxydation par du bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) dans un milieu sulfurique et chauffé à 105 °C pendant 2 h. Après refroidissement des échantillons l'absorbance du kit est lue au spectrophotomètre (DR/2500, Hach) à 605 nm. La concentration en DCO est calculée à partir de la droite d'étalonnage placée en annexe II-7.

II.5.1.4. Analyse de la DBO_5

La demande biologique en oxygène à 5 jours (DBO_5) représente la quantité d'oxygène nécessaire pendant 5 jours pour oxyder biologiquement les substances présentes dans l'échantillon. La DBO_5 correspond donc à la partie biodégradable de la DCO. L'analyse de la DBO_5 est effectuée dans des flacons en verre brun à 20 °C. La DBO_5 est mesurée au bout de 5 jours (OxiTop, WTW).

II.5.1.5. Analyse de l'ammonium et des nitrates

Les concentrations en NH_4^+ et NO_3^- sont déterminées avec les kits Merk (2-150 $mg_{N\text{-}NHH4}.L^{-1}$ et 0-20 $mg_{N\text{-}NO3}.L^{-1}$). Le principe est identique à celui de la DCO et repose sur des réactions de colorimétrie suivie d'une mesure de l'absorbance par spectrophotométrie à 712 nm pour l'ammonium et à 525 nm pour les nitrates. Les concentrations en ammonium et nitrates sont respectivement calculées grâce aux droites d'étalonnage présentes en annexe II-8 et II-9.

II.5.2. Les tests respirométriques

Les tests respirométriques ont pour vocation de suivre l'activité de la biomasse au cours de l'acclimatation. Quotidiennement, l'activité respirométrique (OUR, Oxygen Uptake Rate) de la biomasse dans le réacteur est déterminée en mesurant la décroissance de la concentration en oxygène dissous dans un échantillon de boues activées issues de la cuve d'aération. La pente de la droite obtenue correspond à l'OUR (Figure II-14).

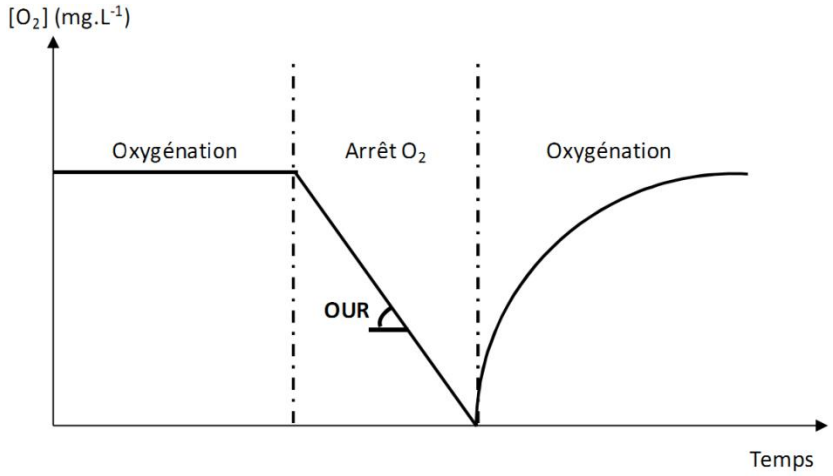


Figure II-14 : Mesure de la respiration des microorganismes

L'activité respirométrique OUR est ensuite rapportée à la concentration en MVS. Cette activité respirométrique spécifique (SOUR, Specific Oxygen Uptake Rate) est calculée en divisant la valeur du OUR par la concentration en MVS.

Lors de la seconde campagne expérimentale, des tests d'activité respirométrique plus spécifiques sont effectués régulièrement. Ces tests permettent de différencier la respiration des bactéries autotrophes de celle des bactéries hétérotrophes. Le respirogramme est obtenu en alternant plusieurs phases de carence et d'ajout de substrat dégradable par les différentes populations de bactéries (Figure II-15). Après prélèvement dans le réacteur les boues activées sont placées sous aération continue pendant une durée minimale de 4 h (phase 1) jusqu'à ce que le SOUR soit constant correspondant à l'état de respiration endogène des bactéries autotrophes (A) et hétérotrophes (H). Un ajout en excès de $(NH_4)_2SO_4$ est ensuite effectué lors de la phase 2 à la concentration de 0.02 $g_{N\text{-}NH4}.g_{MVS}^{-1}$ et permet d'obtenir la respiration exogène maximale des autotrophes. Le retour à l'état endogène est observé lorsque la totalité de l'ammonium est consommé. Une concentration de 0.1 $g.g_{MVS}^{-1}$ d'une solution d'allylthiourée (98 %, Sigma-Aldrich) est alors ajoutée afin

d'inhiber les bactéries autotrophes permettant la détermination des fractions autotrophes et hétérotrophes de la biomasse globale (phase 3). La dernière étape du respirogramme consiste à ajouter du carbone organique (0.3 $g_{glucose}.g_{MVS}^{-1}$) afin de mesurer la respiration exogène maximale des hétérotrophes (phase 4). Après consommation du carbone organique un retour à l'état de respiration endogène des hétérotrophes est observé (phase 3).

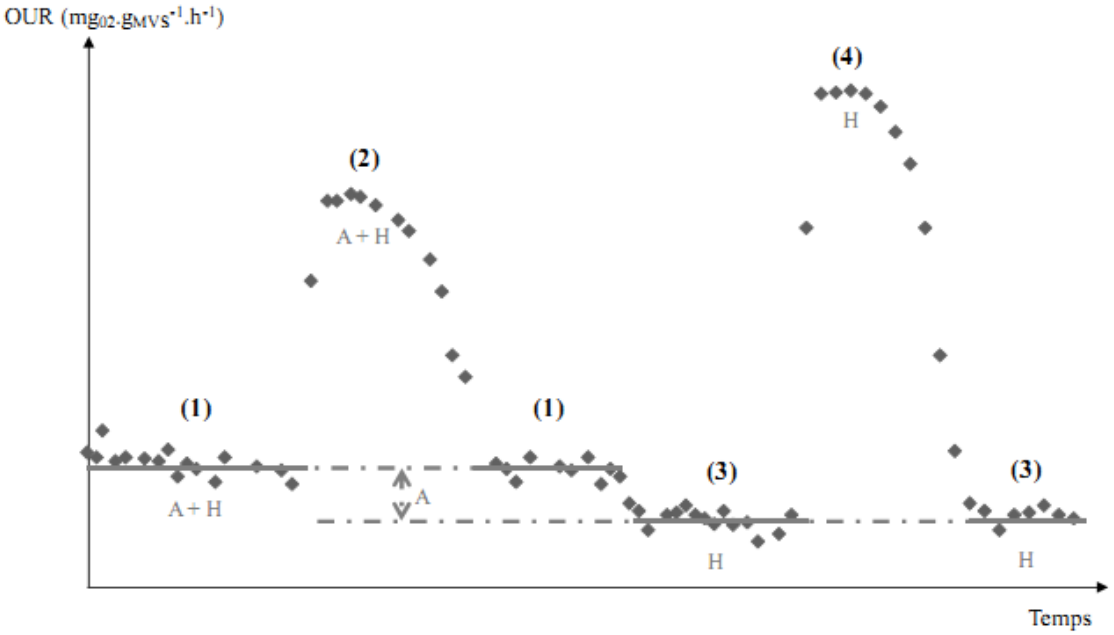


Figure II-15 : Les différentes phases caractérisant un respirogramme (Clouzot, 2009)

Les conditions opératoires optimales en ammonium, allylthiourée et glucose du respirogramme ont été développées au laboratoire M2P2 (Clouzot, 2009). Les concentrations utilisées correspondent aux concentrations minimales à partir desquelles les respirations exogènes maximales spécifiques sont obtenues pour le glucose et l'ammonium et une inhibition complète des autotrophes est atteinte pour l'allylthiourée.

II.5.3. Antibiogrammes

II.5.3.1. Principe

Un antibiogramme permet de quantifier la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne in vivo. L'utilité de l'antibiogramme peut être multiple :

- thérapeutique en aidant au choix judicieux des antibiotiques ;

- épidémiologique en contribuant à la surveillance de la résistance bactérienne au cours du temps ;
- diagnostique en permettant d'identifier les bactéries présentes.

Des disques de papier imprégnés d'une quantité connue d'antibiotiques sont disposés sur un milieu gélosé préalablement ensemencé avec la culture à tester (Figure II-16). Les disques d'antibiotiques diffusent uniformément à travers le milieu gélosé. Après incubation les disques sont entourés ou non d'une zone d'inhibition où la culture a été impossible en raison d'une trop forte concentration d'antibiotique. Les diamètres obtenus sont alors mesurés et correspondent à l'étendue de la zone d'inhibition. La concentration de l'antibiotique calculée à partir du diamètre d'inhibition correspond alors à la concentration minimale inhibitrice.

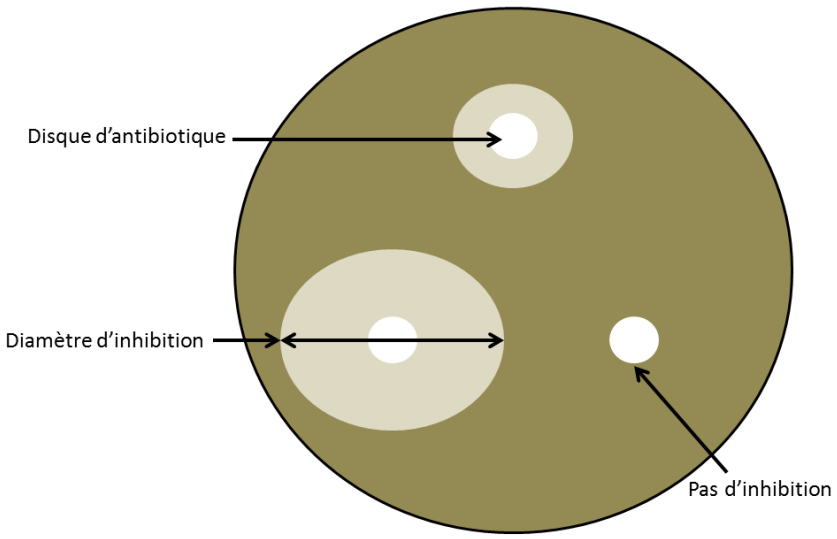


Figure II-16 : Schéma d'un antibiogramme

II.5.3.2. Protocole analytique

Des antibiogrammes sont réalisés lors de la seconde campagne expérimentale afin d'évaluer l'évolution des propriétés antibiorésistantes de la biomasse au cours de l'acclimatation. Les 6 antibiotiques les plus consommés dans l'unité sur laquelle le BàM est raccordé sont sélectionnés pour ce suivi. Il s'agit des pénicillines amoxicilline et ticarcilline, des céphalosporines de troisième génération ceftazidime et ceftriaxone, de la fluoroquinolone ciprofloxacine et de la carbapénème méropénem. Les antibiogrammes sont réalisés selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

(CASFM, 2013). Les boues activées sont diluées avec de l'eau physiologique (9 g de chlorure de sodium par litre d'eau distillée) jusqu'à obtenir une suspension de trouble équivalent au standard Mc Farland 0,5 (~10^8 UFC/mL). Le standard Mc Farland 0.5 correspond à une absorbance de 0.132 à une longueur d'onde de 600 nm.

La solution réalisée peut ensuite être diluée par un facteur 10 ou 100 selon les bactéries étudiées. L'absence d'études concernant la réalisation d'antibiogramme sur des boues activées a imposé plusieurs tests préliminaires. La dilution au 1/10^e de la suspension de trouble équivalent au standard Mc Farland 0.5 a été retenue car elle offre le bon compromis nombre de bactéries / inhibition visible.

Le milieu utilisé est celui de Mueller-Hinton qui est approprié au développement des entérobactéries, des staphylocoques, des pseudomonas et autres bacilles à Gram négatif non fermentaires. L'ensemencement du milieu est effectué par inondation à l'aide d'une pipette Pasteur. Le surplus est aspiré et un séchage de 15 minutes à l'air ambiant est ensuite observé. A l'aide d'une pince stérilisée 3 disques d'antibiotiques au maximum sont ensuite disposés à équidistance sur la gélose ensemencée. Les boîtes sont enfin mises sous incubation 24 heures à 37°C en aérobiose.

II.5.3.3. Interprétation des résultats

Après incubation les diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques sont mesurés. Pour un diagnostic clinique des abaques permettent de déterminer la sensibilité d'une souche à un antibiotique. Ainsi, une souche peut être caractérisée sensible, résistante ou intermédiaire. Les souches sensibles sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité de succès thérapeutique. Les souches catégorisées résistantes sont celles pour lesquelles il y a de fortes chances que le traitement échoue quelle que soit la dose d'antibiotique utilisée. Enfin, la probabilité de succès thérapeutique pour les souches classées intermédiaires est très imprévisible. Cette classification n'est évidemment pas pertinente pour caractériser l'antibiorésistance des boues activées. Pour cette étude les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont calculées à partir des diamètres d'inhibition relevés (Annexe II-10) puis sont comparés avec des boues activées de la STEP municipale de Rousset (t = 0) afin de quantifier l'antibiorésistance acquise. Pour chaque essai 3 antibiogrammes sont effectués pour s'assurer de la répétabilité des résultats.

II.6. Inhibition appropriée des boues activées pour la réalisation de tests de sorption

II.6.1. Avant-propos

La part de biotransformation et la part de sorption dans la disparition d'une molécule de la phase liquide sont communément déterminées en inhibant l'activité métabolique des boues activées dans le but d'empêcher le mécanisme de biotransformation. La part de sorption peut ensuite être déterminée en ajoutant le polluant aux boues inhibées, l'élimination de la phase liquide étant uniquement attribuée au mécanisme de sorption.

Différentes techniques d'inhibition ont été utilisées lors de précédentes études : chimique, thermique, purge par gaz, stérilisation et lyophilisation. Une détermination correcte de la part de sorption requière (i) une inhibition totale des boues activées et (ii) la préservation de l'intégrité structurelle de la biomasse inhibée. Une inhibition incomplète de la biomasse permettrait au mécanisme de biotransformation de se produire et une défloculation des boues activées fausserait la sorption. Aussi, la technique d'inhibition employée ne doit pas avoir d'effet sur le pH du milieu puisque son influence sur les affinités de sorption de polluants ayant des fonctionnalités acides ou basiques a été démontrée (Tadkaew et al., 2010).

Cependant, l'impact des techniques d'inhibition a rarement été étudié, à l'exception de l'azoture de sodium (Chefetz et al., 2006 ; Clouzot et al., 2010 ; Barbot et al., 2010 ; Wick et al., 2011) et différents produits chimiques biocides (Stevens-Garmon et al., 2011). Ces études ont montré que l'azoture de sodium, produit chimique utilisé dans de nombreux travaux pour déterminer les propriétés de sorption, induit un impact sur la viscosité apparente des boues activées (Barbot et al., 2010 ; Clouzot et al., 2010 ; Wick et al., 2011), la distribution boues-eau de plusieurs composés (Wick et al., 2011) ainsi que sur la conductivité de la liqueur mixte (Stevens-Garmon et al., 2011). L'azoture de sodium peut aussi réagir avec le polluant étudié. Chefetz et al. (2006) précisent que son utilisation pour des tests de sorption doit être soigneusement évaluée, particulièrement pour des concentrations supérieures à 100 $mg_{NaN3}.L^{-1}$.

Il ne semble pas y avoir de consensus sur la fiabilité de l'inhibition chimique des boues activées pour déterminer les propriétés de sorption. En effet, certains auteurs considèrent

que les agents chimiques peuvent avoir une influence sur le processus de sorption en raison de l'inactivation de cellules provoquant une lyse cellulaire ou en raison de la possible réaction avec le composé cible (Gaillardon, 1996 ; Chefetz et al., 2006), alors que d'autres ont rapporté que l'ajout d'azoture de sodium ne causait pas de lyse cellulaire (Yi et Harper, 2007) ou de libération de polysaccharides (Barbot et al., 2010).

En ce qui concerne l'inhibition chimique aucun protocole rigoureux d'inhibition ni de validation de la méthode n'ont été développés, à l'exception de l'azoture de sodium (Barbot et al., 2010). Des paramètres clés, tels que la concentration en inhibiteur et la cinétique d'inhibition, ont rarement été précisés et peu d'informations ont mentionné le degré d'inhibition atteint des boues activées. De plus, les concentrations des inhibiteurs n'ont pas toujours été exprimées en fonction du même paramètre (concentration de la biomasse, rapport massique, rapport volumétrique) (Tableau II-6).

De même, l'influence des autres modes d'inhibition sur l'efficacité de l'inhibition des boues activées et de la préservation de leur intégrité structurelle n'a pas, ou très peu, été étudiée. Alors qu'une altération de la texture des flocs des boues activées a déjà été mise en évidence pour la lyophilisation et la stérilisation (Berns et al., 2008 ; Barret et al., 2010) aucunes données n'ont été trouvées concernant l'efficacité et les impacts des techniques thermique et de purge par gaz. Il apparaît ainsi indispensable de déterminer préliminairement la technique la plus efficace sur l'inhibition de l'activité métabolique des boues activées et n'impactant pas la structure de la biomasse afin de proposer une évaluation fiable des propriétés de sorption.

5 méthodes d'inhibition sont retenues pour cette étude comparative : chimique (NaN_3, Hg_2SO_4 et $HgCl_2$), thermique et la purge par gaz. Les sous-parties suivantes présentent ainsi les matériels et méthodes utilisées pour déterminer la technique la plus appropriée à la réalisation de tests de sorption intègres.

Tableau II-6 : Concentrations et commentaires sur les inhibiteurs chimiques dans de précédentes études

Information sur l'inhibition	Concentration calculée	Temps de réaction	Commentaires	Références
		NaN_3		
0.2% m/m	2 $mg.g_{MES}^{-1}$	-	« basée sur la mesure de respirométrie, sans lyse cellulaire ni modification de l'hydrophobicité de la boue »	Yi et Harper, 2007
-	-	-	-	Chen et al., 2008
0.2% v/v	-	-	Pas d'information sur la concentration de la solution d'azoture de sodium – MES = 9.01 $g.L^{-1}$	Wick et al., 2009
0.9 $g.g_{MVS}^{-1}$	720 $mg.g_{MES}^{-1}$	-	Inhibition de l'activité respirométrique. «pas de libération de polysaccharide, viscosité réduite d'environ 40 % mais n'a pas modifié les capacités de sorption des boues activées »	Clouzot et al., 2010
200 $mg.g_{MES}^{-1}$	-	4h	Inhibition d'environ 90% après 4 heures. 0.1 et 0.35 $g.g_{MES}^{-1}$ ont été aussi testés. Diminution de la viscosité apparente.	Barbot et al., 2010
190mL boues - MES = 4 $g.L^{-1}$ [NaN3] = 0.2% et 1%	0.5 $mg.g_{MES}^{-1}$ et 2.5 $mg.g_{MES}^{-1}$	-	Effets néfastes de l'azoture de sodium sur la distribution boues-eau de plusieurs composés	Wick et al., 2011
		Hg_2SO_4		
0.5 $mL.L_{boues}^{-1}$ - $[Hg_2SO_4]$ = 200 $g.L^{-1}$ - 0.1 g $_{Hg2SO4}.L_{boues}^{-1}$ – MES = 1-3-5-7 $g.L^{-1}$	14 – 20 – 33 – 100 $mg.g_{MES}^{-1}$	-	-	Clara et al., 2004
$[Hg_2SO_4]$ = 0.2 $g.L^{-1}$ – MES = 1 $g.L^{-1}$	-	-	-	Kim et al., 2007
1mL Hg_2SO_4 dans 200 mL_{boues} - $[Hg_2SO_4]$ = 20 $g.L^{-1}$ – TSS = 15 $g.L^{-1}$	6.7 $mg.g_{MES}^{-1}$	-	-	Seyhi et al., 2012
		$HgCl_2$		
100 mg_{HgCl2} .L_{boues}^{-1} – Xbiomass = 6.2 $g_{DCO}.L^{-1}$ - TSS = 5.46 $g.L^{-1}$	18.3 $mg.g_{MES}^{-1}$	-	$HgCl_2$ a une plus faible influence que le nitrate d'argent sur les mesures des composés étudiés	Maurer et al., 2007

II.6.2. Respiration des boues inhibées

La respirométrie des boues activées a été suivie par des mesures de l'OUR puis le calcul du SOUR correspondant. Une valeur nulle du SOUR signifie que l'état d'inhibition des boues activées est atteint puisque les microorganismes ne peuvent plus consommer l'oxygène dissous. L'état d'inhibition de la biomasse a ainsi été suivi en calculant les valeurs du SOUR obtenu pour les 5 méthodes d'inhibition, permettant ainsi de calculer l'efficacité d'inhibition par comparaison aux valeurs initiales du SOUR des boues activées non inhibées. La concentration en oxygène dissous a été mesurée en continue par une sonde à oxygène (HQ 40d, Hach LDO).

II.6.3. Réactifs chimiques

L'azoture de sodium (NaN_3, 99 %, Sigma-Aldrich), le chlorure de mercure ($HgCl_2$, 99.5 %, Sigma-Aldrich) et le sulfate de mercure (Hg_2SO_4, 99 %, Chem-Lab) ont été utilisés individuellement pour les inhibitions chimiques.

II.6.4. Méthode thermique

L'inhibition thermique consiste simplement à sécher les boues activées (Delgado, 2009). Les boues activées sont dans un premier temps centrifugées pendant 20 min à 5000 $tr.min^{-1}$ (centrifugeuse 2-16, Sigma). Les culots sont récupérés puis rincés avec de l'eau distillée afin de réduire la quantité de substances exoplymériques. Les boues lavées sont à nouveau centrifugées durant 20 minutes à 5000 $tr.min^{-1}$. Les culots récupérés sont séchés à 80 °C pendant 2 jours pour assurer une complète inactivation et un séchage complet. La biomasse sèche est finalement broyée jusqu'à l'obtention de grains de taille uniforme. Les grains obtenus sont ensuite remis en solution avec du surnageant.

II.6.5. Technique de la purge à l'azote

Le protocole d'inhibition utilisé est celui mis au point par Seira et al. (2011). Dans un premier temps, les boues activées sont aérées afin d'éliminer les substrats résiduels. L'aération est

ensuite stoppée afin de se placer en conditions anoxie et d'éliminer les nitrates formés. Enfin, de l'azote gazeux est injecté afin de chasser l'oxygène du milieu.

II.6.6. Tests d'élimination de la DCO et de l'ammonium

Des tests de dégradation de DCO (sucre, 800 $mg.L^{-1}$, 180 $mg.gMES^{-1}$) et d'ammonium (50 $mg.L^{-1}$, 12 $mg.gMES^{-1}$) sont réalisés pour évaluer l'inhibition des boues activées. Ces tests ont été réalisés sur 2 heures sous aération. La DCO et l'ammonium ont été choisis afin de distinguer l'efficacité des techniques d'inhibition sur les microorganismes hétérotrophes et autotrophes. Une dégradation de substrat indiquerait une inhibition incomplète de la population bactérienne associée.

II.6.7. Bioréacteur et dispositif pour la rhéologie

La mesure du profil rhéologique des boues activées est réalisée dans un bioréacteur spécifique d'un volume utile de 1.9 L et équipé d'un rotor à doubles rubans hélicoïdaux. La température des boues est maintenue constante à 20 °C par circulation d'eau dans une double enveloppe. Le rotor à double rubans hélicoïdaux est connecté à un rhéomètre imposant le taux de cisaillement (Rheomat 30, Contraves) avec 30 valeurs disponibles de la vitesse de rotation imposée dans l'intervalle 0.408-257 $tr.min^{-1}$. Le couple d'agitation a été mesuré pour chaque valeur de la vitesse de rotation. Avant chaque mesure du couple, la suspension a été précisaillée pendant 30 secondes à vitesse moyenne afin d'assurer son homogénéité. La vitesse de rotation a ensuite été ajustée à la valeur désirée et le couple enregistré pendant 15 secondes après 15 secondes de stabilisation. La loi de puissance d'Ostwald (Eq. II-1) a été utilisée pour représenter les courbes de viscosité des boues activées initiales et inhibées :

$$\tau = K\gamma^{n} \quad \text{(Eq II-1)}$$

avec :

τ : contrainte (Pa)

γ : taux de cisaillement (s^{-1})

K : indice de consistance ($Pa.s^{n}$)

n : indice d'écoulement (-)

Les 2 paramètres de ce modèle, à savoir l'indice de consistance K et l'indice d'écoulement n sont déterminés graphiquement par une simple régression linéaire à l'échelle logarithmique.

II.6.8. Caractérisation des boues activées

Le degré de défloculation des boues activées est estimé à partir de la méthode présentée par Wilén et al. (2004). Des échantillons de boues activées sont prélevés durant la réaction d'inhibition puis centrifugés à 2000 $tr.min^{-1}$ pendant 2 min. La turbidité du surnageant est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 650 nm. La distribution de la taille des particules des boues activées est mesurée par un granulomètre laser Mastersizer S (Malvern Instruments) capable de mesurer des particules de 0.1 µm à 900 µm. Le diamètre médian D50 est enregistré pour chaque technique d'inhibition. Le filtrat issu de la concentration des boues activées a été utilisé pour diluer par un facteur 100 les échantillons de boues inhibées afin d'obtenir une obscuration appropriée à la mesure de la distribution de la taille des particules. 3 mesures de la turbidité du surnageant et de la distribution de la taille des flocs sont effectuées afin de s'assurer de la répétabilité des données. Enfin, le pH et la conductivité de la liqueur mixte sont mesurés pour les boues initiales ainsi que pour chaque technique d'inhibition.

Chapitre III

Faisabilité du traitement des effluents d'un service d'oncologie par bioréacteur à membranes : acclimatation de boues activées et élimination des médicaments ciblés.

III.1. Acclimatation d'une biomasse de BàM$_E$ aux effluents d'un service d'oncologie. Cas de l'anticancéreux fluorouracile.

La première campagne expérimentale d'acclimatation de boues activées aux effluents du service d'oncologie (EHO) s'est déroulée avec la configuration BàM$_E$. Cette campagne, d'une durée de 160 jours, est constituée de **deux phases distinctes puisqu'il fut décidé de co-alimenter le BàM$_E$ par un substrat synthétique au 97^e jour de fonctionnement**. Il convient de préciser que les boues activées ont été congelées au 96^e jour en raison de la période des congés d'été qui ne garantissait plus le nombre réglementaire de personnel présent au sein du service pour manipuler. Les résultats décrits dans ce chapitre montrent que cette congélation n'a pas eu d'impact sur les performances des boues activées. Dans un premier temps, les caractéristiques des effluents alimentant le BàM sont présentées pour la durée globale de cette campagne expérimentale afin de comparer les conditions des 2 phases de l'acclimatation. Les évolutions de la concentration de la biomasse en matières en suspensions (MES) et des rendements épuratoires du BàM sur la DCO et la pollution azotée sont ensuite abordées pour discuter de l'état d'acclimatation obtenu. Une biomasse peut être considérée dans un état « acclimaté » à un effluent lorsque la croissance bactérienne est significative et les rendements épuratoires sont élevés et stables. La discussion est étayée par la comparaison des performances des boues du BàM$_E$ hôpital et des boues de STEP municipale sur la résistance à la présence de cocktails médicamenteux et sur l'élimination du second médicament anticancéreux le plus consommé dans le service d'oncologie, le fluorouracile (5-FU).

A noter que les points sont reliés sur certaines figures afin de faciliter leur lecture et non pour signifier une évolution linéaire du paramètre entre 2 mesures.

III.1.1. Conditions de l'acclimatation

L'évolution de la pollution carbonée (DCO) et azotée (N-NH_4^+) des EHO lors de la première campagne expérimentale connaît de nombreuses fluctuations (Figure III-1).

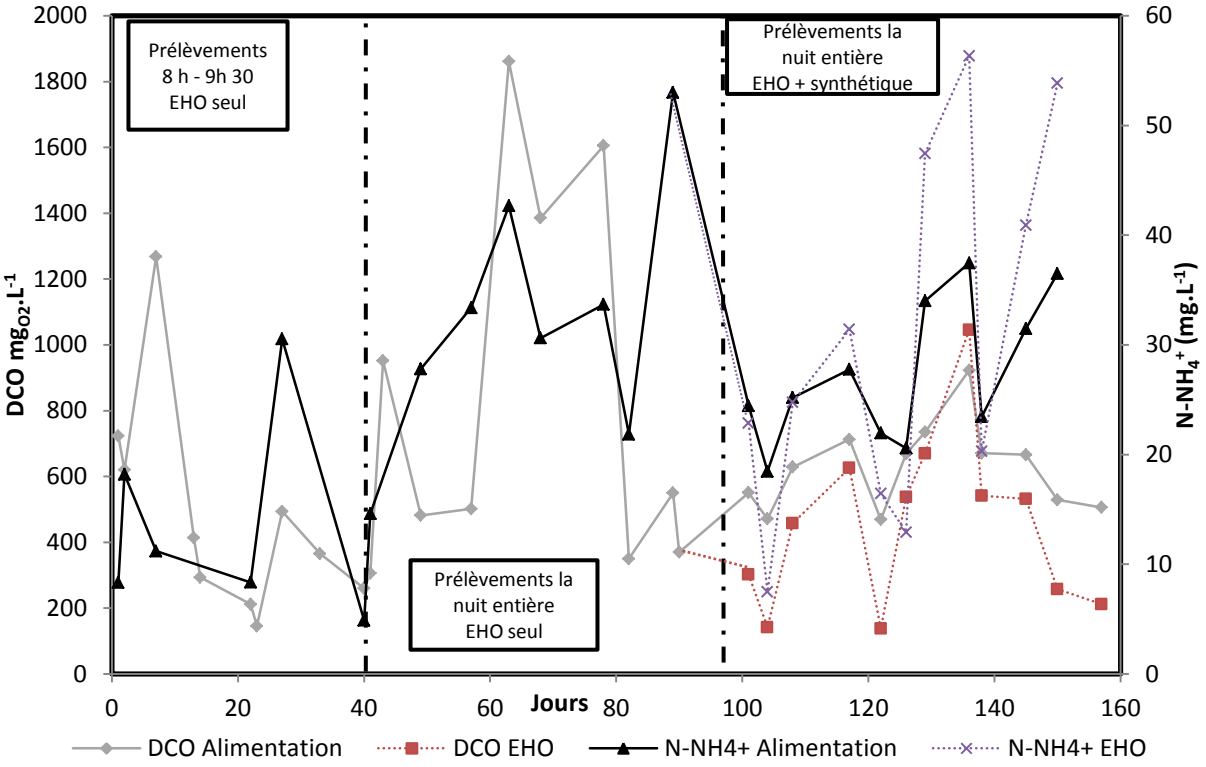


Figure III-1 : Evolution temporelle de la DCO et de l'ammonium dans les EHO.

3 conditions de travail peuvent être distinguées :

- 0 – 40^{e} jour : prélèvement des EHO entre 8 h et 9 h 30 conformément à la stratégie mise en place dans le paragraphe II.2.2.1 ;
- 40^{e} – 97^{e} jour : prélèvement des EHO durant la nuit afin d'éviter la dilution par les eaux de douche (Cf II.2.2.2) ;
- 97^{e} – 160^{e} jour : co-alimentation par les EHO et un substrat synthétique pour favoriser l'acclimatation (Cf III.1.2).

Au 40^{e} jour, le changement de la méthode de prélèvement a induit l'obtention d'un effluent plus chargé en ammonium. Au 97^{e} jour, l'apport de substrat synthétique a permis une relative stabilisation des concentrations de DCO et de N-NH_4^+. Malgré la standardisation de la méthode de prélèvement à partir du 40^{e} jour, d'importantes fluctuations des concentrations en DCO et en N-NH_4^+ ont été relevées pouvant indiquer une certaine hétérogénéité dans l'activité du service d'oncologie.

La composition du substrat synthétique permettant de diluer la charge polluante spécifique des EHO à partir du 97^{e} jour a été déterminée à partir des moyennes des concentrations de

DCO (800 $mg.L^{-1}$) et de $N\text{-}NH_4^+$ (31 $mg.L^{-1}$) mesurées lors de la période du 40^e au 97^e jour (Tableau III-1). Les concentrations en sels minéraux sont fixées par la littérature (Han et al., 2005 ; Barrioz-Martinez, 2006). Le rapport C/N/P de l'effluent synthétique est de 100/4/2 avec C correspondant au carbone organique.

Tableau III-1 : Concentrations de l'effluent synthétique pour la co-alimentation à partir du 97^e jour.

	$C_6H_{12}O_6$	$(NH_4)_2SO_4$	$MgSO_4$	KH_2PO_4	$CaCl_2$
Concentration effluent synthétique ($mg.L^{-1}$)	800	146.7	38.1	76.2	7.6
Proportion massique	1	0.18	0.05	0.10	0.01

Les fluctuations des concentrations en DCO et en $N\text{-}NH_4^+$ induisent logiquement une forte variation du rapport C/$N\text{-}NH_4^+$ au cours des 160 jours de l'acclimatation (Figure III-2).

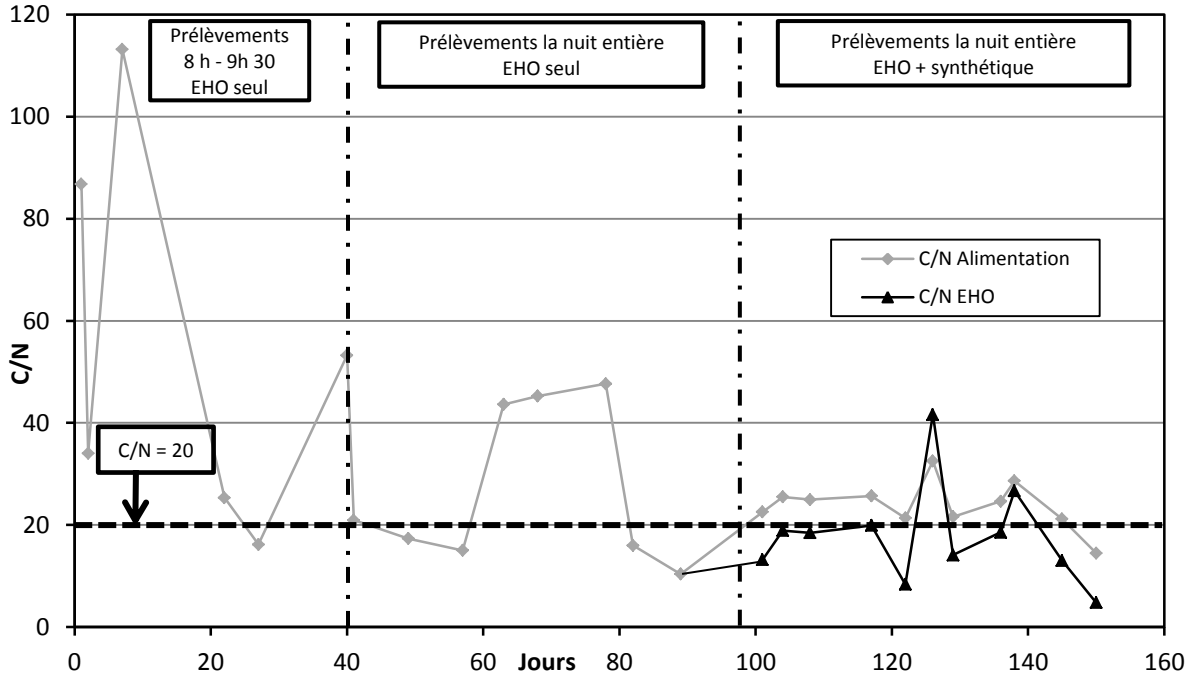


Figure III-2 : Evolution temporelle du rapport C/N dans les EHO.

Au 40^e jour, le changement de la méthode de prélèvement a eu pour effet de modérément harmoniser le rapport C/N de l'alimentation entre 15 et 50. L'apport de substrat synthétique au 97^e jour a accentué cette stabilisation autour de 25 et permet ainsi de pallier les fluctuations continuelles du rapport C/N des EHO. Il est communément admis qu'un rapport C/N/P de 100/5/1 (C/N = 20) est adéquat aux microorganismes. **Le rapport C/N moyen est donc assez proche de cet idéal à partir du 97^e jour mais de nombreuses fluctuations sont à noter.**

III.1.2. Développement de la biomasse

L'ensemencement du BàM$_E$ pilote a été réalisé à partir de boues provenant de la STEP municipale de Rousset (Bouches du Rhône) à une concentration de 8.2 g.L^{-1} en MES. Cette STEP est dotée du procédé BàM$_{IE}$. Pour plus de clarté, la représentation de l'évolution des MES et de la charge massique en DCO (Cm) au cours des 160 jours de l'acclimatation de la biomasse aux EHO a été scindée en 5 phases distinctes incluant les 3 phases de modification des conditions d'alimentation (Figure III-3). Tout au long de l'acclimatation, la proportion de matières volatiles en suspension (MVS) dans les MES est sujette à des variations négligeables (85 ± 3 %).

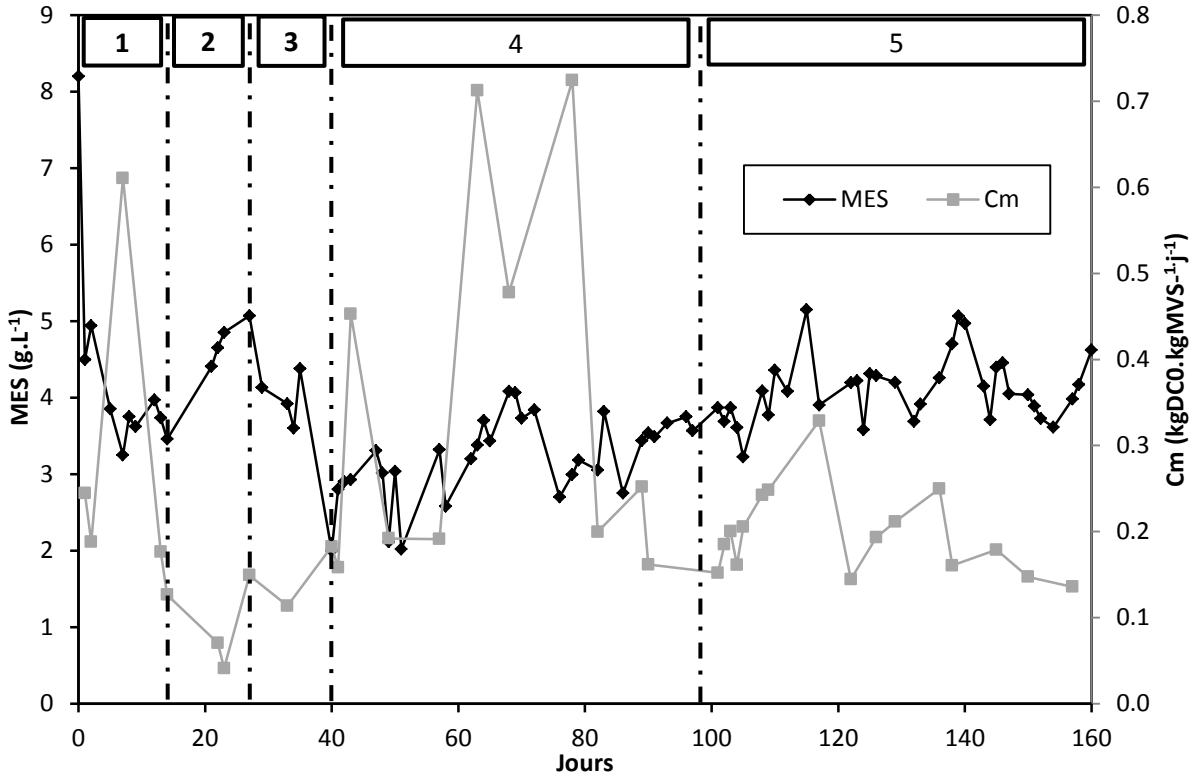


Figure III-3 : Evolution temporelle des MES et de la Cm.

Une perte brutale de la moitié de la biomasse est observée dès la première journée après l'ensemencement. La concentration en MES continue ensuite de décroître jusqu'au 7^e jour. Cette perte peut être principalement attribuée aux nouvelles conditions que subit la biomasse, à savoir à la mise en contact avec un nouvel effluent et aux changements de conditions hydrodynamiques liés à la différence de configuration entre la STEP (BàM$_{IE}$) et le BàM pilote (BàM$_E$). En effet, la forte vitesse tangentielle de 4 m.s^{-1} au sein de la membrane imposée en configuration externe pour contrôler le colmatage induit un important

cisaillement à la biomasse provoquant un phénomène de lyse cellulaire. La fin de la phase 1 est ensuite marquée par quelques fluctuations de la concentration en MES.

Une phase significative de croissance bactérienne est ensuite observée lors de la phase 2 puisque la concentration en MES évolue de 3.4 $g.L^{-1}$ à 5.1 $g.L^{-1}$ entre le 14^{e} et le 27^{e} jour. Cette phase de croissance de 50 % est accompagnée d'une Cm particulièrement basse aux 22^{e} et 23^{e} jours (0.04 et 0.07 $kgDCO.kgMVS.j^{-1}$). La DCO entrante est en effet devenue très faible, les EHO étant majoritairement composés d'eaux de douche suite à une modification de l'activité routinière du service d'oncologie. **Cette phase de croissance significative de biomasse entre le 14^{e} et le 27^{e} jour pourrait être expliquée par la consommation des produits microbiens solubles relargués lors de la lyse cellulaire survenue au cours de la phase 1.**

La phase 3 est caractérisée par une nouvelle chute de la concentration en MES de 5.1 à 2.5 $g.L^{-1}$. La concentration en DCO des EHO est pourtant légèrement supérieure à la phase 2 (environ 400 $mg.L^{-1}$) due à une fraction inférieure mais toujours majoritaire d'eaux de douche collectées. **La présence de tensioactifs (savon et produits d'entretien) a pu perturber les transferts de matière au sein des flocs bactériens.** Il fut donc décidé, à partir du 40^{e} jour, de modifier la méthode de prélèvement en prélevant les EHO durant la nuit entière afin de s'affranchir des eaux de douche. Un trop-plein a été installé sur la cuve de stockage des EHO, permettant le prélèvement continu.

La 4^{e} phase est marquée par de nombreuses fluctuations dans le développement de la biomasse avec l'alternance de phases de croissance et de perte des MES. Une croissance de biomasse de 2.0 $g.L^{-1}$ au 40^{e} jour à 3.7 $g.L^{-1}$ au 96^{e} jour est toutefois observable. Les pics de Cm entre les 60^{e} et 80^{e} jours sont dus à des pics de DCO dans les EHO, obtenus malgré le prélèvement sur les nuits entières supposé harmoniser les concentrations des EHO. Cette très légère croissance bactérienne sur le long terme témoigne des difficultés de la biomasse à s'acclimater aux EHO. Il est probable que les EHO, contenant une multitude de médicaments à de fortes concentrations, aient un effet inhibiteur sur la croissance des boues activées. **Les nombreuses fluctuations de la concentration de la biomasse indiqueraient que celle-ci est prête à croître dès que les conditions, et par conséquent les EHO, le permettent.** Il a ainsi été décidé, à partir du 97^{e} jour, de diluer la charge médicamenteuse en alimentant le BàM pilote par moitié avec un effluent synthétique.

La phase 5 correspond au fonctionnement du BàM alimenté de moitié par les EHO et de moitié par de l'effluent synthétique. L'apport de substrat synthétique a eu pour premier effet de stabiliser la Cm autour de 0.20 $kg_{DCO}.kg_{MVS}^{-1}.j^{-1}$ (0.20 ± 0.05 $kg_{DCO}.kg_{MVS}^{-1}.j^{-1}$). Malgré la dilution par 2 des EHO, de nombreuses fluctuations dans le développement de la biomasse sont à nouveau observées. Bien que l'évolution des MES tende toujours vers une faible croissance, de 3.6 $g.L^{-1}$ au 97^{e} jour à 4.6 $g.L^{-1}$ au 160^{e} jour, elle est étonnamment moins prononcée que celle de la phase 4 lorsque les EHO constituaient l'unique substrat (Figure III-4).

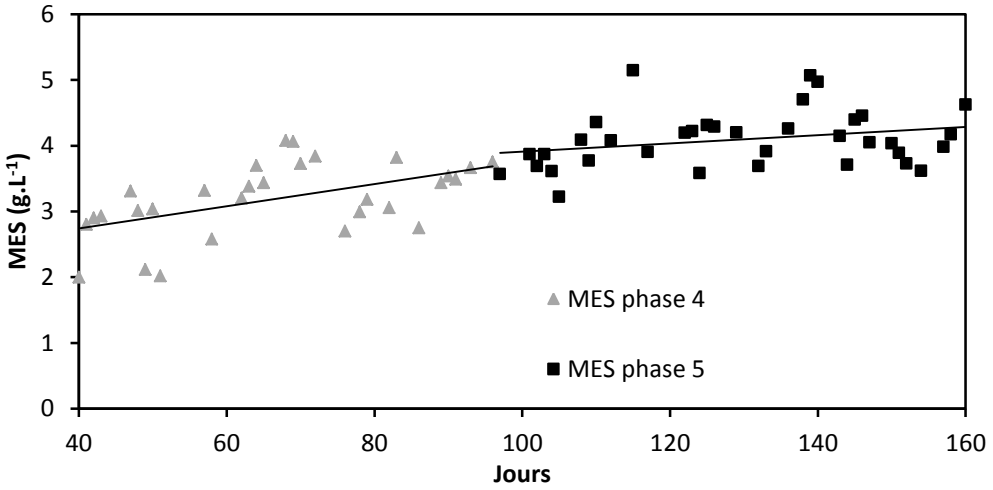


Figure III-4 : Croissance de biomasse lors des phases 4 et 5.

La phase de croissance en présence de substrat synthétique est ainsi 2.7 fois plus faible que la croissance de la phase avec les EHO en tant que seul substrat. **Cette croissance plus lente peut être attribuée à la Cm moyenne 1.7 fois plus forte que lors de la phase 4 (0.34 $kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}$) par rapport à la phase 5 (0.20 $kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}$).** La légère croissance de biomasse obtenue sur le long terme signifie que l'acclimatation aux EHO est possible mais demeure très délicate en raison de la particularité de l'effluent.

III.1.3. Performances épuratoires

Les capacités épuratrices de la biomasse sont évaluées à partir des performances sur l'élimination de la DCO, l'ammonium et des nitrates formés.

III.1.3.1. Elimination de la DCO

L'abattement global de la DCO par le BàM est toujours supérieur à 90 % lors de l'acclimatation hormis au 123^{e} jour où une chute ponctuelle à 86 % est constatée (Figure III-5).

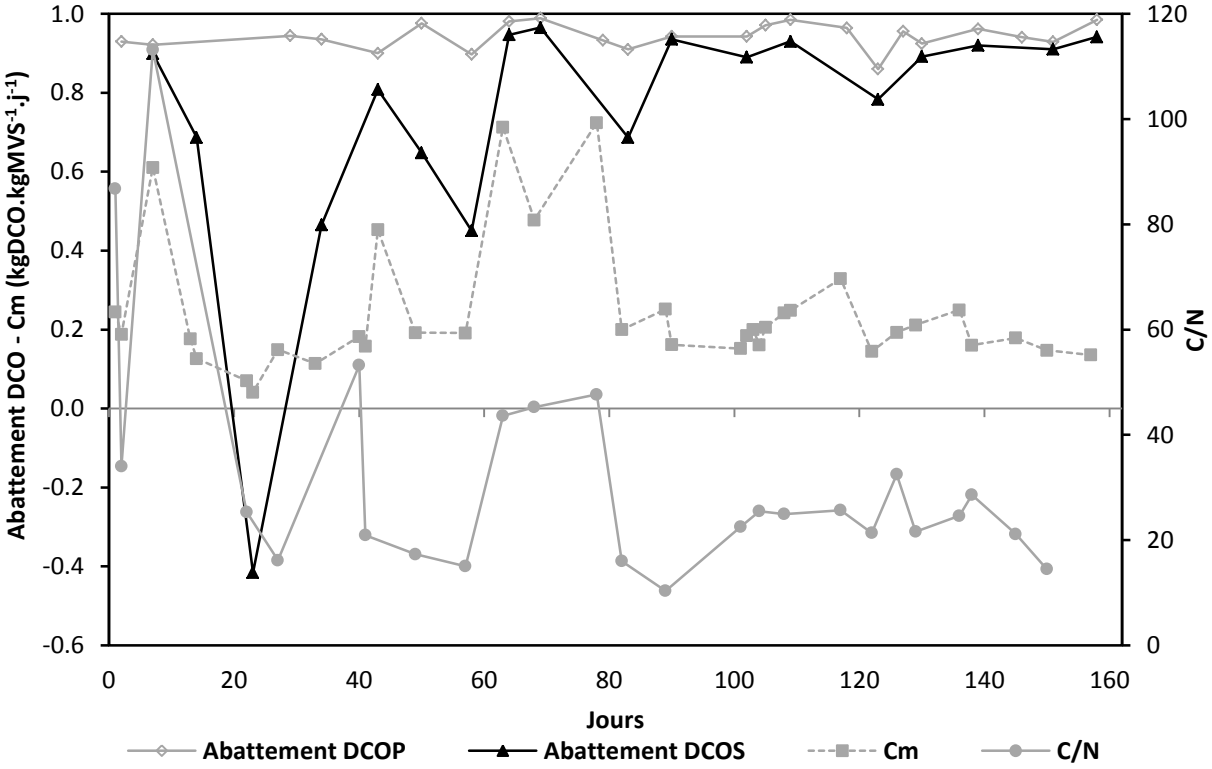


Figure III-5 : Evolution temporelle de l'abattement de la DCO dans le surnageant et dans le perméat, de la charge massique et du rapport C/N.

L'élimination de la DCO dans le perméat (DCOP) semble plutôt indépendante de l'abattement de la DCO dans le surnageant (DCOS). **La membrane utilisée de 150 kDa est donc efficace sur la rétention de la DCO non métabolisée par les bactéries.**

L'abattement de la DCOS est nettement plus variable. Au 23^{e} jour, la présence d'une concentration en DCOS plus forte que dans les EHO confirmerait l'attribution de la phase de croissance bactérienne entre le 14^{e} et le 27^{e} jour à la lyse cellulaire survenue lors de la première phase de l'acclimatation. La croissance significative de biomasse observée entre le

14^{e} et le 27^{e} jour peut ainsi être expliquée par la consommation par les bactéries survivantes des polymères extracellulaires relargués. Il était surprenant que cette croissance ait été obtenue avec la présence de tensioactifs.

Alors que l'élimination de la DCOS est ensuite remontée, une chute progressive de 81 à 43 % de l'abattement de cette DCO du 43^{e} au 58^{e} jour semble liée aux baisses du rapport C/N des EHO lors de cette période (entre 15 et 21) et de la Cm après un pic à 0.45 $kg_{DCO}.kg_{MVS}^{-1}.j^{-1}$ au 43^{e} jour. De même, une autre chute est observée au 83^{e} jour, à nouveau liée avec une chute du rapport C/N (de 48 au 78^{e} jour à 16 au 82^{e}) et une importante chute de la Cm (de 0.72 $kg_{DCO}.kg_{MVS}^{-1}.j^{-1}$ au 78^{e} jour à 0.20 $kg_{DCO}.kg_{MVS}^{-1}.j^{-1}$ au 82^{e} jour). Par la suite, l'apport de substrat synthétique au 97^{e} jour permet la stabilisation de la charge massique et du rapport C/N entre 14 et 25. Ces conditions semblent favoriser l'élimination de la pollution organique puisque l'abattement de la DCO dans le surnageant devient plus constant et toujours supérieur à 78 % jusqu'à la fin de la campagne expérimentale. En considérant sur cette période une élimination de 95 % de la DCO facilement biodégradable issue du substrat synthétique l'élimination de la DCO provenant des EHO est très bonne, puisque comprise entre 73 et 91 %, hormis au 123^{e} jour où une élimination négative de -18 % est calculée. Cette diminution négative indiquerait ainsi une lyse cellulaire causée par les EHO qui est confirmée par une diminution ponctuelle des MES au 124^{e} jour. Seule une diminution de la Cm de 0.33 au 117^{e} jour à 0.14 au 122^{e} jour est constatée puisque le rapport C/N est stable. Cette baisse de la Cm est due à une plus faible concentration en DCO des EHO au 122^{e} jour qui aurait donc provoqué une perte ponctuelle de biomasse.

III.1.3.2. Elimination de la pollution azotée

III.1.3.2.1. Nitrification

L'abattement de l'ammonium apparaît très faible au début de l'acclimatation, probablement en raison de l'extrême sensibilité des microorganismes autotrophes aux conditions hydrodynamiques cisaillantes de la configuration BàM$_E$ (Clouzot et al., 2011) (Figure III-6).

Une importante chute de l'abattement de l'ammonium à 50 % au 83^{e} jour est observée et est à mettre en relation avec celle de l'abattement de la DCO dans le surnageant à la même date. Bien que le 82^{e} jour soit marqué par une chute brutale de la Cm en DCO et du rapport C/N la Cm en ammonium demeure stable, le TSH ayant été diminué de 22 h à 17 h afin de

limiter la chute de la Cm en DCO. Ainsi, la chute de la Cm en DCO et/ou du rapport C/N pourraient avoir également altéré les performances des bactéries autotrophes. Une carence des EHO en carbone inorganique pourrait aussi expliquer cette chute. De même que pour la DCO, l'apport de substrat synthétique à partir du 97^{e} jour permet de stabiliser l'abattement de l'ammonium à plus de 92 %. Une tendance à la hausse de cet abattement est de plus observée jusqu'à la fin de la campagne expérimentale. Au 123^{e} jour, il est remarquable qu'un abattement de 100 % de l'ammonium soit obtenu alors qu'une lyse cellulaire ponctuelle est en train de se produire. Cette lyse cellulaire concernerait ainsi majoritairement les bactéries hétérotrophes.

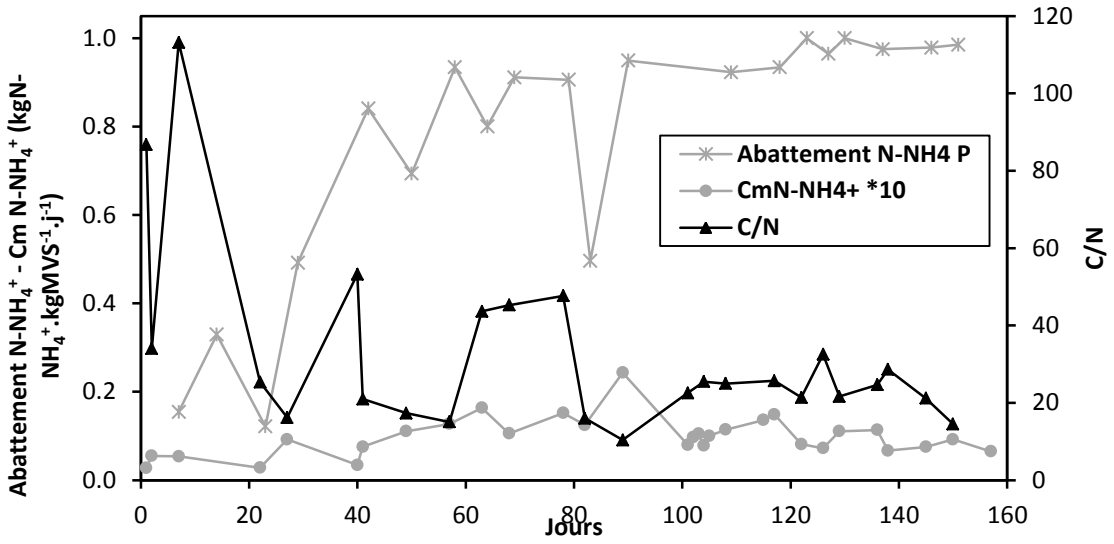


Figure III-6 : Evolution temporelle de l'abattement de l'ammonium dans le perméat, de la charge massique en ammonium et du rapport C/N.

L'abattement de l'ammonium apparaît majoritairement influencé par les fluctuations du rapport C/N. Les abattements très faibles observés lors des 3 premières semaines peuvent être liés à la phase de lyse cellulaire qui a pu fortement impacter les bactéries. En effet, suite à la lyse cellulaire des micro-organismes hétérotrophes, des produits microbiens comme des polysaccharides ou des protéines sont libérés dans le milieu ; une corrélation entre des pics de polysaccharides et les chutes de rendement d'élimination d'ammonium a déjà été observée (Clouzot et al., 2010). L'élimination de l'ammonium ne souffre pas de la lyse cellulaire du 123^{e} jour puisque celle-ci est très éphémère.

III.1.3.2.2. Dénitrification

L'élimination des nitrates par le BàM s'avère largement incomplète lors des 160 jours de fonctionnement (Figure III-7).

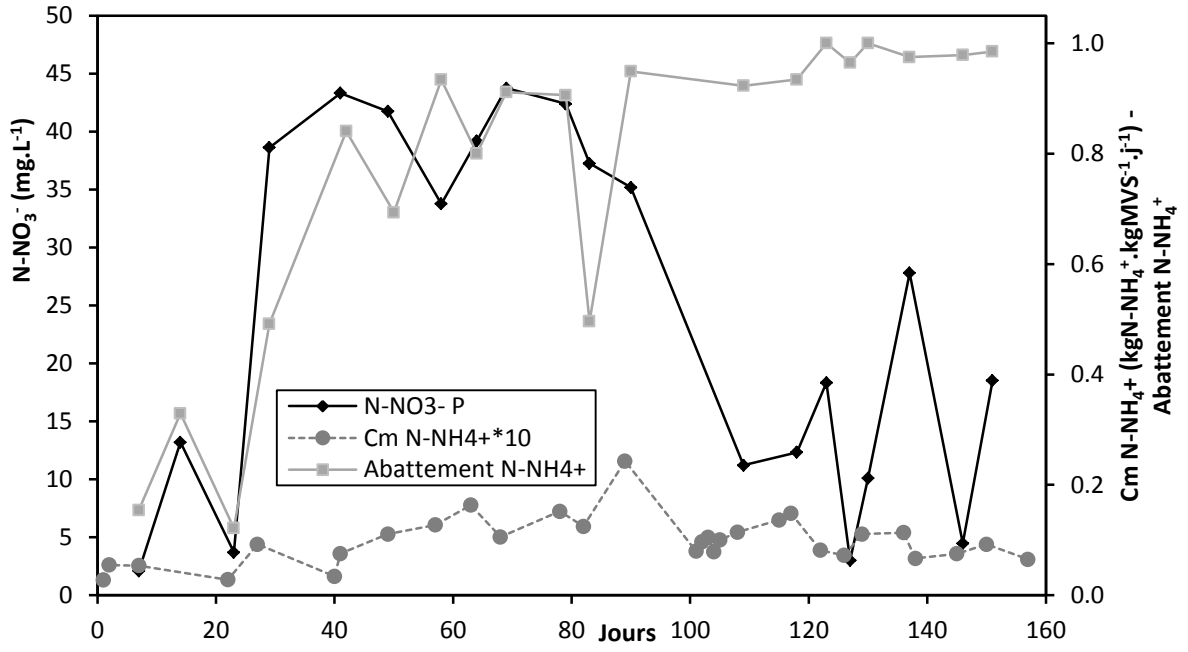


Figure III-7. Evolution temporelle de la concentration en $N\text{-}NO_3^-$ dans le perméat, de l'abatemment de l'ammonium et de la charge massique en ammonium.

Les concentrations résiduelles en nitrates dans le perméat apparaissent plus élevées lors de la phase de fonctionnement avec les EHO en tant que seul substrat (jusqu'au 97^e jour). La réaction de dénitrification semble ainsi fortement inhibée à partir du 29^e jour. Elle serait devenue partiellement opérationnelle lors de l'alimentation du BàM avec une partie d'effluent synthétique. Cette dernière période est de plus accompagnée d'une très bonne élimination de l'ammonium, indiquant un potentiel important de formation de nitrates (si la réaction de nitrification est toutefois complète).

Les causes potentielles d'un dysfonctionnement de la réaction de dénitrification sont nombreuses :

- des conditions d'anoxie non respectées. Oh et Silverstein (1999) ont montré qu'une très faible concentration d'oxygène dissous dans le milieu (jusqu'à 0.09 $mg_{02}.L^{-1}$) suffit à significativement ralentir la réaction de dénitrification. La concentration en oxygène dissous dans la cuve anoxie a toujours été quotidiennement contrôlée à 0.00 $mg_{02}.L^{-1}$.

- une quantité de carbone organique insuffisante. La dénitrification endogène, au cours de laquelle le carbone associé aux microorganismes dénitrifiant est utilisé, est considérée 5 fois plus lente que la dénitrification exogène (Metcalf et Eddy, 1991). Ainsi, le rapport C/N a une influence sur la qualité de la dénitrification. Li et al. (2008) observent une dénitrification complète jusqu'à un rapport C/N de 4. Le BàM pilote a été conçu de manière à bénéficier du carbone organique contenu dans les EHO pour la réaction de dénitrification avant son oxydation dans la cuve aérée. Ainsi, l'alimentation en EHO du BàM pilote est effectuée directement dans la cuve d'anoxie. Ce mode de fonctionnement doit limiter les problèmes de limitation en carbone organique pour la réaction de dénitrification. Le rapport C/N étant systématiquement supérieur à 10 au cours de l'acclimatation il est également possible d'écarter l'hypothèse d'un manque de carbone empêchant la dénitrification exogène.
- un mauvais temps de séjour entre les zones anoxie et aérobie. Un temps de séjour 1h – 2h dans les bassins anoxie – aérobie est généralement convenu comme étant optimal et a été appliqué dans le $BàM_E$.
- une température et/ou un pH inappropriés. La réaction de dénitrification peut s'effectuer sur une large gamme de température. Son efficacité augmente jusqu'à 40°C puis diminue très rapidement pour de plus fortes températures. Un pH compris entre 7 et 8.5 permet un taux de dénitrification maximal. Une inhibition de la dénitrification est observée lorsque le pH est inférieur à 6 ou supérieur à 8.5. puisqu'au cours de l'acclimatation la température a varié entre 14 et 27 °C et le pH entre 6.4 et 8.6 (pour une seule journée) dans la cuve de dénitrification.
- une accumulation de nitrites peut perturber la dénitrification.
- la présence de composés toxiques peut provoquer l'inhibition de la réaction de dénitrification, tels que les produits tensioactifs et les métaux lourds (Seifert et Domka, 2003).

Ainsi, les mauvaises performances de dénitrification pourraient être attribuées à la présence de composés toxiques dans les EHO perturbant les bactéries hétérotrophes. Peu de données ont été retrouvées dans la littérature concernant l'influence de molécules médicamenteuses sur la réaction de dénitrification. A différentes concentrations d'un

cocktail de 5 médicaments, Kraigher et al. (2011) ont observé une nitrification identique mais une chute de l'élimination des nitrates dans le réacteur dopé à 50 $\mu g.L^{-1}$ de chaque médicament. Les auteurs s'étonnent que cette chute de la dénitrification se soit produite pour la plus faible concentration de médicaments tandis que les réacteurs dopés à 200 et 500 $\mu g.L^{-1}$ ont affiché des performances similaires au réacteur témoin. Cette inhibition de la dénitrification dans le réacteur à 50 $\mu g.L^{-1}$ est accompagnée d'une modification de la proportion des espèces composant la classe Nitrospira. Les auteurs émettent 2 hypothèses :

- à faible concentration (50 $\mu g.L^{-1}$), les médicaments sont utilisés comme source de carbone ou sont cométabolisés par la 2^{nde} souche de la classe Nitrospira. A de plus fortes concentrations, (200 et 500 $\mu g.L^{-1}$) les médicaments sont cométabolisés par la $1^{ère}$ souche de la classe Nitrospira ou par un autre compétiteur.
- il est possible que les médicaments à la concentration de 50 $\mu g.L^{-1}$ aient influencé l'activité et/ou la structure des bactéries dénitrifiantes, provoquant l'augmentation des nitrates qui ont modifié la structure de la communauté Nitrospira.

Les résultats de Kraigher et al. (2011) montrent que la présence de médicaments à des conditions bien spécifiques peut conduire à une modification de la communauté bactérienne et à une chute des performances de la réaction de dénitrification. Une légère inhibition de la dénitrification a également été observée par Prado et al. (2009) dans un BàM après l'ajout de l'antibiotique tétracycline tandis que la nitrification et l'abattement de la DCO n'ont pas souffert de l'ajout de ce médicament, indiquant une inhibition sélective des capacités épuratoires des hétérotrophes. Par ailleurs, d'autres composés, tels que les produits tensioactifs, sont connus comme inhibiteurs potentiels de la réaction de dénitrification dans les sols (Seifert et Domka, 2004). Il est fort probable que l'important moussage observé dans la cuve aérobie soit en partie dû à la présence continue de tensioactifs dans le réacteur. L'inhibition de la réaction de dénitrification par des tensioactifs pourrait être expliquée par :

- l'accumulation de ces produits dans le réacteur par la membrane qui accentuerait ainsi les perturbations engendrées ;
- la configuration du BàM pilote avec l'alimentation en EHO dans la cuve anoxie.

Cette seconde hypothèse souligne le fait que les produits tensioactifs sont introduits en premier dans la cuve anoxie dans laquelle se produit la réaction de dénitrification. Ces

produits n'y sont à priori pas dégradés en raison de la concentration nulle en oxygène dissous. **Un phénomène de sorption / polarisation des tensioactifs, et en particulier des tensioactifs cationiques, sur les flocs bactériens chargés négativement est fortement plausible et engendrerait ainsi une perturbation du transfert de matière entre les ions nitrates et les bactéries hétérotrophes.** Les tensioactifs cationiques sont généralement des produits azotés dont les sels d'ammonium quaternaire qui sont très utilisés dans les hôpitaux. L'activité épuratrice retrouvée des bactéries hétérotrophes dans la cuve aérobie pourrait alors être expliquée par la présence d'oxygène dissous qui permettrait une dégradation partielle des agents tensioactifs.

Les EHO, riches en médicaments et en tensioactifs dus aux normes strictes d'hygiènes des services de soins, apparaissent donc responsables de l'inhibition de la dénitrification. Ce constat est appuyé par la dilution des EHO par le substrat synthétique dépourvu de médicaments et d'agents tensioactifs qui a permis l'établissement d'une dénitrification partielle.

III.1.3.3. Consommation d'oxygène

La vitesse de consommation de l'oxygène (Oxygen Uptake Rate = OUR) dans le réacteur est régulièrement mesurée au cours de la campagne expérimentale (Figure III-8). Les mesures sont ramenées à la concentration en MVS afin de s'affranchir des fluctuations de concentrations de la biomasse : le terme utilisé est alors le SOUR (Specific Oxygen Uptake Rate).

Le SOUR est relativement stable au début de la campagne expérimentale, oscillant entre 1.4 et 5.5 $mg_{O2}.gMVS^{-1}.h^{-1}$. Au 23^{e} jour, le taux de respiration de 0.8 $mg_{O2}.gMVS^{-1}.h^{-1}$ est à relier à la très faible Cm de 0.04 $kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}$. Ce taux apparaît cependant bien faible et un effet inhibiteur des EHO sur la biomasse, dû à la présence de tensioactifs à cette période, est fort probable. Cette faible respiration et cette faible Cm semblent entraîner une première perte importante de biomasse du 27^{e} au 29^{e} jour. La phase de perte de biomasse, du 27^{e} au 40^{e} jour, est marquée par le début d'importantes fluctuations de la respiration des boues activées. Un pic à 18.6 $mg_{O2}.gMVS^{-1}.h^{-1}$ est relevé au 35^{e} jour et semble annonciateur de la perte brutale de biomasse atteignant 2.0 $g.L^{-1}$ au 40^{e} jour.

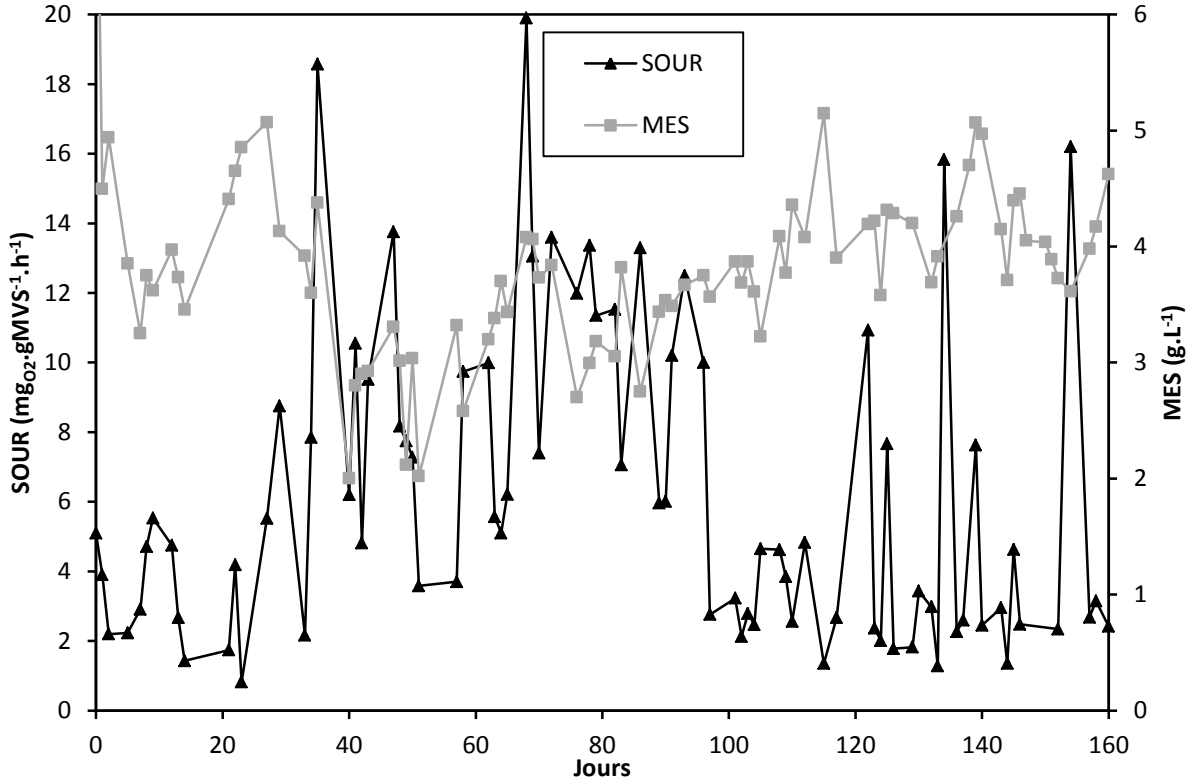


Figure III-8 Evolution temporelle du SOUR et des MES.

La respiration des boues activées apparaît en moyenne plus élevée entre le 40^{e} et le 97^{e} jour, coïncidant au changement de la méthode de prélèvement et au fonctionnement avec les EHO en tant qu'unique substrat. La plupart des valeurs du SOUR entre le 60^{e} et le 80^{e} jour sont supérieures à 10 $mg_{O2}.gMVS^{-1}.h^{-1}$. Cette respiration plus élevée peut être liée à l'importante augmentation de la Cm due à des EHO très chargés en DCO lors de cette période. Une diminution du SOUR à 7.1 $mg_{O2}.gMVS^{-1}.h^{-1}$ est mesurée au jour 83 et coïncide avec la chute globale des performances épuratoires du système à cette date probablement liée à la chute brutale de la Cm. Une nette diminution du SOUR est observée au début de l'apport de substrat synthétique. L'ordre de grandeur des valeurs mesurées entre le 97^{e} et le 115^{e} jour rejoint celui du début de la campagne expérimentale jusqu'au 22^{e} jour. Ainsi, cette diminution du SOUR peut être attribuée à la décongélation des boues qui a engendré une phase de latence de reprise de l'activité. Les valeurs du SOUR sont ensuite plus stables et plus faibles jusqu'à la fin de la campagne expérimentale bien que 3 pics soient à noter aux 122^{e}, 134^{e} et 154^{e} jours.

Le suivi de la consommation en oxygène dans le réacteur s'avère délicat à interpréter sans la connaissance de la composition précise des EHO. Il est cependant possible de relier parfois

l'évolution de la respirométrie avec la charge massique. Les pics de SOUR relevés aux 35^{e}, 68^{e}, 134^{e} et 154^{e} jours ont tous été accompagnés par une phase significative de perte ou de croissance de biomasse. La dernière phase de l'acclimatation du 97^{e} au 160^{e} jour, correspondant à l'alimentation du BàM avec les 2 types d'effluents et une Cm mieux maîtrisée, est marquée par une respirométrie un peu plus stable que la première période. **Cette stabilité de la consommation en oxygène peut être un indicateur (i) d'une acclimatation plus poussée de la biomasse aux EHO ou (ii) d'un effet inhibiteur moins prononcé des EHO en raison de leur dilution par le substrat synthétique.**

III.1.3.4. Colmatage membranaire

L'évolution du colmatage membranaire est analysée par le relevé des pressions de part et d'autre du carter membranaire permettant de calculer la pression transmembranaire puis la perméabilité membranaire. Comme pour l'évolution des MES l'évolution de la perméabilité membranaire normée (à la valeur maximale $Lp_{20°C}$max relevée au cours de la campagne = 58.6 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$) est décomposée en plusieurs phases distinctes correspondant aux lavages et au changement d'alimentation du $BàM_E$ (Figure III-9).

La phase 1 est dans un premier temps caractérisée par une perte immédiate de perméabilité membranaire due à la mise en place du gâteau de filtration. Ensuite, une augmentation de la perméabilité est observée les jours suivants en raison de la modification de la viscosité du milieu consécutif à la lyse cellulaire qui a provoqué une chute de 45 % de la concentration de MES lors du 1er jour. La perméabilité membranaire décroit linéairement jusqu'au 40^{e} jour. La phase 2, du 40^{e} jour au 96^{e} jour, correspondant au changement de la méthode de prélèvement et à l'alimentation du BàM par les EHO seuls, est caractérisée par une nouvelle chute linéaire de perte de perméabilité semblable à celle de la phase 1. La membrane a ensuite dû être lavée chimiquement au 97^{e} jour en raison d'une PTM devenue trop importante pour atteindre le débit de perméat souhaité.

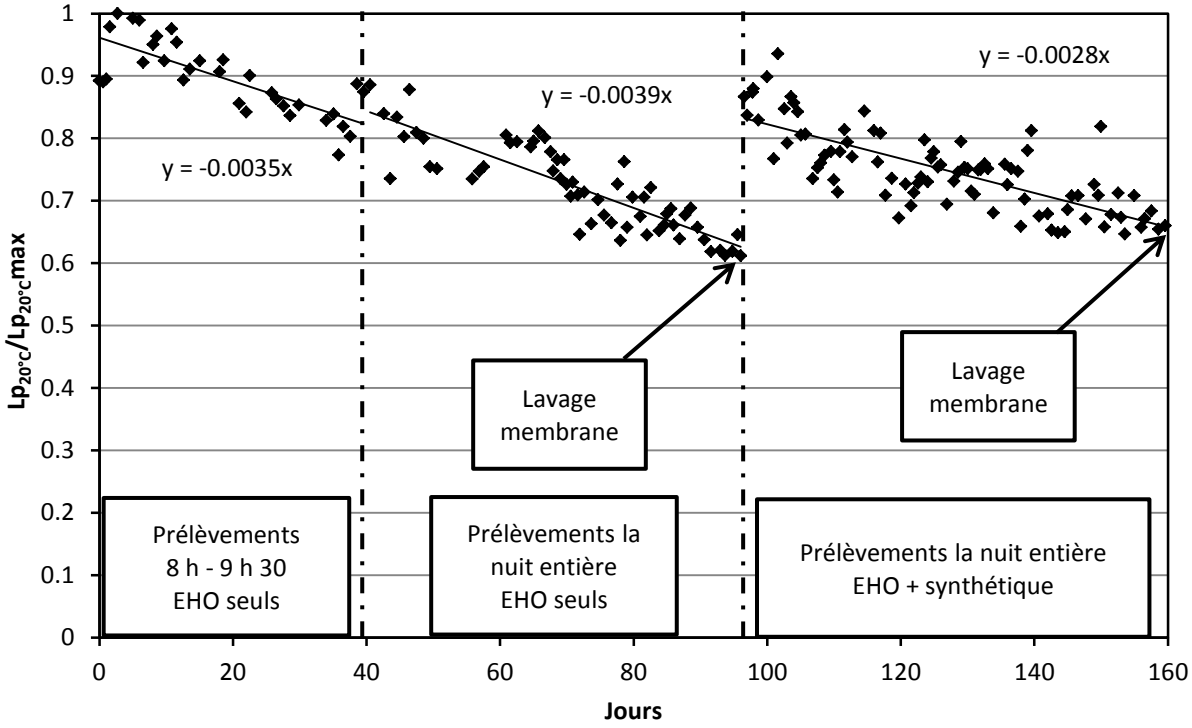


Figure III-9 : Evolution de la perméabilité membranaire normée lors de l'acclimatation aux EHO.

La 3^{e} phase, du 97^{e} au 160^{e} jour, correspondant à l'alimentation du BàM par les EHO et le substrat synthétique, est caractérisée par une perte de perméabilité linéaire au cours du temps moins prononcée que lors de la phase 2. La perte de perméabilité membranaire journalière a ainsi été réduite de 28 % lors de la dilution des EHO par un substrat synthétique. Cette réduction indique dans un premier temps que la liqueur mixte est devenue moins colmatante avec l'apport de substrat synthétique lors de la phase 3. Ainsi, **les EHO induiraient un colmatage plus prononcé de la membrane de manière directe par les différents constituants les composant (tensioactifs, MES inférieures au seuil de coupure de 0.5 mm de la grille de prétraitement…) et indirecte par leur effet toxique sur la biomasse.** Des produits microbiens solubles relargués en raison d'un éventuel stress biologique engendré par la grande variabilité de l'effluent à traiter peuvent en effet expliquer ce colmatage. Il convient cependant de préciser que cette différence de perte de perméabilité membranaire ne peut être complètement attribuée au changement de substrat alimentant le BàM$_{E}$ puisque l'état d'acclimatation plus avancé de la biomasse au cours du temps pourrait lui permettre de se spécifier aux polluants contenus dans les EHO et ainsi de limiter les conséquences des pics de toxicité.

Deux lavages de la membrane ont été effectués au cours de l'acclimatation : au 97^{e} jour coïncidant avec le changement d'alimentation et au 160^{e} jour à la fin de la campagne expérimentale. Les conditions des lavages chimiques sont décrites dans le chapitre II (II-3). La Figure III-10 présente la perméabilité mesurée après chaque phase de la procédure de lavage chimique. Il faut noter que la perméabilité initiale de la membrane neuve Lp_0, mesurée à 102 $L.h^{-1}.m^{2}.bar^{-1}$, est cohérente avec la valeur annoncée par le fabricant qui est de 110 $L.h^{-1}.m^{2}.bar^{-1}$.

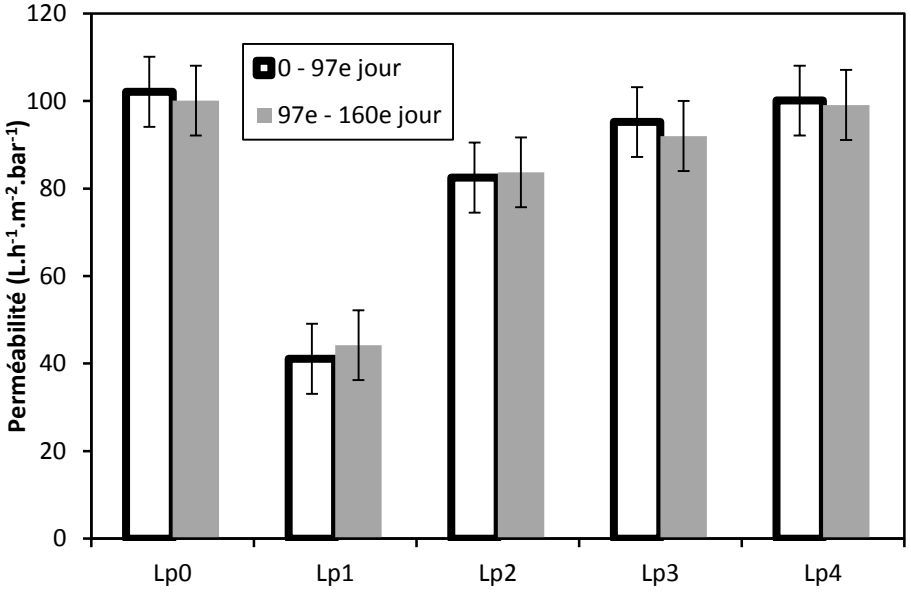


Figure III-10 : Evolution de la perméabilité à l'eau et à 20 °C des membranes en fonction des lavages chimiques.
[Lp0 : perméabilité initiale – Lp1 : perméabilité en fin de production – Lp2 : perméabilité après un lavage basique – Lp3 : perméabilité après un lavage acide – Lp4 : perméabilité après un lavage basique]

Dans un premier temps, un rinçage à l'eau distillée est réalisé pour déterminer la perméabilité Lp_1 de la fin de la phase de production. Ce rinçage permet de constater que la polarisation de concentration est de l'ordre de 8 % et peut donc être négligée au regard de l'incertitude élevée sur la mesure de la perméabilité et que le colmatage en fin de production a réduit de 60 % la perméabilité membranaire pour la première période et de 56 % pour la seconde. Un premier lavage basique permet de récupérer une proportion similaire de perméabilité Lp_2 pour les 2 périodes (68 et 65 %). Le lavage acide permet d'éliminer une proportion du colmatage restant plus important pour la première période puisque 21 % de perméabilité Lp_3 est récupérée contre 14 % pour la phase 97^{e} – 160^{e} jour. Enfin, le second lavage basique permet d'éliminer des proportions plus faibles de colmatage organique

puisque 8 et 12 % de perméabilité Lp_4 sont récupérées au cours de ce dernier lavage. Le colmatage est, comme attendu, majoritairement d'origine organique puisque la proprortion du colmatage « organique » dans le colmatage total représente 76 % pour la première période et 83 % pour la seconde période (Figure III-11). **La proportion de colmatage « minéral » relevée semble ainsi plus importante lorsque les EHO ont constitué le seul substrat et pourrait être due à certains produits tensioactifs (sels d'ammonium quaternaire).** Il convient cependant d'être prudent sur ces résultats en raison de l'incertitude sur la mesure de la perméabilité qui ne permet pas de conclure avec certitude sur la différence de colmatage minéral entre les 2 périodes. Enfin, le colmatage irréversible correspond à 3 % du colmatage total pour la première période et à 2 % du colmatage total pour la seconde et apparaît donc négligeable au regard de l'incertitude de mesure de la perméabilité (estimée à ± 8%).

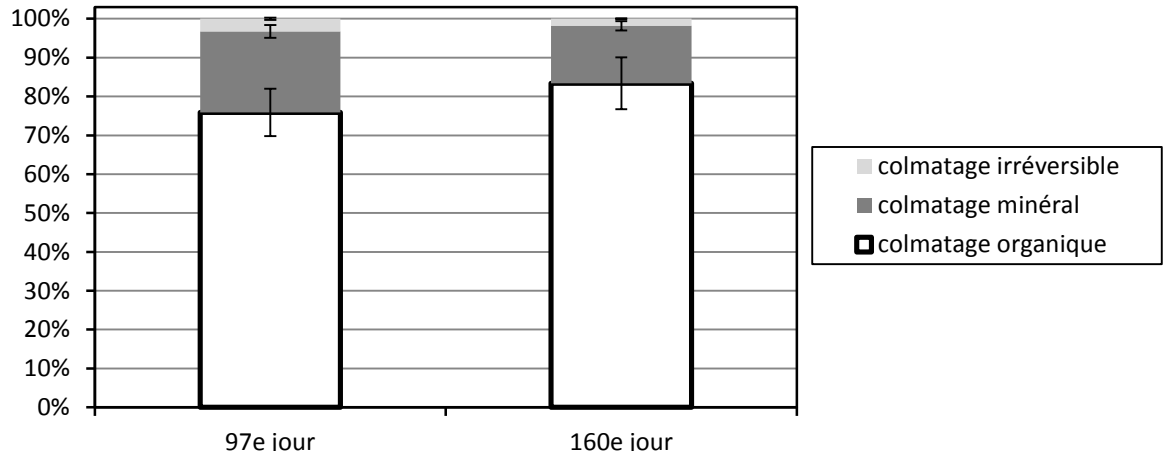


Figure III- 11 : Proportion du colmatage organique, minéral et irréversible en fin de phase de production pour les 2 phases de l'acclimatation.

A noter qu'en fin de filtration la résistance de la membrane compte pour environ 40 % de la résistance hydraulique totale à la filtration.

III.1.4. Quantification de l'acclimatation

La faible croissance de biomasse observée sur le long terme conjuguée aux incessantes fluctuations de son évolution montre la grande complexité de l'acclimatation aux EHO. L'une des hypothèses soulevées serait que cette inhibition partielle des capacités reproductrices de la biomasse pourrait être due aux nombreuses substances spécifiques contenues dans les EHO. A la fin de la campagne expérimentale, il a été décidé de quantifier le degré d'acclimatation aux EHO en comparant les performances de biodégradation de la biomasse du $BàM_E$ pilote traitant les EHO avec celle d'une STEP municipale en présence de cocktails médicamenteux.

Les objectifs de ces tests sont donc :

- d'évaluer l'influence de cocktails médicamenteux sur les performances des deux biomasses ;
- de déterminer si une classe de médicaments est plus néfaste qu'une autre sur les performances des deux biomasses.

Ce second objectif provient de la différence d'utilisation des anticancéreux et des antibiotiques dans le service d'oncologie. Alors que l'administration des anticancéreux est continue dans le service celle des antibiotiques est plus aléatoire. Il est ainsi supposé que l'acclimatation de la biomasse aux antibiotiques est rendue encore plus délicate par la présence de pics ponctuels de concentrations dans les EHO.

III.1.4.1. Conditions expérimentales

L'influence de différents cocktails médicamenteux sur les performances des deux biomasses a été évaluée par l'intermédiaire de cinétiques de dégradation de substrats facilement dégradables (DCO, NH_4^+) en réacteur batch. Les cocktails médicamenteux ont été réalisés à partir de flacons fournis par l'hôpital. La composition du cocktail d'anticancéreux a été établie depuis la concentration maximale retrouvée en 5-FU dans les EHO lors de la première campagne expérimentale, soit 1287 $\mu g.L^{-1}$ (voir partie III.5.1), du taux de métabolisation de chaque médicament et de la quantité consommée dans l'unité sur laquelle le BàM est raccordée (Eq. III-1). Les concentrations ainsi calculées sont présentées dans le Tableau III-2.

$$[médicament] = [5 - FU]_{max} \cdot \frac{n_{med}}{n_{5-FU}} \cdot \frac{1-\tau_{med}}{1-\tau_{5-FU}} \qquad \text{Eq. III-1}$$

avec :

$[5\text{-FU}]_{max}$: Concentration maximale en 5-FU détectée dans les EH lors de la première campagne expérimentale ($\mu g.L^{-1}$)

n_{med} : Quantité consommée du médicament dans l'unité par an ($mg.an^{-1}$)

$n_{5\text{-FU}}$: Quantité consommée en 5-FU dans l'unité par an ($mg.an^{-1}$)

$1\text{-}\tau_{med}$: Taux de médicament non métabolisé (-)

$1\text{-}\tau_{5\text{-FU}}$: Taux de 5-FU non métabolisé (-)

Tableau III-2 : Concentrations du cocktail d'anticancéreux réalisé

Anticancéreux	Concentration ($\mu g.l^{-1}$)
5-FU	1300
Carboplatine	600
Etoposide	600
Doxorubine	400
Cisplatine	400
Cytarabine	200
Methotrexate	150
Gemcitabine	150
Total	**3800**

A noter que certains médicaments anticancéreux très consommés dans l'unité, tels que le cyclophosphamide et l'ifosfamide, n'ont pu être ajoutés dans ce cocktail d'anticancéreux faute de disponibilité lors de ces multiples tests.

A ce stade du projet ne disposant pas de « concentration référence » d'un antibiotique dans les EHO, les concentrations du cocktail d'antibiotiques ont arbitrairement été fixées de manière à obtenir une concentration totale du même ordre grandeur que celle des anticancéreux. La concentration de chacun des 4 antibiotiques les plus consommés dans le service a ainsi été établie à 1 $mg.L^{-1}$ (Tableau III-3).

Tableau III-3 : Concentrations du cocktail d'antibiotiques

Antibiotique	Concentration ($\mu g.L^{-1}$)
Ticarcilline	1000
Amoxicilline	1000
Ciprofloxacine	1000
Ceftriaxone	1000
Total	**4000**

Il convient de préciser que ces cocktails ne représentent en aucun cas la moyenne ou le maximum des concentrations pouvant être détectées dans les EHO. Cela ne dénature toutefois pas l'objectif principal de ces tests qui est de comparer les différences des performances des deux biomasses en présence de cocktails médicamenteux identiques. Une comparaison fiable de l'impact des cocktails médicamenteux sur le comportement des 2 biomasses impose de réaliser les expériences sur une même journée afin de tester les différentes concentrations avec des boues provenant du même échantillon initial pour les 2 biomasses et d'utiliser les mêmes cocktails médicamenteux. La logistique complexe associée a imposé de faire un choix sur le nombre de cocktails à tester. Il a ainsi été décidé de sacrifier le test du cocktail d'antibiotiques seul pour tester l'effet du mélange des cocktails d'antibiotiques et d'anticancéreux.

Cinq concentrations initiales en DCO rapportées à la quantité de MES ont été testées pour chaque couple « type de biomasse – cocktail médicamenteux » : 0.1 – 0.2 – 0.5 – 1 – 3 $gDCO.gMES^{-1}$. La durée totale des tests est de 4 h. Cependant, la durée retenue pour le calcul de la vitesse maximale de dégradation est variable selon les concentrations initiales et correspond à la phase de vitesse de dégradation linéaire de la DCO.

III.1.4.2. Acquisition d'une résistance aux médicaments par le traitement à la source des EHO ?

Les vitesses spécifiques de dégradation de la DCO ont été calculées pour chaque configuration « type de biomasse – cocktail médicamenteux » et représentées en fonction de la concentration en DCO rapportée à la quantité de MES (Figure III-12).

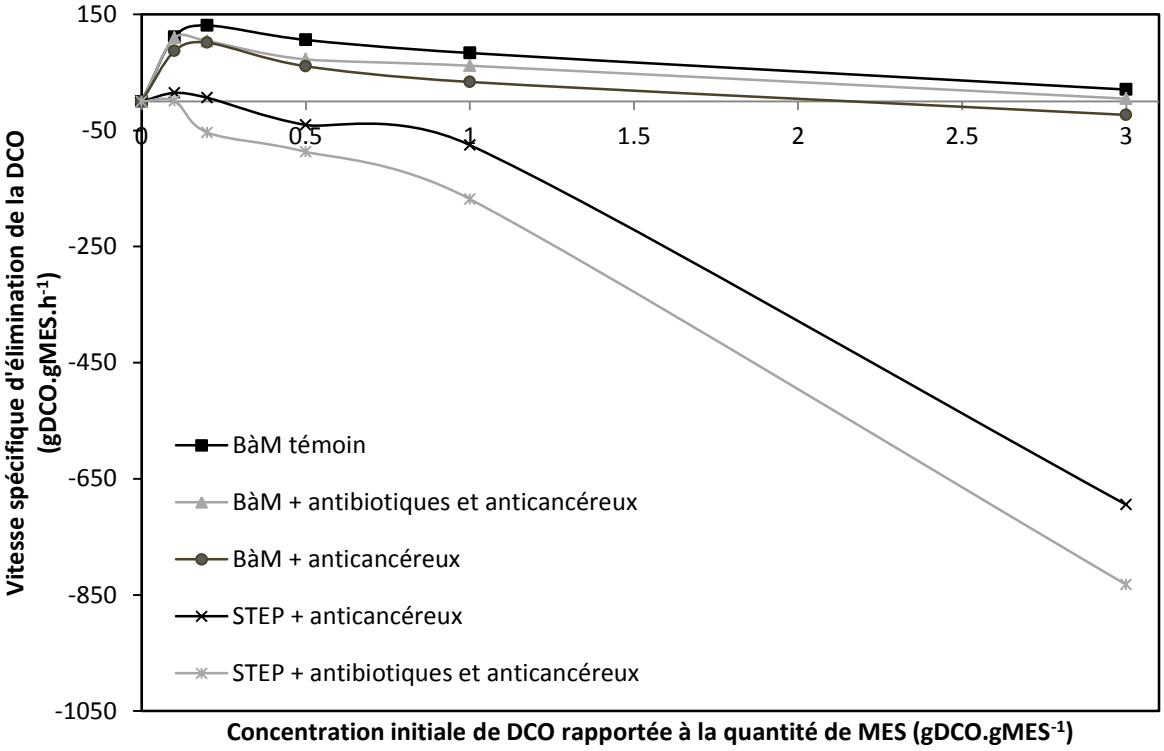


Figure III-12. Vitesse spécifique de dégradation de la DCO en fonction de la concentration initiale de DCO en présence de médicaments pour les boues du BàM$_E$ hôpital et des boues de STEP.

Sur la figure III-12, les vitesses positives et négatives montrent respectivement une dégradation de la DCO et un effet inhibiteur des médicaments**. Les boues non acclimatées de la STEP se révèlent totalement impactées par la présence des cocktails médicamenteux.** En effet, la vitesse de dégradation de la DCO est nulle aux faibles concentrations et devient même négative pour les fortes charges. Une vitesse de dégradation négative signifie que la présence de médicaments a provoqué une lyse cellulaire. A l'inverse, des vitesses positives de dégradation de la DCO sont relevées pour les boues du BàM$_E$ hopital. **Les boues du BàM$_E$ conservent donc une capacité épuratoire en présence de médicaments.** Cependant, les vitesses de dégradation de la DCO sont plus faibles que celles du témoin sans médicaments indiquant que **les cocktails médicamenteux exercent toujours une inhibition partielle sur les performances des boues du BàM$_E$** ce qui n'est pas abérent au regard des fortes cncentrations utilisées dans le cocktail.

La vitesse de dégradation optimale se situe aux alentours de 0.2 gDCO.gMES^{-1} pour les boues du BàM$_E$ hôpital. Une inhibition de la dégradation de la DCO par les substances médicamenteuses est observable dès 0.1 gDCO.gMES^{-1} pour les boues en présence du seul cocktail d'anticancéreux et de 0.2 gDCO.gMES^{-1} pour le cocktail d'anticancéreux en présence d'antibiotiques. L'inhibition apparaît ainsi plus marquée pour le cocktail d'anticancéreux seul

que pour le mélange des cocktails d'anticancéreux et d'antibiotiques. Ce constat surprenant pourrait être dû (i) à des interactions entre les médicaments anticancéreux et antibiotiques ayant provoqué une baisse de la toxicité médicamenteuse totale ou (ii) à aucune toxicité du cocktail d'antibiotiques sur les boues du BàME hôpital, les différences observées dans les vitesses spécifiques d'élimination de la DCO étant uniquement dues aux incertitudes expérimentales. Un comportement opposé est observé pour les boues de la STEP municipale. Le cocktail d'anticancéreux en présence d'antibiotiques a causé une lyse cellulaire plus prononcée que le seul cocktail d'anticancéreux indiquant que les antibiotiques exercent un effet bactéricide sur les boues activées non acclimatées. Ainsi, **la biomasse du BàM$_E$ hôpital a acquis une résistance aux antibiotiques testés et a peut-être été en mesure de les métaboliser partiellement.**

Ces résultats montrent clairement que l'acclimatation de la biomasse du BàM$_E$ aux EHO a permis de développer d'importantes capacités de résistance aux médicaments anticancéreux et antibiotiques puisque les boues ne sont que légèrement affectées par leur présence à faible charge.

III.1.5. Performances du BàM$_E$ sur l'élimination du 5-FU

III.1.5.1. Détection du 5-FU dans les EHO

Hormis au 150^e jour, **le 5-FU a systématiquement été détecté dans les EHO** pour les échantillons analysés (Figure III-13).

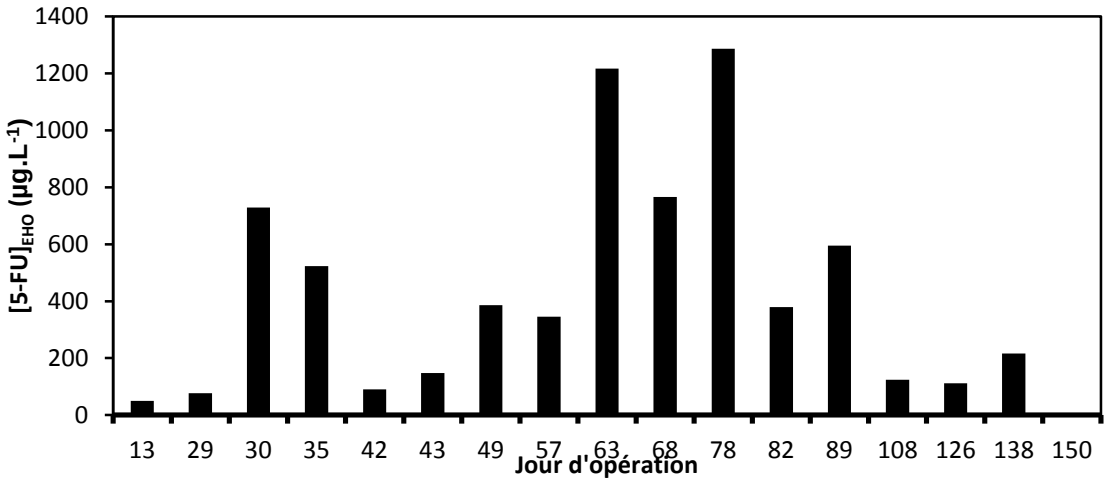


Figure III-13. Concentrations en 5-FU relevées dans les EHO.

Les concentrations relevées varient de 0 à 1287 $\mu g.L^{-1}$. **Ces concentrations sont très importantes comparées à celles observées dans de précédentes études.** Mahnik et al. (2007) ont détecté le 5-FU à des concentrations variant entre 11.5 et 122 $\mu g.L^{-1}$ dans des effluents représentant 75% du service d'oncologie d'un hôpital. Kosjek et al. (2013) ont eux détecté le 5-FU entre 35 et 92 $ng.L^{-1}$ dans le bassin de neutralisation d'un service d'oncologie.

III.1.5.2. Elimination du 5-FU par le $BàM_E$

Les échantillons de perméat analysés indiquent une bonne élimination du 5-FU par le $BàM_E$ puisque les **abattements sont supérieurs à 90 %** à l'exception du jour 83 (Figure III-14). A noter que la concentration du 5-FU dans le surnageant a toujours été similaire à la concentration dans le perméat, écartant l'hypothèse d'une rétention de ce médicament par la membrane dans la cuve biologique ou sur la membrane.

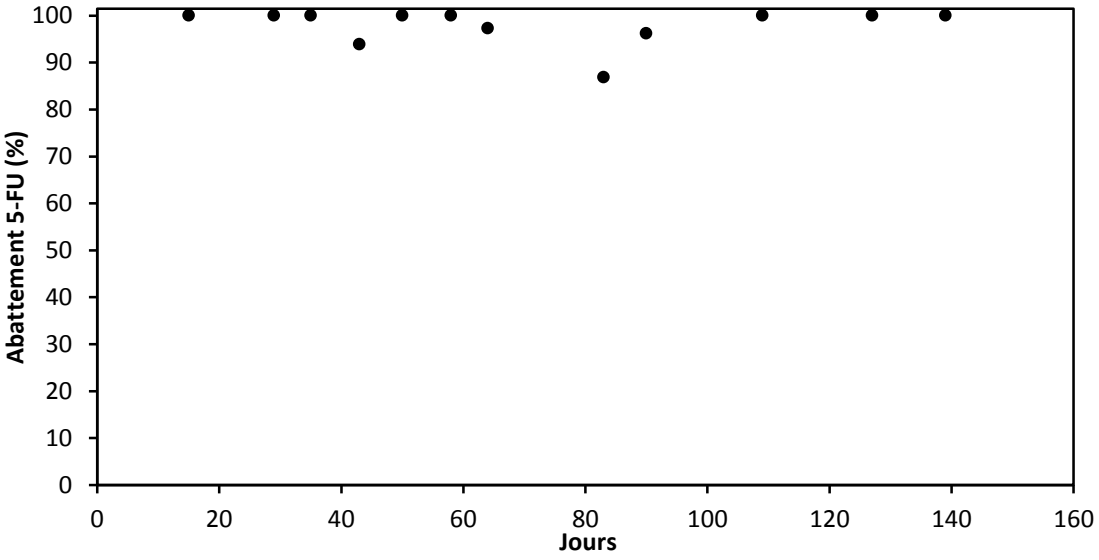


Figure III-14. Evolution de l'abattement du 5-FU au cours de l'acclimatation aux EHO.

Il convient de préciser que les points représentant une élimination de 100 % du 5-FU correspondent aux échantillons de perméat pour lesquels le 5-FU n'a pu être détecté signifiant que la concentration de 5-FU dans le perméat est inférieure à 5 $\mu g.L^{-1}$ (Limite de Quantification : LQ). Ce médicament s'avère très bien éliminé dès le début de la campagne expérimentale puisque le 5-FU n'est pas détectable dans le perméat dès le 15^e jour. Ainsi,

l'influence de l'acclimatation de la biomasse aux EHO sur l'élimination du 5-FU apparaît dans un premier temps négligeable.

L'abattement du 5-FU de 86.8 % au 83^{e} jour coïncide avec la chute globale des performances épuratoires du système à cette date. La forte baisse de la concentration en DCO dans les EHO a entraîné une chute importante de la Cm. Le TSH a été immédiatement diminué de 22 h à 17 h pour partiellement palier cette baisse de Cm. Ainsi, une chute brutale de la Cm conjuguée à un TSH plus faible ont provoqué une diminution de l'abattement du 5-FU. Il est remarquable que la baisse de l'abattement de la DCO dans le surnageant de 81 à 45 % entre le 43^{e} et le 58^{e} jour n'ait pas été suivi par une chute des performances sur l'élimination du 5-FU puisque l'abattement en 5-FU est maximal à ces dates, probablement en raison de la facile métabolisation de ce médicament.

Quelle que soit la concentration initiale en 5-FU celui-ci est très bien éliminé par le BàM$_E$ (Figure III-15). Hormis au jour 83 où l'abattement du 5-FU « chute » à 86.8 %, l'élimination du 5-FU ne semble pas subir les conséquences des nombreuses fluctuations observées des performances épuratoires du BàM$_E$.

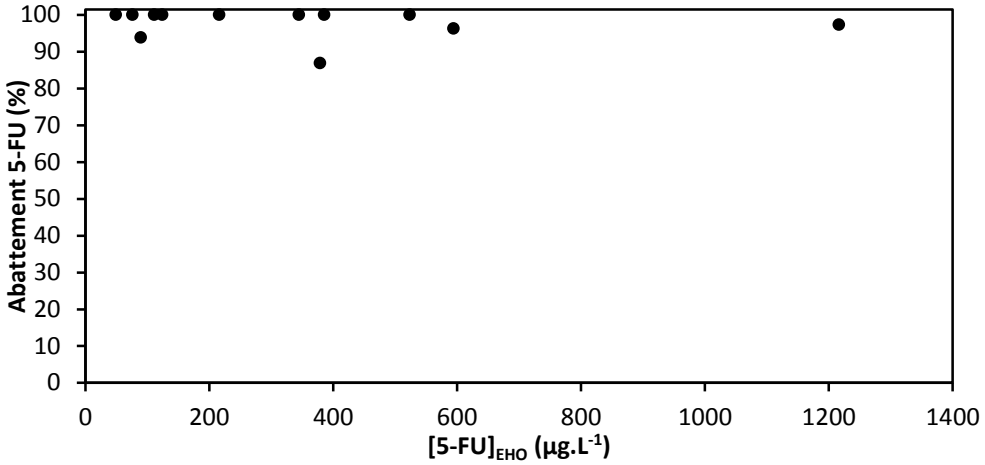


Figure III-15. Evolution de l'abattement du 5-FU en fonction de sa concentration relevée dans les EHO.

Malgré la très forte concentration supérieure à 1 mg.L^{-1} dans les EHO, l'élimination du 5-FU reste supérieure à 95 %. La vitesse d'élimination spécifique de dégradation apparaît relativement proportionnelle à la concentration initiale en 5-FU (pseudo-premier ordre) (Figure III-16). Il convient de noter que la vitesse plus élevée obtenue pour les concentrations en 5-FU dans le perméat supérieures à la LQ correspondent à des TSH moyens plus faibles (20.4 h contre 24.4 h) ainsi qu'à une concentration moyenne en MES

plus faible (3.2 $g.L^{-1}$ contre 3.8 $g.L^{-1}$). Ainsi, un TSH de 24 h conjugué à une concentration en MES d'environ 4 $g.L^{-1}$ semblent appropriés pour éliminer le 5-FU au-delà de la LQ.

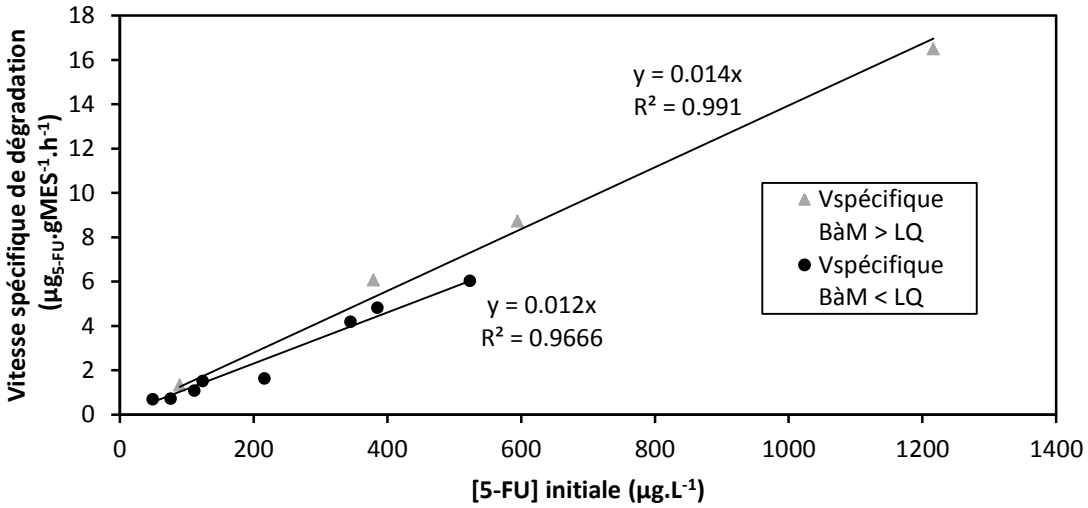


Figure III-16. Vitesse spécifique de dégradation du 5-FU dans le $BàM_E$ hôpital.

L'élimination du 5-FU a été évaluée lors d'une étude similaire portant sur le traitement des EHO d'un hôpital Autrichien par $BàM_E$ (Mahnik et al., 2007). Les conditions expérimentales de cette étude sont répertoriées dans le Tableau III-4.

Tableau III-4 : Comparatif des conditions opératoires avec l'étude de Mahnik et al. (2007)

	Effluents	$[5\text{-FU}]_{EHO}$ ($\mu g.L^{-1}$)	LQ ($\mu g.L^{-1}$)	Procédé	Membrane	TSH (h)	MES ($g.L^{-1}$)	Abattement (%)
Présente étude	EHO discontinu	[< LQ – 1287]	5	$BàM_E$	UF 150 kDa	[16 – 32]	[2.0 - 5.1]	86.8 à 100
Mahnik et al. (2007)	EHO continu	[< LQ -124]	8.6	$BàM_E$	UF 100 kDa	[20 – 24]	[11.8 - 15.2]	100

Mahnik et al. (2007) ont également observé une élimination totale du 5-FU par leur BàM puisque le 5-FU n'était plus quantifiable en sortie. Par l'intermédiaire de tests de dégradation en batch avec des composés radiomarqués ils ont pu remarquer une totale élimination du 5-FU de la phase liquide et une sorption négligeable sur les boues activées, de l'ordre de 2 à 5 %. **Ainsi, le 5-FU est quasi-intégralement éliminé par biotransformation.** Les résultats de Mahnik et al. (2007) sur l'élimination du 5-FU s'avèrent similaires à ceux de cette étude.

La biotransformabilité du 5-FU à faibles et fortes concentrations avait déjà été démontrée par certains auteurs (Kiffmeyer et al., 1998 ; Yu et al., 2006) au cours de tests dont la méthodologie est toutefois critiquable. Les tests à fortes concentrations ne reflètent en effet pas la situation réelle puisqu'un effet inhibiteur peut se produire, faussant ainsi les résultats, et les méthodes analytiques employées sont parfois inappropriées (mesure de la DCO ou du CO_2 formé). Ainsi, Kümmerer (1997) avait observé des résultats contradictoires en n'observant aucune biotransformation du 5-FU pour de très fortes concentrations de 5-FU (9 et 850 $mg.L^{-1}$).

III.1.5.3. Comparaison BàM$_E$ hôpital / STEP conventionnelle sur l'élimination du 5-FU

Des cinétiques de dégradation du 5-FU ont été réalisées sur des boues provenant de la STEP municipale de Rousset et sur les boues du BàM$_E$ hôpital pour 5 concentrations initiales : 50 – 100 – 200 – 500 – 1000 $\mu g.L^{-1}$. Les cinétiques ont été réalisées sur 21h afin de correspondre au TSH du BàM$_E$. Les boues provenant de la STEP municipale sont ajustées à la concentration des boues du BàM$_E$ à la date des manipulations, soit au 69^e jour de l'acclimatation : 4.1 $g.L^{-1}$. Quelle que soit la concentration, **l'abattement du 5-FU est toujours légèrement supérieur pour les boues acclimatées à l'hôpital que pour les boues prélevées en STEP municipale.** Dans cet intervalle de concentration, les boues activées de STEP municipale semblent également très efficaces sur l'élimination du 5-FU puisque l'abattement minimal est toujours supérieur à 80 %. Les abattements du 5-FU par les 2 types de boues ainsi que les vitesses spécifiques de dégradation associées sont présentées en Figure III-17 et III-18.

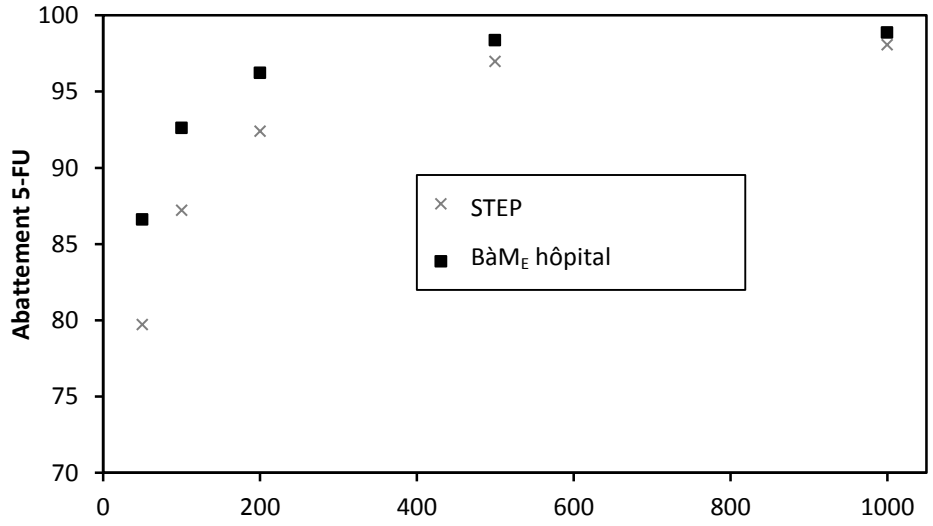


Figure III-17. Abattements du 5-FU en réacteur batch pour les boues de STEP et les boues du BàM$_E$ hôpital.

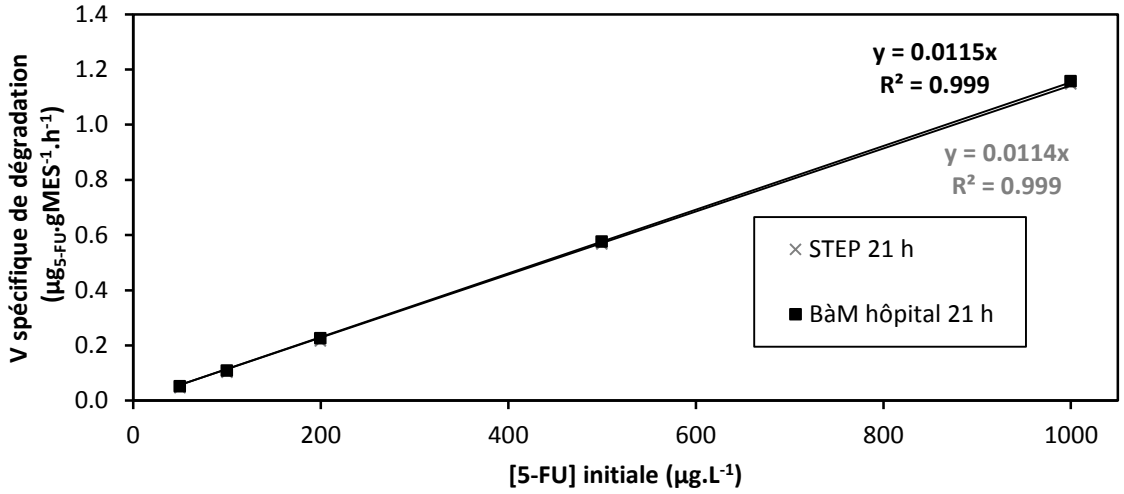


Figure III-18. Vitesses spécifiques de dégradation du 5-FU dans les réacteurs batch pour les boues de STEP et les boues du $BàM_E$ hôpital.

De même que pour les boues du $BàM_E$ hôpital, plus la concentration initiale est élevée plus l'abattement est important, indiquant que la gamme de concentrations testées (50 – 1000 $\mu g.L^{-1}$) est inférieure à un éventuel seuil d'inhibition ; la cinétique reste du pseudo-premier ordre. L'acclimatation de la biomasse du $BàM_E$ placé à l'hôpital aux EHO a permis à la biomasse du $BàM_E$ d'être légèrement plus efficace aux faibles concentrations initiales (50 – 200 $\mu g.L^{-1}$). Cette amélioration est infime car le 5-FU s'avère être une molécule très facilement éliminable. Les vitesses spécifiques d'élimination du 5-FU sont ainsi quasi-identiques : 0.0115 $g_{MES}^{-1}.h^{-1}$ pour les boues du $BàM_E$ hôpital et 0.0114 $g_{MES}^{-1}.h^{-1}$ pour les boues de la STEP municipale.

Les vitesses spécifiques d'élimination sont similaires pour les boues de la STEP et les boues du $BàM_E$ en batch et en continu. Il est difficile de différencier les bénéfices du traitement à la source par l'étude de cette molécule puisqu'au vu des performances de la STEP, le 5-FU peut être classé dans les molécules facilement éliminables pour lesquelles le procédé BàM n'apportera pas d'améliorations substantielles par rapport à une STEP conventionnelle (Sipma et al., 2010). Il est toutefois très important de noter que **malgré les nombreux médicaments, métabolites et produits d'entretien présents dans les EHO, la biomasse du $BàM_E$ hôpital s'est avérée être au moins aussi performante que les boues de STEP qui elles ont dégradé le 5-FU seul.** Enfin, la présence d'un substrat extérieur pour favoriser

l'élimination par cométabolisme ne semble pas nécessaire pour l'élimination du 5-FU qui est très bien éliminé en conditions endogènes comme le montrent les réacteurs batch.

L'étude cinétique permet toutefois de dégager quelques différences de comportements pour les 2 types de boues. Les constantes cinétiques de dégradation k_{biol} ont été calculées entre t = 15 min et t = 90 min puisque, sur cet intervalle, le terme $\ln(C/C_0)$ est linéaire indiquant que la cinétique de dégradation est bien de pseudo-premier ordre lors des 90 premières minutes (Figure III-19).

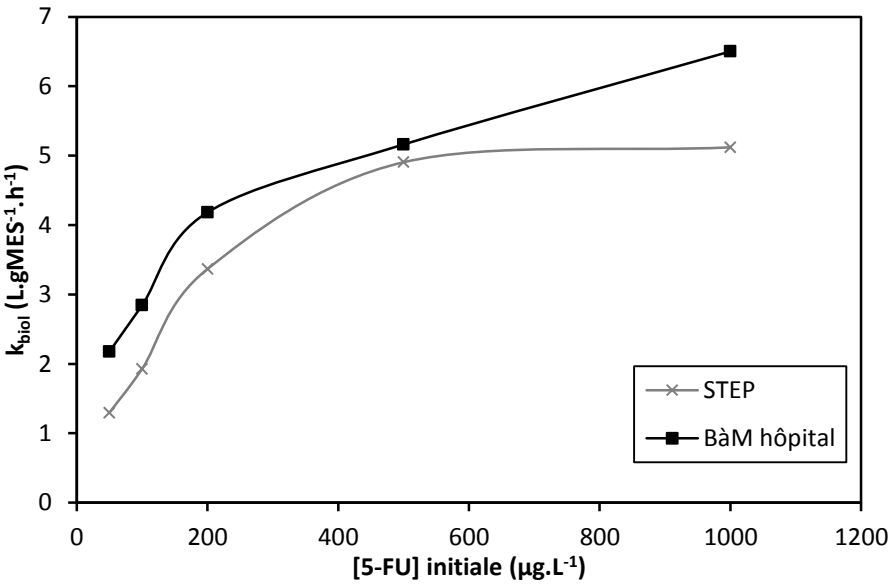


Figure III-19. Evolution de la constante de dégradation k_{biol} pour les boues du BàM à la source et de la STEP municipale.

L'évolution de la constante de dégradation k_{biol} montre que **l'acclimatation à la source permet de dégrader plus rapidement le 5-FU. Une augmentation moyenne de 34 % est ainsi atteinte pour les boues du BàM$_E$ à la source par rapport aux boues de la STEP.** L'évolution des constantes k_{biol} montre qu'un seuil est atteint pour les boues de la STEP tandis qu'elle semble encore évoluer après 1000 µg.L^{-1} pour les boues du BàM$_E$ à la source. Ainsi, il semble que **la concentration minimale d'inhibition soit plus faible pour les boues de la STEP que pour celles du BàM$_E$ hôpital.**

III.1.6. Conclusion

Cette première campagne expérimentale d'acclimatation d'une biomasse de bioréacteur à membranes externes ($BàM_E$) aux effluents d'un service d'oncologie (EHO) s'est déroulée sur 160 jours. **Les EHO sont caractérisés par de nombreuses fluctuations de DCO et d'ammonium, induisant un rapport C/N très instable.** Le changement de la méthode de prélèvement au 40^e jour a permis d'éviter la majorité des eaux de douche en collectant les EHO durant la nuit. Si ce changement a permis l'obtention d'effluents suffisamment chargés, les fluctuations de composition sont encore nombreuses comme le montrent les pics de DCO enregistrés entre le 63^e et le 78^e jour et le rapport C/N compris entre 10 et 53 entre le 40^e et le 97^e jour. Ces changements de composition peuvent être directement imputés au nombre réduit de chambres sur lesquelles l'installation est raccordée.

L'évolution des matières en suspension (MES) a connu de nombreuses fluctuations, probablement liées aux fluctuations de composition des EHO. Mais, **une faible croissance de biomasse a été observée lors des 120 derniers jours d'expérimentation**, de 2.0 à 4.6 g.L^{-1}. Les phases de croissance significatives amorcées aux jours 112, 132 et 152 montreraient que la biomasse est prête à croître dès que les conditions, et par conséquent les EHO, le permettent. Bien que l'alimentation du $BàM_E$ par moitié de substrat synthétique n'ait pas permis d'obtenir comme attendu une croissance plus forte de la biomasse, le régime permanent semble avoir été atteint sur l'élimination de la DCO dans le surnageant ainsi que de l'ammonium confirmant que la biomasse est bien dans un état avancé d'acclimatation aux EHO. Aussi, **la biomasse développée a montré une forte résistance aux cocktails médicamenteux d'anticancéreux et d'antibiotiques** puisque ses performances épuratoires n'ont été que très partiellement impactées. A l'inverse, **la présence de ces médicaments a engendré une lyse cellulaire prononcée sur les boues non acclimatées de la STEP municipale**.

Les agents tensioactifs très utilisés dans les hôpitaux en raison des normes strictes d'hygiènes perturbent les boues activées en provoquant un important moussage dans la cuve aérée. Ces produits sont également suspectés **d'empêcher la réaction de dénitrification** dans la cuve anoxie par sorption et/ou polarisation de concentration sur les flocs bactériens. Le colmatage « minéral » plus prononcé lors de la phase d'alimentation

avec les EHO seul pourrait témoigner de la présence importante de ces agents tensioactifs dans les EHO.

Le 5-FU, second médicament anticancéreux le plus consommé dans l'unité, a quasi systématiquement été détecté dans les EHO **à de très fortes concentrations, parfois supérieures à 1 mg.L^{-1}**, ce qui n'avait encore jamais été observé dans la littérature et qui justifie pleinement le positionnement de notre procédé. La grande variabilité de concentrations en 5-FU confirme le caractère versatile des EHO. La variabilité importante de la composition médicamenteuse peut également expliquer les difficultés rencontrées par la biomasse à croître. Le 5-FU est très bien éliminé par le BàM$_E$ et par les boues de STEP municipales **mais l'acclimatation aux EHO a permis une augmentation de 34 % de la constante cinétique de dégradation.** Il est important de préciser que si l'élimination du 5-FU par les boues du BàM$_E$ hôpital apparaît identique à celle des boues de STEP celle-ci a été obtenue en présence des autres composés contenus dans les EHO (médicaments, tensioactifs) ce qui rend les résultats remarquables.

Ainsi, malgré des conditions d'acclimatation « rustiques » puisque les boues activées proviennent d'une STEP municipale sans sélection de souches les résultats de la première campagne expérimentale, obtenus sur un effluent très chargé et sujet à de fortes variations, sont très encourageants. La seconde campagne expérimentale est réalisée avec la configuration BàM$_{IE}$ afin d'évaluer l'influence de conditions hydrodynamiques plus douces sur l'acclimatation de la biomasse aux EHO. L'acclimatation sera effectuée sans apport de substrat synthétique puisque la dilution des EHO n'a pas permis d'obtenir une croissance bactérienne plus importante. La caractérisation des activités biologiques des bactéries hétérotrophes et autotrophes sera réalisée afin de mieux comprendre les nombreuses fluctuations de la respiration observées lors de cette première campagne expérimentale. Aussi, l'antibiorésistance de la biomasse sera suivie par la réalisation d'antibiogrammes sur les 6 antibiotiques les plus consommés dans le service. Enfin, les performances du BàM$_{IE}$ sur les anticancéreux cyclophosphamide et ifosfamide, l'antibiotique sulfaméthoxazole et l'antidouleur codéine seront comparées à celles d'une STEP municipale.

III.2. Acclimatation d'une biomasse de BàM$_{IE}$ aux effluents d'un service d'oncologie. Cas de l'ifosfamide, du cyclophosphamide, du sulfaméthoxazole et de la codéine.

Cette seconde campagne expérimentale d'acclimatation de boues activées aux EHO a été conduite avec la configuration bioréacteur à membranes immergées externes (BàM$_{IE}$). Dans cette configuration, les membranes utilisées sont des fibres creuses de seuil de coupure 100 kDa. A noter que la surface membranaire a été doublée de 0.2 à 0.4 m² à partir du 56^{e} jour. De nouveaux indicateurs de l'acclimatation de la biomasse aux EHO ont été testés lors de cette seconde campagne tels que l'antibiorésistance et les tests respirométriques. Surtout, les performances épuratoires sur la pollution médicamenteuse sont évaluées sur 4 médicaments dont 2 des 3 anticancéreux les plus consommés dans le service (ifosfamide et cyclophosphamide), un antibiotique (sulfaméthoxazole) et un antidouleur (codéine).

III.2.1. Conditions de l'acclimatation

Les EHO ont été prélevés en continu au cours de la nuit conformément à la méthode de prélèvement mise en place à partir du 40^{e} jour de la première campagne expérimentale. L'évolution de la pollution carbonée (DCO) et azotée (N-NH_4^+) montre à nouveau de nombreuses fluctuations des concentrations en DCO et ammonium au cours des 180 jours d'acclimatation (Figure III-20).

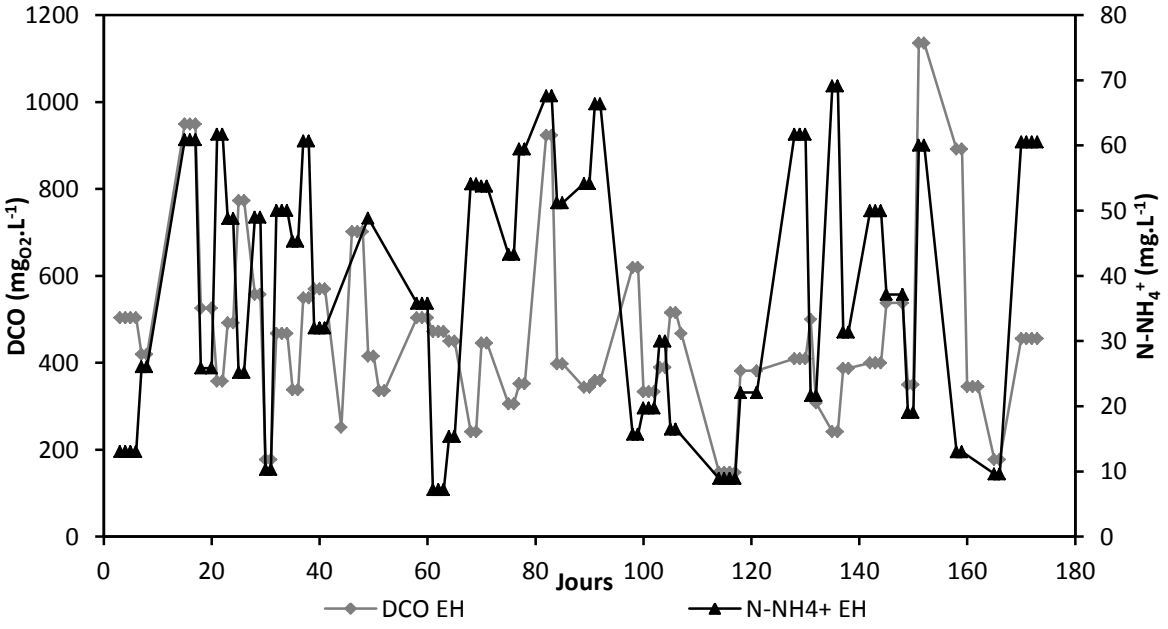


Figure III-20 : Evolutions temporelles de la DCO et de l'ammonium lors de la seconde campagne.

Cette disparité de concentrations implique logiquement une évolution en dents de scie du rapport C/N (DCO/N-NH_4^+) des EHO (Figure III-21).

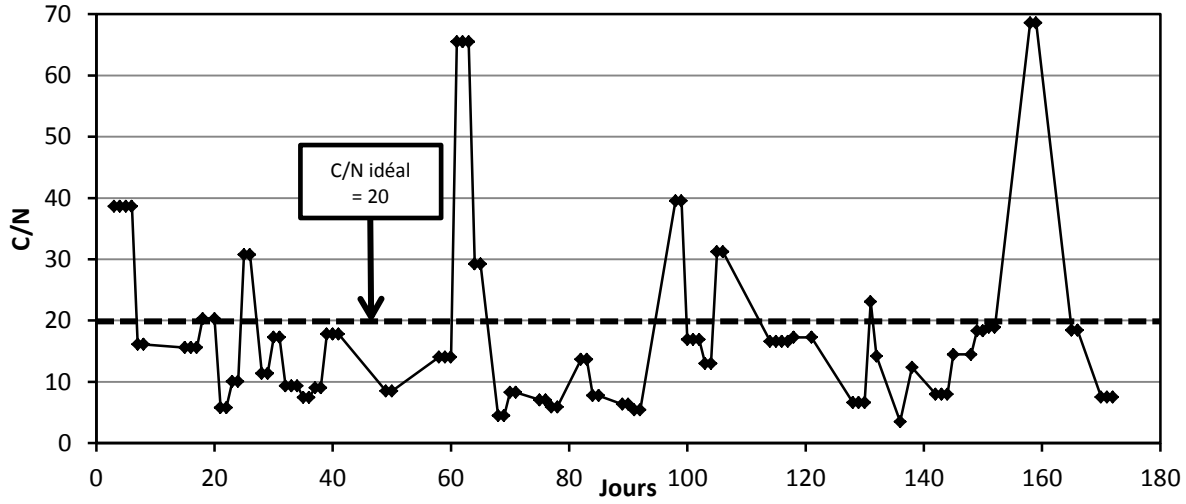


Figure III-21 : Evolution temporelle du rapport C/N des EHO lors de la seconde campagne.

La majorité des EHO prélevés a un rapport C/N compris entre 5 et 30. **Le rapport C/N moyen de 17.9** est ainsi bien plus faible que lors de la première campagne (32.3), indiquant une proportion d'azote plus importante vis-à-vis du carbone, **mais se situe plus proche du rapport idéal souhaité de 20** (Tableau III-5). Cependant, certaines valeurs du rapport C/N apparaissent très faibles avec un premier quartile autour de 8. Deux pics notables sont enregistrés aux 61^{e} et 158^{e} jours correspondant à des concentrations très faibles d'ammonium dans les EHO.

Tableau III-5 : Comparaison des teneurs en DCO et N-NH_4^+ dans les EHO lors des 2 campagnes.

	1^{ere} campagne (avec ajout d'effluent synthétique)			2nde campagne		
	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy
DCO (mg.L^{-1})	146	1862	646 ± 395	148	1136	464 ± 201
N-NH_4^+ (mg.L^{-1})	5	53	26 ± 11	7	69	36 ± 20
C/N	10.4	113.2	32.3 ± 23.4	3.5	68.6	17.9 ± 14.6

III.2.2. Performances globales du BàM$_{IE}$

L'ensemencement du BàM$_{IE}$ hôpital a de nouveau été effectué avec des boues activées provenant de la STEP municipale de Rousset également équipée d'un procédé BàM$_{IE}$. La concentration initiale en MES est de 6.8 g.L^{-1}. L'évolution des MES et de la Cm en DCO a été scindée en 4 phases distinctives afin de faciliter la description (Figure III-22). Les performances épuratoires sur la DCO, l'ammonium et les nitrates sont également présentées au fur et à mesure de la description de ces 4 phases (Figures III-23, III-24 et III-25). **Cette seconde campagne expérimentale a de nouveau été marquée par un moussage intense quasi-permanent de la liqueur mixte dans la cuve aérée, reflétant le stress bactérien exercé par les EHO et / ou la présence importante de produits tensioactifs.**

Lors de la première campagne expérimentale, l'une des hypothèses émises pour expliquer la faible croissance de la biomasse sur le long terme concernait les nombreux composés spécifiques des EHO qui exerceraient une inhibition sur les capacités reproductrices des microorganismes. Il a donc été décidé **d'appliquer des conditions de substrat limitant à la biomasse afin d'habituer les microorganismes à la présence des substances spécifiques contenues dans les EHO et de forcer leur dégradation.** Cette stratégie de substrat limitant explique la faible valeur moyenne de la Cm en DCO à 0.09 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} lors des 50 premiers jours. La concentration moyenne plus faible de 28 % en DCO des EHO lors de la 2nde campagne par rapport à la première a eu pour conséquence l'application de Cm occasionnelles parfois très faibles. Suite aux problèmes rencontrés sur les performances de la biomasse et décrits dans cette sous-partie, la suite de l'acclimatation a été conduite avec un carter membranaire de surface double (0.2 à 0.4 m²) à partir du 56^{e} jour dans le but d'appliquer une Cm plus élevée. Conformément à la première campagne expérimentale, le taux de MVS dans les MES est demeuré relativement constant au cours de l'acclimatation à 88 ± 3 %.

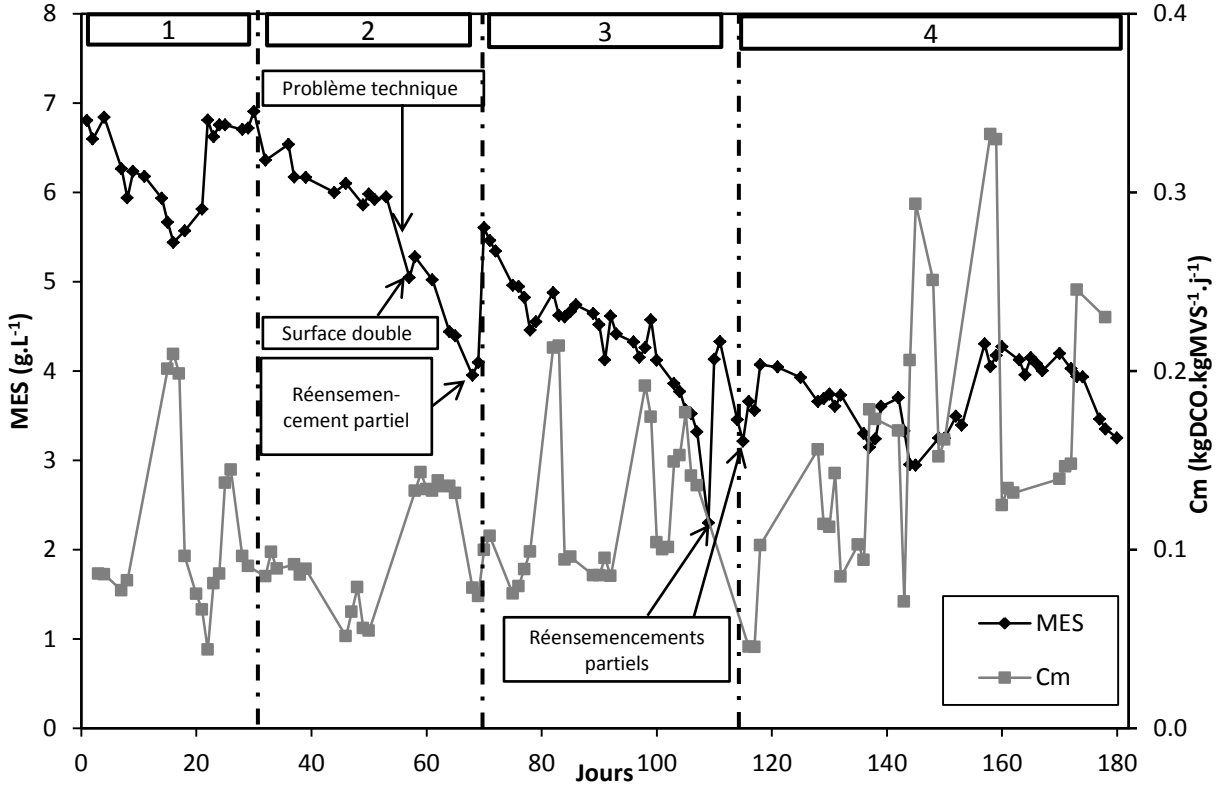


Figure III-22 : Evolutions temporelles des MES et de la Cm en DCO au cours de la seconde campagne.

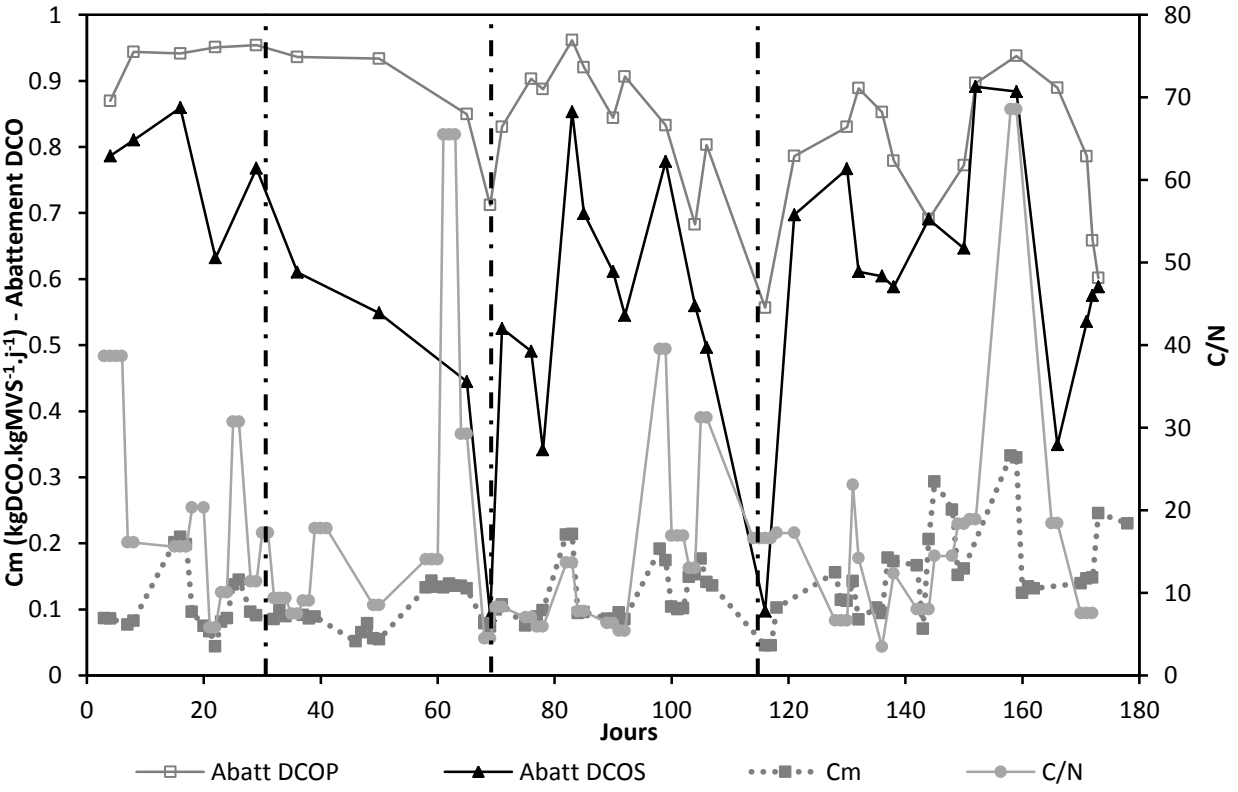


Figure III-23 : Evolutions temporelles de l'abattement de la DCO dans le surnageant et le perméat, de la Cm et du rapport C/N.

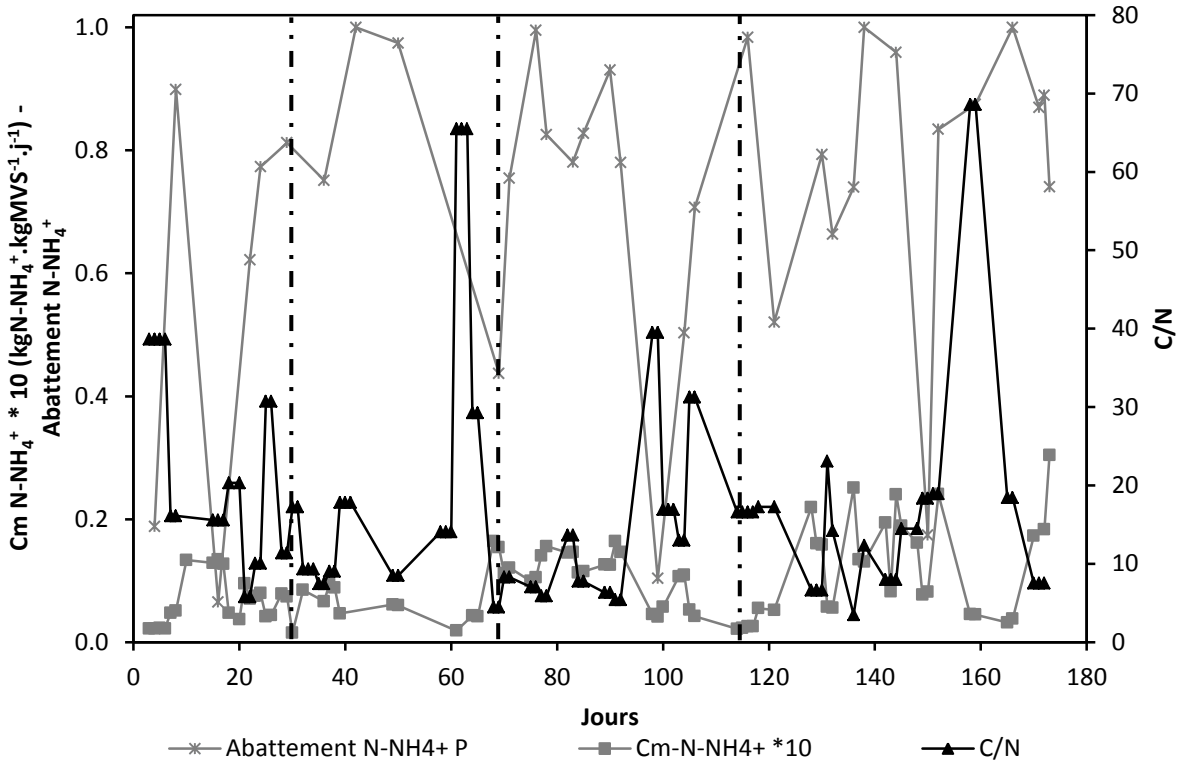


Figure III-24- : Evolutions temporelles de l'abattement de l'ammonium dans le perméat, de la Cm en ammonium et du rapport C/N.

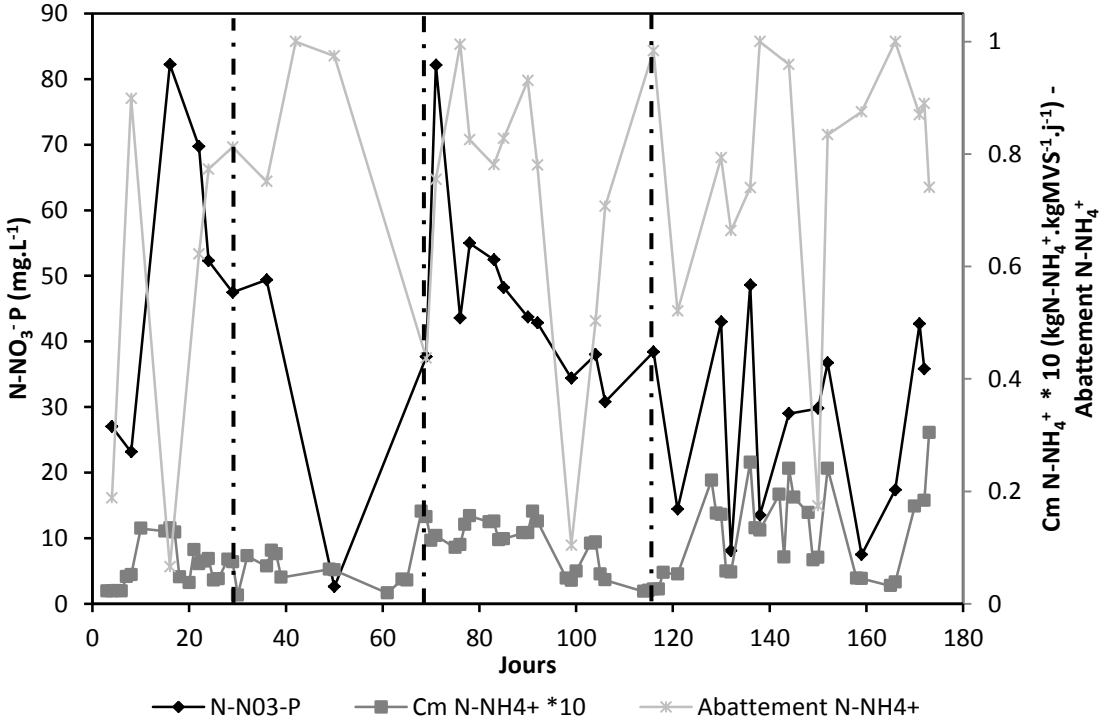


Figure III-25 : Evolutions temporelles de la concentration en nitrates dans le perméat, de l'abattement de l'ammonium et de la charge massique en ammonium.

Phase 1 : 0 – 30^{e} jour

Contrairement à la 1ère campagne expérimentale la concentration de la biomasse est demeurée relativement stable au cours des premiers jours. Les conditions hydrodynamiques de la configuration BàM$_{IE}$ sont en effet beaucoup plus douces que celles de la configuration externe (BàM$_{E}$) puisqu'il n'est pas nécessaire d'imposer une forte vitesse tangentielle au sein de la membrane, le colmatage étant contrôlé par l'injection de bulles d'air dans le carter membranaire. Des évolutions contradictoires sont relevées pour la biomasse et l'élimination de la DCOS lors de cette première phase. La légère perte de MES observée jusqu'au 16^{e} jour à 5.4 g.L^{-1} coïncide en effet avec une élimination correcte de la DCOS alors que la phase de croissance, permettant de revenir à la concentration initiale de 6.8 g.L^{-1} au 22^{e} jour, est liée avec la diminution brutale de l'abattement de la DCOS entre le 16^{e} et le 22^{e} jour. Cette chute semble due à une Cm très faible à 0.04 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} en raison d'EHO bien moins chargés qu'au 16^{e} jour.

L'élimination de l'ammonium connaît également quelques fluctuations marquées par une chute à 7 % au 16^{e} jour alors qu'elle était excellente dès le 8^{e} jour. Les bactéries autotrophes ont ainsi pu être ponctuellement sensibles à un composé présent ou à un manque de carbone inorganique dans les EHO puisque l'élimination de l'ammonium atteint à nouveau des valeurs correctes dès le 22^{e} jour. Parallèlement, une inhibition prononcée de la dénitrification se produit dès le début de cette seconde campagne expérimentale et ce malgré une formation potentielle de nitrates parfois limitée en raison de la faible élimination de l'ammonium.

Phase 2 : 30^{e} – 69^{e} jour

Après une stabilisation des MES jusqu'au 30^{e} jour, cette phase est dans un premier temps marquée par une perte très lente de biomasse jusqu'au 53^{e} jour à 5.9 g.L^{-1} puis par une chute à 3.9 g.L^{-1} au 68^{e} jour due à un problème technique sur une pompe de l'installation qui a contraint l'arrêt de l'alimentation en EHO de la biomasse entre les 53^{e} et 56^{e} jours. Cette avarie ne semble pas avoir acccéléré la diminution progressive de l'abattement de la DCOS entamée au 29^{e} jour. Les performances antinomiques de l'élimination de la DCOS et de l'ammonium pourraient indiquer une inhibition sélective par les EHO des populations hétérotrophes ou autotrophes. Au 69^{e} jour, une chute globale des performances du BàM$_{IE}$ est observée avec des éliminations de la DCOS et de l'ammonium respectives à 9 % et 44 %.

Cette chute peut être consécutive au problème technique mais également à la variation très importante du rapport C/N, de 65 à 4.5 du 61^{e} au 68^{e} jour. Un rapport C/N inférieur à 5 est susceptible d'inhiber les bactéries autotrophes (Gagnaire, 2010) mais celles-ci semblent avoir mieux supporté ces conditions que les bactéries hétérotrophes signifiant que le seul rapport C/N ne suffit pas pour expliquer cette chute globale des performances du BàM$_{IE}$. La Cm en DCO a également connu quelques fluctuations lors de cette période ce qui aurait éventuellement pu perturber le système. Elle avait en effet été augmentée à 0.14 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} dans le but d'obtenir de la croissance bactérienne mais une concentration en DCO plus faible dans les EHO au 69^{e} jour a ensuite causé une diminution de 50 % de la Cm.

La dénitrification semble très efficace au 50^{e} jour comme en témoigne la concentration nulle en nitrates dans le perméat coïncidant avec une élimination de l'ammonium excellente à 97 % indiquant un potentiel élevé de formation de nitrates. Une vidange des nitrates accumulés dans le BàM$_{IE}$ via la mise en place d'une membrane neuve non colmatée peut être exclue puisque le carter membranaire du 50^{e} jour est en opération depuis le 22^{e} jour. Pourtant, l'élimination de la DCOS n'est que partielle et indiquerait une inhibition sélective de l'activité épuratrice des bactéries hétérotrophes.

La faible élimination de la DCOS lors de cette période souligne également une rétention importante par la membrane de la DCO non dégradée permettant d'obtenir une élimination apparente élevée malgré des performances biologiques altérées. Un réensemencement partiel a été effectué au 69^{e} jour avec des boues activées de la STEP de Rousset afin de compenser les pertes engendrées, la concentration en MES du BàM$_{IE}$ remontant alors à 5.6 g.L^{-1}. La biomasse du BàM$_{IE}$ hôpital est ainsi constituée de 30 % de boues activées non acclimatées issues de la STEP municipale au 69^{e} jour.

Phase 3 : 70^{e} – 115^{e} jour

Une nouvelle perte continue de biomasse est observée lors de la phase 3. Cette perte est plus prononcée suite au réensemencement puique la concentration en MES chute de 5.6 à 4.4 g.L^{-1} du 70^{e} au 78^{e} jour puis décroît plus modérément, similairement à la phase 2, jusqu'au 100^{e} jour pour atteindre 4.1 g.L^{-1}. Elle est associée à une remontée en dents de scie de l'abattement de la DCOS et une élimination très correcte de l'ammonium, probalement liées à la relative stabilisation du rapport C/N. Cependant, la mise en place d'un carter

membranaire de surface double (Cf III.2.5) entraîne une diminution de l'abattement de la DCOP. La plus grande surface membranaire disponible a pour effet de ralentir l'impact de la formation du colmatage sur la rétention de la DCO résiduelle non biodégradée. Alors que 2 pics de Cm à 0.21 et 0.19 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} aux 82^{e} et 98^{e} jours avaient engendré une légère croissance éphémère de biomasse, une augmentation similaire de la Cm à partir du 103^{e} jour pour obtenir de la croissance a été suivie cette fois d'une chute brutale des MES à 2.3 g.L^{-1} au 116^{e} jour. Cette chute liée à celles des performances épuratoires (DCOS et NH_4^+) peut ainsi être imputable à un nouveau pic de carbone (C/N = 39.5) survenu au 98^{e} jour. Un second réensemencement partiel en deux étapes, aux 109^{e} et 115^{e} jours, a été nécessaire pour compenser les pertes de biomasse, la concentration en MES remonte alors à 4.1 g.L^{-1} et est ainsi constituée à 44 % de boues activées non acclimatées au 115^{e} jour.

Entre les 92^{e} et 121^{e} jours, une diminution progressive de la concentration en nitrates dans le perméat est observée. Cette diminution est liée à une charge et un abattement de l'ammonium faibles et montrerait ainsi la persistance des nitrates dans le réacteur due à la rétention exercée par la membrane. Il ne faut toutefois pas écarter la possibilité de pics d'ammonium dans les EHO lors des jours non sujets aux analyses.

Phase 4 : 115^{e} – 180^{e} jour

Une perte lente de biomasse similaire aux phases 2 et 3 est de nouveau amorcée. Le réensemencement partiel semble avoir immédiatement affecté l'élimination de la DCOS, avec une chute brutale à 10 % au 116^{e} jour, mais pas celle de l'ammonium qui atteint 98 %. A l'inverse, l'élimination de l'ammonium baisse à 52 % au 121^{e} jour tandis que l'élimination de la DCOS remonte pour atteindre des valeurs supérieures à 70 %. Ces résultats montrent à nouveau que les bactéries autotrophes et hétérotrophes sont différemment impactées par les EHO.

Du 144^{e} au 157^{e} jour, une croissance significative et inédite de biomasse, de 2.9 à 4.3 g.L^{-1}, est obtenue et liée à un rapport C/N relativement stable et idéal lors de cette période, puisque compris entre 15 et 20, et à l'application d'une forte Cm. Le débit de perméat avait en effet été sensiblement augmenté depuis le 136^{e} jour pour tenter à nouveau d'obtenir de la croissance bactérienne (de 1 L.h^{-1} depuis le début de la phase 4 à une moyenne de 1.35 L.h^{-1} entre les 136^{e} et 157^{e} jours). **Cette phase de croissance est aussi marquée par l'absence de mousse dans le réacteur pour la première fois depuis le début de**

l'acclimatation, indiquant une diminution notable de la toxicité du milieu et/ou de l'absence de tensioactifs dans les EHO. De très bonnes performances épuratoires sont associées à cette croissante bactérienne à l'exception du 150^{e} jour où une chute ponctuelle de l'élimination de l'ammonium à 17 % est peut être due à l'absence de carbone inorganique dans les EHO. Au 158^{e} jour, un ultime pic de carbone (rapport C/N de 68) provoque l'arrêt de la croissance bactérienne et une chute drastique de l'abattement de la DCOS à 35 %. Il est notable que l'augmentation de la Cm à 0.25 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} au 173^{e} jour et 0.23 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} au 178^{e} jour soit liée avec une nouvelle perte de biomasse alors que ces valeurs sont de l'ordre de grandeur des Cm appliquées lors de la phase de croissance.

A partir du 121^{e} jour, la concentration de nitrates dans le perméat connaît de nombreuses fluctuations. Ce comportement est à mettre en relation avec les changements fréquents de carter membranaire (Cf III.2.5) permettant une vidange des nitrates accumulés dans le réacteur biologique par la membrane faiblement colmatée. Il est par ailleurs notable que la phase de croissance bactérienne ne soit pas associée avec une amélioration de la dénitrification.

Discussion

Les EHO ont un effet inhibiteur très prononcé sur les capacités reproductrices de la biomasse qui ne semble pas bien réagir aux changements de composition de l'effluent. Des performances contradictoires ont été observées pour des conditions opératoires similaires tout au long de l'acclimatation et signifieraient que **la composition spécifique des EHO serait responsable de l'antinomie observée des performances de la biomasse du BàM$_{IE}$ hôpital**. Il est ainsi possible que les deux catégories de bactéries ne soient pas affectées avec la même cinétique par les EHO ni sur la même durée. **L'élimination de la DCOS a connu de nombreuses fluctuations qui semblent être liées aux variations du rapport C/N.** Les 4 pics de carbone relevés aux 61^{e}, 98^{e}, 105^{e} et 158^{e} jours ont en effet tous provoqué une chute drastique de l'abattement de la DCOS. A l'inverse, les performances des bactéries autotrophes n'ont pas été systématiquement altérées par les pics de carbone. Aussi, une inhibition sélective des bactéries hétérotrophes a ponctuellement été observée avec une dénitrification opérationnelle et une élimination de la DCO très faible. **La non répétabilité des résultats indique que le suivi des indicateurs conventionnels de pollution des EHO ne permet pas d'exploiter parfaitement le BàM pilote** puisque l'inhibition des boues activées

semble parfois liée aux polluants spécifiques et non à la proportion de carbone et d'azote dans les EHO.

Le colmatage des fibres creuses 100 kDa exerce une influence majeure sur la rétention de la DCOS et permet d'atteindre une élimination globale excellente de la DCO par le BàM$_{IE}$ malgré les fluctuations importantes des performances épuratoires de la biomasse. Similairement à la première campagne expérimentale, la réaction de dénitrification s'est à nouveau avérée très inhibée tout au long de l'acclimatation alors que les paramètres physico-chimiques (température, oxygène dissous, pH) sont optimums pour permettre une dénitrification opérationnelle. Deux expériences en réacteur batch ont été réalisées à la fin de cette 2nde campagne expérimentale afin de vérifier si l'inhibition de la réaction de dénitrification pouvait provenir de l'absence de carbone facilement assimilable :

- un réacteur batch anoxique en condition endogène (sans apport de substrat extérieur) ;
- un réacteur batch anoxique en condition exogène (avec apport de carbone organique facilement biodégradable (sucre)).

La concentration de l'oxygène dissous a été contrôlée et est restée nulle au cours de l'expérimentation. Aucune dénitrification n'a été observée dans les 2 réacteurs batch après les 4 heures d'expérimentation, les concentrations de nitrates demeurant constantes. Ainsi, l'inhibition de la réaction de dénitrification ne provient pas de l'absence de carbone organique facilement assimilable. Les observations de la première campagne expérimentale seraient donc confirmées : **l'inhibition de la dénitrification serait causée par des produits perturbant les transferts de matière au sein des flocs bactériens dans la cuve d'anoxie.** Ces produits, tels que des agents tensioactifs, présents en grande quantité dans les EHO en raison de l'activité hospitalière, pourraient également être en partie responsables du moussage de la liqueur mixte observé sur la quasi-intégralité de la seconde campagne expérimentale. Ces produits perturberaient moins les bactéries hétérotrophes dans la cuve aérobie en raison de leur dégradation partielle due à la présence d'oxygène dissous dans cette cuve.

III.2.3. Consommation d'oxygène

Lors de cette campagne expérimentale, l'évolution du Specific Oxygen Uptake Rate (SOUR) dans le réacteur s'avère nettement plus stable au cours du temps en comparaison à la première campagne avec la configuration BàM$_E$ (Figure III-26).

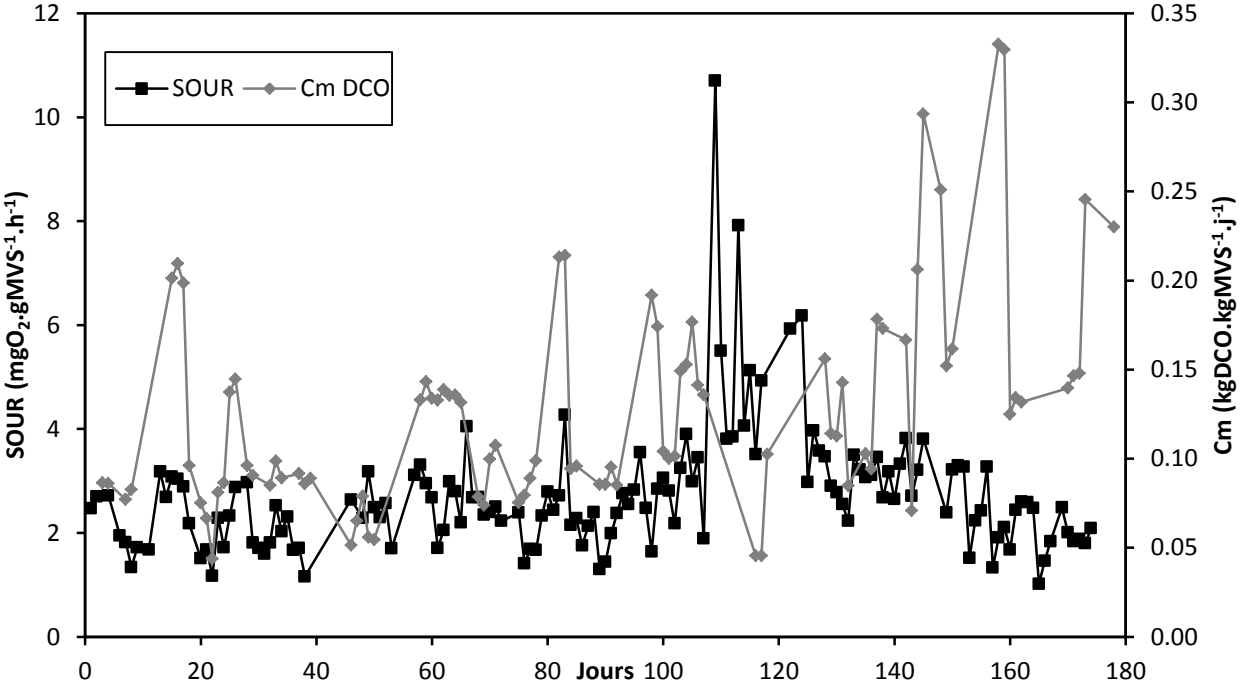


Figure III-26 : Evolution temporelle du SOUR dans le réacteur et de la Cm.

La représentation du SOUR et de la Cm en DCO permet de constater que **l'évolution du SOUR dans le réacteur est directement liée à la Cm lors des 40 premiers jours**. Cependant, la réponse respiratoire des boues activées n'apparaît pas proportionnelle à la Cm comme le montrent les 2 pics de Cm relevés aux 16^e et 26^e jours à 0.21 et 0.14 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} induisant une respiration similaire aux alentours de 3 mg$_{O2}$.gMVS^{-1}.h^{-1}. La respiration des boues activées est très forte entre le 109^e et le 124^e jour correspondant à la période de réensemencement partiel en deux étapes effectuées les jours 109 et 115. Deux pics de respirométrie sont observés aux jours 109 et 113 liés avec les importantes pertes de MES indiquant que la biomasse est en état de stress. Une diminution progressive du SOUR dans le réacteur est observable du 145^e jour jusqu'à la fin de cette campagne expérimentale et ce, malgré d'importantes Cm appliquées.

L'évolution de la respiration endogène et de l'activité exogène spécifique des boues activées est également suivie (Figures III-27 et III-28) tout au long de cette seconde campagne. Les conditions endogènes sont obtenues après 4 h d'aération des boues activées prélevées sans apport de substrat. Les respirations endogènes et les activités exogènes spécifiques sont ensuite mesurées après apport d'ammonium, d'allylthiourée puis de carbone pour différencier les populations autotrophes et hétérotrophes. L'activité exogène correspond à la consommation d'oxygène nécessaire à l'oxydation du substrat ajouté (ammonium ou carbone).

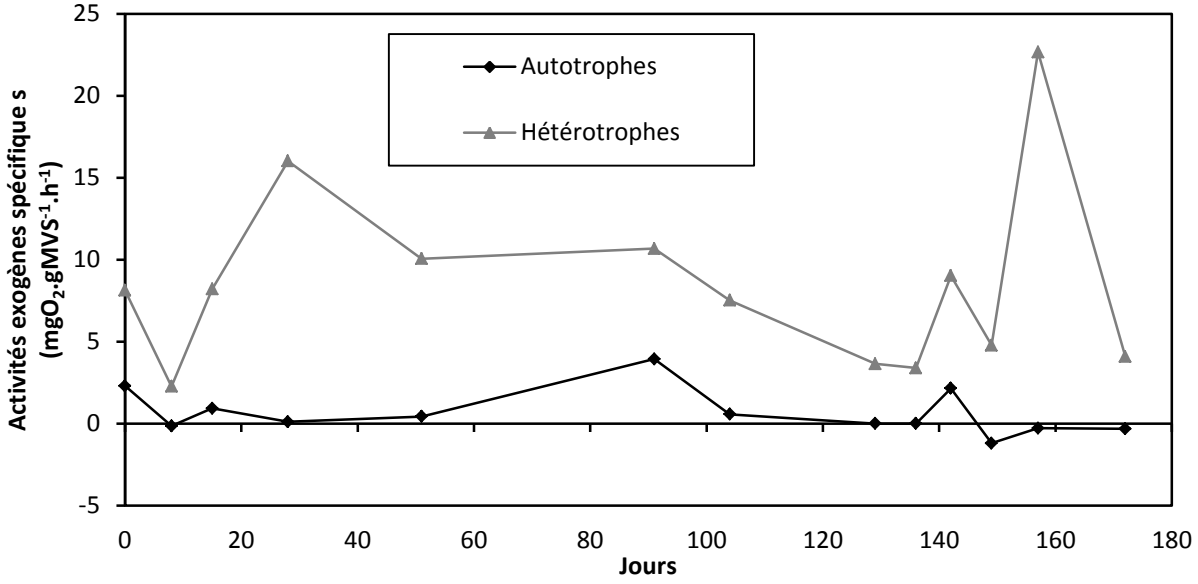


Figure III-27 : Activités exogènes spécifiques des hétérotrophes et autotrophes au cours de l'acclimatation en BàM$_{IE}$.

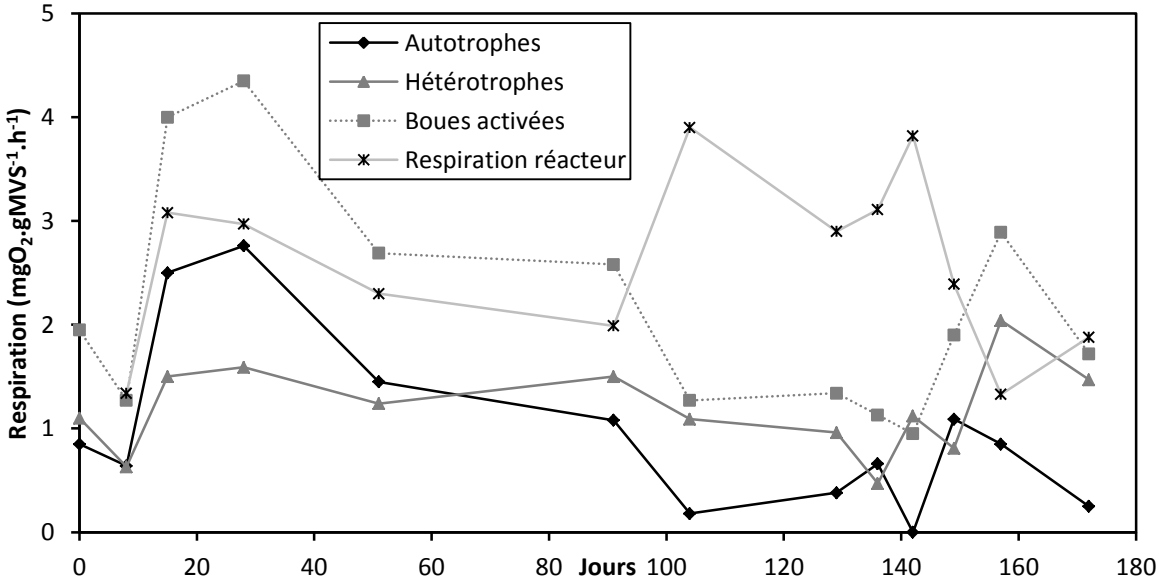


Figure III-28 : Activités endogènes spécifiques et respiration de la biomasse dans le réacteur au cours de l'acclimatation en BàM$_{IE}$.

Une baisse générale de la respiration endogène et des activités exogènes est observée au 8e jour et doit être due aux changements de conditions hydrodynamiques entre la STEP et le $BàM_{IE}$ pilote. Bien que le procédé soit similaire, le changement d'environnement et des paramètres opératoires peut expliquer cette diminution.

L'activité exogène des hétérotrophes semble suivre l'évolution des MES puisqu'elle augmente jusqu'au 28e jour puis décroît ensuite progressivement jusqu'au 136e jour. Les divers réensemencements partiels effectués ne semblent pas avoir particulièrement influencés l'évolution de cette activité exogène. 2 pics sont ensuite relevés aux jours 142 et 157. L'activité exogène des hétérotrophes est maximale au 157e jour et correspond au dernier jour de la phase de croissance significative de biomasse observée sur 2 semaines. Lors de cette phase de croissance, l'activité respirométrique des boues activées est à son maximum et la mousse est absente du $BàM_{IE}$ pour la première fois depuis le début de l'acclimatation, indiquant une diminution notable de la toxicité du milieu et/ou de l'absence de tensioactifs dans les EHO. Ainsi, **ces résultats confirment que lorsque les conditions, et principalement la composition des EHO, le permettent, les boues activées sont toujours capables de se développer. L'inhibition des EHO sur les capacités reproductrices et sur l'activité respiratoire de la biomasse apparaît ainsi importante mais non irréversible.**

L'activité exogène spécifique des bactéries autotrophes est très faible hormis au 91e jour où une activité de 3.9 $mg_{O2}.gMVS^{-1}.h^{-1}$ est mesurée et est consécutive à une élimination de l'ammonium systématiquement supérieure à 75 % depuis 20 jours. Il est surprenant que certains jours au cours desquels l'ammonium est très bien éliminé soient associés avec une activité exogène spécifique très faible des autotrophes. Celle-ci pourrait ainsi se développer uniquement lorsqu'une élimination efficace de l'ammonium est stabilisée durablement. L'activité négative mesurée à la fin de la seconde campagne expérimentale indiquerait une inhibition exercée par l'ajout d'ammonium. Ce résultat n'est pas en cohérence avec l'élimination de l'ammonium obtenue sur cette période et peut être attribué aux incertitudes expérimentales. La chute de l'élimination de l'ammonium à 17 % au 150e jour correspond à l'activité la plus faible mesurée et pourrait éventuellement indiquer une inhibition des bactéries autotrophes devenues très sensibles à un composé contenu dans les EHO.

L'évolution de la respiration endogène suit celle de la biomasse avec notamment une diminution continue du 28^{e} au 142^{e} jour puis un regain lors de la phase de croissance bactérienne. Alors que la respiration des bactéries hétérotrophes semble relativement stable tout au long de l'acclimatation celle des autotrophes est nettement plus variable. Les autotrophes semblent ainsi plus sensibles que les hétérotrophes aux conditions expérimentales, confirmant que l'inhibition exercée par les EHO peut être sélective.

Surtout, la **respiration dans le réacteur apparaît plus faible que la respiration endogène entre le 15^{e} et le 91^{e} jour. Ce résultat indique clairement que les boues dans le réacteur sont partiellement inhibées par les EHO** puisque leur respiration augmente après seulement 4 h d'aération sans ajout de substrat (pour établir des conditions endogènes). La respiration dans le réacteur supérieure à la respiration endogène entre le 104^{e} et le 149^{e} jour peut être attribuée aux plus fortes Cm appliquées lors de cette période par rapport à la période du 15^{e} au 91^{e} jour. Ainsi, **la respiration des boues activées dans le réacteur est la résultante d'une compétition entre la quantité plus importante de substrat à dégrader et l'effet inhibiteur de certains composés des EHO.**

Les données respirométriques montrent l'inhibition exercée par les EHO sur la respiration endogène et sur les activités exogènes des bactéries hétérotrophes et autotrophes. La diminution conjointe de la respiration endogène et de l'activité exogène des autotrophes montre bien que les EHO provoquent une mort cellulaire des bactéries autotrophes qui ne sont même plus capables de consommer leurs réserves pour survivre. La respiration endogène constante des hétérotrophes montre une plus grande robustesse de la part de cette population bactérienne. Cependant, l'activité exogène de celle-ci s'avère également inhibée par les EHO ce qui explique les fluctuations de l'élimination de la DCOS.

III.2.4. Colmatage membranaire

Il convient de rappeler que la surface membranaire a été doublée de 0.2 m² à 0.4 m² à partir du 56^{e} jour afin d'appliquer des Cm plus élevées. La représentation de l'évolution du colmatage membranaire a été réalisée à partir de la résistance de colmatage ($R_{colmatage}$) obtenue à partir d'un modèle de résistance en série classique (Figure III-29). A partir du 12^{e} jour de l'acclimatation une relaxation (une minute) et un rétrolavage (1 min - 0.5 bar) des

fibres creuses sont réalisés manuellement deux fois par jour afin de ralentir la formation du colmatage (non représentés sur les courbes d'évolution journalière).

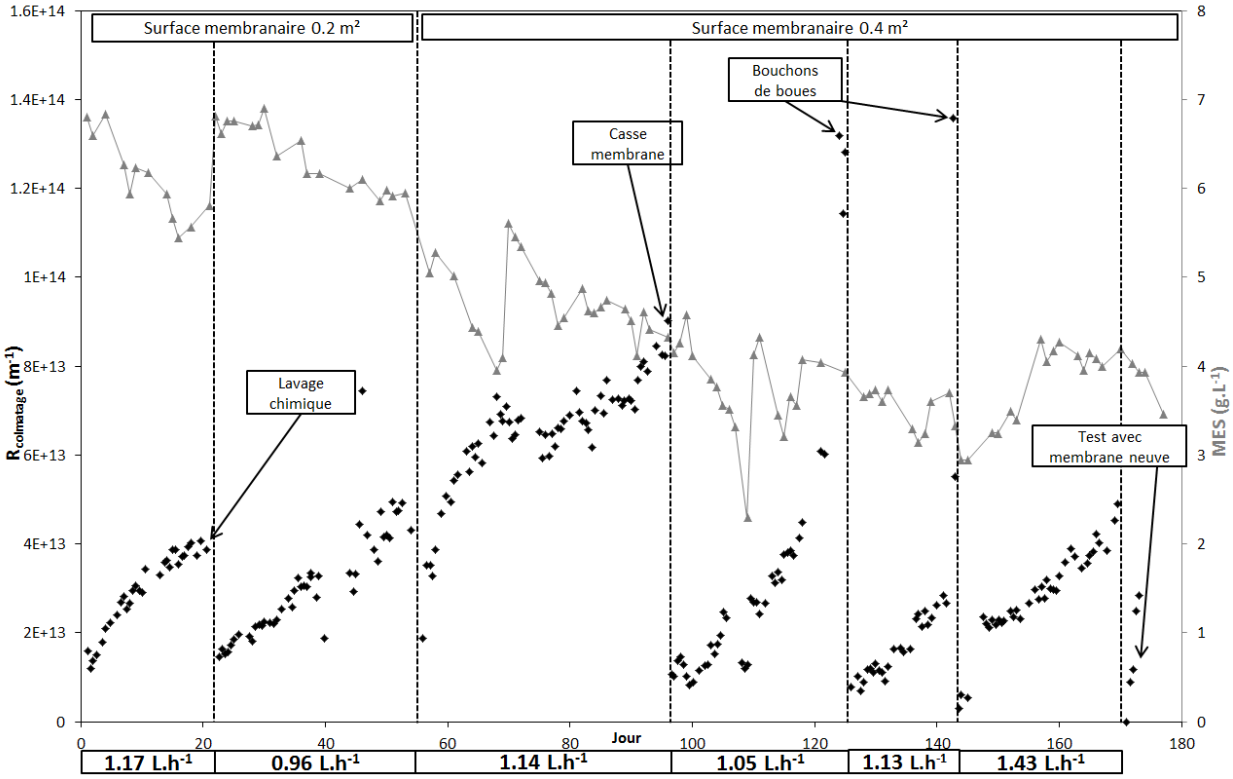


Figure III-29-. Evolution temporelle de la résistance du colmatage à la filtration.

Plusieurs incidents se sont produits lors des 180 jours de fonctionnement du BàM$_{IE}$. Au 55^{e} jour, une fibre creuse s'est cassée ayant pour conséquence de laisser passer de la biomasse dans le perméat. Aux 124^{e} et 143^{e} jours, des problèmes techniques ont imposé le remplacement immédiat du carter membranaire en production par un autre carter (neuf ou lavé chimiquement).

L'évolution du colmatage est à peu près similaire pour les 2 premières phases avec le carter de surface membranaire 0.2 m². Avec le carter de surface membranaire double, la perte de perméabilité membranaire s'avère initialement plus prononcée en raison d'un débit plus élevé de perméat et de la forte perte de MES à cette période ayant pu entraîner le relargage de produits microbiens solubles propices au colmatage. La cinétique de formation du colmatage devient ensuite comparable à celle des 55 premiers jours et correspond à une relative stabilisation des MES et un débit de perméat similaire. La phase suivante, du 96^{e} au 125^{e} jour, est caractérisée par une formation plus rapide du colmatage et coïncide avec

d'importantes fluctuations de la concentration en MES et les deux réensemencements partiels de boues activées. La lyse cellulaire survenue a ainsi de nouveau pu entraîner le relargage de composés à fort pouvoir colmatant. La cinétique de formation du colmatage est ensuite atténuée lors de la phase de stagnation et de croissance de la biomasse indiquant le bon état physiologique des boues activées. **Le rôle de l'état de la biomasse apparaît ainsi majeur dans la formation du colmatage membranaire** puisque cette phase est associée à une augmentation notable du débit de perméat.

Le degré de colmatage exerce une influence majeure sur la rétention de la DCOS non éliminée par les bactéries (Figure III-30).

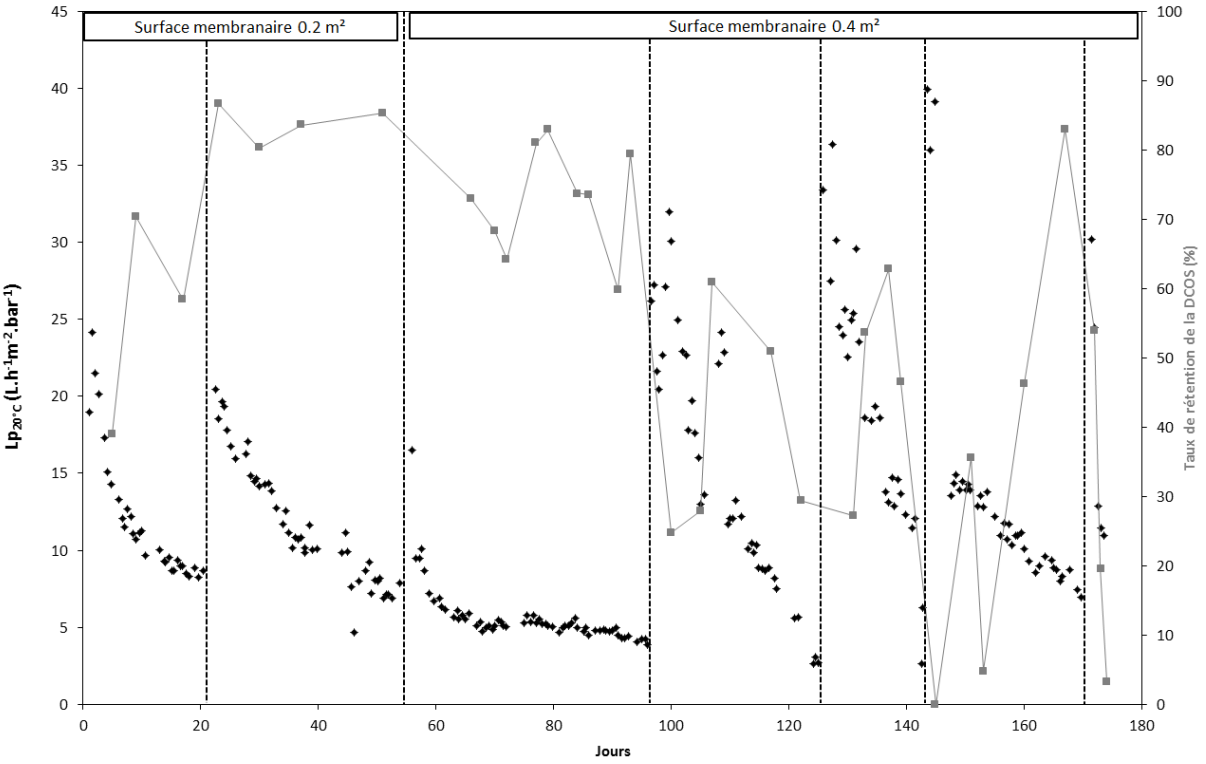


Figure III-30. Evolutions temporelles du taux de rétention de la DCO du surnageant et de la perméabilité membranaire.

Le taux de rétention (TR) de la DCOS devient rapidement important et demeure élevé jusqu'au 93^{e} jour et le changement de carter membranaire en raison de la casse d'une fibre creuse. Cette rétention élevée est associée à une chute rapide de la perméabilité membranaire malgré l'application de rétrolavage et de la relaxation des fibres mais également du lavage chimique du 21^{e} jour. Lorsque la surface membranaire est doublée et pour un débit de perméat similaire le taux de rétention de la DCOS est plus faible et surtout

fluctue. A partir du 93e jour, le fonctionnement à des perméabilités membranaires plus élevées impacte directement le taux de rétention de la DCOS qui oscille entre 30 et 63 % jusqu'au 139e jour. La mise en place d'une membrane neuve au 145e jour confirme **l'influence majeure du colmatage sur la rétention de la DCO** puisque cette rétention devient nulle. Bien que le fonctionnement à un degré de colmatage conséquent permette l'amélioration de l'élimination apparente de la DCO**, la rétention importante de substances spécifiques dans le réacteur pourrait constituer une hypothèse d'explication des altérations ponctuelles des performances épuratoires de la biomasse** (Figure III-31).

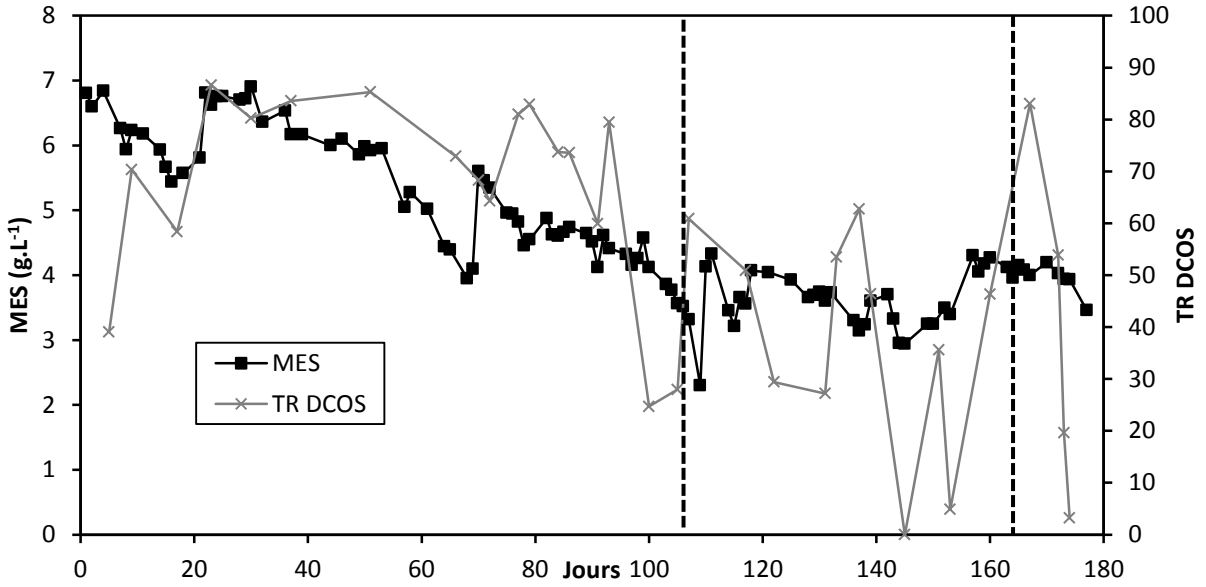


Figure III-31. Influence du TR de la DCOS sur l'évolution de la biomasse concentration en MES.

Il est remarquable que les chutes de MES sur le long terme soient obtenues du 23e au 105e jour alors que le taux de rétention moyen de la DCO du surnageant est de 67 %. Ensuite, le TR de la DCOS moyen n'est plus que de 38 % et coïncide avec les phases de stabilisation et de croissance de la biomasse. Les dernières valeurs faibles du TR de la DCOS correspondent au dernier changement de carter membranaire. Une rétention importante de la DCOS par la membrane et son colmatage pourrait conduire à l'accumulation des composés toxiques dans le réacteur biologique qui perturberaient la croissance de la biomasse. Ces observations fournissent ainsi une autre hypothèse concernant les paramètres pouvant influencer la croissance de la biomasse.

III.2.5. Antibiorésistance

Des antibiogrammes ont été réalisés afin de quantifier l'évolution des propriétés antibiorésistantes de la biomasse au cours de cette seconde campagne expérimentale. L'acquisition de résistance bactérienne à un antibiotique est censée se produire à des concentrations sub-inhibitrices favorisant le développement de bactéries antibiorésistantes (Gullberg et al., 2011 ; Bruchmann et al., 2013). Les 6 antibiotiques les plus consommés dans l'unité sur laquelle le $BàM_{IE}$ hôpital est raccordé ont été sélectionnés pour ce suivi. Il s'agit des pénicillines amoxicilline et ticarcilline, des céphalosporines de troisième génération ceftazidime et ceftriaxone, de la fluoroquinolone ciprofloxacine et de la carbapénème méropénem.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques sur les boues activées est calculée à partir des diamètres d'inhibition mesurés. Les CMI de la biomasse du $BàM_{IE}$ sont comparées avec celles de la STEP municipale du Rousset (CMI_0) afin de quantifier l'antibiorésistance acquise (Figure III-32). Ainsi, plus le rapport CMI/CMI_0 est élevé et plus la biomasse a développé une résistance à l'antibiotique. Le choix de normaliser les CMI est imposé par les différentes quantités initiales contenues sur les disques d'antibiotiques puisque les antibiogrammes sont habituellement destinés à la réalisation de diagnostics médicaux. Les points situés à l'ordonnée « Résistant » sur la Figure III-32 correspondent aux dates auxquelles l'inhibition n'était pas mesurable, le degré atteint d'antibiorésistance étant donc considéré maximal dans le cadre de ces tests.

La résistance des boues activées à l'ensemble des antibiotiques a logiquement augmenté au cours de l'acclimatation. La biomasse est rapidement devenue totalement résistante aux 2 pénicillines puisque leurs diamètres d'inhibition n'ont pu être quantifiés qu'une seule fois chacun : au 51^{e} jour pour l'amoxicilline et au 95^{e} jour pour la ticarcilline. Ce résultat n'est pas surprenant puisque les boues activées initiales de la STEP municipale montraient déjà une résistance importante à ces 2 antibiotiques avec une CMI_0 bien plus élevée que pour les autres molécules (Tableau III-6). L'antibiorésistance mesurée de l'amoxicilline est en accord avec son élimination dans les STEP conventionnelles à boues activées puisque des éliminations de 100 % (Watkinson et al., 2007 ; Zuccato et al., 2010) et 99 % (Watkinson et al., 2009) ont été relevées.

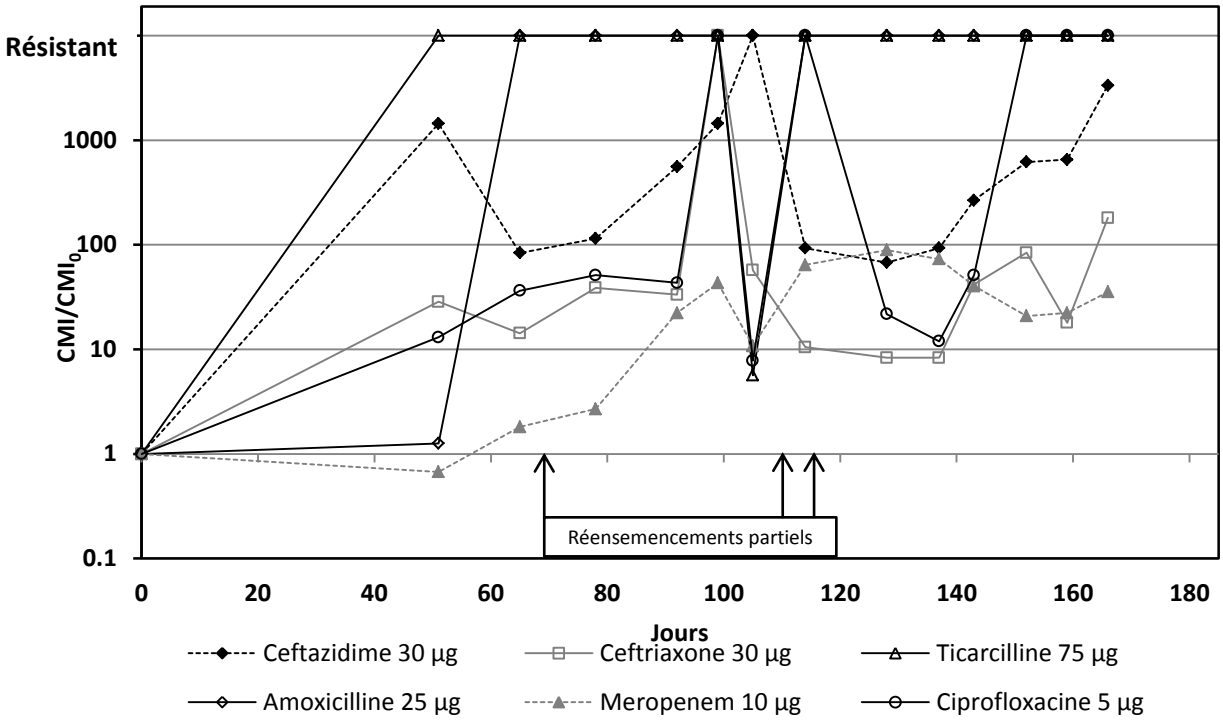


Figure III-32. Evolution de la résistance de la biomasse aux antibiotiques les plus consommés au cours de l'acclimatation.

Tableau III-6 : Valeurs des CMI_0 et des CMI_{163j} pour les 6 antibiotiques testés

Antibiotique	CMI_0 (mg. L^{-1})	CMI_{163j} (mg. L^{-1})	CMI_{163j}/CMI_0
Amoxicilline	34.6	/	Résistant
Ceftazidime	0.2	632.0	3344
Ceftriaxone	0.7	128.0	181
Ciprofloxacine	2.7	/	Résistant
Méropénem	0.1	3.0	35
Ticarcilline	90.6	/	Résistant

Le degré maximal d'antibiorésistance est atteint pour la plupart des antibiotiques au 99^{e} jour où la ciprofloxacine et la ceftriaxone ne sont d'ailleurs plus quantifiables. A cette date, l'abattement de la DCO dans le surnageant est remonté à 78 % mais celui de l'ammonium a chuté à 10 % suite au pic de carbone relevé dans les EHO. Ce pic de carbone relevé au 98^{e} jour conjugué avec une augmentation de la Cm semblent induire la diminution simultanée de l'antibiorésistance du méropénem, de la ticarcilline et de la ciprofloxacine entre les 99^{e} et le 105^{e} jours. Ainsi, similairement à l'évolution des MES et à l'élimination de la DCOS, **les propriétés antibiorésistantes de la biomasse pourraient également être impactées à court**

terme par les importantes fluctuations de composition des EHO. A l'inverse, la biomasse était étonnament totalement résistante à la ceftazidime au 105^{e} jour. La chute de la résistance à la ceftazidime au 114^{e} jour pourrait être due à un temps de latence requis pour cet antibiotique ou au réensemencement partiel avec des boues activées moins résistantes que les boues développées dans le $BàM_{IE}$ hôpital qui auraient spécifiquement altéré la résistance à cet antibiotique. L'antibiorésistance de la ciprofloxacine, de la ceftriaxone et de la ceftazidime continue d'évoluer jusqu'à la fin de l'acclimatation tandis que celle du méropénem semble avoir atteint un palier. Le méropénem est d'ailleurs le seul antibiotique testé à toujours avoir exercé un effet inhibiteur quantifiable sur les microorganismes. La biomasse a toutefois acquis une importante résistance à cet antibiotique au cours du temps puisqu'elle lui est 35 fois plus résistante que les boues de STEP municipale.

Il n'a pas été possible de retrouver de données relatant l'élimination du méropénem, de la ceftazidime et de la ceftriaxone par les procédés à boues activées. Un test de dégradation, obtenue suivant une méthodologie discutable (cf III.1.5.2), a mis en évidence la biodégradabilité quasi-nulle du méropénem (Al-Ahmad et al., 1999). Ce résultat appuierait la CMI_0 et le rapport CMI/CMI_0 très faibles du méropénem au cours des deux premiers mois vis-à-vis des autres antibiotiques testés. Il est remarquable que ce rapport augmente fortement par la suite ce qui montre l'adaptabilité des boues activées à un puissant antibiotique. De même, un autre test de dégradation a montré la non biodégradabilité de la ceftriaxone (Junker et al., 2006) pouvant expliquer sa CMI_0 très faible. La ciprofloxacine est partiellement éliminée en STEP conventionnelle municipale. Son abattement est compris entre 18 et 89.8 % (Michael et al., 2013). Ainsi, la résistance à la ciprofloxacine est acquise plus lentement que pour les pénicillines mais est plus élevée (résistance non mesurable en fin d'acclimatation) que pour la ceftriaxone.

L'acquisition de résistance par la biomasse semble en adéquation avec la classification des antibiotiques. La biomasse est en effet facilement devenue résistante aux 2 pénicillines et les valeurs des CMI_0 et CMI_{163j} pour les 2 céphalosporines sont du même ordre de grandeur. **L'antibiorésistance semble bien être valable pour les antibiotiques ayant le même mode d'action** (Kümmerer, 2009). Un antibiotique spécifique n'a ainsi pas besoin d'être présent dans les EHO pour que la communauté bactérienne des boues activées lui devienne résistante puisque celle-ci peut développer une résistance croisée via un autre antibiotique

contenu dans l'alimentation. La forte résistance acquise aux 2 pénicillines n'est pas surprenante car, en plus de leur CMI_0 élevée, ces 2 antibiotiques sont de loin les plus consommés dans le service d'oncologie. Une résistance croisée aux céphalosporines de 3^{e} génération peut également être effectuée via la cefixime, consommée toutefois en petite quantité dans le service. Enfin, les carbapénèmes sont connues comme étant des antibiotiques plus forts que les pénicillines et sont par conséquent utilisées en dernier recours lorsque d'autres antibiotiques n'ont pas fonctionné. Le méropénem étant la seule carbapénème utilisée dans le service, son utilisation spécifique aux cas critiques conjuguée à une efficacité systématique justifie donc le degré plus faible de résistance atteint en comparaison aux autres antibiotiques testés. Toutefois, la résistance atteinte en fin d'acclimatation est identique à celle initiale de l'amoxicilline. Il est possible que la stagnation de la résistance au méropénem soit due à son absence dans les EHO pendant une durée prolongée.

Après 180 jours de fonctionnement, la biomasse a développé une très forte résistance aux antibiotiques testés, de 35 fois plus à totalement résistante. Ces résultats démontrent ainsi les facultés d'adaptation des microorganismes à des molécules intialement conçues pour les détruire. Malgré les difficultés rencontrées pour obtenir une croissance significative de la biomasse au cours de cette seconde campagne expérimentale il est notable que l'antibiorésistance semble toujours en évolution pour certains antibiotiques. Un palier semble avoir été atteint pour le méropénem, antibiotique exercant l'effet inhibiteur le plus prononcé sur la biomasse tout au long de l'acclimatation aux EHO. Ces résultats confirment ceux de Stalder (2012) qui a mis en évidence l'influence des EH sur la diversité bactérienne et la dissémination des gènes de résistance au sein des communautés bactériennes. Ainsi, la présence d'antibiotiques très concentrés dans les EHO par rapport aux EUU favorise le développement à un degré élevé de l'antibiorésistance au sein de la biomasse épuratrice.

III.2.6. Quantification de l'acclimatation

III.2.6.1. Conditions expérimentales

Une perte de biomasse quasi continue a été observée lors de cette seconde campagne et ce, malgré des performances épuratrices sur la DCO et l'ammonium ponctuellement très bonnes. La phase de croissance bactérienne significative obtenue du 144^{e} au 157^{e} jour indiquerait que les capacités reproductrices des microorganismes sont inhibées par les EHO mais demeurent opérationnelles dès que la composition du substrat le permet.

Pour vérifier cette hypothèse, des expérimentations complémentaires d'une durée de 4 jours en réacteurs batch ont été réalisées pour différentes conditions d'alimentation. L'influence du type de substrat (réel et synthétique) et de la Cm a ainsi été évaluée sur les performances de boues prélevées dans le BàM$_{IE}$ hôpital au 177^{e} jour de cette seconde campagne expérimentale. Les performances de dégradation de la DCO sont quotidiennement mesurées et la liqueur mixte de chaque réacteur batch est filtrée, séchée puis pesée pour déterminer la quantité de MES présente à la fin des 4 jours d'expérimentation. Les conditions expérimentales sont récapitulées dans le Tableau III-7. A noter que l'alimentation des boues activées en substrat a dû être effectuée de manière discontinue au début de chaque jour mais est demeurée identique pour chaque batch. Le substrat synthétique est réalisé aux mêmes concentrations de DCO et d'ammonium que les EHO prélevés au 177^{e} jour à partir de glucose pour la DCO et de $(NH_4)_2SO_3$ pour l'ammonium.

Tableau III-7 : Récapitulatif des conditions expérimentales

Réacteur batch	1	2	3
MES initiales (g.L^{-1})	3.5	3.5	3.5
Cm (kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1})*	0.1	0.2	0.2
Effluent	EHO	EHO	½ EHO + ½ Synthétique
DCO (mg.L^{-1})		300	
N-NH4+ (mg.L^{-1})		25	
C/N		12	

* Cm au jour de prélèvement : 0.23 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}

III.2.6.2. Influence de la charge massique et du type de substrat sur les performances de la biomasse du BàM$_{IE}$

L'évolution des MES dans les 3 réacteurs batch met clairement en évidence l'effet inhibiteur des EHO sur les capacités reproductrices de la biomasse (Figure III-33).

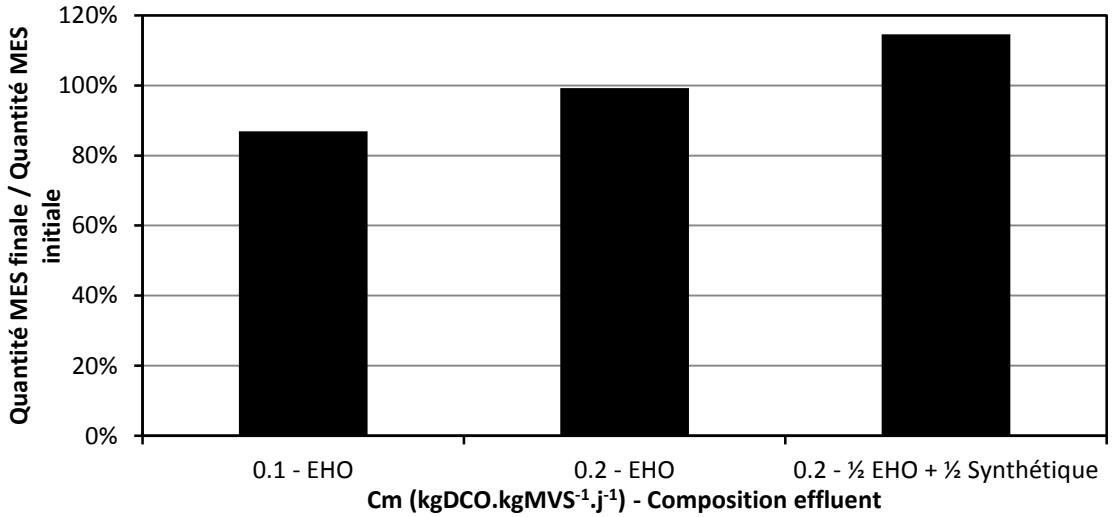


Figure III-33 : Evolution de la quantité de biomasse pour les 3 conditions d'alimentation testées après 4 jours d'expérimentation.

Une perte de 13 % de la biomasse est en effet observée pour la Cm de 0.1 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} avec les EHO en unique substrat. Par contre, une stabilisation surprenante de la quantité de MES est observée pour le réacteur 2 alimenté par les EHO à une Cm de 0.2 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}. L'influence du rapport C/N de l'effluent, se situant dans l'intervalle des derniers EHO collectés, peut d'ores et déjà être écartée. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce fait : (i) une compétition se produirait entre la croissance bactérienne liée au substrat dégradé des EHO et la lyse bactérienne liée aux effets inhibiteurs des EHO ou (ii) la Cm dans le réacteur 2 est peu différente de celle appliquée aux boues prélevées dans le BàM$_{IE}$. La variation de la Cm de 0.23 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} au 177^{e} jour dans le BàM$_{IE}$ à 0.10 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} dans le réacteur 1 est en effet beaucoup plus importante que pour le réacteur 2. La Cm la plus proche (réacteur 2) des conditions opératoires dans le BàM$_{IE}$ hôpital à la date de prélèvement des boues activées n'aurait ainsi pas induit de perte de biomasse. Cependant, il convient de préciser que ces résultats demeurent surprenants puisque la méthode d'alimentation discontinue des réacteurs batch engendre un pic de

substrat, et donc de toxicité en ce qui concerne les EHO. **La toxicité exercée par les EHO sur la biomasse serait ainsi indépendante de la Cm.** Le maintien de la quantité de MES dans le réacteur 2 suggère que **les pertes engendrées par la toxicité des EHO causant une lyse cellulaire auraient été compensées par l'assimilation du substrat facilement dégradable des EHO** disponible en plus grande quantité que dans le réacteur 1.

Pour une Cm de 0.20 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} avec dilution de moitié des EHO par un substrat synthétique une croissance de 14 % de biomasse a été obtenue sur 4 jours. Ce résultat montre ainsi que **la biomasse a conservé ses capacités reproductrices mais que la croissance observée ne peut être attribuée qu'à l'assimilation du substrat synthétique facilement biodégradable. Les EHO exercent donc clairement une inhibition persistante sur la croissance bactérienne même après 180 jours d'acclimatation.** Les EHO testés sont de surcroît peu chargés en pollution conventionnelle (DCO et NH_4^+) ce qui ne les dépourvus pourtant pas d'un fort potentiel inhibiteur sur la croissance bactérienne.

Les vitesses de dégradation de la DCO, mesurées à partir de la concentration résiduelle en DCO dans le surnageant après une journée de mise en contact avec le substrat, confirment l'évolution des MES dans les 3 réacteurs batch (Figure III-34).

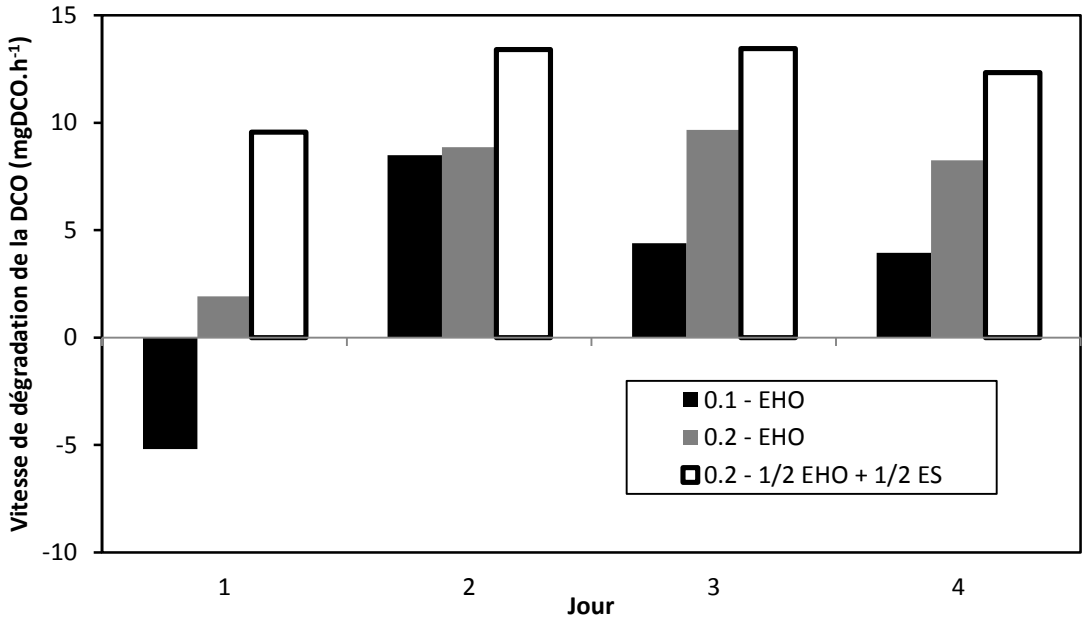


Figure III-34 : Vitesse de dégradation de la DCO pour les différentes conditions d'alimentation.

La vitesse de dégradation de la DCO est :

- atteinte au bout de 48 h quelles que soient les conditions opératoires ;
- maximale en présence de substrat facilement biodégradable ;
- négative le 1er jour pour le réacteur 1 ce qui confirme la lyse cellulaire et la perte de MES associée. Au 2e jour, la vitesse de dégradation est maximale dans ce réacteur et peut être attribuée à la consommation des produits microbiens solubles relargués lors du 1er jour et qui sont facilement assimilables par la biomasse.
- faible au 1er jour dans le réacteur 2 et montre l'inhibition exercée par le premier pic brutal de pollution dû à l'alimentation discontinue qui a également engendré une perte de biomasse dans ce réacteur le premier jour.

Ces résultats confirment ainsi que l'impact des EHO est compensé dans le réacteur 2 par la plus grande disponibilité de substrat vis-à-vis du réacteur 1. La dégradation de ce substrat par les bactéries non impactées a permis de revenir progressivement à la quantité de MES initiale dans le réacteur 2. L'inhibition exercée par les EHO sur la biomasse n'est donc pas proportionnelle à la Cm appliquée. **Cette inhibition est probablement sélective et certaines espèces pourraient ne pas être impactées suivant les composés constituant les EHO.** Par ailleurs, la vitesse de dégradation de la DCO dans le réacteur 2 est légèrement supérieure au double de celle obtenue dans le réacteur 1 aux 3e et 4e jours. Cela pourrait indiquer qu'une fraction des composés récalcitrants des EHO a pu être dégradée par cométabolisme grâce à la plus grande quantité de substrat disponible dans le réacteur 2.

Ainsi, les EHO exercent un effet inhibiteur important sur la biomasse même après 180 jours d'acclimatation. **Ces résultats suggéreraient d'alimenter le BàM$_{IE}$ hôpital avec une Cm supérieure à 0.20 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} afin de permettre un bilan positif entre la croissance et la lyse bactérienne.**

III.2.7. Performances du BàM$_{IF}$ hôpital sur l'élimination des médicaments ciblés

Lors de cette seconde campagne expérimentale, les performances du BàM pilote sur la pollution médicamenteuses sont quantifiées à partir des anticancéreux ifosfamide (IF) et cyclophosphamide (CP), de l'antibiotique sulfaméthoxazole (SM) et de l'antidouleur codéine (CD).

III.2.7.1. Détection dans les EHO

Tout comme le 5-FU, l'IF, le CP et le SM sont présents à de très fortes concentrations dans les EHO collectés (Figure III-35).

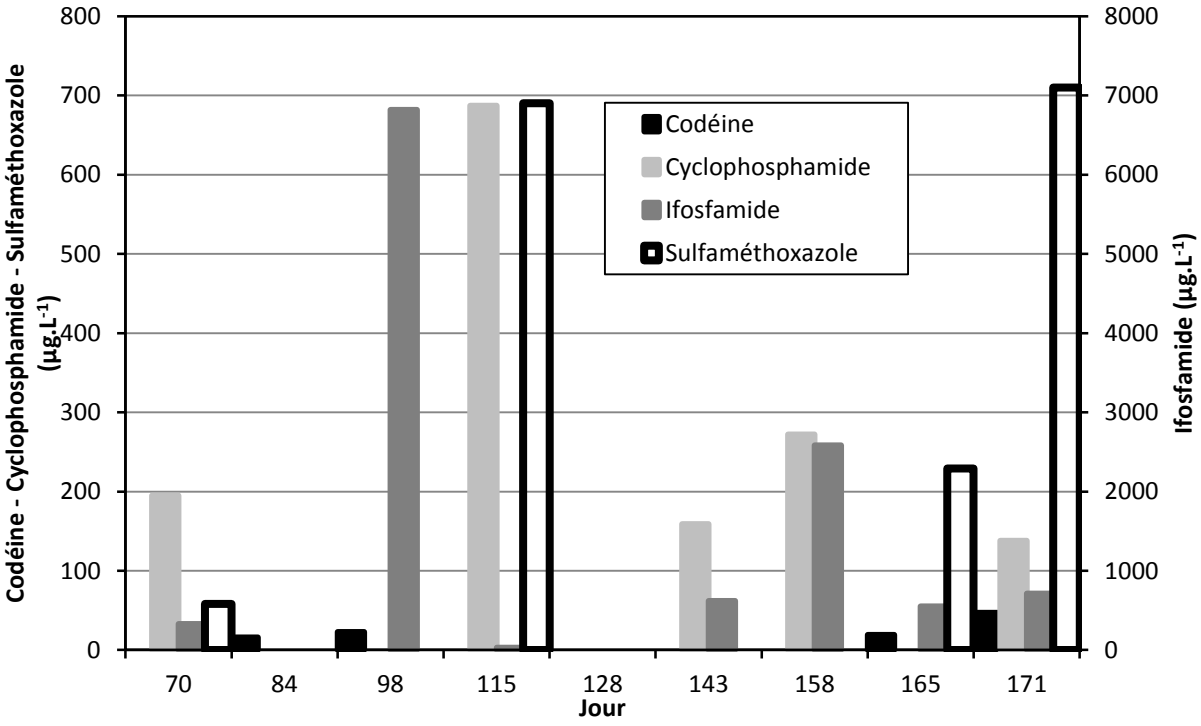


Figure III-35. Concentrations des médicaments sélectionnés dans les effluents du service d'oncologie (avant dopage).

Les 2 médicaments anticancéreux ont été détectés dans 6 des 9 échantillons analysés. **De très importantes concentrations ont été relevées pour l'ifosfamide : 6.8 mg.L^{-1} au 98^{e} jour et 2.6 mg.L^{-1} au 158^{e} jour.**

Le sulfaméthoxazole et la codéine ont été détectés dans 4 des 9 échantillons testés. Les concentrations de CD sont très faibles (max : 47 µg.L^{-1}) tandis que les concentrations de SM

et de CP atteignent régulièrement plusieurs centaines de µg.L^{-1}. Les fréquences de détection et les concentrations obtenues montrent la forte variabilité de la composition médicamenteuse des EHO collectés. En effet, le BàM n'étant relié qu'à 6 chambres, la composition des effluents collectés dépend d'un nombre très réduit de patients (9 au maximum) ayant de surcroit des pathologies différentes. Les très fortes concentrations médicamenteuses relevées peuvent à nouveau être attribuées (i) au prélèvement discontinu pendant la nuit afin d'éviter la dilution des EHO par les eaux de douche et (ii) à l'origine des EHO provenant uniquement de chambres de patients.

Les concentrations en IF, CP et SM dans les EHO apparaissent logiquement bien plus élevées que celles relevées dans les EH globaux lors de précédentes études (Annexe II-1). L'ordre de grandeur est ainsi supérieur de 2 log pour le CP et SM et supérieur à 2,5 log pour l'IF (Tableau III-8). Concernant les études sur les eaux usées urbaines (EUU), le faible rapport avec les concentrations relevées dans les EHO pour le SM peut être expliqué par la concentration maximale relevée dans l'étude de Peng et al. (2006) nettement plus élevée que dans la plupart des autres études (quelques centaines de ng.L^{-1}). Les concentrations de CD détectées dans les EHO correspondent aux concentrations relevées dans les EH globaux et dans les EUU. Ceci apparaît logique car la codéine est un antidouleur largement répandu et n'est pas spécifique à l'activité du service d'oncologie.

Tableau III-8. Rapports des concentrations médicamenteuses maximales dans les EHO, les EH et les EUU.

Molécule	$[EHO_{max}]_{présente\ étude}$	$[EH_{max}]_{littérature}$		$\frac{[EHO_{max}]_{présente\ étude}}{[EH_{max}]_{littérature}}$	$[EUU_{max}]_{littérature}$		$\frac{[EHO_{max}]_{présente\ étude}}{[EUU_{max}]_{littérature}}$
CP	687	5.73	Gómez-Canela et al., 2012	120	0.143	Steger-Hartman et al., 1997	4804
IF	6820	10.647	Yin et al., 2009	640	0.029	Kümmerer et al., 1997	235172
SM	710	4.588	Kovalova et al., 2012	155	7.91	Peng et al., 2006	90
CD	47	50	Foster et al., 2007	0.9	32.295	Kasprzyk-Horder et al., 2009	1.5

Les concentrations sont exprimées en µg.L^{-1}.

A noter que la hiérarchie est respectée concernant les 2 anticancéreux puisque l'ifosfamide est de très loin l'anticancéreux le plus consommé dans le service d'oncologie et que le cyclophosphamide est troisième derrière le 5-FU.

III.2.7.2. Elimination par le BàM$_{IE}$ hôpital

III.2.7.2.1. Suivi de l'élimination des médicaments sélectionnés

Afin d'assurer la présence dans l'alimentation des médicaments sélectionnés et de pouvoir quantifier les performances du BàM$_{IE}$ sur leur élimination, les EHO recueillis dans la cuve de stockage ont été exceptionnellement dopés les jours de prise d'échantillons à des concentrations aléatoires mais connues. Le dopage des EHO est réalisé à partir de fonds de flacons récupérés la veille pour le cyclophosphamide et l'ifosfamide, de flacons neufs pour le sulfaméthoxazole et de comprimés pour la codéine. Le dopage n'est pas constant afin de conserver la spécificité fluctuante des EHO et d'étudier l'influence de la concentration initiale sur les performances du BàM$_{IE}$. Etant donné les fortes concentrations relevées en 5-FU, le dopage appliqué est conséquent (parfois supérieur à 1 mg.L^{-1}) (Tableau III-9). Il est à noter que ces compléments en médicaments sont cependant trop faibles pour influencer les performances de la biomasse. Les dopages d'IF et de CP sont bien inférieurs aux concentrations contenues dans les EHO collectés. Le dopage de la CD a été surestimé mais sa concentration totale dans l'alimentation reste faible vis-à-vis des autres médicaments. Le SM a également été surestimé mais son influence est négligée par les résultats de tests de dégradation en réacteur batch (Cf III.2.7.3.3).

Tableau III-9. Concentrations globales (EHO + dopage) des médicaments dans l'alimentation du BàM$_{IE}$.

Molécule	Jour 70		84		98		115		128	
CD	180	*100*	391	*96*	523	*96*	375	*100*	0	*0*
CP	1195	*84*	500	*100*	0	*0*	687	*0*	450	*100*
IF	1828	*82*	900	*100*	8320	*18*	1030	*97*	900	*100*
SM	58	*0*	1290	*100*	1180	*100*	1190	*42*	2000	*100*

Molécule	Jour 143		158		165		171	
CD	375	*100*	0	*0*	19	*0*	47	*0*
CP	609	*74*	272	*0*	203	*0*	388	*64*
IF	1620	*62*	3486	*26*	517	*0*	965	*26*
SM	2500	*100*	1000	*100*	729	*69*	1710	*58*

Les concentrations sont exprimées en µg.L^{-1}. Les chiffres en italique indiquent le pourcentage que représente le dopage en médicament vis-à-vis de sa concentration globale dans l'alimentation.

L'échantillon de perméat est prélevé après respect d'une durée minimale égale au TSH du $BàM_{IE}$ afin d'assurer la représentabilité des prélèvements. L'évolution des abattements des médicaments sélectionnés par le $BàM_{IE}$ sont présentés sur la Figure III-36. Ces abattements sont calculés à partir des concentrations médicamenteuses dans l'alimentation (EHO collectés + dopage) et le perméat. L'absence de points à certaines dates correspond aux concentrations nulles en entrée (absence dans les EHO et non dopage de ce médicament à cette date).

Tout comme l'épuration de la pollution conventionnelle, **l'élimination des médicaments par le $BàM_{IE}$ hôpital a connu de nombreuses fluctuations au cours de la campagne expérimentale.** Elle est systématiquement positive à l'exception du 165^{e} jour pour SM, CP et IF et au 171^{e} jour pour CD pour lesquels des concentrations supérieures à l'alimentation (EHO + dopage) ont été relevées dans le perméat suite à un changement de membrane. L'élimination des 4 médicaments semble augmenter jusqu'au jour 115, à l'exception du 98^{e} jour où l'élimination de l'IF n'est que de 22 %. Cette faible élimination apparente de l'IF à cette date correspond à sa concentration maximale détectée dans les EHO (8.32 $mg.L^{-1}$ avec le dopage). Une différence de 1.83 $mg.L^{-1}$ entre l'alimentation et le perméat est tout de même relevée indiquant que le $BàM_{IE}$ s'est montré performant mais qu'à cette très forte concentration l'ifosfamide est susceptible d'exercer une inhibition puisque son élimination ne semble plus uniquement dépendante de sa concentration initiale. Lors de cette période, le SM est toujours éliminé à plus de 96 %, la CD et le CP à plus de 67 %.

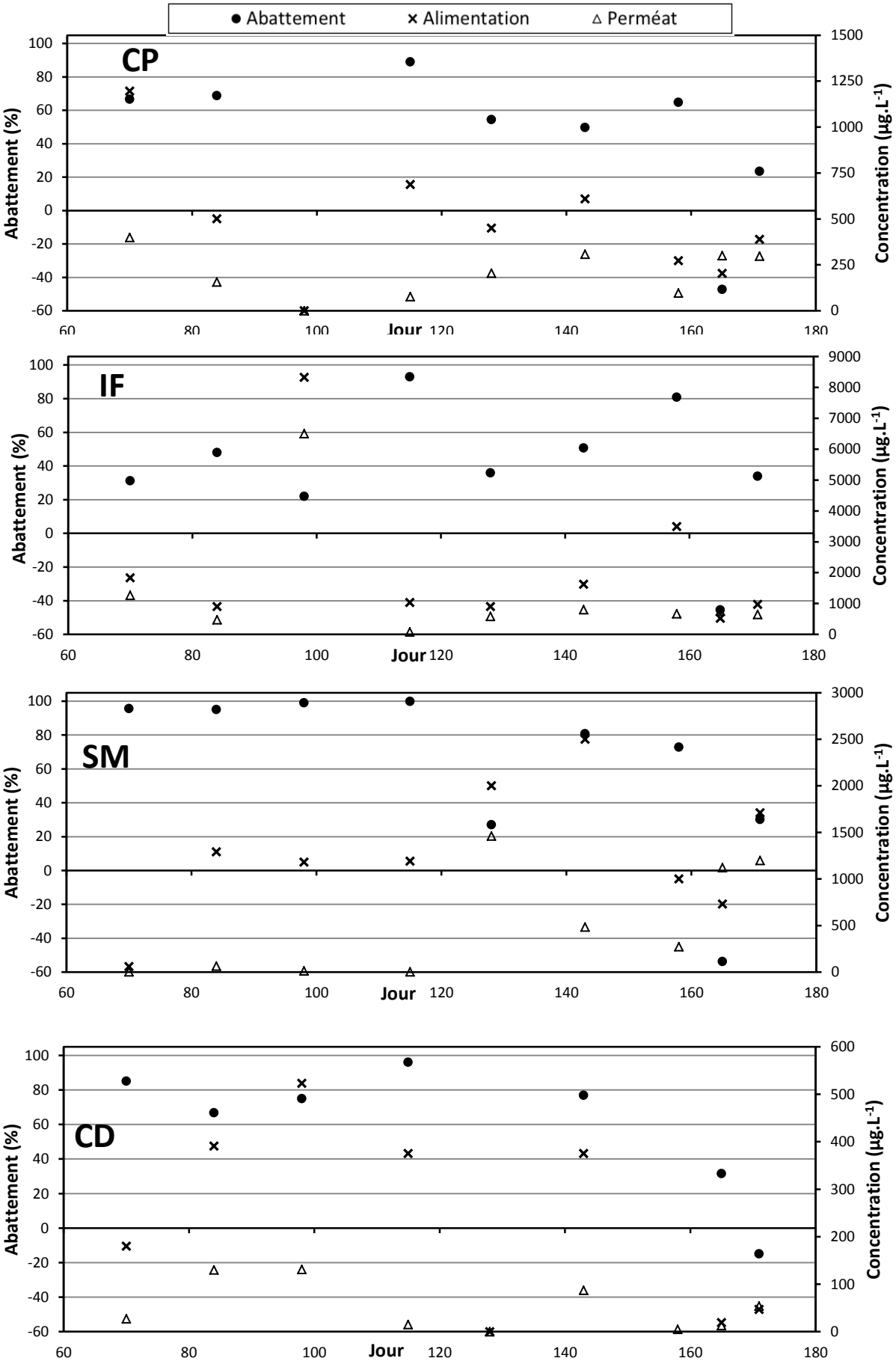


Figure III-36. Evolution de l'élimination des médicaments sélectionnés par le BàM.

Une excellente élimination globale des 4 médicaments est obtenue au jour 115, la molécule la moins bien éliminée étant le CP à 89 %. L'analyse du surnageant du réacteur à cette date a permis de constater que le taux de rétention par la membrane de la codéine, du cyclophosphamide, de l'ifosfamide et du sulfaméthoxazole présents dans le surnageant du $BàM_{IE}$ était respectivement de 81, 86, 91 et 95 % (Tableau III-10). L'analyse des 2 autres échantillons de surnageant aux 128^{e} et 143^{e} jours a **confirmé une rétention des médicaments par les membranes fibres creuses** (plus limitée toutefois).

Tableau III-10. Taux de rétention de la membrane pour les échantillons de surnageant analysés.

Date	Molécule	EHO_{global} ($\mu g.L^{-1}$)	Surnageant ($\mu g.L^{-1}$)	Abattement réacteur biologique (%)	Perméat ($\mu g.L^{-1}$)	Abattement global BàM (%)	TR médicament (%)	$R_{colmatage}$ (m^{-1})	TR DCO (%)	DCOS ($mg.L^{-1}$)
115^{e} jour	CD	375	80	78.7	15	96.0	81.3	$3.9.10^{13}$	50.9	133.6
	CP	687	552	19.7	76	88.9	86.2			
	IF	1030	809	21.5	73	92.9	91.0			
	SM	1190	57	95.2	3	99.7	94.7			
128^{e} jour	CD	< LQ	< LQ	-	< LQ	-	-	$1.3.10^{13}$	27.2	95.6
	CP	450	278	38.2	205	54.4	26.3			
	IF	900	614	31.8	578	35.8	5.9			
	SM	2000	2170	-8.5	1460	27.0	32.7			
143^{e} jour	CD	375	108	71.2	87	76.8	19.4	$6.1.10^{12}$	0	123.6
	CP	609	386	36.6	307	49.6	20.5			
	IF	1620	1010	37.7	800	50.6	20.8			
	SM	2500	1530	38.8	482	80.7	68.5			

Ces résultats sont très surprenants puisque toutes les études sur le sujet sont unanimes sur le fait que les membranes de microfiltration ou d'ultrafiltration utilisées dans les BàM ne peuvent pas retenir les molécules médicamenteuses qui sont de très petites tailles, généralement autour de 200-300 Da, et sont ainsi au moins 100 à 1000 fois plus petites que le seuil de coupure de ces membranes (Joss et al., 2005 ; Sipma et al., 2010). Aussi, dans un $BàM_{E}$ pilote, Delgado (2009) et Seira (2013) n'ont pas observé de rétention du cyclophosphamide par la membrane céramique de seuil de coupure 0.2 µm. Ce seuil de coupure correspondant environ à 400 kDa est ainsi 4 fois supérieur à celui des fibres creuses 100 kDa utilisées lors de cette campagne expérimentale. Très récemment, Zaviska et al. (2013) ont relevé jusqu'à 60 % de rétention du CP dans un BàM-NF lorsque le colmatage de la membrane de nanofiltration de seuil de coupure 600 Da est devenu plus prononcé. En

raison de l'unanimité de la communauté scientifique sur la non rétention des médicaments par les membranes de microfiltration et d'ultrafiltration utilisées dans les BàM et par souci de contrôler les coûts liés aux analyses, il avait été décidé d'effectuer seulement l'analyse de 3 échantillons de surnageant lors de cette campagne expérimentale.

L'important colmatage membranaire au 115^{e} jour semble responsable de cette forte rétention inattendue. **La rétention des médicaments par la membrane se montre en effet dépendante du colmatage** puisque les taux de rétention (TR) des médicaments les plus élevés de part et d'autre de la membrane sont obtenus le 115^{e} jour pour la résistance du colmatage à la filtration la plus importante. Cependant**, la rétention n'est pas seulement liée au colmatage** car bien que le colmatage soit plus prononcé au 128^{e} jour qu'au 143^{e} jour un TR supérieur est relevé pour le SM et l'IF au 143^{e} jour. Une rétention de 68.5 % est même obtenue pour le SM avec une membrane quasiment neuve. Ces résultats sont d'autant plus surprenants que la rétention de la DCO semble logiquement dépendante du colmatage membranaire et s'avère nulle au 143^{e} jour en raison de la résistance de colmatage très faible.

Le 115^{e} jour est situé dans une importante phase de perte de biomasse comme en témoignent l'évolution des MES mais également la concentration en DCO dans le surnageant. **Les produits microbiens solubles relargués lors de la lyse cellulaire**, dont certains avoisinent 700 kDa (Villain, 2012), **pourraient constituer des sites de sorption pour les médicaments sélectionnés.** La rétention par la membrane et son colmatage de ces produits microbiens solubles bonifierait ainsi l'élimination apparente des médicaments sélectionnés par le BàM$_{IE}$ hôpital. Cette hypothèse pourrait expliquer la forte rétention du SM au 143^{e} jour, coïncidant également avec une lyse cellulaire, malgré un colmatage de la membrane très faible. Il ne s'agit cependant que d'une piste très hypothétique en raison de la faible hydrophobicité des médicaments sélectionnés (Cf II.1.2.6) mais il se pourrait que la sorption sur les produits microbiens solubles soit caractérisée par des affinités différentes vis-à-vis de la sorption sur les flocs bactériens.

Ayant disposé des résultats des analyses médicamenteuses seulement à la fin de cette campagne expérimentale il n'a pas été possible de multiplier les analyses dans le surnageant afin d'éventuellement dégager une corrélation claire entre la rétention des médicaments et le degré de colmatage membranaire. Ces résultats montrent donc que **le colmatage des**

membranes fibres creuses utilisées, de seuil de coupure 100 kDa de 330 à 400 fois plus grand que la taille des molécules médicamenteuses sélectionnées, peut constituer un mécanisme de rétention important de ces médicaments dans le BàM$_{IE}$, voire majeur en cas de colmatage sévère. Cependant, le colmatage ne peut expliquer à lui seul les résultats obtenus puisque la rétention médicamenteuse au 143^{e} jour avec une membrane quasi neuve s'est avérée globalement plus prononcée que celle du 128^{e} jour avec une membrane modérément colmatée. **Les propriétés de la liqueur mixte, l'état physiologique de la biomasse et la nature du colmatage pourraient ainsi jouer un rôle important dans la rétention des médicaments sélectionnés.**

La rétention des médicaments par la membrane et son colmatage pourrait expliquer la concentration plus élevée du SM dans le surnageant du réacteur biologique que dans les EHO au 128^{e} jour et les abattements négatifs globaux calculés au jour 165. A cette date, l'abattement de l'ammonium est excellent mais celui de la DCO dans le surnageant du réacteur n'est que de 30 % indiquant que les capacités épuratoires des bactéries hétérotrophes sont partiellement inhibées. Les « abattements négatifs » pourraient être expliqués par l'accumulation dans le réacteur sur plusieurs jours d'importantes quantités de médicaments par la membrane et son colmatage. Au jour 165, les concentrations médicamenteuses relativement moyennes présentes dans l'alimentation se seraient avérées nettement plus faibles que celles présentes dans le surnageant du BàM$_{IE}$. Ainsi, cette différence importante de concentration entre l'alimentation et le surnageant du réacteur n'aurait pas été compensée par la rétention de la membrane et de son colmatage ce qui pourrait expliquer les concentrations plus fortes dans le perméat que celles relevées dans l'alimentation. Une sorption des médicaments sélectionnés sur les produits microbiens solubles apparaît de plus très peu probable ici en raison du bon état physiologique de la biomasse au 165^{e} jour ce qui confirmerait ces observations.

L'interprétation d'éliminations « négatives » peut parfois s'avérer complexe. Par exemple, le métabolite humain principal du SM, le N4-acetylsulfamethoxazole, a le potentiel de se retransformer en SM par les bactéries composant la biomasse épuratrice (Göbel et al., 2005 ; Lindberg et al., 2006 ; Radjenovic et al., 2009). Ainsi, la retransformation de ce métabolite en molécule mère dans le réacteur a pu causer l'augmentation de la

concentration de SM. Ce phénomène a également été observé par Kovalova et al. (2012) qui ont rapporté des éliminations « négatives » du SM et suggèrent de prendre en compte l'élimination globale du SM et du N4-acetylsulfamethoxazole pour évaluer objectivement l'élimination de ce médicament. Cette hypothèse semble toutefois peu probable dans cette étude puisque les 2 dates correspondant à une élimination « négative » du SM (au 128^{e} jour dans le surnageant et au 165^{e} jour dans le perméat) coïncident avec une concentration en médicament provenant très majoritairement du dopage des EHO, excluant ou limitant fortement la présence du métabolite dans les EHO. Ce phénomène pourrait toutefois expliquer certaines performances occasionnellement plus faibles sur l'élimination du SM.

L'étude de l'élimination de la DCO dans le surnageant et de l'ammonium ainsi que des charges massiques en DCO et ammonium aux dates correspondantes aux données disponibles sur les concentrations médicamenteuses dans le surnageant permettent de remarquer une différence de comportement selon les molécules médicamenteuses (Tableau III-11). En effet, l'abattement dans le réacteur de 78 % pour la CD et 95 % pour le SM au 115^{e} jour ne semble pas souffrir d'une inhibition des bactéries hétérotrophes, indiquée par un abattement de la DCOS inférieur à 10 %, et des faibles concentrations en DCO et ammonium des EHO. La grande quantité de SM métabolisée indique que sa biotransformation par cométabolisme n'a pas été limitée par des teneurs faibles en DCO et ammonium**. Ce résultat montre également le rôle crucial des bactéries autotrophes sur l'élimination du SM et de la CD.** A l'inverse, l'élimination dans le réacteur d'environ 20 % de CP et IF semble substantiellement altérée par cette inhibition des hétérotrophes et/ou par ces teneurs très faibles en DCO et ammonium au 115^{e} jour. Leur élimination biologique est en effet comprise entre 31 et 38 % pour les 2 autres dates coïncidant avec un meilleur abattement de la DCOS et des concentrations en DCO et ammonium respectivement 2.5 et 6 fois supérieures à celles du 115^{e} jour. **La quantité de substrat extérieur disponible pourrait ainsi jouer un rôle majeur sur la biotransformation de ces deux molécules.** Il est cependant à noter que l'élimination excellente de l'ammonium au 143^{e} jour ne soit pas associée à une élimination aussi significative du SM dans le réacteur démontrant à nouveau la grande complexité d'interaction des paramètres influençant l'élimination des médicaments. La rétention des médicaments par la membrane et son colmatage ne permet pas d'analyser l'influence des

concentrations de DCO et d'ammonium dans les EHO sur l'élimination des médicaments sélectionnés pour les dates dont les données sur le surnageant ne sont pas disponibles.

Tableau III-11. Performances sur l'élimination de la DCO dans le surnageant et de l'ammonium pour les dates sélectionnées.

Date	Molécule	Abattement Réacteur (%)	Abattement global (%)	Abattement DCOS (%)	Abattement $N\text{-}NH_4^+$ (%)	DCO_{EHO} ($mg.L^{-1}$)	$N\text{-}NH_4^+{}_{EHO}$ ($mg.L^{-1}$)
115e jour	CD	78.7	96	10	98	148	8.9
	CP	19.7	88.9				
	IF	21.5	92.9				
	SM	95.2	99.7				
128e jour	CD	-	-	76	79	409.6	61.7
	CP	38.2	54.4				
	IF	31.8	35.8				
	SM	-8.5	27				
143e jour	CD	71.2	76.8	69	96	399.6	50
	CP	36.6	49.6				
	IF	37.7	50.6				
	SM	38.8	80.7				

Une chute globale des performances de l'élimination des médicaments sélectionnés est remarquée après le 115e jour. Cette chute pourrait être attribuée à un colmatage membranaire plus faible aux dates de prélèvements qui ont suivi mais également à la biomasse qui a été affectée par les différents réensemencements causant une perte partielle des bienfaits de l'acclimatation sur la dégradation des molécules médicamenteuses. Cette dernière hypothèse pourrait être écartée pour CP et IF au regard des abattements dans le réacteur bien plus élevés aux 128e et 143e jours qu'au 115e jour. Ainsi, **la chute de l'élimination globale pourrait être attribuée en partie au fonctionnement du $BàM_{IE}$ hôpital à des degrés de colmatage moins prononcé.** Les réensemencements partiels auraient impacté l'élimination biologique du SM ce qui expliquerait sa faible élimination au 143e jour malgré des performances correctes sur la DCO et l'ammonium. L'influence du colmatage sur l'élimination apparente des médicaments a également été évaluée au 165e jour avec un changement de membrane entre la prise de l'échantillon des EHO et celui du perméat. Des concentrations supérieures à celles de l'alimentation ont été mesurées dans le perméat démontrant clairement le rôle du colmatage membranaire sur la rétention des médicaments

sélectionnés. Ces « abattements négatifs » peuvent être attribués au passage à travers les pores de la membrane non colmatée des médicaments accumulés dans le réacteur par la précédente membrane colmatée.

Le sulfaméthoxazole et la codéine sont les molécules les mieux éliminées par le $BàM_{IE}$ avec respectivement 75 et 72 % d'élimination moyenne (en supprimant les « éliminations négatives » du 165^{e} jour et 171^{e} jour) (Tableau III-12). L'élimination des 2 anticancéreux s'avère moindre avec 60 % en moyenne pour le cyclophosphamide et 49 % pour l'ifosfamide.

Tableau III-12. Synthèse des performances du $BàM_{IE}$ sur l'élimination des médicaments sélectionnés.

Molécules	Abattement (%)		
	Min	Max	Moy
Codéine	31.6 (165)	96.0 (115)	71.9
Cyclophosphamide	23.5 (171)	88.9 (115)	59.5
Ifosfamide	21.9 (98)	92.9 (115)	49.3
Sulfaméthoxazole	27.0 (128)	99.7 (115)	75.0

Les valeurs sont exprimées en %.
Le jour correspondant à l'élimination minimale ou maximale est précisé entre parenthèses.
Les éliminations négatives, résultant de changement de membrane, ont été supprimées.

L'intérêt de la représentation de l'abattement par le $BàM_{IE}$ en fonction de la concentration de l'alimentation initiale apparaît limité en raison de la rétention par la membrane et son colmatage des médicaments sélectionnés faussant les concentrations réelles des médicaments en amont de la membrane (Figure III-37).

La concentration initiale des médicaments dans les $EHO_{globaux}$ n'a ainsi pas d'effet sur leur élimination apparente par le $BàM_{IE}$ pour le CP, SM et CD puisque ceux-ci sont éliminés à un taux supérieur ou égal à leur élimination moyenne pour leur concentration initiale maximale. Seul le pic d'ifosfamide de 8.32 $mg.L^{-1}$ (EHO très élevé + dopage) correspond à l'élimination apparente la plus faible relevée sur toute la campagne (en excluant l'élimination négative du 165^{e} jour).

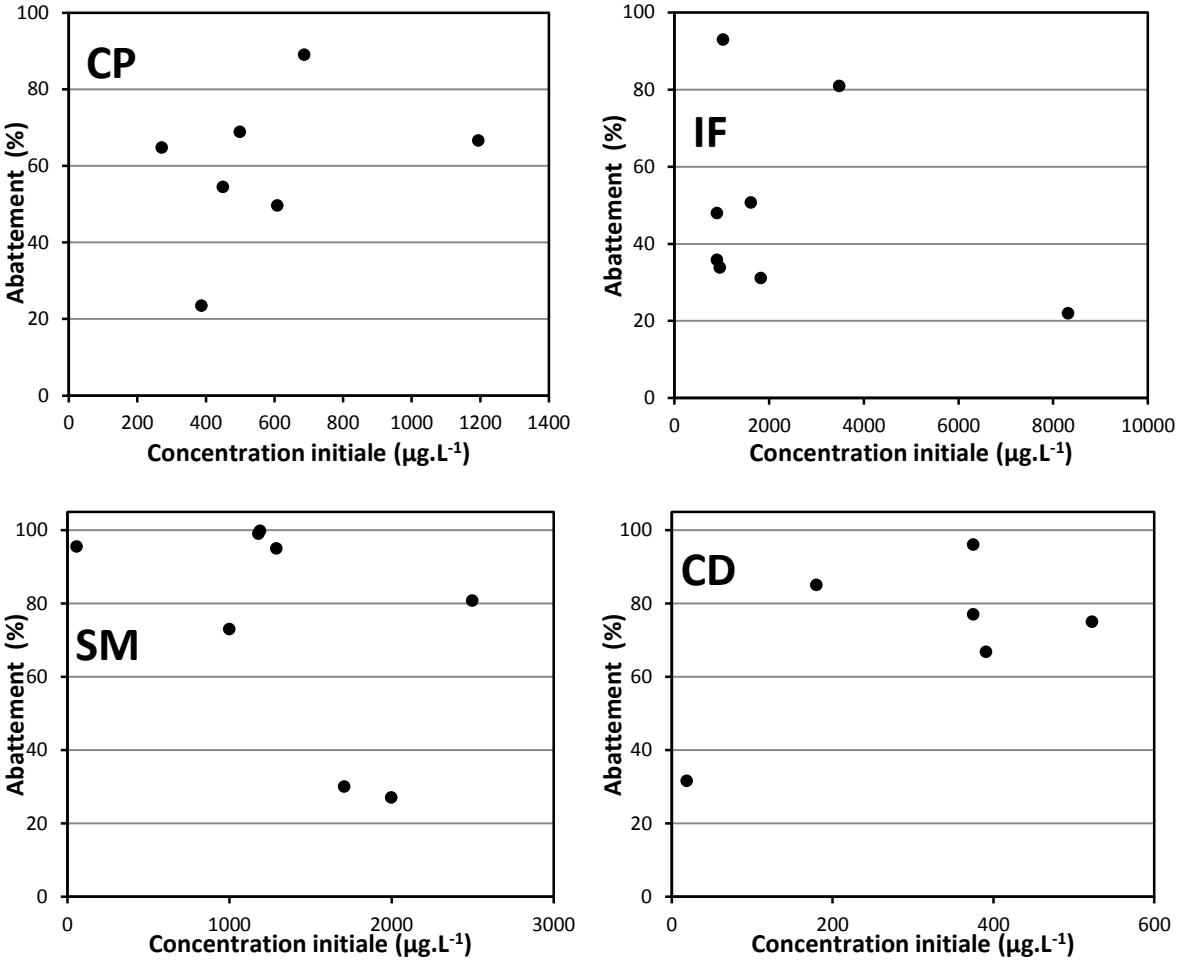


Figure III-37. Evolution de l'élimination des médicaments sélectionnés par le BàM en fonction de leur concentration dans l'alimentation.

III.2.7.2.2. Comparaison avec d'autres études

L'élimination de la CD relevée lors de cette étude rejoint l'ordre de grandeur des meilleures performances relevées dans la littérature (Wick et al., 2009 ; Rosal et al., 2010 ; Dolar et al., 2012) (Tableau III-13). A noter que ces performances ont été réalisées pour des EUU à des concentrations en codéine inférieures de 3 log à cette étude et que les 2 meilleures éliminations sont obtenues par le procédé BàM.

Tableau III-13. Elimination de la codéine dans la littérature.

Effluent	Concentrations entrée	Echelle	Procédé	Elimination	Référence
EHO	**<LQ - 523 µg.L^{-1}**	**Pilote**	**BàM$_{IE}$ 100 kDa - TSH 29 ± 8 h**	**Moyenne de 71.9%**	**Présente étude**
EUU	< LQ - 0.54 µg.L^{-1}	STEP	12 STEP - Boues activées	Moyenne de 50%	Hummel et al., 2006
EUU	18.1 - 119.7 ng.L^{-1}	STEP	5 STEP - Boues activées	De - 232 % à 83 %	Boleda et al., 2007
EUU	1732 - 32295 ng.L^{-1}	STEP	STEP 1 : Boues activées STEP 2 : Lit bactérien	STEP 1 : 37 % STEP 2 : 42 %	Kasprzyk-Horder et al., 2009
EUU	< LQ - 0.16 µg.L^{-1}	STEP	Boues activées - TSH 24 h - TSB 18 jours	81.7%	Wick et al., 2009
EUU	150 - 2087 ng.L^{-1}	STEP	Boues activées	69.3%	Rosal et al., 2010
EUU	0.055 - 0.338 ng.L^{-1}	Sur STEP	BàM$_{IE}$ 0.4 µm - TSH 12.5 h - TSB 45 jours	88%	Dolar et al, 2012

De nombreuses données sont disponibles dans la littérature concernant l'élimination du SM (Tableau III-14).

Tableau III-14. Elimination du sulfaméthoxazole dans la littérature.

Effluent	Concentrations entrée	Echelle	Procédé	Elimination	Référence
EHO	**58 - 2500 µg.L^{-1}**	**Pilote**	**BàM$_{IE}$ 100 kDa - TSH 29 ± 8 h**	**Moyenne de 75.0%**	**Présente étude**
EUU	<LQ - 145 ng.L^{-1}	Pilotes sur STEP	BàM - TSH 0.5 - 1.2 - 4 jours - TSB : 10 - 27 - 55 jours	61 - 100 - 100 %	Clara et al., 2005
EUU	390 - 1000 ng.L^{-1}	STEP	-	20%	Brown et al., 2006
EUU	0.82 ± 0.23 µg.L^{-1}	STEP	Boues activées	24%	Ternes et al., 2007
EUU	16 - 118 ng.L^{-1}	STEP	Boues activées	Entre 0 et 64 %	Xu et al., 2007
EUU	Dopage 10 µg.L^{-1}	Pilote	BàM$_{I}$ 0.04 µm- TSH 1 jour - TSB 44-72 jours	69%	Reif et al., 2008
EUU	0.25 - 1.3 µg.L^{-1}	STEP	Boues activées	73.8 ± 12.7 %	Radjenovic et al., 2009
EUU	0.25 - 1.3 µg.L^{-1}	Pilotes sur STEP	2 BàM - Fibres creuses TSH 7.2 h et Plaques TSH 15 h	78.3 ± 13.9 % (fibres creuses) - 80.8 ± 12.2 % (plaques)	Radjenovic et al., 2009
EUU	<LQ - 274 ng.L^{-1}	STEP	STEP 1 : Boues activées STEP 2 : Lit bactérien	STEP 1 : -20 % STEP 2 : 70 %	Kasprzyk-Horder et al., 2009
EUU	Dopage de 0.5 à 2 µg.L^{-1}	mini STEP	BàM - TSH > 3.4 jours TSB > 100 jours	Entre 75 et 90 %	Abegglen et al., 2009
EUU	146.5 - 355.5 ng.L^{-1}	2 STEP	Boues activées + chloration	68.2%	Li et al., 2009
EUU	Dopage	Pilote	BàMI 0.04 µm – TSB 15 et 30 jours	55 et 64 % (mais > 80 % pour certains jours)	Tambosi et al., 2010
EUU	298± 92.5 ng.L^{-1}	Pilote	BàM$_{I}$ UF- TSB > 40 jours	69.6 ± 7.3 %	Sahar et al., 2010
EUU	246 ng.L^{-1}	STEP	Boues activées	81%	Zuccato et al., 2010
EUU	-	2 STEP	Boues activées	90 % et 62 %	Li et Zhang., 2011
EH	3.476 ± 4.588 µg.L^{-1}	Hôpital	BàM$_{I}$ 150 kDa - TSH 1.7 jours - TSB 30-50 jours	7 ± 57 %	Kovalova et al., 2012
EUU	0.020 - 0.268 ng.L^{-1}	Pilote sur STEP	BàM$_{IE}$ 0.4 µm - TSH 12.5 h - TSB 45 jours	69%	Dolar et al, 2012
Synthétique	Dopage 500 µg.L^{-1}	Laboratoire	BàM - TSB = 3, 10, 30, 60 jours	88.5 - 96.9 - 99.3 - 99.5 %	Xia et al., 2012

A l'exception de quelques études concernant des procédés conventionnels à boues activées pour lesquels de faibles abattements ont été relevés (Brown et al., 2006 ; Ternes et al.,

2007 ; Kasprzyk-Horder et al., 2009), l'élimination du SM s'avère généralement supérieure ou aux alentours de 70 %. L'étude se rapprochant du présent travail, puisqu'elle concerne le traitement sur site d'EH globaux par BàM, est celle précédemment citée de Kovalova et al. (2012) qui ont relevé un abattement du SM très faible de 7 % marqué par une grande variabilité indiquant l'obtention fréquente d'élimination négative. Pourtant, la concentration initiale de l'étude de Kovalova et al. (2012) de 3.476 ± 4.588 µg.L^{-1} est de l'ordre de grandeur des autres études et est bien inférieure à celle relevée dans la présente étude. Ainsi, **les meilleures performances relevées dans la présente étude avec une élimination moyenne du SM de 75.0 % montrent la possibilité d'éliminer à un degré élevé ce médicament directement sur site.** Il convient de préciser qu'une partie de cette amélioration vis-à-vis de l'étude Kovalova et al. (2012) pourrait provenir de la méthode de dopage des EHO consistant uniquement à ajouter du SM sans son métabolite humain ayant le potentiel de se recombiner en SM au cours du traitement biologique.

Les performances les plus élevées sur l'élimination du CP ont été obtenues par Delgado (2009) et Zaviska (2013) qui ont respectivement observé jusqu'à 90 et 80 % d'élimination. Cependant, ces résultats concernent des études en laboratoire reposant sur un dopage par du CP d'eaux usées urbaines ou d'effluents synthétiques (Tableau III-15).

Tableau III-15. Elimination du cyclophosphamide et l'ifosfamide dans la littérature.

Molécule	Effluent	Concentrations entrée	Echelle	Procédé	Elimination	Référence
CP	**EHO**	**<LQ - 1195 µg.L^{-1}**	**Pilote**	**BàM$_{IE}$ 100 kDa – TSH 29 ± 8 h**	**Moyenne de 59.5%**	**Présente étude**
	EUU	2 - 11 ng.L^{-1}	STEP	Boues activées	0 %	Buerge et al., 2006
	EUU	Dopage à 5 µg.L^{-1}	Laboratoire	BàM$_{E}$ 0.2 µm - TSH 48 h – TSB 50 jours	Jusqu'à 80 % d'élimination	Delgado, 2009
	EH	0.161 ± 0.026 µg.L^{-1}	Hôpital	BàM$_{I}$ 150 kDa - TSH 1.7 jours - TSB 30-50 jours	< 20 %	Kovalova et al., 2012
	EUU	Dopage à 5 µg.L^{-1}	Laboratoire	BàM$_{E}$ 0.2 µm - TSH 36 h – TSB 20 jours	60%	Seira, 2013
	Synthétique	Dopage à 100 µg.L^{-1}	Laboratoire	BàM$_{E}$ NF 600 Da – TSH 15.4 h - TSB 40 jours	Jusqu'à 80 % d'élimination et jusqu'à 60 % de rétention	Zaviska et al., 2013
IF	**EHO**	**517 - 8320 µg.L^{-1}**	**Pilote**	**BàM$_{IE}$ 100 kDa – TSH 29 ± 8 h**	**Moyenne de 49.3%**	**Présente étude**
	EUU	<6 ng.L-1 - 29 ng.L^{-1}	STEP	-	0 %	Kümmerer et al., 1997
	EUU	1.4 - 6 ng.L^{-1}	STEP	Boues activées	0 %	Buerge et al., 2006

L'élimination moyenne de 59.5 % obtenue lors de la présente étude se situe dans l'ordre de grandeur de celle de Seira (2013), reposant aussi sur un dopage d'EUU collectées, pour des concentrations bien plus fortes en entrée. Il est notable que la seule étude ressemblant à celle-ci, par l'aspect de traitement par BàM des effluents hospitaliers directement sur site, ait relevé une élimination inférieure à 20 % du CP (Kovalova et al., 2012). Il convient de préciser que leur étude s'est focalisée sur le traitement des EH globaux résultant en une concentration d'entrée moyenne en CP de 0.161 ± 0.026 $\mu g.L^{-1}$ s'avérant ainsi de 3 à 6 log plus faible par rapport à la présente étude. Zaviska et al. (2013) ont également observé une rétention du CP par leur membrane de NF atteignant jusqu'à 60 % permettant une élimination maximale de 80 % par leur BàM-NF. Ainsi, dans la présente étude, **le colmatage sévère de la membrane au 115^{e} jour a permis d'obtenir la meilleure élimination recensée du CP à 88.9 % pour un BàM traitant un effluent réel sur site.**

Une élimination de l'IF par STEP conventionnelle à boues activées n'a pas été observée dans la littérature. **L'élimination moyenne obtenue lors de cette étude de 49.3 % est à notre connaissance le premier résultat positif à ce jour concernant l'élimination de l'anticancéreux le plus utilisé dans le service d'oncologie de l'étude.**

Les performances épuratoires moyennes relevées sur les médicaments sont en accord avec la littérature pour la CD, le SM et le CP. Il est remarquable que ces performances aient été réalisées en traitant les EHO dont les effets inhibiteurs sur la croissance bactérienne et sur la constance des performances épuratoires ont été démontrés. De plus**, le BàM$_{IE}$ hôpital a été capable de dégrader ces médicaments présents à des concentrations très élevées, de plusieurs log dans certains cas, vis-à-vis des précédentes études relevées dans la littérature. Ces résultats justifient à la fois la stratégie du traitement sur site émetteur permettant de traiter un effluent très concentré en médicaments ainsi que le choix du procédé BàM permettant à la fois d'améliorer l'élimination biologique des médicaments sélectionnés et de retenir physiquement une fraction importante de la concentration résiduelle médicamenteuse par la membrane en cas de colmatage prononcé.**

III.2.7.3. Mécanismes d'élimination des médicaments sélectionnés

Des tests de dégradation en réacteur batch sont effectués afin de différencier la part des deux mécanismes d'élimination liés à la biomasse épuratrice : la sorption et la biotransformation. Ces tests doivent permettre de conclure si l'élimination apparente dans le $BàM_{IE}$ est principalement liée à un transfert de pollution de la phase liquide vers la phase solide ou s'il s'agit plutôt de leur métabolisation par les bactéries de la biomasse épuratrice. Enfin, ces tests sont également réalisés avec des boues activées provenant de la STEP municipale de Rousset afin de quantifier le gain apporté par l'acclimatation de boues activées aux EHO.

Préalablement aux tests de sorption, il est nécessaire de déterminer la technique d'inhibition des boues activées la plus appropriée à la réalisation de ces tests**. La technique retenue doit permettre une inhibition totale du mécanisme de biotransformation et la préservation de l'intégrité structurelle des boues activées.**

III.2.7.3.1. Détermination de la technique d'inhibition des boues activées appropriée pour la réalisation des tests de sorption

Plusieurs techniques d'inhibition issues de précédentes études ont été évaluées. Ces techniques emploient différents modes d'action : chimique (NaN_3, Hg_2SO_4, $HgCl_2$) thermique, purge par gaz. Les techniques ont été évaluées sur leur capacité à inhiber la respiration des boues activées et sur leur impact sur la structure de la biomasse. La viscosité apparente, le diamètre médian D_{50} des flocs bactériens ainsi que la turbidité du surnageant ont été sélectionnés pour quantifier l'impact des techniques d'inhibition testées sur la structure des boues activées.

L'influence de la concentration en NaN_3 sur la viscosité apparente des boues activées a été mise en évidence lors de tests préliminaires (Annexe III-1). Ainsi, les plus faibles concentrations en inhibiteur chimique permettant une inhibition totale de la respiration des boues activées ont dans un premier temps été déterminées (Annexe III-1) : 100 $mg.gMES^{-1}$ pour Hg_2SO_4 et 30 $mg.gMES^{-1}$ pour $HgCl_2$. Un seuil a été observé pour l'azoture de sodium puisque l'augmentation de la concentration au-delà de 200 $mg.gMES^{-1}$ n'a pas permis de dépasser 90 % d'inhibition du SOUR des boues activées. La concentration de 200 $mg.gMES^{-1}$ en NaN_3 a été retenue pour la suite des tests mais l'utilisation de l'azoture de sodium pour la

réalisation la réalisation de tests de sorption s'avère d'ores et déjà non neutre car l'inhibition complète n'est pas assurée. De plus, l'azoture de sodium a causé une augmentation notable de la conductivité (de 854 µS.cm^{-1} à 3240 µS.cm^{-1}) pouvant fausser les interactions électrostatiques de sorption tandis que les autres techniques d'inhibition testées n'ont pas exercé d'effet sur le pH et la conductivité. NaN_3 a néanmoins été conservé pour la suite des tests puisque ce réactif a été utilisé dans de nombreuses études pour déterminer la sorption de polluants.

L'impact des 5 techniques d'inhibition retenus a été mesuré sur la viscosité apparente des boues (Figure III-38), la turbidité du surnageant des boues (Figure III-39) et le diamètre médian D_{50} des flocs bactériens (Tableau III-16).

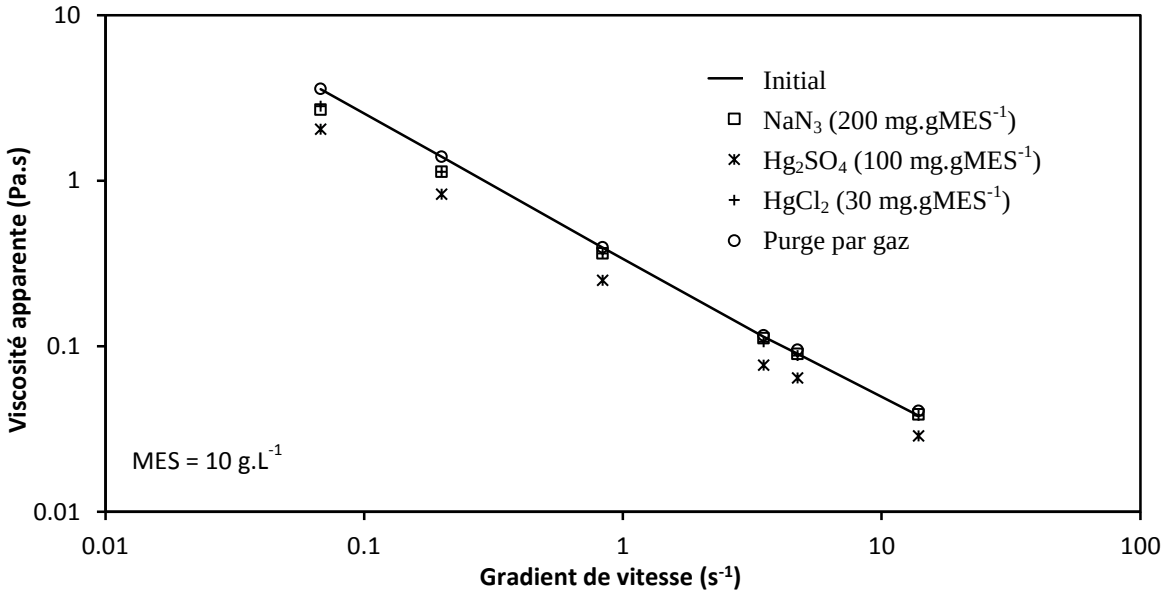


Figure III-38 : Comportement rhéologique des boues activées inhibées aux concentrations optimales en inhibiteurs chimiques et par la technique de la purge par gaz.

Aux faibles gradients de vitesse, une diminution de la viscosité apparente par rapport aux boues activées non inhibées est engendrée par les 3 inhibiteurs chimiques. Celle-ci est plus prononcée pour le sulfate de mercure. Les paramètres de la loi d'Ostwald associés sont indiqués en Annexe III-1. La technique de purge par gaz est la seule permettant de conserver intact les propriétés rhéologiques des boues activées. Cependant, il s'avère nécessaire de contrôler le débit de gaz puisqu'une défloculation a été observée à partir de $3L_{N2}.min^{-1}$ (Annexe III-1).

A noter que la viscosité apparente des boues inhibées par la technique d'inhibition thermique n'a pu être représentée sur la Figure III-38 en raison de l'incapacité rencontrée par le dispositif expérimental à mesurer la contrainte associée aux gradients de vitesses en régime laminaire. En effet, la boue séchée et broyée n'a pas du tout pu être re-solubilisée dans le surnageant, formant ainsi 2 phases distinctes (décantation immédiate sans agitation). La technique d'inhibition thermique cause donc un effet irréversible sur la structure de la biomasse.

La quantification du degré de défloculation induit par les différentes techniques d'inhibition est affiné par la mesure de la turbidité du surnageant après centrifugation à 2000 $tr.min^{-1}$ pendant 2 min d'après le protocole établi par Wilén et al. (2004) (Figure III-39).

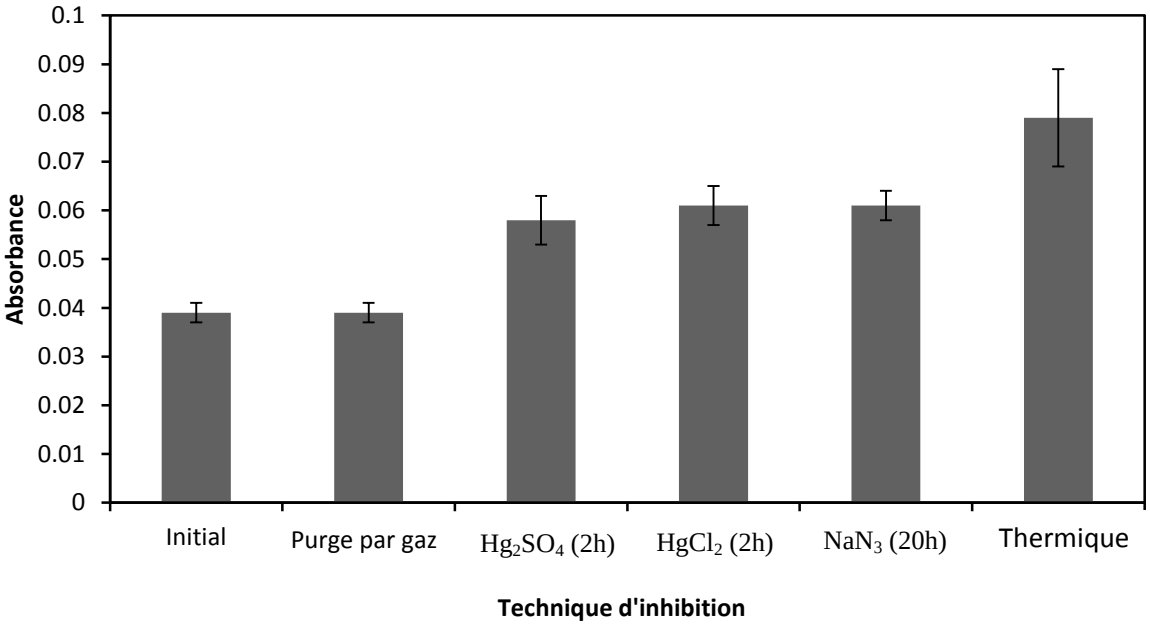


Figure III-39 : Turbidité du surnageant de la biomasse initiale et inhibée.

Les résultats sont en accord avec les mesures rhéologiques. Les inhibiteurs chimiques entraînent une défloculation identique tandis que la purge par gaz n'a induit aucun effet. A l'inverse, l'inhibition thermique a provoqué la défloculation la plus importante de toutes les techniques d'inhibition testées. Ce degré élevé de défloculation provient, à nouveau, de l'incapacité à solubiliser les boues séchées et broyées dans le surnageant. La centrifugation effectuée conformément au protocole pour mesurer la turbidité du surnageant n'est pas suffisamment rapide pour lier les matières solides.

Les mesures du diamètre médian (D_{50}) des flocs bactériens par granulométrie laser montrent que les 3 inhibiteurs chimiques induisent une réduction du D_{50} même si celui-ci est plus limité pour NaN_3 que pour les inhibiteurs de mercure (Tableau III-16).

Tableau III-16- : D_{50} des boues activées initiales et inhibées.

Technique d'inhibition	D_{50} (µm)*	Diminution du D_{50} (%)
Initial	87.3 ± 2.1	-
Purge par gaz	86.6 ± 1.6	0.8
NaN_3	81.8 ± 2.4	6.3
$HgCl_2$	74.5 ± 1.1	14.7
Hg_2SO_4	69.8 ± 2.5	20.1
Thermique	118.7 ± 31.4	-36.0

* Moyennes et écarts types calculés à partir de 3 mesures.

La méthode thermique exerce à nouveau un impact radical sur la distribution de la taille des flocs, principalement dû aux étapes de broyage et de re-solubilisation des boues séchées. La grande variabilité du D_{50} obtenu après application de l'inhibition thermique montre le manque d'homogénéité obtenu par le broyage. Enfin, la technique de purge par gaz n'a une nouvelle fois pas eu d'impact. Cette technique permet donc de conserver l'intégrité structurelle de la biomasse.

Des tests de dégradation de DCO et d'ammonium ont été réalisées pour les boues inhibées par les 5 techniques évaluées (Annexe III-1). Les inhibiteurs chimiques ont tous provoqué une lyse cellulaire caractérisée par une augmentation de la DCO du milieu. La DCO n'a pas été éliminée par la technique de purge par gaz mais une légère élimination de l'ammonium a été observée. Cette élimination de l'ammonium est attribuée à une interaction avec le gaz utilisé (diazote) puisque le test a été effectué sans injection d'air et sans oxygène libre ou lié dans la liqueur mixte. Ainsi, il est important d'utiliser un gaz neutre ne réagissant pas avec le polluant étudié.

La technique de la purge par gaz est la seule n'ayant induit aucun effet sur la structure de la biomasse. Les propriétés initiales des boues activées sont ainsi préservées après injection d'azote dans le bioréacteur. De plus, cette inhibition est très facile à mettre en œuvre et l'état d'inhibition est immédiatement atteint puisque la concentration en oxygène dissous devient quasi-instantanément nulle. Seul le débit d'azote doit être contrôlé afin de limiter la

défloculation des boues activées. Ce paramètre ne constitue toutefois pas un facteur limitant puisqu'un faible débit suffit à rapidement chasser l'oxygène du milieu. Néanmoins, une réaction entre le gaz et le composé d'intérêt, telle qu'observée entre l'ammonium et l'azote, peut se produire et fausser le test de sorption. Il est ainsi indispensable d'éviter toute réaction avec le composé cible. Le moyen le plus simple pour éviter toute réaction consisterait simplement à **effecteur le test de sorption en conditions anaérobie sans injection de gaz.** En effet, la technique de la purge par gaz consiste seulement à supprimer l'oxygène dissous du système après avoir supprimer l'oxygène lié, donc à appliquer des conditions anaérobie. Au cours du test de sorption, l'agitation requise pour homogénéiser la liqueur mixte peut conduire à un échange d'oxygène entre l'air ambiant et la surface de la liqueur mixte. Il est donc nécessaire de contrôler la concentration nulle en oxygène dissous pour empêcher le mécanisme de biotransformation.

Il convient de préciser que les bactéries anaérobies ne sont pas inhibées par la technique de la purge par gaz. La fraction de bactéries anaérobies dans les boues activées peut être considérée négligeable car les bactéries sont en contact permanent avec de l'oxygène libre ou lié dans les STEP. L'inhibition de boues activées aérobie peut ainsi être effectuée par la mise en place de conditions anaérobie. Des interprétations plus étoffées sont disponibles en Annexe III-1 (Hamon et al., 2014).

III.2.7.3.2. Sorption

La part d'élimination des médicaments sélectionnés due au mécanisme de sorption a été évaluée pour les boues du $BàM_{IE}$ hôpital et de la STEP municipale de Rousset. Les tests de sorption ont été réalisés sur 4 h puisque cette durée permet d'atteindre l'équilibre de sorption de l'ifosfamide et du cyclophosphamide quelle que soit l'origine des boues activées (Seira, 2013). L'équilibre de sorption du sulfaméthoxazole est atteint en 2 h (Yang et al., 2011) et il n'y a pas de données disponibles concernant la codéine. A partir de boues filtrées à l'aide de filtres à café, de l'eau distillée est utilisée pour la mise en solution des boues filtrées afin de ne pas utiliser le surnageant du $BàM_{IE}$ hôpital susceptible de contenir les médicaments sélectionnés à des concentrations non négligeables pouvant fausser les résultats. La concentration en MES des boues activées est ramenée à 4 $g.L^{-1}$. Les tests de sorption ont été réalisés en cocktail médicamenteux à 4 concentrations initiales différentes.

Les fonds de flacons récupérés ayant subi une légère dégradation, quelques écarts ont été observés par rapport aux concentrations initiales souhaitées de 100 – 250 – 500 et 1000 $\mu g.L^{-1}$ mais l'ordre de grandeur et le facteur de concentration (1 – 2.5 – 5 et 10) sont respectés. Ainsi, les résultats sont représentés en fonction de ce facteur de concentration pour faciliter la clarté mais les abattements et les valeurs de K_D sont calculés à partir des concentrations initiales réelles. Conformément aux résultats précédents, les boues activées ont été placées en conditions anaérobie et le cocktail médicamenteux a été réalisé à partir d'eau désoxygénée par du diazote avant l'introduction des médicaments et la prise de l'échantillon initial. Les tests de sorption ont été réalisés dans des flacons en verre brun fermés de 200 mL remplis intégralement et faiblement agitées pour assurer un mélange homogène et empêcher toute décantation. L'oxygène dissous a été contrôlé à une valeur nulle une fois par heure durant les tests.

La sorption des médicaments sélectionnés apparaît relativement faible pour les molécules anticancéreuses sur les boues du $BàM_{IE}$ hôpital et de la STEP municipale puisqu'elle s'avère inférieure à 10 % (Figure III-40). Bien que sa sorption reste très faible, l'ifosfamide semble avoir davantage d'affinités de sorption que le cyclophosphamide, ce qui est en cohérence avec les résultats de Seira (2013). **Le sulfaméthoxazole est davantage éliminé que les anticancéreux pour les deux types de boues mais sa sorption reste limitée puisque son élimination atteint un maximum de 13 % pour le $BàM_{IE}$ hôpital. La codéine semble avoir des affinités de sorption bien plus prononcées puisque son élimination par sorption atteint jusqu'à 30 % pour les boues de STEP.** Quelles que soient les boues utilisées, la sorption des médicaments a tendance à diminuer avec l'augmentation de sa concentration initiale en raison d'un nombre constant de sites de sorption sur les flocs bactériens pour une plus grande quantité de polluant. A noter qu'un problème analytique a empêché de quantifier la sorption de la codéine sur les boues du $BàM_{IE}$ hôpital.

L'élimination apparente du cyclophosphamide, de l'ifosfamide et du sulfaméthoxazole dans le $BàM_{IE}$ hôpital peut donc être quasi-intégralement attribuée à biotransformation et à la rétention par la membrane.

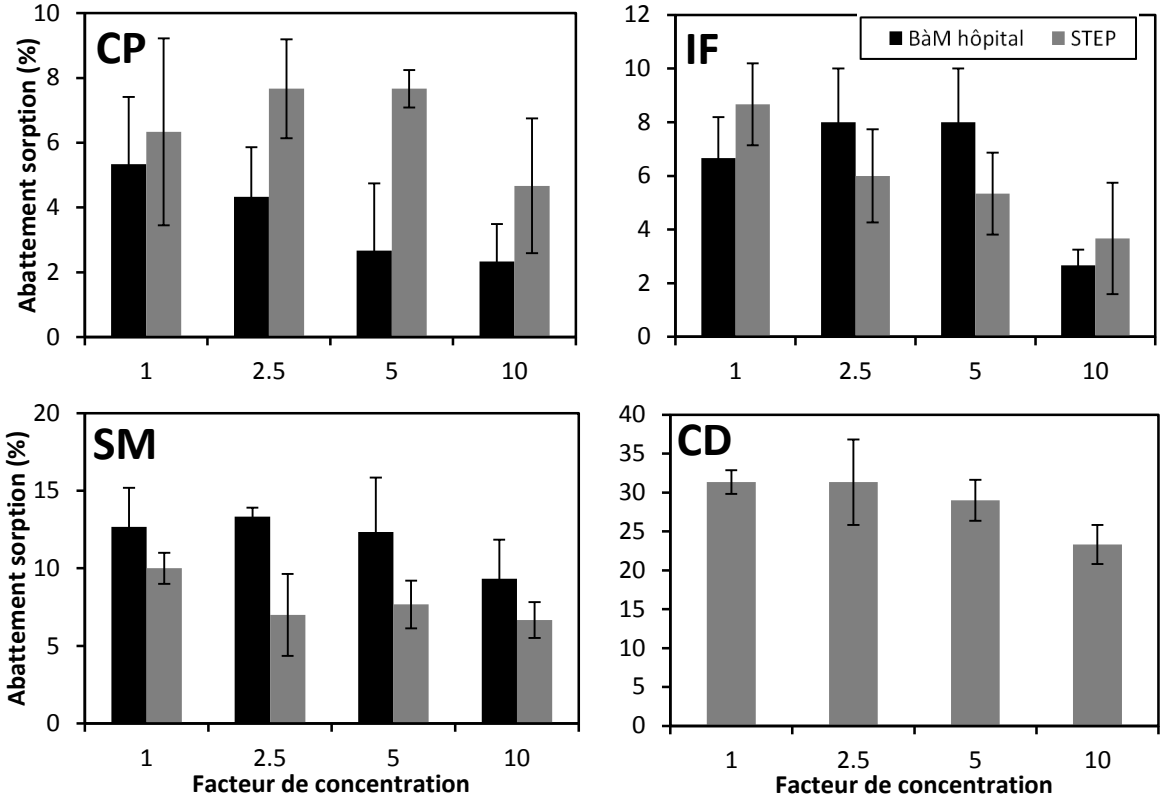


Figure III-40. Elimination des médicaments sélectionnés dus à la sorption par les boues du $BàM_{IE}$ hôpital et de la STEP municipale de Rousset.

Bien que le transfert de pollution de la phase liquide vers les boues apparaisse limité les concentrations médicamenteuses très fortes des EHO peuvent impliquer des quantités non négligeables de médicaments sorbés sur les boues du $BàM_{IE}$ hôpital. Ces quantités, calculées à partir des concentrations moyennes relevées dans les EHO (sans dopage) et des facteurs de concentration correspondant, montrent que l'ifosfamide et le sulfaméthoxazole pourraient être présents dans des concentrations importantes et à prendre en compte pour le choix de la filière appropriée de traitement des boues en excès (Tableau III-17).

Tableau III-17 : Quantité de médicaments adsorbée sur les boues activées.

Molécule	EHO_{moyen} ($\mu g.L^{-1}$)	FC correspondant	Abattement correspondant (%)	Quantité relative de médicament adsorbé ($\mu g.gMES^{-1}$)
CD	26	1	31.3 (STEP)	2
CP	290	2.5	4.3	3
IF	1664	10	2.7	11
SM	422	5	12.3	13

L'évolution des coefficients de distribution K_D en fonction du facteur de concentration est logiquement identique à celle de l'abattement par sorption (Figures III-41). De faibles coefficients de distribution K_D sont associés aux médicaments sélectionnés. En effet, **K_D est inférieur à 40 L.kgMES^{-1} pour CP, IF et SM et inférieur à 120 L.kgMES^{-1} pour la CD en STEP municipale.** Joss et al. (2005) affirment que pour une valeur de K_D inférieure à 300 L.kgMES^{-1} la sorption d'un composé est négligeable et son élimination peut simplement être évaluée par les concentrations d'entrée et de sortie. Ternes et al. (2004) fixent quant à eux une valeur seuil de 500 L.kgMES^{-1} pour considérer la sorption comme un mécanisme d'élimination non négligeable. Si cela apparaît justifié pour les 2 molécules anticancéreuses, la sorption du SM représente plus de 10 % de l'élimination pour les boues du $BàM_{IE}$ hôpital et surtout celle de la CD permet une élimination supérieure à 30 % de la phase liquide. Ces observations rejoignent celles de Seira (2013) précisant que **les faibles valeurs de K_D ne peuvent être systématiquement ignorées en raison de l'élimination parfois significative due à la sorption.** Il propose de préciser les concentrations en particules associées à toute suggestion de valeur de K_D limite à partir de laquelle la sorption peut être considérée négligeable.

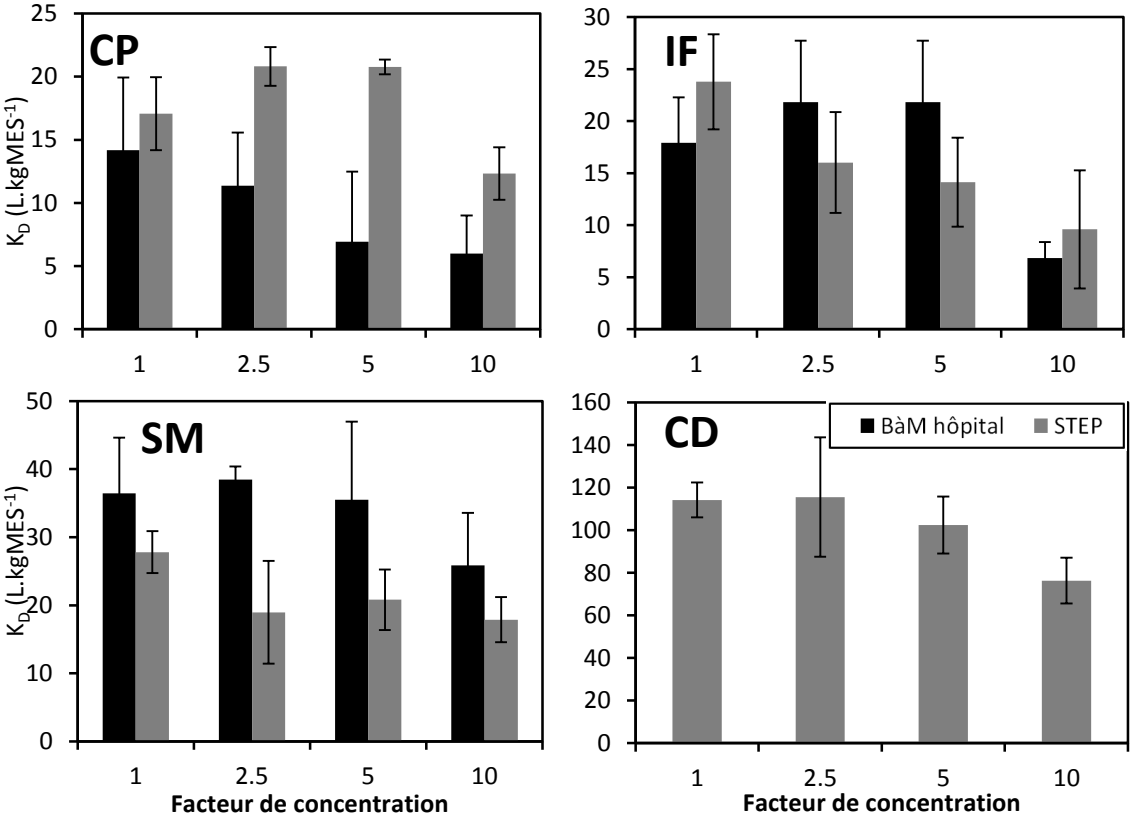


Figure III-41. Valeurs des coefficients de distribution K_D des médicaments sélectionnés pour les boues du $BàM_{IE}$ hôpital et de la STEP municipale de Rousset.

La sorption du CP, de l'IF et du SM s'est avérée être du même ordre de grandeur pour les deux types de boues activées testées. La nature des boues aurait pu avoir une influence importante sur les affinités de sorption d'un composé mais ne s'est pas révélée déterminante entre les boues du $BàM_{IE}$ hôpital et de la STEP de Rousset, probablement en raison de la configuration identique de BàM et de l'origine des boues du $BàM_{IE}$ hôpital qui proviennent de la STEP de Rousset. Une comparaison inter études s'avère compliquée en raison des différences de conditions opératoires et de la nature des boues (Tableau III-18).

Tableau III-18. Valeurs de K_D des médicaments sélectionnés observées dans de précédentes études.

Molécule	K_D (L.kgMES^{-1})	Types de boues	Technique d'inhibition	Référence
CD	**-**	**$BàM_{IE}$ TSB infini**	**Anaérobie**	**Présente étude**
	102.1 ± 8.9	**STEP $BàM_{IE}$**	**Anaérobie**	**Présente étude**
	Sorption trop faible pour être quantifiée	primaire - secondaire faible TSB - secondaire long TSB	Les boues sont "légèrement congelées" puis stérilisées à 103 °C pendant 3 h	Hörsing et al., 2011
	14 ± 1	STEP classique	Azoture de sodium 0.2 % (v/v)	Wick et al., 2009
CP	**9.6 ± 3.8**	**$BàM_{IE}$ TSB infini**	**Anaérobie**	**Présente étude**
	17.7 ± 4.0	**STEP $BàM_{IE}$**	**Anaérobie**	**Présente étude**
	15 - 12 - 0 – 47 - 20 - 32	BàMI - STEP classique - Epaississeur - STEP classique - BàME - STEP classique	Purge par gaz	Seira (2013)
	794.28	$BàM_E$	Thermique	Delgado (2009)
	2.4 ± 0.5	STEP	Purge par gaz	Ternes et al., 2004
	log K_D environ 3.2 --> K_D = 1600	Boues primaires	-	Okuda et al., 2009
IF	**17.1 ± 2.1**	**$BàM_{IE}$ TSB infini**	**Anaérobie**	**Présente étude**
	15.9 ± 0.6	**STEP $BàM_{IE}$**	**Anaérobie**	**Présente étude**
	22-71-7-87-55-63	BàMI - STEP classique - Epaississeur - STEP classique - BàME - STEP classique	Purge par gaz	Seira (2013)
	1.4 ± 0.4	STEP	Purge par gaz	Ternes et al., 2004
SM	**34.1 ± 7.3**	**$BàM_{IE}$ TSB infini**	**Anaérobie**	**Présente étude**
	21.4 ± 2.0	**STEP $BàM_{IE}$**	**Anaérobie**	**Présente étude**
	256 ± 169	STEP classique	Congélation	Göbel et al., 2005
	3.2 ± 4.5 - 77 ± 60 - 60 ± 49 - 63 ± 42	Boues primaires - secondaires - BàM plaques - BàM fibres creuses	Congélation	Radjenovic et al., 2009
	40 ± 13 - 50 ± 13	BàM	-	Abbeglen et al., 2009
	320 - 370 - 280	Boues primaires - secondaires long TSB secondaires faible TSB	Les boues sont "légèrement congelées" puis stérilisées à 103 °C pendant 3 h	Hörsing et al., 2011
	<30	primaire - et 2 secondaires différentes	Lyophilisation et séchage thermique	Stevens-Garmon et al., 2011
	28.6 ± 1.9	STEP classique	Azoture de sodium 1 g.L^{-1}	Yang et al., 2011

Les coefficients de K_D des 2 anticancéreux (CP et IF) relevés dans la littérature sont généralement faibles (Seira, 2013 ; Ternes et al., 2004). Les valeurs de K_D élevées pour CP de 794.3 L.kgMES^{-1} (Delgado, 2009) et de 111.4 L.kgMES^{-1} (Zaviska, 2013) pourraient être dues à la technique thermique d'inhibition utilisée qui déstructure complètement la biomasse (Hamon et al., 2014). Seira (2013) obtient, pour des boues activées issues d'un $BàM_I$ pilote,

des résultats fortement similaires à cette étude avec un K_D de 15 L.kgMES^{-1} pour CP et de 22 L.kgMES^{-1} pour IF. A noter que l'étude de Seira relève la sorption la plus prononcée de CP et IF pour des boues de BàM$_E$ qu'ils attribuent en partie à la taille des flocs plus petite offrant davantage de sites de sorption aux composés.

Les coefficients K_D du SM relevés dans la littérature apparaissent très disparates puisque compris entre 3.2 et 370 L.kgMES^{-1}. Ces différences pourraient être liées à la nature des boues activées et aux techniques d'inhibition employées mais également à la photosensibilité du SM (Hörsing et al., 2011) qui peut être écartée dans la présente étude en raison de l'utilisation de flacons en verre brun pour la réalisation des tests de sorption. Les valeurs moyennes observées dans cette étude de 34.1 L.kgMES^{-1} pour le BàM$_{IE}$ hôpital et de 21.4 L.kgMES^{-1} pour la STEP de Rousset sont du même ordre de grandeur que les K_D relevés dans les études de Abbeglen (2009) pour des boues de BàM et de Yang et al. (2011) pour des boues de STEP classique. Un écart important est observé pour les valeurs de K_D obtenues pour la CD. Cette différence pourrait à nouveau être due aux techniques d'inhibition employées et/ou à la nature des boues activées. Il convient également de préciser que la sorption évaluée dans cette étude est compétitive puisque les médicaments ont été ajoutés en cocktail tandis que les résultats de certaines études de la littérature concernent des valeurs de sorption de composés seuls.

Bien que la sorption des médicaments sélectionnés ne puisse pas totalement être négligée elle s'avère être un mécanisme d'élimination mineur pour les boues du BàM$_{IE}$ hôpital à l'exception de la codéine qui pourrait être éliminée par sorption dans des proportions importantes, de l'ordre de 30 %.

III.2.7.3.3. Biotransformation

Des cinétiques de dégradation des médicaments sélectionnés ont été réalisées dans des flacons en verre brun aérés sur 4 h avec les boues du $BàM_{IE}$ hôpital et des boues de la STEP municipale de Rousset. Similairement aux tests de sorption, la concentration en MES des boues activées est ramenée à 4 $g.L^{-1}$ à l'aide de filtres à café. De l'eau distillée est utilisée pour la mise en solution des boues filtrées. Les concentrations initiales des cocktails médicamenteux sont identiques aux tests de sorption à savoir proches des concentrations souhaitées de 100 – 250 – 500 et 1000 $\mu g.L^{-1}$ et permettent de respecter le facteur de concentration : 1 – 2.5 – 5 et 10.

Une amélioration très nette de l'élimination totale des 4 médicaments a été observée avec les boues du $BàM_{IE}$ hôpital (Figure III-42).

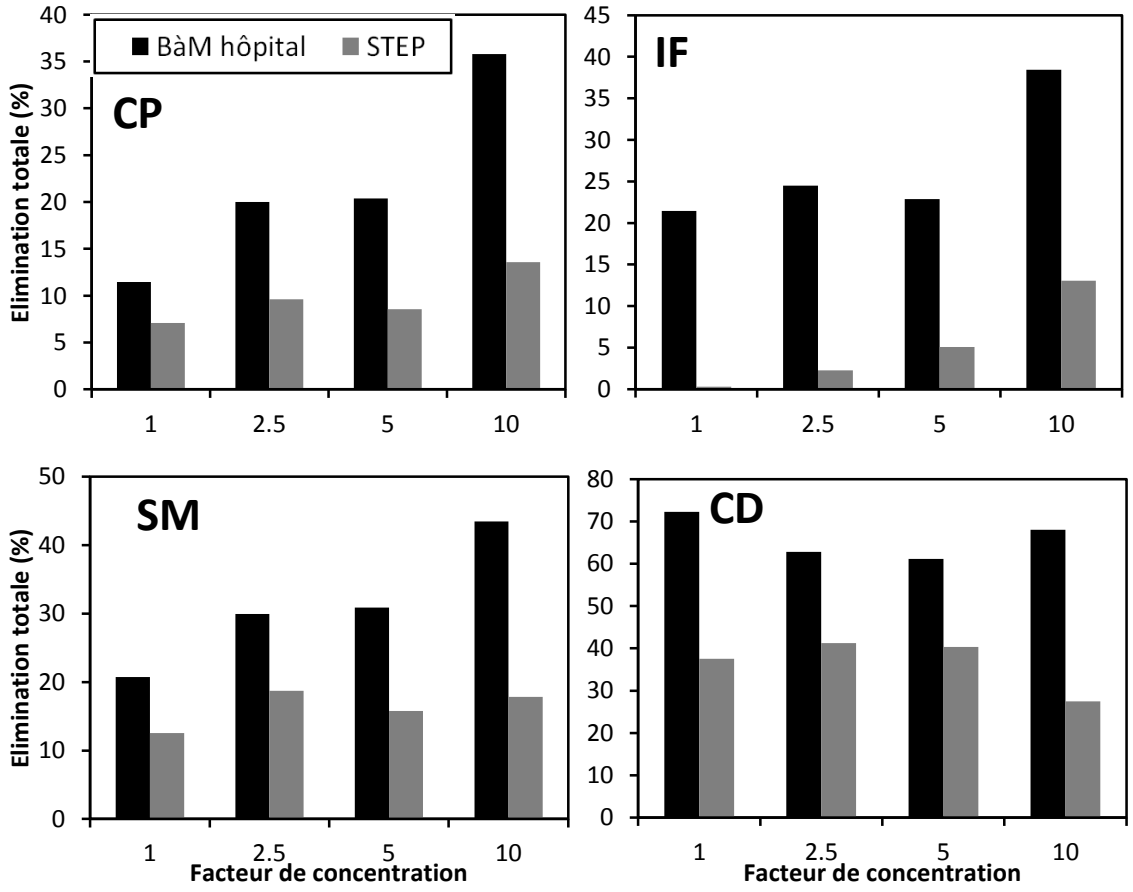


Figure III-42. Elimination des médicaments sélectionnés par les boues du $BàM_{IE}$ hôpital et de la STEP municipale de Rousset sur 4 h.

Hormis pour la codéine, très bien éliminée quel que soit le facteur de concentration, l'élimination totale des médicaments semble augmenter avec leur concentration initiale pour les boues du $BàM_{IE}$ hôpital. A l'inverse et à l'exception de l'ifosfamide, elle semble stagner pour les boues de la STEP municipale lorsque la concentration initiale augmente.

Les résultats obtenus ici en dopage batch s'avèrent pertinents pour justifier certaines hypothèses avancées sur l'influence du dopage exceptionnel réalisé dans le $BàM_{IE}$. L'amélioration de l'élimination totale des médicaments sélectionnés en fonction de leur concentration initiale indique que le « dopage » exceptionnel effectué dans le $BàM_{IE}$ hôpital les jours de prélèvement a eu une influence négligeable sur les performances générales de la biomasse. En effet, la concentration maximale ajoutée dans les EHO est de 2500 $\mu g.L^{-1}$ en SM au jour 143 ce qui revient à une injection continue de 0.08 $mg.h^{-1}$ sur 2 jours. L'ajout de 1 $mg.L^{-1}$ de SM ici dans le réacteur batch le plus concentré équivaudrait à un débit d'alimentation de 0.25 $mg.h^{-1}$ sur les 4 h du test et s'avère donc 3 fois plus important que dans le BàM. De plus, cet ajout n'a pas été effectué en continu mais en une seule fois ce qui aurait pu être encore plus toxique pour la biomasse. Une inhibition sur le long terme sur le BàM peut être exclue en raison du changement des EHO tous les 2 jours.

Des capacités de biotransformation ont été développées par la biomasse du $BàM_{IE}$ hôpital alors que pour les boues de la STEP municipale de Rousset l'élimination des médicaments sélectionnés est principalement due au mécanisme de sorption comme l'indique le rapport $\frac{Biotransformation}{Sorption}$ inférieur à 1 (Tableau III-19).

Tableau III-19. Elimination des médicaments sélectionnés par les 2 types de boues sur 4 h. *

Molécule	$BàM_{IE}$ hôpital				STEP municipale de Rousset			
	Totale (%)	Biotrans formation (%)	Sorption (%)	$\frac{Biotransformation}{Sorption}$	Totale (%)	Biotrans formation (%)	Sorption (%)	$\frac{Biotransformation}{Sorption}$
CD	66.1 ± 5.1	-	-	-	36.6 ± 6.3	7.9	28.7 ± 3.8	0.3
CP	21.9 ± 10.1	18.2	3.7 ± 1.4	4.9	9.7 ± 2.8	3.1	6.6 ± 1.4	0.5
IF	26.8 ± 7.9	20.5	6.3 ± 2.5	3.2	5.2 ± 5.6	-0.7	5.9 ± 2.1	sorption seule
SM	31.3 ± 9.4	19.4	11.9 ± 1.8	1.6	16.2 ± 2.7	8.4	7.8 ± 1.5	1.1

*Les valeurs correspondent aux éliminations moyennes calculées à partir des 4 facteurs de concentrations.

Conformément aux données de la littérature la biotransformation des 2 anticancéreux CP et IF par les boues de STEP s'avère faible voire nulle (Kümmerer et al., 1997 ; Buerge et al.,

2006). L'élimination par biotransformation de la CD et du SM pour les boues de la STEP de Rousset est faible puisque de l'ordre de 8 % en 4 h. L'élimination globale après 4 h semble confirmer les éliminations partielles de ces 2 médicaments relevées dans la littérature**. La stagnation de l'élimination observée pour les boues de la STEP municipale pourrait témoigner de l'inhibition exercée par les cocktails médicamenteux les plus concentrés.** Le cocktail à environ 1000 µg.L^{-1} de chaque médicament semble d'ailleurs provoquer une inhibition très marquée puisqu'une diminution notable de l'abattement de la CD est relevée. **L'augmentation de l'élimination du CP et de l'IF pour ce cocktail le plus concentré pourrait ainsi être due à la sorption de ces molécules sur des produits microbiens solubles relargués lors d'une éventuelle lyse cellulaire causée par le cocktail médicamenteux sur les boues non acclimatées de la STEP municipale.** Ces tests en réacteur batch confirment les bons abattements observés dans le surnageant du $BàM_{IE}$ hôpital avec 43 % pour SM et environ 70 % pour CD d'élimination maximale en seulement 4 h (Figure III-42). L'élimination maximale du CP à 36 % et d'IF à 38 % dans cet intervalle de temps réduit semble meilleure que celle obtenue dans le $BàM_{IE}$ hôpital et peut provenir de la nature du substrat, bien moins riche et complexe que les EHO, et de l'absence initiale de ces molécules dans le surnageant contrairement au $BàM_{IE}$. A noter également que des conditions exclusivement aérobies (appliquées dans les réacteurs batch) sont connues pour favoriser la dégradation des micropolluants vis-à-vis des conditions aérobie/anoxie (appliquées dans le $BàM_{IE}$) (Suarez et al., 2010), même si les 4 h de test demeurent très inférieures au TSH du $BàM_{IE}$. **Bien que ces éliminations soient incomplètes il est à noter que les différences de concentrations associées sont importantes puisque de l'ordre de 700 µg.L^{-1} pour CD et 400 µg.L^{-1} pour SM, CP et IF.**

Ces éliminations ont été obtenues sans ajout de co-substrat dans les réacteurs batch. La biotransformation des médicaments sélectionnés pourrait ainsi être effective par voie métabolique directe. Seira (2013) n'a pas observé de biotransformation de CP et d'IF sans ajout de co-substrat mais les concentrations testées dans son étude, respectivement de 6 et 2 µg.L^{-1}, sont très inférieures à celles de la présente étude (100 à 1000 µg.L^{-1}). Ainsi, les plus fortes concentrations utilisées ici, car représentatives des concentrations relevées dans les EHO, permettraient aux médicaments de servir de substrat primaire à la biomasse.

Les données obtenues permettent de calculer, pour chaque médicament, les paramètres cinétiques d'élimination par les 2 types de boues activées testés (Eq.III-2).

$$\frac{d[Médicament]}{dt} = k_{global} \cdot [Médicament]^{n}_{initiale} \qquad \text{Eq.III-2}$$

k_{global}, la constante cinétique de l'élimination totale mesurée lors des 4 h de tests ($\mu g^{1-n}.L^{n-1}.h^{-1}$), et n, l'ordre de la réaction, sont ensuite déterminés par linéarisation (Eq.III-3) :

$$\log_{10} \frac{d[Médicament]}{dt} = \log_{10} k_{global} + n \cdot \log_{10}[Médicament]_{initiale} \qquad \text{Eq.III-3}$$

La représentation de cette équation permet ainsi de déterminer la constante cinétique k_{global} (Tableau III-20).

Tableau III-20-. Valeurs de k et n pour l'élimination globale par les 2 types de boues.

Molécule	BàM$_{IE}$ hôpital		STEP municipale	
	k_{global} ($\mu g^{1-n}.L^{n-1}.j^{-1}$)	n	k_{global} ($\mu g^{1-n}.L^{n-1}.j^{-1}$)	n
Codéine (CD)	4.680	1	4.056	0.9
Cyclophosphamide (CP)	0.072	1.5	0.120	1.2
Ifosfamide (IF)	0.456	1.2	1.30E-05	2.7
Sulfaméthoxazole (SM)	0.336	1.3	0.480	1.1

MES = 4 $g.L^{-1}$ – t = 4h

Il apparaît que certaines cinétiques de dégradation dévient du pseudo premier-ordre telle que celle du cyclophosphamide par les boues du BàM$_{IE}$ hôpital. Cette déviation peut être attribuée aux incertitudes expérimentales ou à une inhibition exercée par le cocktail médicamenteux sur les boues activées aux plus fortes concentrations. Par contre, il apparaît évident que l'ordre supérieur à 2 obtenu avec la STEP de Rousset pour l'IF est dû à l'incapacité rencontrée par les boues de la STEP à métaboliser ce composé. Le modèle classique de pseudo-premier ordre n'est pas utilisé dans la suite et les valeurs des constantes cinétiques ne pourront être comparées avec les données de la littérature en raison de leurs unités dépendantes de l'ordre de la réaction.

La constante cinétique de biotransformation k_{biol} et l'ordre de la réaction n associé peuvent être déterminés à partir des concentrations à l'équilibre de sorption $[Médicament]_{eq}$ et finale $[Médicament]_f$ lors du test d'élimination globale (Eq.III-4 et Tableau III-21) :

$$\log_{10} \frac{[Médicament]_{eq} - [Médicament]_f}{t_f - t_i} = \log_{10} k_{biol} + n \cdot \log_{10} [Médicament]_{initiale} \qquad \text{Eq.III-4}$$

Tableau III-21. Valeurs de k et n pour l'élimination par biotransformation par les 2 types de boues.

Molécule	BàM$_{IE}$ hôpital		STEP municipale Rousset	
	k_{biol} ($\mu g^{1-n}.L^{n-1}.j^{-1}$)	n	k_{biol} ($\mu g^{1-n}.L^{n-1}.j^{-1}$)	n
Codéine (CD)	-	-	0.792	0.9
Cyclophosphamide (CP)	0.012	1.7	5.28E-04	1.9
Ifosfamide (IF)	0.192	1.3	Aucune biotransformation	
Sulfaméthoxazole (SM)	0.048	1.6	0.024	1.6

Après intégration de l'équation III-2, les constantes de cinétiques et les ordres de réaction préalablement déterminés permettent de calculer la concentration résiduelle en médicament en fonction du temps (Eq.III-5) :

$$[Médicament](t) = \left[k \cdot t \cdot (n-1) + [Médicament\,]_{initiale}^{(1-n)}\right]^{\frac{1}{1-n}} \qquad \text{Eq.III-5}$$

Il est ainsi possible de représenter le profil d'élimination de chaque médicament pour les 2 types de boues. Un profil est proposé avec la constante k_{global} représentant l'élimination maximale du médicament dans le cas où la biotransformation ne limite pas la cinétique de sorption et permet la libération des sites de sorption sur les flocs bactériens. Un autre profil est représenté avec la constante k_{global} pour les 4 premières heures puis avec uniquement k_{biol} pour la suite, représentant le cas le plus défavorable, à savoir une sorption qui ne se renouvelle pas en raison d'une biotransformation très faible ne permettant pas de libérer rapidement des sites sur les flocs bactériens.

La concentration finale en médicament a été calculée avec l'Eq.III-6 jusqu'à 4 h puis l'Eq.III-7 à partir de 4 h pour le profil ne prenant en compte que le mécanisme de biotransformation après 4 h.

De 0 à 4 h :

$$[Médicament](t) = \left[k_{global} \cdot t \cdot (n-1) + [Médicament]_{initiale}^{(1-n)}\right]^{\frac{1}{1-n}} \qquad \text{Eq.III-6}$$

Puis à t > 4 h :

$$[Médicament](t) = \left[k_{biol} \cdot (t-4) \cdot (n-1) + [Médicament]_{4\,h}^{(1-n)}\right]^{\frac{1}{1-n}} \qquad \text{Eq.III-7}$$

Les profils d'élimination sont calculés avec les concentrations moyennes détectées des médicaments sélectionnés dans les EHO (Tableau III-22).

Tableau III-22. Concentrations moyennes des médicaments sélectionnés dans les EHO.

Molécule	EHO_{moyen} ($\mu g.L^{-1}$)
Codéine (CD)	26
Cyclophosphamide (CP)	290
Ifosfamide (IF)	1664
Sulfaméthoxazole (SM)	422

L'absence ponctuelle d'un médicament dans les EHO n'est pas prise en compte dans le calcul de la moyenne.

L'évolution de la disparition des 4 médicaments de la phase liquide est représentée pour les 2 types de boues (Figure III-43). Il convient de préciser que les profils utilisant k_{global} surestiment pour la plupart la cinétique de disparition de la phase liquide, en particulier pour les boues de la STEP de Rousset. Le renouvellement des sites de sorption est en effet dépendant du mécanisme de biotransformation. Une faible biotransformation limitera donc la cinétique de sorption après atteinte de l'équilibre de sorption.

L'élimination d'un médicament de la phase liquide en réacteur batch se situe entre les 2 courbes calculées à partir de k_{global} et de k_{biol}. L'évolution réelle de l'élimination de la CD, du CP et de l'IF pour les boues de la STEP de Rousset devrait donc suivre la courbe d'élimination par biotransformation puisque ce mécanisme limite la cinétique de sorption**. Celle-ci est probablement proche de la courbe k_{global} pour les boues du BàM$_{IE}$ hôpital, en raison de la biotransformation développée supérieure à la sorption, et proche de k_{biol} pour les boues de la STEP municipale de Rousset.** Ces deux courbes sont en lignes pleines sur la figure III-43.

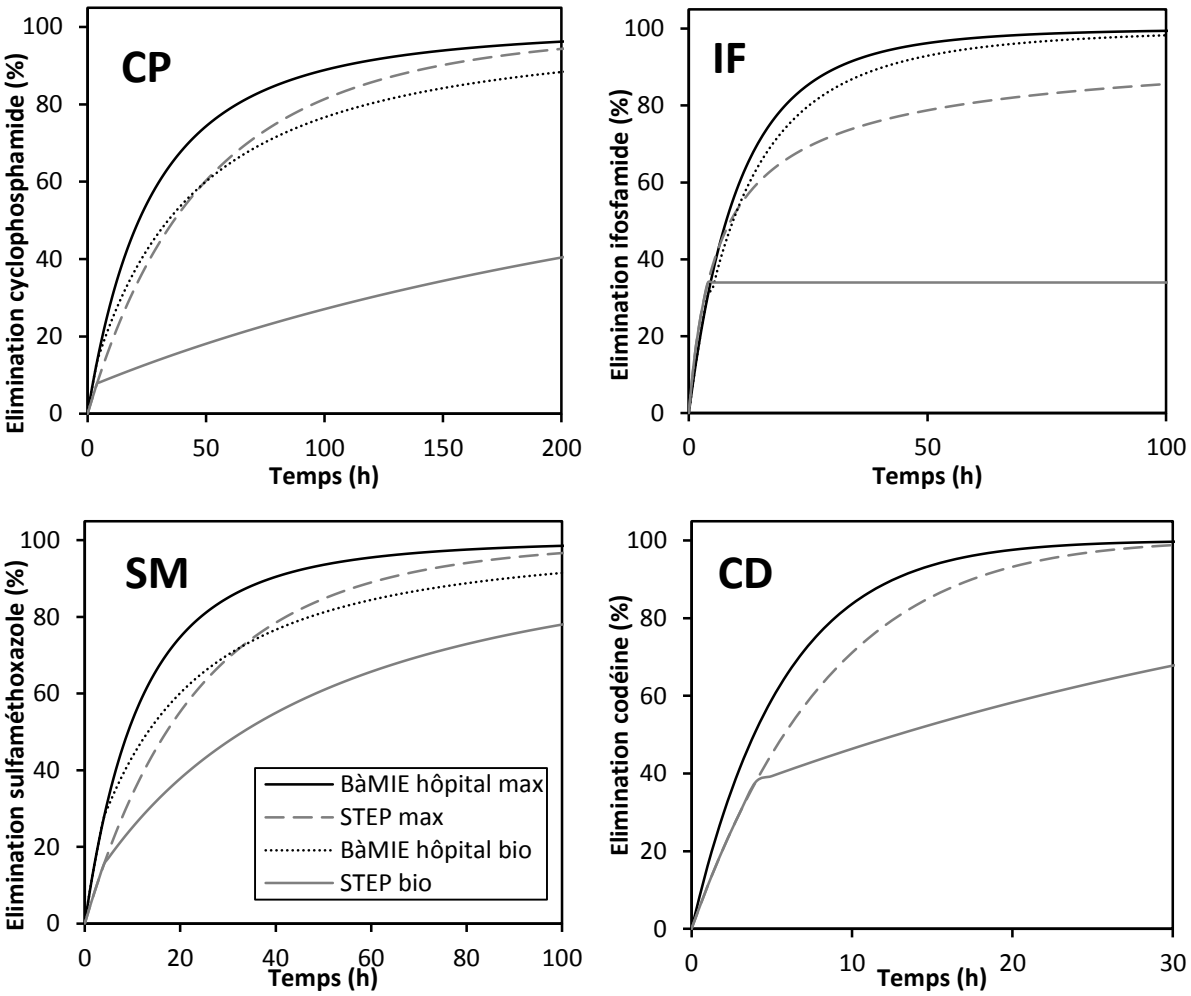


Figure III-43. Profils d'élimination des 4 médicaments par les 2 types de boues activées.

Ces profils permettent d'apprécier les capacités de biotransformation développées par les boues du $BàM_{IE}$ hôpital grâce au traitement directement sur site des EHO. Il semble que le SM soit le médicament présentant le moins de différences entre les 2 types de boues**. Le gain apporté par le traitement sur site des EHO est le plus flagrant pour les 2 molécules anticancéreuses (CP et IF) puisque la biotransformation développée permet d'atteindre des éliminations conséquentes.** Il est d'ailleurs cohérent de supposer que le profil représentant le mieux l'élimination des anticancéreux pour les boues de la STEP de Rousset est celui prenant en compte uniquement la biotransformation à partir de 4 h, la sorption n'étant pas limitante au mécanisme de biotransformation qui s'avère quasi-inexistant.

Tous les profils d'élimination calculés avec la constante k_{global} se situent évidemment au-dessus du profil associé calculé avec la constante k_{biol} à l'exception de l'ifosfamide pour les

boues du BàM$_{IE}$ hôpital dont les 2 profils sont quasiment superposés. Cette superposition indique bien que la sorption est renouvelée au fur et à mesure du processus biotransformation de l'IF.

Il est ainsi possible de déterminer le temps nécessaire pour atteindre un abattement donné. Le temps nécessaire à l'obtention de 95 % d'abattement a été déterminé pour les 2 types de boues (Tableau III-23).

Tableau III-23. Temps nécessaire à l'obtention de 95 % d'élimination des médicaments sélectionnés pour les 2 types de boues.

Molécule	BàM$_{IE}$ hôpital t95% max (h)	STEP municipale t95% bio (h)	BàM$_{IE}$ hôpital t95% max (h)	STEP municipale t95% bio (h)
Codéine (CD)	16	22	-	94
Cyclophosphamide (CP)	170	212	408	4849
Ifosfamide (IF)	44	619	61	Jamais
Sulfaméthoxazole (SM)	57	86	150	336

Ces résultats montrent bien le gain apporté par les boues du BàM$_{IE}$ hôpital. **Cependant, ces durées demeurent bien supérieures au TSH moyen du BàM$_{IE}$ hôpital de 29 h sur cette seconde campagne expérimentale.** Les éliminations correspondantes à ce TSH moyen sont présentées dans le Tableau III-24.

Tableau III-24. Elimination des médicaments sélectionnés par les 2 types de boues au TSH moyen de 29 h du BàM$_{IE}$ hôpital.

Molécule	BàM$_{IE}$ hôpital		STEP municipale	
	Elimination max (%)	Elimination bio (%)	Elimination max (%)	Elimination bio (%)
Codéine (CD)	99.6	-	98.6	67.0
Cyclophosphamide (CP)	58.8	46.0	42.9	13.7
Ifosfamide (IF)	88.6	91.8	71.5	34.0
Sulfaméthoxazole (SM)	84.3	69.3	68.1	46.6

Il convient d'être prudent dans l'interprétation de ces données calculées. Il est en effet délicat de comparer les cinétiques d'élimination entre réacteur batch et procédé continu, surtout que la rétention des médicaments par la membrane observée dans cette étude limite fortement cette comparaison. Ces données calculées à partir des paramètres cinétiques montreraient en effet une élimination excellente de l'IF pour les boues du BàM$_{IE}$

hôpital. Pourtant, les performances du $BàM_{IE}$ hôpital se sont avérées régulièrement inférieures. Ces différences peuvent être imputables au cocktail médicamenteux créé pour les tests en réacteur batch qui ne contenait que 4 médicaments ce qui est très éloigné de la grande complexité des EHO en quantité, en qualité sans parler des métabolites. Le profil de l'élimination de l'IF par les boues du $BàM_{IE}$ hôpital peut ainsi être remis en cause par les raisons susmentionnées, par des erreurs expérimentales ou par les faibles concentrations expérimentales employées en IF par rapport aux concentrations dans les EHO qui n'induiraient qu'un effet inhibiteur limité à la biomasse. L'élimination obtenue au TSH moyen pour le CP apparaît plus fiable puisque l'élimination de 46 % calculée à partir de k_{biol} est relativement proche des abattements dans le réacteur mesurés aux jours 128 et 143. A noter qu'en retranchant à cette élimination de 46 % du CP la part de sorption moyenne de 3.7 % observée précédemment pour les boues du $BàM_{IE}$ hôpital, la part de biotransformation atteindrait 42.3 %. Cette fraction biotransformée de 42.3 % se situe dans le même ordre de grandeur que la biotransformation relevée par Seira (2013) de 39 ± 5 % dans un $BàM_E$ pilote traitant des EUU avec un dopage de CP. Le modèle développé semble également fiable pour le SM puisque son élimination moyenne par le $BàM_{IE}$ de 75.0 % se situe entre les éliminations maximales et par biotransformation calculées. L'absence de données concernant la sorption de la codéine sur les boues du $BàM_{IE}$ ne permettent pas de de conclure sur la validité du modèle pour ce médicament.

III.2.8. Conclusion

Cette seconde campagne expérimentale a été marquée par une perte continue de biomasse, nécessitant 2 réensemencements partiels du bioréacteur à membranes immergées externes ($BàM_{IE}$), et par l'inhibition ponctuelle des performances épuratoires de la biomasse avec d'importantes variations de l'élimination de l'ammonium et de la DCO dans le surnageant. **Ces paramètres témoignent des difficultés de l'acclimatation de la biomasse aux effluents du service d'oncologie sujets à des fluctuations incessantes de composition.** Cependant, la phase de croissance bactérienne de 2.9 à 4.3 $g.L^{-1}$ obtenue du 144^{e} au 157^{e} jour conjuguée à une forte activité respirométrique des boues activées et à la disparition de la mousse lors de cette période montre que la biomasse est toujours dans un état propice à une croissance, même significative, dès que les conditions le lui permettent. Ce constat a été confirmé par des tests en réacteur batch mettant en exergue **l'influence majeure de la nature du substrat et de la charge massique en DCO sur les performances épuratrices et les capacités de reproduction de la biomasse.** L'inhibition exercée par les effluents du service d'oncologie (EHO) ne semble en effet pas proportionnelle à la charge massique appliquée suggérant que la toxicité des EHO impacte sélectivement les différentes espèces bactériennes. **Si la charge massique en DCO appliquée est suffisante, vraisemblablement au-delà de 0.20 $kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}$, les pertes de biomasse peuvent être compensées, voire dépassées, par la métabolisation du substrat facilement assimilable des EHO par les bactéries survivantes.** La stagnation des matières en suspension (MES) pour le réacteur uniquement alimenté par des EHO et la croissance de 14 % obtenue dans le réacteur alimenté à charge massique identique par un substrat composé à moitié d'effluents synthétiques et d'EHO montrent bien que les **EHO ont conservé un fort potentiel inhibiteur sur la biomasse du $BàM_{IE}$ hôpital développée pendant 180 jours.**

Les concentrations médicamenteuses des EHO sont très élevées et notamment marquées par plusieurs pics d'ifosfamide, anticancéreux le plus consommé dans le service. Les concentrations maximales de cette étude (ifosfamide (IF) : 6820 $\mu g.L^{-1}$ – cyclophosphamide (CP) : 687 $\mu g.L^{-1}$ – sulfaméthoxazole (SM) : 710 $\mu g.L^{-1}$) sont ainsi les plus importantes détectées à ce jour et **s'avèrent au moins supérieures de 2 log à celles relevées dans la littérature pour des effluents hospitaliers globaux ce qui justifie pleinement le**

positionnement du projet. Le caractère versatile des EHO collectés associé à ces fortes concentrations médicamenteuses peuvent expliquer en partie les difficultés d'acclimatation rencontrées par la biomasse. Malgré ces difficultés, les boues activées ont montré de grandes facultés d'adaptation aux EHO, caractérisées par la **création de capacités étendues de biotransformation et l'acquisition d'une résistance très prononcée aux antibiotiques** les plus consommés dans le service d'oncologie. Alors que la sorption constitue le principal, voire l'unique, mécanisme d'élimination par les boues non acclimatées de la STEP le traitement sur site des EHO a permis la création de capacités de biotransformation par les boues du $BàM_{IE}$ hôpital offrant une amélioration substantielle de l'élimination des médicaments sélectionnés. Ainsi, 20 % des quantités de CP, IF et SM peuvent être éliminés par biotransformation en seulement 4 h. A l'exception de la codéine pour lesquels la sorption atteint 30 %, **la sorption sur les boues des médicaments sélectionnés s'est révélée mineure car inférieure ou de l'ordre de 10 % pour les 2 types de boues testées.**

Le colmatage de la membrane joue un rôle clé sur l'élimination apparente de la DCO et des médicaments. Cette étude est d'ailleurs la première à montrer une rétention significative de résidus médicamenteux par un BàM équipé d'une membrane d'ultrafiltration. **Des éliminations de l'ordre de 90 % des 4 médicaments sélectionnés ont pu être atteintes en cas de colmatage sévère de la membrane.** Les mécanismes de rétention n'ont pu être correctement identifiés mais il est fortement envisageable que les propriétés de la liqueur mixte et l'état physiologique des boues aient un rôle sur la rétention des médicaments. Cette rétention a par ailleurs rendu délicate l'exploitation de certaines performances du $BàM_{IE}$ hôpital sur l'élimination des médicaments. De plus, le colmatage membranaire contribue également à une amélioration notable des performances épuratoires du système avec notamment l'obtention ponctuelle de 90 % d'abattements de la DCO malgré une faible dégradation de celle-ci par voie biologique. Il est cependant légitime de s'interroger sur l'influence de la rétention dans le réacteur de la DCO pouvant conduire à la persistance de la toxicité affectant les performances des boues activées.

La synthèse des résultats obtenus sur les 2 campagnes expérimentales est effectuée dans la suite de ce manuscrit ainsi qu'une réflexion sur les pistes à explorer pour compléter ce travail.

III.3. Synthèse des deux campagnes expérimentales

Les conditions opératoires différentes appliquées lors des deux campagnes expérimentales ne permettent pas de conclure sur l'influence de la configuration de bioréacteur à membranes (BàM) sur le traitement des effluents du service d'oncologie (EHO). La faible croissance de biomasse observée sur le long terme lors de la première campagne expérimentale, malgré l'application de fortes charges en DCO (0.34 puis 0.20 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}), a conduit à modifier le mode opératoire du BàM pilote. Une alimentation à faible charge (environ 0.10 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}), réalisée en réduisant le débit d'alimentation du BàM, a été choisie pour mener le début de la seconde campagne expérimentale afin de favoriser l'acclimatation de la biomasse aux composés toxiques. Cette stratégie, décrite dans la littérature comme favorisant la dégradation des composés récalcitrants (Drillia et al., 2005), ne s'est pas révélée appropriée puisqu'une perte continue de biomasse a été observée. Ces résultats ont toutefois permis d'identifier les conditions favorisant le développement de la biomasse.

L'objectif de cette synthèse est ainsi de discuter des résultats obtenus lors des deux campagnes expérimentales menées et de dégager les concordances afin de conclure sur la faisabilité du traitement des effluents du service d'oncologie (EHO) par bioréacteur à membranes (BàM).

III.3.1. Capacités d'adaptation de la biomasse épuratrice aux EHO et inhibition résiduelle

III.3.1.1. La charge massique, paramètre clé pour le développement de la biomasse

Le développement de la biomasse au cours des deux campagnes expérimentales menées s'est révélé laborieux puisqu'au mieux une faible croissance a pu être obtenue sur le long terme. Les difficultés rencontrées peuvent être expliquées par le caractère fluctuant des EHO collectés qui proviennent d'un nombre limité de chambres. 6 des 9 patients occupant les 6 chambres reliées sont hospitalisés de 2 à 4 jours ce qui implique un changement très fréquent de patients et par conséquent des traitements associés. Ainsi, **à chaque renouvellement des EHO, la composition (molécule mère et métabolites associés) et la charge médicamenteuse sont fortement modifiées.** Ces variations qualitatives et

quantitatives incessantes ne permettent pas le développement correct de la biomasse probablement **en raison du mode d'action et des cibles propres à chaque médicament.** Le renouvellement des EHO peut ainsi impacter certaines espèces bactériennes pourtant acclimatées aux composés présents antérieurement dans l'alimentation. Malgré les capacités d'adaptation prononcées de la biomasse aux médicaments, démontrées par l'ensemble des indicateurs suivis, **les variations de composition des EHO empêchent le développement normal de la biomasse.**

Toutefois, les phases de croissance bactérienne significatives ponctuellement observées lors des deux campagnes indiquent que la biomasse est réactive et prête à croître dès que les conditions, et par conséquent la composition des EHO, le lui permettent. Ces observations ont été confirmées par les expérimentations en réacteur batch de la seconde campagne expérimentale au cours desquelles une croissance bactérienne a été obtenue pour un substrat mixte (EHO + synthétique) et une Cm de 0.20 $kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}$ démontrant que **l'inhibition résiduelle exercée par les EHO après 6 mois de traitement n'est pas irréversible sur les performances de la biomasse et peut très rapidement s'estomper.**

Ces expérimentations en réacteur batch ont par ailleurs amélioré la compréhension de l'effet inhibiteur qu'exercent les effluents du service d'oncologie sur la biomasse**. La toxicité apparente des EHO sur les performances de la biomasse s'est en effet révélée indépendante de la Cm appliquée** pour les réacteurs uniquement alimentés par les EHO ce qui est cohérent avec les résultats des deux campagnes expérimentales (Tableau III-25).

Tableau III-25. Comparaison des performances épuratoires moyennes des 2 campagnes expérimentales

	Cm ($kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}$)	Croissance MES	C/N	Elimination DCOS (%)	Elimination DCOP (%)	TR (%)	Elimination $N\text{-}NH_4^+$
$BàM_E$ EHO seul	0.34 ± 0.22	Faible	30 ± 17	77.7 ± 19.2	94.1 ± 3.7	62 ± 27	81.6 ± 15.4
$BàM_E$ EHO + synthétique	0.20 ± 0.05	Très faible	24 ± 5	89.5 ± 5.3	94.7 ± 3.5	49 ± 22	97.0 ± 2.8
$BàM_{IE}$ EHO seul	0.13 ± 0.06	Perte	18 ± 15	60.5 ± 19.4	83.6 ± 10.7	54 ± 26	72.9 ± 26.3

Malgré la toxicité avérée des EHO sur la biomasse, **plus la Cm est importante et plus la croissance est prononcée.** Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce gain de

performances à forte Cm et montrent une **réponse biologique complexe** à un effluent sujet à d'incessantes variations :

- le détournement des bactéries vers le substrat facilement dégradable des EHO, la biomasse serait ainsi moins affectée par la toxicité des EHO ;
- une inhibition sélective des EHO sur les espèces bactériennes, les bactéries non impactées seraient capables de dégrader la plus grande quantité de substrat disponible à forte Cm pour compenser la lyse engendrée par la toxicité des EHO sur les espèces sensibles;
- la plus grande quantité de substrat disponible servirait de source de carbone et d'azote à la dégradation de certains composés récalcitrants par cométabolisme.

Cette dernière hypothèse permettrait d'expliquer en partie l'écart de 17 % sur l'élimination de la DCO dans le surnageant observée entre les 2 périodes d'alimentation du BàM avec les EHO en tant que seul substrat (du 40^{e} au 97^{e} jour pour la première campagne et l'intégralité de la seconde campagne). **Une partie de cet écart de 17 % en faveur de la première campagne pourrait représenter la fraction de la DCO dégradée par cométabolisme grâce à la plus grande quantité de substrat disponible, la Cm moyenne étant près de 3 fois supérieure à celle de la seconde campagne.** Une augmentation de la Cm pourrait ainsi permettre une amélioration de l'élimination de la pollution médicamenteuse par cométabolisme. A faible Cm, le substrat facilement dégradable serait consommé par la biomasse en état de stress uniquement pour pallier les pertes engendrées par les EHO et ne serait pas utilisé en tant que source de substrat pour cométaboliser les composés réfractaires.

Au cours de la première campagne expérimentale, une croissance bactérienne plus prononcée a été obtenue lors de l'alimentation avec les EHO seuls vis-à-vis de la période d'alimentation avec dilution des EHO par un substrat synthétique, période pourtant associée à d'excellents rendements épuratoires. Ce résultat peut être expliqué par la charge massique moyenne en DCO près de 2 fois supérieure lors de l'alimentation avec les EHO seuls. De même, la « relative » stabilisation des MES suivie d'une croissance significative de biomasse lors de la dernière phase de la 2nde campagne expérimentale coïncide avec une Cm moyenne appliquée (0.16 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}) respectivement plus forte de 38 % et de 23 % à celles

appliquées lors des phases 2 et 3 de cette même campagne marquées par une perte continue de biomasse.

La compilation de ces résultats montre **le rôle crucial de la Cm sur les performances générales de la biomasse. Une Cm relativement forte (probablement supérieure à 0.20 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}) semble être nécessaire pour obtenir une croissance bactérienne.** L'assimilation d'une plus grande quantité disponible de substrat facilement biodégradable permettrait de compenser les pertes de biomasse provoquées par les substances toxiques des EHO et / ou de favoriser la dégradation de certains composés récalcitrants par cométabolisme. Il est cependant difficile de proposer une valeur précise de la Cm à appliquer puisque celle-ci dépend évidemment de la composition des EHO qui est sujette à de nombreuses variations**. La stratégie d'alimentation à faible charge** avec une Cm visée de 0.10 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} appliquée lors de la majorité de la seconde campagne expérimentale **s'avère donc inappropriée au développement de la biomasse** puisqu'une perte continue de biomasse et de faibles rendements épuratoires ont été observés.

Une charge massique inférieure à 0.20 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1} ne peut cependant pas expliquer à elle seule l'évolution des MES et des performances épuratoires du BàM. Les pics du rapport C/N des EHO relevés lors des deux campagnes ont quasi systématiquement été suivis d'une chute, parfois brutale, de l'élimination de la DCO dans le surnageant. **Un rapport C/N supérieur à 30 semble ainsi suffire pour affecter l'élimination de la DCOS**. Aussi, les trois pics relevés supérieurs à 60 du rapport C/N lors des deux campagnes expérimentales ont été suivis par les chutes les plus brutales de l'élimination de la DCOS.

L'élimination de l'ammonium apparaît supérieure à celle de la DCOS pour les deux configurations soulignant le bon développement des bactéries autotrophes pourtant connues pour être plus sensibles que les hétérotrophes. Le taux de rétention moyen de la DCOS est sensiblement le même pour la membrane céramique 150 kDa et les fibres creuses 100 kDa. La meilleure élimination globale de la DCO par le BàM$_E$ est donc liée à l'élimination de la DCOS et non à la rétention par la membrane et son colmatage.

Comme énoncé précédemment, il est délicat de conclure sur l'influence exercée par la configuration de BàM sur les rendements épuratoires. Les meilleures performances obtenues par le BàM$_E$ pourraient provenir (i) de la plus forte charge massique appliquée permettant le développement de la biomasse et la dégradation de certains composés

récalcitrants par cométabolisme ou (ii) de la plus grande surface d'échange des flocs bactériens consécutifs à la réduction de la taille des flocs par les conditions hydrodynamiques cisaillantes du $BàM_E$. Une surface active supérieure favoriserait les transferts de matière au sein de la liqueur mixte et permettrait de limiter les perturbations engendrées par les produits tensioactifs.

III.3.1.2. Dénitrification et tensioactifs

L'évolution de la concentration de nitrates relevée dans le perméat a mis en évidence une inhibition très prononcée de la réaction de dénitrification au cours des deux campagnes expérimentales. La dilution des EHO par un substrat synthétique lors de la dernière phase de la première campagne expérimentale a permis de substantiellement réduire la concentration de nitrates dans le perméat, mettant ainsi en exergue l'effet des EHO sur la réaction de dénitrification. **L'inhibition est probablement induite par la pollution médicamenteuse ou les produits tensioactifs.** Ces derniers perturberaient les bactéries hétérotrophes dans la cuve d'anoxie dans laquelle sont introduits en premier les EHO. Les tensioactifs, dont la dégradation en zone anoxie n'est pas possible en raison de l'absence d'oxygène dissous, se concentreraient sur les flocs bactériens et empêcheraient ainsi l'assimilation de l'oxygène lié des nitrates par les bactéries hétérotrophes. **L'étude respirométrique des boues activées appuie cette hypothèse.** La respiration exogène des boues activées dans le $BàM_{IE}$ s'est parfois avérée inférieure à celle obtenue en conditions endogène (après 4 h d'aération dans un réacteur batch sans ajout de substrat). **Cette inhibition de la respiration dans le BàM pourrait à nouveau être attribuée à la présence de substances, tels que les produits tensioactifs, qui se lient aux flocs bactériens** et qui perturbent le transfert d'oxygène dans le BàM ralentissant ainsi la cinétique d'assimilation de l'oxygène libre par les bactéries pour leurs besoins endogène et exogène. L'aération de 4 h aurait permis une dégradation partielle de ces substances perturbatrices dans le réacteur batch et favoriserait ainsi le transfert d'oxygène.

III.3.2. Gain apporté sur l'élimination des médicaments

L'acclimatation de boues activées issues de STEP municipale aux EHO a permis d'accroître les capacités d'élimination des cinq molécules médicamenteuses sélectionnées. Bien que l'élimination du 5-FU se soit également avérée excellente pour les boues de la STEP municipale l'étude cinétique a mis en évidence le gain apporté par les boues développées dans le $BàM_E$ hôpital avec une augmentation de 34 % de la constante cinétique de biotransformation k_{biol}. De plus, l'évolution de k_{biol} semble atteindre un seuil à 1 $mg.L^{-1}$ pour les boues de la STEP, signifiant une probable inhibition au-delà, alors qu'elle continue d'augmenter pour les boues du $BàM_E$. Des capacités de biotransformation ont été développées par les boues du $BàM_{IE}$ hôpital sur les 4 autres médicaments, avec notamment 20 % d'élimination par biotransformation en seulement 4 h pour les deux anticancéreux cyclophosphamide et ifosfamide, uniquement éliminés dans de très faibles proportions par sorption dans les STEP. **Le traitement des EHO par BàM a donc permis d'obtenir des performances semblables ou supérieures à celles des STEP sur l'élimination des médicaments sélectionnés.** Il est de plus remarquable que les éliminations obtenues se situent dans l'ordre de grandeur de celles réalisées par d'autres études traitant de manière simplifiée un effluent synthétique ou urbain dopé par quelques médicaments, signifiant que les performances sur l'élimination des médicaments n'ont que très ponctuellement souffert de la spécificité des EHO. Cependant, l'élimination de ces médicaments, et en particulier des anticancéreux ifosfamide et cyclophosphamide, demeure toujours incomplète et variable en raison des fluctuations des performances des boues activées et des changements de membrane.

Pour la première fois, une rétention très importante de l'ordre de 90 % des médicaments sélectionnés par une membrane d'ultrafiltration utilisée en BàM a été relevée. **Le colmatage des fibres creuses 100 kDa a joué un rôle déterminant dans la rétention des médicaments** mais la rétention de 68.5 % du sulfaméthoxazole par une membrane très peu colmatée **suggère que d'autres paramètres peuvent jouer un rôle majeur**. Cette rétention inattendue est associée à une lyse et suggérerait que **l'état physiologique des boues pourrait contribuer à la rétention médicamenteuse**. Le relargage de produits microbiens solubles lors des lyses fréquentes de biomasse induites par les EHO, dont l'évolution des MES et le moussage continu de la liqueur mixte pourraient témoigner, auraient ainsi offert aux

médicaments de nouveaux sites de sorption. Les affinités de sorption entre ces produits pourraient d'ailleurs s'avérer différentes de celles des flocs bactériens. Par exemple, les substances humiques-like constitueraient des pièges à polluants à travers la grande diversité des fonctions chimiques qu'elles portent (Seira, 2013). Les produits microbiens solubles relargués contenant des médicaments adsorbés seraient retenus par la membrane et son colmatage ce qui pourrait expliquer certain taux de rétentions obtenus. **Le colmatage membranaire et sa nature, l'état physiologique des boues activées et des propriétés de la liqueur mixte devraient faire l'objet d'études approfondies pour quantifier leur influence sur la rétention médicamenteuse.** Il serait pertinent d'ajouter des molécules de plus petites tailles au suivi des performances du BàM puisque le CP, IF, CD et SM sont de tailles similaires (250-300 Da). Le 5-FU, environ deux fois plus petit, aurait pu être un choix judicieux si sa biotransformation n'avait pas été aussi efficace. Il convient donc de choisir des molécules petites et récalcitrantes au traitement biologique afin d'étudier les mécanismes de rétention des médicaments.

Le fonctionnement avec des membranes très colmatées semble irréaliste mais l'utilisation directe de membranes de nanofiltration en lieu et place de l'ultrafiltration a déjà été testée avec succès en laboratoire sur l'élimination du cyclophosphamide contenu dans un effluent synthétique (Zaviska et al., 2013). Le BàM-NF (seuil de coupure 600 Da) a permis une rétention du CP de 60 % lorsque le colmatage a commencé à se former. Bien que le BàM-NF soit potentiellement intéressant concernant les performances pures sur les résidus médicamenteux le verrou technologique majeur de cette technologie concerne la capacité à maintenir un flux de perméat correct sur le long terme. La réponse de la biomasse vis-à-vis de l'accumulation de médicaments à de très fortes concentrations dans le réacteur biologique est incertaine puisque **le fonctionnement permanent à de très fortes concentrations pourrait accentuer l'inhibition ou, au contraire, conduire au développement de capacités de biotransformation encore plus étendues.** L'application d'une stratégie d'acclimatation douce serait ainsi judicieuse pour les premières semaines de traitement. Une dilution des EHO par un substrat synthétique, telle qu'effectuée lors de la dernière phase de la première campagne expérimentale, permettrait de limiter les effets toxiques sur la biomasse. Une fois le régime permanent atteint, la fraction d'EHO dans l'alimentation du BàM-NF pourrait être progressivement incrémentée jusqu'à alimenter exclusivement le BàM-NF avec les EHO. Cependant, **la faisabilité industrielle du BàM-NF**

semble compromise en raison de l'importante surface membranaire requise pour compenser le faible flux attendu de production.

III.3.3. Acquisition d'une résistance de la biomasse aux médicaments : quels enjeux ?

Les tests de dégradation de DCO en présence de médicaments avec les boues du $BàM_E$ et le suivi de l'antibiorésistance de la biomasse du $BàM_{IE}$ ont montré **les grandes facultés d'adaptation de la biomasse épuratrice aux médicaments**, pourtant présents à de très fortes concentrations. Le suivi de l'antibiorésistance développée par la biomasse du $BàM_{IE}$ vient d'ailleurs conforter l'une des observations de la première campagne. La présence du cocktail d'antibiotiques semblait « favoriser » la dégradation de la DCO pour les boues du $BàM_E$. Or, la biomasse du $BàM_{IE}$ a développé une résistance très prononcée aux 4 antibiotiques composant ce cocktail (amoxicilline, ticarcilline, ciprofloxacine et ceftriaxone). Ces résultats prouvent donc qu'une résistance prononcée à ces 4 antibiotiques a été acquise lors de la première acclimatation et explique ainsi le maintien observé des performances épuratoires sur la DCO et la possible métabolisation de ces 4 antibiotiques.

L'influence des effluents hospitaliers (EH) sur la biomasse épuratrice et notamment sur la diversité bactérienne et la dissémination des gènes de résistance a récemment été démontrée par Stalder (2012). Il attribue la dissémination de l'antibiorésistance au sein des boues activées à « l'intrusion et / ou au développement de bactéries du genre *Pseudomonas* », bactéries pathogènes opportunistes dont la présence est très problématique dans les milieux hospitaliers en raison de leur résistance aux antibiotiques (Kunz et Brook, 2010). Le potentiel pathogène des boues de STEP hospitalières avait déjà été mis en exergue (Tsai et al., 1998) : de 10^{10} à 10^{12} UFC/100 mL pathogènes seraient relarguées quotidiennement dans l'environnement à Taïwan via les boues d'épuration pour un hôpital de 1000 lits.

Il apparaît ainsi primordial d'éviter toute dissémination environnementale des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques développées par le traitement des EH. La prolifération bactérienne peut provenir des eaux en sortie de traitement et des boues en excès. Des études doivent être menées sur l'évaluation des différentes filières de traitement des boues en excès développées lors du traitement des EH. La valorisation classique de ce sous-produit par épandage agricole semble d'ores et déjà impossible et le facteur économique devra ainsi

être intégré dans cette évaluation. Le développement de bactéries antibiorésistantes avec un potentiel pathogène doit faire l'objet de procédures strictes de sécurité pour le manipulateur et pour l'acheminement des boues en excès vers la filière de traitement retenue, particulièrement à proximité d'un hôpital. Concernant la dissémination de bactéries antibiorésistantes via les eaux traitées, Stalder (2012) confirme que **le procédé BàM représente une solution pertinente** même s'il recommande toutefois la réalisation d'études sur ce sujet pour optimiser ce procédé puisque le perméat de l'un des BàM pilote étudié s'est révélé contaminé.

Si l'acquisition d'une résistance des microorganismes épurateurs aux médicaments contenus dans les EHO semble positive pour limiter les effets toxiques des EHO sur la biomasse et améliorer la métabolisation de ces médicaments elle soulève cependant de sérieuses interrogations quant aux risques pour l'opérateur et l'environnement. **Les recherches sur la filière de traitement appropriée des boues en excès et sur la rétention des bactéries antibiorésistantes par la membrane du BàM devraient être prioritaires avant de considérer le bioréacteur à membranes comme une solution appropriée à l'épuration des effluents hospitaliers.**

Conclusion générale et perspectives

La présence de résidus médicamenteux dans l'environnement soulève plusieurs interrogations quant aux risques associés pour l'homme et les espèces aquatiques et démontre l'inefficacité des stations d'épuration (STEP) sur leur élimination. Bien que les connaissances sur l'impact des résidus médicamenteux soient limitées, les premiers cas concrets et l'introduction récente (2013) de trois médicaments sur une liste de surveillance de l'Union Européenne laissent présager de la dangerosité de ces produits.

La grande majorité des études retrouvées dans la littérature se focalisent autour du constat de la présence de composés pharmaceutiques dans l'environnement et leurs risques potentiels. Un nombre moindre d'études présente les mécanismes de remédiation par traitement biologique. Finalement, seul un nombre très faible montre l'influence de micropolluants sur les procédés de traitement biologique. La communauté scientifique se doit d'ores et déjà d'évaluer différentes stratégies visant à limiter la dissémination environnementale de ces produits conçus pour agir biologiquement sur leur cible.

La synthèse bibliographique a révélé **qu'aucun consensus n'existe à l'heure actuelle sur la stratégie à appliquer sur le court terme pour réduire le rejet de molécules médicamenteuses dans l'environnement.** L'optimisation des stations d'épuration existantes permettrait de traiter le flux global médicamenteux mais la faisabilité économique et l'intérêt environnemental d'une telle entreprise sont fortement contestés. A l'inverse, le traitement sur site d'importantes sources émettrices permettrait de traiter de petits volumes d'une pollution très spécifique à forte concentration et pourrait constituer une alternative judicieuse. Les établissements de soins, généralement perçus comme une source importante, ne représentent toutefois qu'une fraction mineure, puisqu'inférieure à 10 %, du flux médicamenteux global des eaux usées urbaines. La spécificité des rejets hospitaliers ne peut cependant pas être ignorée et certains auteurs ont ainsi recommandé d'évaluer la toxicité de chaque service de soins en raison de leurs activités parfois très disparates. De telles études permettraient l'indentification des sources critiques et pourraient justifier la stratégie du traitement sur site si l'essentiel de la toxicité des effluents hospitaliers était concentré sur quelques services. **Cette stratégie impliquerait de très faibles volumes à traiter, éviterait la dilution de la toxicité par les autres rejets de l'hôpital et modifierait sans aucun doute la perception de l'impact environnemental de l'hôpital.** C'est dans cet

esprit que le service d'oncologie de l'hôpital de la Timone (Marseille) a été choisi pour ce projet. Les médicaments anticancéreux ont un mode d'action bien spécifique qui leur confère un effet cancérigène quel que soit le niveau d'exposition. L'augmentation du nombre de cancers accentue leur consommation et pourrait engendrer la mise en place d'une synergie ce qui montre la nécessité de se préoccuper de cette classe thérapeutique particulière.

L'étude bibliographique montre également que les molécules médicamenteuses sont éliminées dans des proportions très variables en STEP. Le bioréacteur à membranes (BàM), procédé équipant les stations d'épuration de nouvelle génération, a été retenu pour l'étude car il offre des résultats prometteurs sur les micropolluants modérément et difficilement éliminés dans les STEP conventionnelles pour lesquels l'élimination peut parfois atteindre 90 % par BàM. Contrairement aux procédés classiques, souvent limités à des âges de boues de 15 jours maximum, des valeurs élevées (30-50 jours) peuvent être affectées à l'âge de boues en BàM. L'enrichissement de la biomasse par l'apparition de bactéries à croissance lente développe des capacités étendues de biotransformation ce qui permet l'amélioration de l'élimination des micropolluants.

La configuration de BàM a une influence sur les propriétés de la biomasse épuratrice et son acclimatation. Le BàM pilote a ainsi été conçu de manière à tester deux configurations de BàM : BàM externe ($BàM_E$) et BàM immergées externes ($BàM_{IE}$). La plus grande robustesse de la configuration externe liée à la membrane céramique permettant de mieux encaisser les conséquences des variations ponctuelles de l'effluent, dont le colmatage, et par la possibilité d'appliquer des lavages chimiques agressifs a orienté le choix de la configuration $BàM_E$ pour mener la première campagne expérimentale de faisabilité. Le suivi des performances épuratrices du BàM sur les médicaments est réalisé sur les trois anticancéreux les plus consommés du service : l'ifosfamide (IF), le fluorouracile (5-FU) et le cyclophosphamide (CP). Ces trois anticancéreux ont d'ailleurs été inscrits sur la liste des médicaments prioritaires à rechercher dans les eaux par l'affsa en 2008. Deux autres médicaments, l'antidouleur codéine (CD) et l'antibiotique sulfaméthoxazole (SM) ont été ajoutés à cette étude.

Les effluents du service d'oncologie (EHO) collectés sont marqués par une grande variabilité de composition fort probablement imputable au nombre réduit de chambres sur lequel le BàM pilote est raccordé. Le rapport C/N des EHO est ainsi sujet à des pics ponctuels dont témoigne l'importante étendue des valeurs mesurées au cours des deux campagnes menées (entre 3 et 110). **La composition médicamenteuse des EHO apparaît également marquée par de nombreuses fluctuations mais surtout par des concentrations très élevées** puisque généralement supérieures à plusieurs centaines de $\mu g.L^{-1}$ pour les trois anticancéreux. Certaines concentrations relevées à 6.82 $mg.L^{-1}$ en ifosfamide, 1.28 $mg.L^{-1}$ en fluorouracile, 687 $\mu g.L^{-1}$ en cyclophosphamide et à 710 $\mu g.L^{-1}$ en sulfaméthoxazole **sont de loin les concentrations les plus élevées relevées à ce jour dans la littérature avec un ordre de grandeur supérieur à 2 log par rapport aux effluents hospitaliers globaux, justifiant ainsi pleinement le positionnement du projet.**

Ces fluctuations de composition n'ont pas facilité l'acclimatation dans le BàM pilote des boues activées prélevées dans une STEP municipale. Une faible croissance de biomasse a été observée après 160 jours avec le $BàM_E$ tandis qu'une perte quasi-continue a marqué l'acclimatation menée avec le $BàM_{IE}$. Cependant, lors de l'acclimatation avec le $BàM_{IE}$, une croissance bactérienne significative obtenue en fin de campagne indique que **l'inhibition exercée par les EHO sur les capacités reproductrices de la biomasse n'est pas irréversible** et qu'une croissance peut se produire dès que les conditions le permettent. Ces conditions idéales déterminées par la présente étude comprendraient (i) l'absence de tensioactifs dans les EHO qui perturbent les transferts de matière et sont en partie responsables du moussage intense de la liqueur mixte, (ii) un rapport C/N des EHO inférieur à 30, valeur qui semble critique puisqu'une chute de l'élimination de la DCO s'est quasi systématiquement produite au-delà, et (iii) l'application d'une charge massique en DCO relativement élevée, vraisemblablement supérieure à 0.20 $kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}$. **L'absence de tensioactifs** pourrait être réalisée par des produits de substitution, par une ségrégation de leurs rejets ou, de manière plus réaliste, **par la mise en place d'un prétraitement approprié. La maîtrise du rapport C/N pourrait être atteinte par la collecte d'un effluent représentatif d'un service entier qui permettrait de normaliser la composition et de s'affranchir de ces pics obtenus. La Cm dépend de la composition des EHO et de l'exploitation du BàM ; elle peut être facilement maîtrisée si la composition des EHO est normalisée.**

Cette étude a donc permis d'identifier qu'une charge massique en DCO supérieure à 0.20 $kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}$ semble nécessaire à l'obtention de croissance bactérienne bien que l'effet inhibiteur des EHO sur la biomasse soit démontré. **L'inhibition exercée par les EHO serait en effet sélective car indépendante de la charge massique appliquée**. Une forte Cm permettrait aux espèces bactériennes non impactées d'assimiler le substrat facilement biodégradable des EHO pour compenser, voire dépasser, les pertes engendrées sur les espèces sensibles. Ces résultats mettent également en exergue que la stratégie d'alimentation en substrat limitant, pourtant citée dans la littérature comme l'un des avantages conceptuels du procédé BàM pour faciliter l'acclimatation de la biomasse aux micropolluants, s'avère inappropriée au développement de la biomasse au contact des EHO.

L'élimination de la pollution conventionnelle est marquée par des performances en dents de scie. L'effet inhibiteur des EHO sur les capacités épuratrices de la biomasse a été mis en exergue lors de la dilution des EHO par un effluent synthétique qui a permis d'obtenir durablement des rendements épuratoires excellents sur la DCO et l'ammonium. Des performances contradictoires pour des conditions opératoires similaires ont parfois été observées démontrant toute la complexité des interactions en jeu et **la difficulté d'exploiter le BàM pilote à partir des paramètres conventionnels de pollution.** Les EHO exercent parfois une inhibition sélective sur la biomasse puisque les bactéries hétérotrophes et autotrophes ne sont pas affectées avec la même ampleur et la même cinétique ce qui confirme les observations précédentes sur l'indépendance de la toxicité à la charge massique. Si ceci était prévisible en début d'étude, la sélectivité et ses paramètres, ampleur et cinétique, a été minimisée en termes d'analyses à effectuer pour la mettre en évidence avec plus de précisions. Malgré la complexité des EHO**, des rendements épuratoires supérieurs à 90 % sur la DCO et l'ammonium ont ponctuellement été atteints**, démontrant à nouveau que l'inhibition exercée n'est pas irréversible. L'application d'une forte Cm a permis l'obtention de rendements épuratoires supérieurs. La plus grande quantité de substrat facilement dégradable disponible aurait permis à la biomasse de compenser les pertes induites par la toxicité des EHO mais également de dégrader une partie des composés récalcitrants par cométabolisme**. L'application d'une forte Cm pourrait ainsi permettre une amélioration de l'élimination de la pollution médicamenteuse. Bien que les concentrations élevées des médicaments dans les EHO se soient révélées suffisantes pour permettre leur**

assimilation par une voie métabolique directe, une plus grande quantité de substrat disponible pourrait permettre de compléter leur élimination.

La réaction de dénitrification apparaît cependant inhibée en permanence. L'origine de ce dysfonctionnement semble provenir des produits **tensioactifs**, utilisés en grande quantité dans les services hospitaliers. Le moussage intense de la liqueur mixte observé quasi continuellement lors des deux campagnes menées pourrait en partie être engendré par l'importante présence de produits tensioactifs. Lors de l'introduction des EHO dans la cuve anoxie, les tensioactifs perturberaient les transferts de matière entre les flocs bactériens et les nitrates. Leur dégradation partielle dans la cuve aérée permettrait ensuite aux bactéries hétérotrophes d'être opérationnelles sur l'élimination de la DCO.

L'élimination des molécules médicamenteuses par le BàM pilote confirme les observations de la littérature sur l'hétérogénéité du devenir des médicaments. Le 5-FU a été éliminé quasi systématiquement au-delà de 90 %. Cette molécule est facilement éliminable comme l'ont confirmé les performances des boues de STEP. L'élimination des quatre autres médicaments a été marquée par de nombreuses fluctuations liées aux effets des EHO sur la biomasse et par leur rétention par la membrane et son colmatage faussant les concentrations réelles en amont de la membrane. **Les éliminations dans le surnageant du BàM$_{IE}$ montrent que le SM et la CD peuvent être significativement éliminés par voie biologique, respectivement jusqu'à 79 et 95 %, tandis que l'élimination de l'IF et du CP dans le réacteur semble plus modérée puisqu'elle ne dépasse pas 40 %.** La rétention des molécules médicamenteuses par la membrane et son colmatage a artificiellement bonifié les performances épuratrices du BàM$_{IE}$. **Le fonctionnement à un colmatage membranaire sévère a ainsi permis d'atteindre une élimination apparente supérieure ou égale à 89 % de l'ensemble des médicaments sélectionnés.** Ce phénomène n'avait jamais été mis en évidence dans la littérature à l'exception évidente d'études comprenant des membranes de seuils de coupure bien inférieurs aux fibres creuses testées de 100 kDa. **D'autres paramètres, et en particulier l'état physiologique des boues, semblent également influer sur la rétention des médicaments sélectionnés par la membrane et son colmatage.** L'évaluation des performances épuratoires du BàM sur les molécules médicamenteuses doit ainsi tenir

compte de la composition initiale et finale du surnageant du réacteur biologique en complément de celle de l'alimentation et du perméat.

La sorption des 4 médicaments s'est révélée non significative puisque de l'ordre de 10 % ou moins hormis pour la codéine dont l'élimination par sorption peut atteindre 30 %. Ces résultats sont positifs puisqu'ils signifient que l'élimination observée dans le BàM peut être majoritairement attribuée à la biotransformation développée et à la rétention par la membrane et son colmatage. Si l'élimination par sorption est faible, les quantités adsorbées demeurent néanmoins importantes en raison des concentrations médicamenteuses élevées des EHO. **Le transfert de pollution de la phase liquide vers la phase solide ne peut ainsi être négligé et doit être pris en compte dans la détermination de la filière appropriée de traitement des boues.**

L'impact des techniques d'inhibition sur la biomasse avait rarement été étudié. Le protocole d'inhibition des boues activées développé dans ce travail de thèse permet d'assurer une inhibition totale de la biomasse sans en modifier son intégrité structurelle. **L'inhibition consiste à appliquer des conditions anaérobies à la biomasse**, c'est-à-dire à supprimer tout oxygène libre ou lié dans le système avant introduction du polluant à étudier. Même si ce travail, présenté en annexe, n'est pas directement lié à la gestion d'une unité de traitement des effluents, il permettra de servir de référence aux nombreuses études menées sur le mécanisme de sorption **car il garantit un impact nul de la technique d'inhibition proposée sur les propriétés de sorption des micropolluants.**

Les boues activées développées dans le BàM pilote ont montré de grandes facultés d'adaptation aux médicaments contenus dans les EHO. Ce constat est appuyé par la **conservation des capacités épuratrices de la biomasse en présence de cocktail médicamenteux, l'acquisition d'une antibiorésistance prononcée et surtout par la création de capacités de biotransformation sur les médicaments sélectionnés.** L'exemple le plus révélateur concerne les deux anticancéreux CP et IF pour lesquels la biotransformation par les boues de STEP est quasiment inexistante tandis que 20 % d'élimination par biotransformation ont été réalisés par les boues du $BàM_{IE}$ hôpital en seulement 4 heures de contact. Il est remarquable que l'amélioration systématique des performances par les boues activées développées dans le BàM pilote vis-à-vis des boues activées de STEP ait été obtenue

malgré la présence dans les EHO de nombreux composés (médicaments, métabolites, produits d'entretien) dont les effets inhibiteurs se sont parfois ressentis sur le développement de la biomasse. **Le traitement directement sur site des EHO permet le développement des performances épuratoires sur les molécules médicamenteuses et confirme, bien que la présence simultanée de ces nombreux composés conduise à une réponse biologique complexe, le choix du procédé BàM pour le traitement de cet effluent.** Les résultats de cette thèse sont prometteurs puisqu'une amélioration notable de l'élimination de la pollution spécifique visée a été obtenue et que les paramètres permettant le développement de la biomasse ont été identifiés. **Cette étude a permis de répondre positivement à la question de faisabilité du traitement des effluents du service d'oncologie par bioréacteur à membranes.** La robustesse du procédé et les capacités d'adaptation de la biomasse sont largement dépendants de la présence d'une membrane ; membrane qui compense également les effets toxiques pouvant impacter les boues activées : fragilisation de la biomasse, excrétion d'exopolymères (mécanisme de protection). Il convient maintenant de vérifier sur une (des) nouvelle(s) campagne(s) expérimentale(s) les perspectives / recommandations dégagées par ce travail de thèse avant d'envisager l'industrialisation de ce procédé, aujourd'hui prématurée, pour le traitement d'un service hospitalier :

(i) Les fluctuations de composition des EHO ont perturbé le développement de la biomasse et ses performances épuratoires. Il serait ainsi fortement recommandé de mener une étude, toujours à l'échelle pilote, **sur le traitement d'un effluent représentatif d'un service entier** afin de limiter la dépendance de composition de l'effluent à un simple changement de patient associé à une différente posologie. Cela induirait quelques travaux sur le circuit de collecte des effluents du service d'oncologie de l'hôpital de la Timone.

(ii) Il serait judicieux d'affecter une **surface membranaire plus élevée** en prévision d'éventuelles chutes de pollution des EHO afin **d'assurer l'application d'une Cm toujours supérieure à 0.20 kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}** recommandée par ce travail.

(iii) Les produits tensioactifs, utilisés en grande quantité dans les hôpitaux pour satisfaire les niveaux élevés d'hygiène requis, sont supposés responsables de nombreuses perturbations

observées telles que le moussage parfois continu de la liqueur mixte ou l'inhibition de la dénitrification et de la respiration exogène dans le réacteur. Alors que leur substitution ou l'affectation d'un point de rejet spécifique non relié au réseau d'eaux usées du service semble difficilement envisageable, **il pourrait être pertinent de développer un prétraitement dédié.** Aussi, une étude sur **l'influence des produits tensioactifs sur la nature du colmatage membranaire et sur la rétention des molécules médicamenteuses** permettrait éventuellement de comprendre certaines interactions aboutissant à la rétention des médicaments sélectionnés.

(iv) Si les recommandations énoncées dans les trois premiers points favorisent les performances épuratoires et le développement de la biomasse alors la possibilité d'extraire du BàM des boues en excès permettrait de tester l'influence de **différents âges de boues sur le développement des capacités de biotransformation sur les molécules médicamenteuses.**

(v) Cette étude est la première, à notre connaissance, à relever une rétention significative des médicaments sélectionnés par une membrane d'ultrafiltration et son colmatage. Le colmatage semble jouer un rôle crucial mais la rétention significative de certains médicaments par la membrane quasi neuve montre que d'autres mécanismes interviennent dans la rétention des médicaments sélectionnés. **Il est ainsi nécessaire de quantifier l'influence de ces différents paramètres (résistance du colmatage, nature du colmatage (produits tensioactifs), propriétés de la liqueur mixte et état physiologique des boues activées) sur la rétention médicamenteuse afin de l'optimiser.** L'influence de la composition des EHO sur l'état physiologique des boues activées devrait également être étudiée car ce paramètre pourrait directement intervenir sur la cinétique de formation du colmatage et sur la rétention des molécules médicamenteuses via leur sorption sur les produits microbiens solubles relargués lors de la lyse cellulaire.

(vi) Dans le même esprit, une étude sur un BàM équipé de membranes à seuil de coupure réduit serait intéressante à mener sur un effluent réel. L'influence de l'accumulation des molécules médicamenteuses dans le réacteur biologique serait à étudier car elle pourrait altérer les performances épuratoires de la biomasse ou au contraire, être bénéfique en permettant le développement de capacités plus étendues de biotransformation. Cependant,

le verrou technologique majeur à lever d'une telle étude concernerait la capacité à maintenir un flux de production suffisant, la perméabilité à l'eau d'une membrane de nanofiltration étant de l'ordre de grandeur de celle d'une membrane d'ultrafiltration filtrant des boues activées. L'impact des EHO sur le colmatage a de plus été démontré lors de la première campagne et les lyses consécutives au stress bactérien induit par les EHO peuvent conduire à une formation de colmatage très prononcée. Il apparaît donc qu'une telle étude soit très difficilement envisageable d'un point de vue industriel.

(vii) Malgré les résultats prometteurs atteints dans cette présente étude, la technologie bioréacteur à membranes semble aujourd'hui limitée pour atteindre une élimination excellente et systématique de la pollution médicamenteuse. **Il serait donc judicieux d'évaluer, en parallèle à l'étude à mener sur l'optimisation du BàM pour le traitement des EHO, la faisabilité technico-économique de différents procédés de traitement tertiaire (ozonation, charbon actif, nanofiltration…).**

(viii) Le devenir des **métabolites**, humains et issus du processus de biotransformation, n'a été que très rarement étudié, principalement en raison du manque de développement des techniques analytiques. Ces molécules sont pourtant parfois excrétées dans des proportions bien plus importantes que leurs molécules mères. La présence de métabolites à des concentrations environnementales supposées élevées et la méconnaissance totale des risques associés imposent l'intensification des recherches sur ces produits de transformation. **L'évaluation de leur devenir au cours du traitement des EHO par BàM, pouvant conduire à leur élimination ou à leur formation suite au processus de biotransformation, s'avère ainsi nécessaire pour valider définitivement ce procédé pour le traitement de résidus médicamenteux.**

(ix) L'étude bibliographique a exposé la problématique complexe que représentait la détermination de l'écotoxicité des résidus médicamenteux. **La mise au point de tests d'écotoxicité fiables constituerait assurément le meilleur outil de quantification des performances du BàM.** De tels tests permettraient en effet de mesurer la **toxicité d'un mélange** ce qui assurerait une évaluation fiable de l'épuration globale atteinte en comparaison à une évaluation reposant sur l'élimination de molécules médicamenteuses

isolées, bien que sélectionnées selon des critères pertinents. La quantification de l'écotoxicité des EHO, du surnageant du réacteur biologique et du perméat permettrait de mesurer l'épuration biologique ainsi que la rétention de la toxicité par la membrane. Enfin, **la confrontation de données écotoxicologiques aux concentrations des principaux médicaments pourrait orienter l'optimisation de l'exploitation du BàM sur l'élimination de certains médicaments critiques.**

(x) Le degré d'**antibiorésistance** développée par la biomasse au contact des EHO s'est avéré très prononcé et montre bien les facultés d'adaptation des boues activées. Ce résultat confirme une étude récente démontrant l'influence des effluents hospitaliers sur le développement de bactéries antibiorésistantes au sein de la biomasse épuratrice. Bien que le développement de l'antibiorésistance soit favorable à l'acclimatation de la biomasse aux EHO et à ses performances épuratrices il apparaît indispensable de conduire des études, en parallèle à celles sur le développement des procédés de traitement**, sur les risques associés pour le manipulateur et son environnement. Une étude technico-économique devrait également être consacrée aux filières de traitement des boues en excès** développées afin de conclure sur la faisabilité industrielle du traitement des effluents d'un service hospitalier.

Références bibliographiques

60 millions de consommateurs n° 481. Qualité de l'eau, à qui faire confiance ? Avril 2013.

Abegglen C., Joss A., McArdell C., Fink G., Schlüsener M., Ternes T., Siegrist H., 2009. The fate of selected micropollutants in a single-house MBR. Water Research 43, 2036-2046.

Académie nationale de Pharmacie, 2008. Médicaments et environnement.

Afssa, 2008. Hiérarchisation des résidus de médicaments d'intérêt pour l'analyse des ressources et des eaux traitées.

Al-Ahmad A., Daschner F., Kümmerer K., 1999. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. Arch Environ Contam Toxicol 37 (2), 158-163.

Allen, Y., Matthiessen, P., Scott, A. P., Haworth, S., Feist, S. et Thain, J. E. (1999). The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments -- further surveys of flounder. Science of The Total Environment 233, 5-20.

Alturki A., Tadkaew N., McDonald J., Khan S., Price W., Nghiem L., 2010. Combining MBR and NF/RO membrane filtration for the removal of trace organics in indirect potable water reuse applications. Journal of Membrane Science 365 (1-2), 206-215.

Anses, 2011. Campagne nationale d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine.

Ansm, 2013. Analyse des ventes de médicaments en France en 2012.

Aubenneau M., Tahar A., Casellas C., Wisniewski C., 2010. Membrane bioreactor for pharmaceutically active compounds removal: Effects of carbamazepine on mixed microbial communities implied in the treatment. Process Biochemistry 45, 1826-1831.

Backhaus T., Arrhenius A., Blanck H., 2004. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: predictive power and limitations of independent action and concentration addition. Environ. Sci. Technol 38, 6363–6370.

Backhaus T., Sumpter J.P., Blanck H., 2008. On the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures. Pharmaceuticals in the Environment. Sources Fate Effects and Risks, third ed. Springer, Berlin Heidelberg, 257–276.

Backhaus T., Karlsson M., 2014. Screening level mixture risk assessment of pharmaceuticals in STP effluents, Water Research 49, 157-165.

Barbot E., Seyssiecq I., Roche N., Marrot B., 2010. Inhibition of activated sludge respiration by sodium azide addition: Effect on rheology and oxygen transfer. Chemical Engineering Journal 163, 230-235.

Barcelo D., 2003. Emerging pollutants in water analysis. Trends in Analytical Chemistry 22 (10), 14-16.

Barret M., Patureau D., Latrille E., Carrère H., 2010. A three-compartment model for micropollutants sorption in sludge: Methodological approach and insights. Water Research 44, 616-624.

Batt A., Kim S., Aga D., 2006. Enhanced biodegradation of iopromide and trimethoprim in nitrifying activated sludge, Environmental Science Technology 40, 7367–7373.

Bendz D., Paxéus N., Ginn T., Loge F., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. Journal of Hazardous Materials 122, 19-204.

Berns A., Philipp H., Narres H., Burauel P., Vereecken H., Tappe W., 2008. Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy. Eur. J. Soil Sci 59, 540–550.

Berthe-Corti L., Fetzner S., 2002. Bacterial metabolism of n-alkanes and ammonia under oxic, suboxic and anoxic conditions. Acta Biotechnol 22 (3 –4), 299 – 336.

Besse J-P., Latour J-F., Garric J., 2012. Anticancer drugs in surface waters: What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? Environment International 39 (1), 73-86.

Besse J-P., Garric J., 2008. Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. Toxicology Letters 176, 104-123.

Bernhard M., Müller J., Knepper T., 2006. Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. Water Research 40, 3419– 3428.

Bicchi C., Schiliro T., Pignata C., Fea E., Cordero C., Canale F., Gilli G., 2009. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. Science of the Total Environment 407 (6) 1842-1851.

Bitton G., 1994. Wastewater microbiology. Chapter 18. Wiley-Liss. 333-335.

Boillot C., 2008. Evaluation des risques écotoxicologiques lies aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Thèse de doctorat, INSA de Lyon.

Boleda M., Galceran M., Ventura., 2007. Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of chromatography A 1175, 38-48.

Bolong N., Ismail A., Salim M., Matsuura T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. Desalination 239, 229-246.

Bouki C., Venieri D., Diamadopoulos E., 2013. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety 91, 1-9.

Brown K., Kulis J., Thomson B., Chapman T., Mawhinney D., 2006. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. Science of the Total Environment 366, 772-783.

Bruchmann J., Kirchen S., Schwartz T., 2013. Sub-inhibitory concentrations of antibiotics and wastewater influencing biofilm formation and gene expression of multi-resistant Pseudomonas aeruginosa wastewater isolates. Environ Sci Pollut Res Int.

Bu Q., Wang B., Huang J., Deng S., Yu G., 2013. Pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in China: A review. Journal of Hazardous Material 262, 189-211.

Buerge I., Buser H., Poiger T., Müller M., 2006. 1st Network Conference on Persistent Organic Pollutants: Human Exposure and Impacts, University of Birmingham, March 29-30, 2006.

Calamari D., Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., 2003. Strategic survey of therapeutic drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. Environ Sci Technol 37, 1241–1248.

Camacho-Munoz D., Martin J., Santos J., Aparicio I., Alonso E., 2012. Effectiveness of conventional and low-cost wastewater treatments in the removal of pharmaceutically active compounds. Water Air Soil Pollut 223, 2611–21.

Carballa M., Omil F., Lema J., Llompart M., Garcia-Jares C., Rodriguez I., Gomez M., Ternes T., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics andhormones in a sewage treatment plant. Water Research 38, 2918-2926.

Cargouet M., Perdiz D., Mouatassim-Souali A., Tamisier-Karolak S., Levi Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). Science of The Total Environment 324 (1-3), 55-66.

CASFM, 2013. Recommandations 2013.

Chefetz B., Stimler K., Shechter M., Drori Y., 2006. Interactions of sodium azide with triazine herbicides: Effect on sorption to soils. Chemosphere 65, 352-357.

Chen J., Huang X., Lee D., 2008. Bisphenol A removal by a membrane bioreactor. Process Biochemistry 43, 451-456.

Chen Y., Yu G., Cao Q., Zhang H., Lin Q., Hong Y., 2013. Occurrence and environmental implications of pharmaceuticals in Chinese municipal sewage sludge. Chemosphere 93 (9), 1765-1772.

Cirja M., Ivashechkin P., Schäffer A., Corvini P., 2008. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR), Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 7 (1), 61–78.

Clara M., Strenn B., Saracevic E., Kreuzinger N., 2004. Adsorption of bisphenol-A, 17b-estradiole and 17a-ethinylestradiole to sewage sludge. Chemosphere 56, 843-851.

Clara M., Kreuzinger N., Strenn B., Gans O., Kroiss H., 2005. The solids retention time—a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. Water Research 39, 97-106.

Cleuvers M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. Ecotox. Environ. Safe 59, 309–315.

Clouzot L., 2009. Etude du bioréacteur à membrane pour l'élimination de l'hormone synthétique 17α-éthinylestradiol. Thèse de doctorat, Université Paul Cézanne d'Aix-Marseille.

Clouzot L., Doumenq P., Roche N., Marrot B, 2010. Kinetic parameters for 17a - ethinylestradiol removal by nitrifying activated sludge developed in a membrane bioreactor. Bioresource Technology 101, 6425-6431.

Clouzot L., Roche N., Marrot B., 2011. Effect of membrane bioreactor configurations on sludge structure and microbial activity. Bioresource Technology 102 (2), 975-981.

Conkle J., White J., Metcalfe C., 2008. Reduction of pharmaceutically active compounds by a lagoon wetland wastewater treatment system in Southeast Louisiana. Chemosphere 73, 1741-1748.

Crane M., Watts C., Boucard T., 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. Science of the Total Environment 367 (1), 23-41.

Cribb A., Spielberg S., 1992. Sulfamethoxazole is metabolized to the hydroxylamine in humans. Clin Pharmacol Ther 51 (5), 522-526.

Cunningham V., Binks S., Olson M., 2009. Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. Regulatory Toxicology and Pharmacology 53, 39-45.

Daughton C., Ternes T., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? Environ Health Perspect 107, 907-038.

De Metrio G., Corriero A., Desantis S., Zubani D., Cirillo F., Deflorio M., Bridges C., Eicker J., de la Serna J., Megalofonou P., Kime D., 2003. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (Xiphias gladius L.). Marine Pollution Bulletin 46, 358-361.

De Wever H., Weiss S., Reemtsma, Vereecken J., Müller J., Knepper T., Rörden O., Gonzalez S., Barcelo D., Hernando M., 2007. Comparison of sulfonated and other micropollutants removal in membrane bioreactor and conventional wastewater treatment. Water Research 41, 935-945.

Defrance L., Jaffrin M., Gupta B., Paullier P., Geaugey V., 2000. Contribution of various constituents of activated sludge to membrane bioreactor fouling. Bioresource Technology 73 (2), 105-112.

Delgado L., 2009. Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux : élimination et influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le procédé. Thèse de doctorat, INP Toulouse.

Delgado L., Faucet-Marquis V., Schetrite S., Pfohl-Leszkowicz A., Paranthoen S., Albasi C., 2010. Effect of cytostatic drugs on the sludge and on the mixed liquor characteristics of a cross-flow membrane bioreactor: Consequence on the process. Journal of Membrane Science 347, 165-173.

Deloffre-Bonnamour N, 1995. Les rejets des établissements de santé : des effluents liquides aux déchets solides. Mémoire de maîtrise. Université Claude Bernard, Lyon.

Diasio R., Harris B., 1989. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. Clin Pharmacokinet 16 (4), 215-237.

Dionisi D., Levantesi C., Majone M., Bornoroni L., De Sanctis M, 2007. Effect of Micropollutants (Organic Xenobiotic sand heavy metals) on the Activated Sludge Process. Ind. Eng. Cham. Res. 46, 6762-6769.

Doerr-MacEwen N., Haight M, 2006. Expert stakeholders' views on the management of human pharmaceuticals in the environment. Environ. Manage 38, 853–866.

Dolar D., Gros M., Rodriguez-Mozaz S., Moreno J., Comas J., Rodriguez-Roda I., Barcelo D., 2012. Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR–RO. Journal of Hazardous Materials 239-240, 64-69.

Drillia P., Dokianakis S., Fountoulakis M., Kornaros M., Stamatelatou K., Lyberatos G., 2005. On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: the example of the antibiotic sulfamethoxazole, Journal of Hazardous Materials 122, 259 – 265.

Emmanuel E, 2004. Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Thèse de doctorat, INSA de Lyon.

Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM et Vermande P, 2005. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. J. Hazard. Mater. 117 (1), 1-11.

EMEA, 2006. Guideline on the requirements to the chemical and pharmaceutical quality documentation concerning investigational medicinal products in clinical trial.

Escher B., Baumgartner R., Koller M., Treyer K., Lienert J., McArdell C., 2011. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. Water Research 45, 75-92.

Fent K., Weston A.A, Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceutical. Aquat. Toxicol 76, 122-159.

Ferk F., Misik M., Grummt T., Majer B., Fuerhacker M., Buchmann C., Vital M., Uhl M., Lenz K., Grillitsch B., Parzefall W., Nersesyan A., Knasmüller S., 2009. Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. Mutations Research 672, 69-75.

Ferreira da Silva B., Jelic A., López-Serna R., Mozeto A., Petrovi M., Barcelo D., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. Chemosphere 85 (8), 1331-1339.

Foster A., 2007. Occurrence and fate of endocrine disruptors through the San Marcos wastewater treatment plant. Thèse de Master, San Marcos (Texas, Etats-Unis)

Fram M., Belitz K., 2011. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California, Science of the Total Environment 409 (18), 3409-3417.

Fürhacker M., Lenz K., Mahnik S., Weissenbacher N., Mader R., Knasmüller S., Ferk F., Uhl M., Bursch W., Köllensperger G., Hann S., 2006. Chemische Analyse, Risikobewertung und Entfernung von ausgewählten Zytostatika aus Abwasserströmen aus Krankenhäusern Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft (BMLFUW), Wien.

Gagnaire J., 2010. Couplage de procédés appliqué au traitement d'un effluent de compostage. Thèse de doctorat, Université Paul Cézanne d'Aix-Marseille.

Gaillardon P., 1996. Influence of soil moisture on long-term sorption of diuron and isoproturon, Pestic. Sci. 47, 347–354.

Gander M., Jefferson B., Judd S., 2000. Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment:

a review with cost considerations. Separation and Purification Technology 18 (2), 119-130.

Gilard V., Malet-Martino M., de Forni M., Niemeyer U., Ader J., Martino R., 1993. Determination of the urinary excretion of ifosfamide and its phosphorated metabolites by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 31 (5), 387-394.

Gilard V., Martino R., Malet-Martino M., Kutscher B., Müller A., Niemeyer U., Pohl J., Polymeropoulos E., 1994. Chemical and biological evaluation of hydrolysis products of cyclophosphamide. J Med Chem 37 (23), 3986-3993.

Giuliani F., Koller T., Würgle F., Widmer R., 1996. Detection of genotoxic activity in native hospital waste water by the umuC test. Mutation Research 368, 49-57.

Göbel A., Thomsen A., McArdell C., Joss A., Giger W., 2005. Occurrence and Sorption Behavior of Sulfonamides, Macrolides, and Trimethoprim in Activated Sludge Treatment. Environ. Sci. Technol. 39, 3981-3989.

Golet E, Xifra I., Siegrist H., Alder A., Giger W., 2003. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. Environ. Sci. Technol. 37, 3243–3249.

Gomez M., Bueno M., Lacorte S., Fernandez-Alba A., Agüera A., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. Chemosphere 66, 993-1002.

Gomez-Canela C., Cortes-Francisco N., Pujol C., Ventura F., Lacorte S., Caixach J., 2012. Occurrence of cyclophosphamide and epirubicin in wastewaters by direct injection analysis-liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. Environ Sci Pollut Res Int 19 (8), 3210-3218.

Grasmick A., Cabassu C., Spérandio M., Wisniewski C., 2007. Bioréacteurs à membranes et traitement des eaux usées. Les techniques de l'ingénieur, W4140.

Green R., Newtion I., Shultz S., Cunningham A., Gilbert M., Pain D., Prakash V., 2004. Diclofenac poisoning as a cause of vulture population dclines across the Indian subcontinent. Journal of Applied Ecology 41, 793-800.

Gros M., Petrovic M., Barcelo D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. Talanta 70 (4), 678-690.

Gullberg E., Cao S., Berg O. G., Ilback C., Sandergren L., Hughes D., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. PLoS Pathog.

Halling-Sorensen B., Nors Nielsen S., Lanzsky P.F. Ingerslev F., Holten Lützhoft H.C., Jorgensen S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. Chemosphere 36, 357-393.

Hamon P., Villain M., Marrot B., 2014. Determination of sorption properties of micropollutants: What is the most suitable activated sludge inhibition technique to preserve the biomass structure? Chemical Engineering Journal 242, 260-268.

Hartemann P., Hautemaniere A., Joyeux M., 2005. La problématique des effluents hospitaliers. Hygiène 13(5), 369-374.

Heggie G., Sommadossi J-P., Cross D., Huster W., Diasio R., 1987. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. Cancer Res 47, 2203-2206.

Henriques I., Holbrook R., Kelly R., Love N., 2005. The impact of floc size on respiration inhibition by soluble toxicants—a comparative investigation. Water Research 39, 2559-2568.

Henriques I., Love N., 2007. The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. Water Research 41, 4177-4185.

HolbrookR.,LoveN.,Novak J., 2004. Sorptionof17bestradioland 17ethinylestradiol by colloidal organic carbon derived from biological wastewater treatment systems. Environ. Sci.Technol.38, 3322–3329.

Hörsing M., Ledin A., Grabic R., Fick J., Tysklind M., Jansen J., Andersen H., 2011. Determination of sorption of seventy-five pharmaceuticals in sewage sludge. Water Research 45, 4470-4482.

Hummel D., Löffler D., Fink G., Ternes T., 2006. Simultaneous Determination of Psychoactive Drugs and Their Metabolites in Aqueous Matrices by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Environmental Science Technology 40, 7321-7328.

Igos E., Benetto E., Venditti S., Kohler C., Cornelissen A., Moeller R., Biwer A., 2012. Is it better to remove pharmaceuticals in decentralized or conventional wastewater treatment plants? A life cycle assessment comparison. Science of the Total Environment 438, 533-540.

Ikehata K., Naghashkar N., El-Din M., 2006. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: a review. Ozone: Sci. Eng. 28, 353–414.

Institut National du Cancer, 2012. Situation de la chimiothérapie des cancers.

IUCN, 2004. IUCN Red list of threatened species. Gland, Switzerland.

Jobling S., Nolan M., Tyler C., Brighty G., Sumpter J., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. Environ Sci Technol, 32, 2498-2506.

Johnson L., Lomax D., Myers M., Olson O., Sol S., O'Neill S., West J., Collier T., 2008. Xenoestrogen exposure and effects in English sole (Parophrys vetulus) from Puget Sound, WA. Aquatic Toxicology 88, 29-38.

Jones O., Green P., Voulvoulis N., Lester J., 2007. Questioning the Excessive Use of Advanced Treatment to Remove Organic Micropollutants from Wastewater. Environ. Sci. Technol. 41, 5085-5089.

Joqueviel C., Martino R., Gilard V., Malet-Martino M., Canal P., Niemeyer U., 1998. Urinary excretion of cyclophosphamide in humans, determined by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Drug Metab Dispos 26 (5), 418-428.

Joss A., Andersen H., Ternes T., Richle P., Siegrist H., 2004. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. Environmental Science Technology 38, 3047-3055.

Joss A., Keller E., Alder A., Göbel A., McArdell C., Ternes T., Siegrist H., 2005. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. Water Research 39, 3139-3152.

Joss A., Zabczynski S., Göbel A., Hoffmann B., Löffler D., McArdell C., Ternes T., Thomsen A., Siegrist H., 2006. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. Water Research 40, 1686-1696.

Junker T., Alexy R., Knacker T., Kümmerer K., 2006. Biodegradability of 14C-Labeled Antibiotics in a Modified Laboratory Scale Sewage Treatment Plant at Environmentally Relevant Concentrations. Environ Sci Technol 40, 318-324.

Karthikeyan K., Meyer M., 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. Science of the Total Environment 361, 196-207.

Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R., Guwy A., 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. Water Research 43, 363-380.

Kim J., LeeC., Chang I., 2001. Effect of pump shear on the performance of a crossflow membrane bioreactor. Water Research 35, 2137-2144.

Kim J., Ryu K., Kim E., Choe W., Cha G., Yoo I., 2007. Degradation of bisphenol A and nonylphenol by nitrifying activated sludge. Process Biochemistry 42, 1470-1474.

Kimura K., Hara H., Watanabe Y., 2005. Removal of pharmaceutical compounds by submerged membrane bioreactors (MBRs). Desalination 178, 135– 140.

Kiffmeryer T., Götze H., Jursch M., Lüders U., 1998. Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. Fresenius J Anal Chem 361, 185–191

Kosjek T., Heath E., 2011. Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment. Trends in Analytical Chemistry 30 (7), 1065 - 1087.

Kosjek T., Perko S., Zigon D., Heath E., 2013. Fluorouracil in the environment: Analysis, occurrence, degradation and transformation. Journal of Chromatography A 1290, 66-72.

Kovalova L., McArdell C., Hollender J., 2009. Challenge of high polarity and low concentrations in analysis of cytostatics and metabolites in wastewater by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1216, 1100-1108.

Kovalova L., Siegrist H., Singer H., Wittmer A., McArdell C., 2012. Hospital Wastewater Treatment by Membrane Bioreactor: Performance and Efficiency for Organic Micropollutant Elimination. Environmental Science Technology 46, 1536-1545.

Kraigher B., Kosjek T., Heath E., Kompare B., Mandic-Mulec I., 2008. Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. Water Research 42, 4578-4588.

Kraigher B., Mandic-Mulec I., 2011. Nitrification activity and community structure of nitrite-oxidizing bacteria in the bioreactors operated with addition of pharmaceuticals. Journal of Hazardous Materials 188, 78-84.

Kümmerer K., Steger-Hartmann T., Meyer M., 1997. Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. Water Research 31 (11), 2705-2710.

Kummerer K., Al-Ahmad A., 1997. Biodegradability of the anti-tumor agents 5-fluorouracil, cytarabine, and gemcitabine: impact of the chemical structure and synergistic toxicity with hospital effluent. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 25 (4), 166–172.

Kummerer K., Helmers E., 1997. Hospital effluents as a source of platinum for the environment. Science of Total Environment 193, 179-184.

Kummerer K., Helmers E., 2000. Hospital effluents as a source of gadolinium in the aquatic environment. Environ. Science Technol. 34, 573–577.

Kümmerer K., 2007. Sustainable from the very beginning: rational design of molecules by life cycle engineering as an important approach for Green Pharmacy and Green Chemistry, Green Chemistry 9, 899–907.

Kümmerer K., 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. Journal of Environmental Management 90 (8), 2354 – 2366.

Kwon D., Vigneswaran S., Fane A., Aim R., 2000. Experimental determination of critical flux in cross-flow microfiltration. Separation and Purification Technology 19, 169-181.

Lai K., Johnson M., Scrimshaw K., Lester M., 2000. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. Environmental Science Technology 34, 3890-3894.

Larsen T., Alder A., Eggen R., Maurer M., Lienert J., 2009. Source separation: Will we see a paradigm shift in wastewater handling? Environmental Science & Technology 43 (16), 6121-6125.

Le Corre K., Ort C., Kateley D., Allen B., Escher B., Keller J., 2012. Consumption-based approach for assessing the contribution of hospitals towards the load of pharmaceutical residues in municipal wastewater. Environment International 45, 99-111.

Lee W., Kang S., Shin H., 2003. Sludge characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors, Journal of Membrane Science 216, 217–227.

Lema (Loi sur l'eau et les milieux aquatiques), 2006.

Leprat P., 1998. Les rejets liquides hospitaliers, quels agents et quelles solutions techniques? Santé et environnement hospitalier, les Assises Nationales QUALIBO, Caen, 10-13.

Leprat P., 1999. Caractéristiques et impacts des rejets liquides hospitaliers. Techniques hospitalières 634, 56-57.

Lesjean B., Gnirss R., Adam C., 2002. Process configurations adapted to membrane bioreactors for enhanced biological phosphorous and nitrogen removal. Desalination 149, 217-224.

Li K., Yediler A., Yang M., Schulte-Hostede S., Wong M., 2008. Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products. Chemosphere 72, 473-478.

Li B., Zhang T., Xu Z., Fang H., 2009. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 645, 64-72.

Li B., Zhang T., 2011. Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants. Chemosphere 83, 1284-1289.

Li X., Zheng W., Kelly W., 2013. Occurrence and removal of pharmaceutical and hormone contaminants in rural wastewater treatment lagoons. Science of the Total Environment 445-446, 22-28.

Li Y., Zhu G., Ng W.J., Tan S.K., 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. Science of the Total Environment 468-469, p. 908-932.

Lienert J., Bürki T., Escher B., 2007. Reducing micropollutants with source control: substance flow analysis of 212 pharmaceuticals in faeces and urine. Water Sci. Technol. 55 (5), 87–96.

Lienert J., Larsen T., 2010. High acceptance of urine source separation in seven European countries: A review. Environmental Science & Technology 44 (2), 556-566.

Lin A., Tsai Y., 2009. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. Science of the Total Environment 407 (12), 3793-3802.

Lindberg R., Olofsson U., Rendahl P., Johansson M., Tyslind M., Andersson B., 2006. Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. Environ. Sci. Technol. 40 (3), 1042-1048.

Lishman L., Smyth S., Sarafin S., Kleywegt S., Toito J., Peart T., Lee B., Servos B., Beland M., Seto P., 2006. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. Science of the Total Environment 367, 544 –558.

Liu J., Wong M., 2013. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. Environment International 59, 208-224.

LIR, 2012. Synthèse de l'étude européenne sur la consommation de médicaments.

Llorens E., Matamoros V., Domingo V., Bayona J., Garcia J., 2009. Water quality improvement in a full-scale tertiary constructed wetland: Effects on conventional and specific organic contaminants. Science of the Total Environment 407, 2517-2524.

Louvet J-N., Giammarino C., Potier O., Pons M-N., 2009. Impact des rejets d'antibiotiques sur le traitement par boues activées, cas de l'érythromycine. TH 715, mai-juin 2009.

MacLeod S., Wong C., 2010. Loadings, trends, comparisons, and fate of achiral and chiral pharmaceuticals in wastewaters from urban tertiary and rural aerated lagoon treatments. Water Research 44, 533-544.

Mahnik S., Lenz K., Weissenbacher N., Mader R., Fuerhacker M., 2007. Fate of 5-fluorouracil, doxorubicin, epirubicin, and daunorubicin in hospital wastewater and their elimination by activated sludge and treatment in a membrane-bio-reactor system. Chemosphere 66, 30-37.

Martin S., Choubert J., Esperanza M., Miège C., Navalón Madrigal P., Budzinski H., 2011. On-site evaluation of the removal of 100 micro-pollutants through advanced wastewater treatment processes for reuse applications. Water Sci Technol 63, 2486–2497.

Matamoros V., Bayona J., 2006. Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed wetlands. Environ Sci Technol 40, 5811–5816.

Maurer M., Escher B., Richle P., Schaffner C., Alder A., 2007. Elimination of b-blockers in sewage treatment plants. Water Research 41, 1614-1622.

Melin T., Bixiio D., Thoeye C., De Wilde W., De Koning J., van der Graaf J., Wintgens T., 2006. Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse. Desalination 187, 271-282.

Metcalf et Eddy, 1991. Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse. New York: McGraw-Hill Book Company. 3rd ed. 303p.

Michael I., Rizzo L., McArdell C.S., Manaia C.M., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Fatta-Kassinos D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. Water Research 47, 957-995.

Miège C., Favier M., Brosse C., Canler J.P., Coquery M., 2006. Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. Talanta 70 (4), 739-744.

Miège C., Choubert J., Ribeiro L., Eusèbe M., Coquery M., 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. Environmental Pollution 157, 1721-1726.

Moldovan Z., 2006. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. Chemosphere 64, 1808-1817.

Mouy N., 2008. Effluents hospitaliers et réglementation : l'exemple parisien. Techniques Hospitalières 711.

Mullot J-U., 2009. Modélisation des flux de médicaments dans les effluents hospitaliers. Thèse de doctorat, Université Paris-Sud 11.

Oaks J., Gilbert M., Virani M., Watson R., Meteyer C., Rideout B., Shivaprasad H., Ahmed S., Chaudhry M., Arshad M., Mahmoud S., All A., Khan A., 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. Nature 427, 630-633.

Oh J., Silverstein J., 1999. Oxygen inhibition of activated sludge. Water Research 33 (8), 1925-1937.

Okuda T., Yamashita N., Tanaka H., Matsukawa H., Tanabe K., 2009. Development of extraction method of pharmaceuticals and their occurrences found in Japanese wastewater treatment plants. Environment International 35, 815-820.

Oppenheimer J., Stephenson R., Burbano A., Liu L., 2007. Characterizing the passage of personal care products through wastewater treatment processes. Water Environ. Res. 79 (13), 2564–2577.

Orias F., Perrodin Y., 2013. Characterisaiton of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. Science of the Total Environment 454-455, 250-276.

Ortiz de Garcia S., Pinto G., Encina P., Mata R., 2013. Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. Science of the Total Environment 444, 451-465.

Pailler J.Y., Frein A., Pfister L., Hoffmaann L., Guignard C., 2009. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. Science of the Total Environment 407, 4736-4743.

Passerat J., Tamtam F., Le Bot B., Eurin J., Chevreuil M. et Servais P. 2010. Rejets hospitaliers d'antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine. European Journal of Water Quality, 41, p1-14.

Peng X., Wang Z., Kuang W., Tan J., Li K., 2006. A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China. Science of the Total Environment 371 (1-3), 314-322.

Petrović M., Škrbić B., Živančev J., Ferrando-Climent L., Barcelo D., 2014. Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole–linear ion trap in different types of water in Serbia, Science of the Total Environment 468-469, 415-428.

Phillips P., Smith S., Kolpin D., Zaugg S., Buxton H., Furlong E., 2010. Method Description, Quality Assurance, Environmental Data, and other Information for Analysis of Pharmaceuticals in Wastewater-Treatment-Plant Effluents, Streamwater, and Reservoirs, 2004-2009.

Plan National sur les Résidus de Médicaments dans les Eaux (PNRM), 2011. Ministère de l'Écologie, du Développement durable, des Transports et du Logement – Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé.

Plan National Santé Environnement (PNSE) 2004-2008. Ministère de la Santé et de la Protection sociale - Ministère de l'Écologie et du Développement durable - Ministère de l'Emploi, du Travail et de la Cohésion sociale - Ministère délégué à la Recherche.

Plan National Santé Environnement 2 (PNSE 2) 2009-2013. Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement Durable et de la Mer – Ministère de la Santé et des Sports – Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche – Ministère du Travail, des Relations Sociales, de la Famille, de la Solidarité et de la Ville.

Pomati F., Orlandi C., Clerici M., Lucian F., Zuccato E., 2007. Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. Toxicol. Sci.102, 129–137.

POSEIDON, 2006. Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse.

Prado N., Ochoa J., Amrane A., 2009. Biodegradation by activated sludge and toxicity of tetracycline into a semi-industrial membrane bioreactor. Bioresource Technology 100, 3769-3774.

Purdom C., Hardiman P., Bye V., Eno C., Tyler C., Sumpter J., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem Ecol, 8, p275-285.

Radjenovic J., Petrovic M., Barcelo D., 2007. Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. Trends in Analytical Chemistry 26 (11), 1132-1144.

Radjenovic J., Petrovic M., Barcelo D., 2009. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. Water Research 43, 831-841.

Reif R., Suarez S., Omil F., Lema J.M., 2008. Fate of pharmaceuticals and cosmetic ingredients during the operation of a MBR treating sewage. Desalination 221, 511-517.

Rivera-Utrilla J., Sànchez-Polo M., Ferro-Garcìa M.A., Prados-Joya G., Ocampo-Pérez R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. Chemosphere 93 (7), 1268-1287.

Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M., Michael I., Fatta-Kassinos D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. Science of the Total Environment 447, 345-360.

Rosal R., Rodriguez A., Perdigon-Melon J., Petre A., Garcia-Calvo E., Gomez M., Agüera A., Fernandez-Alba A., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation.Water Research 44, 578-588.

Sahar E., David I., Gelman Y., Cikurel H., Aharoni A., Messalem R., Brenner A., 2011. The use of RO to remove emerging micropollutants following CAS/UF or MBR treatment of municipal wastewater. Desalination 273, 142-147.

Sahar E., Messalem R., Cikurel H., Aharoni A., Brenner A., Godehart M., Jekel M., Ernst M., 2011. Fate of antibiotics in activated sludge followed by ultrafiltration (CAS-UF) and in a membrane bioreactor (MBR). Water Research 45, 4827-4836.

Sahinkaya E., Dilek F., 2005. Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge—Evaluation of biokinetic coefficients. Environmental Research 99 (2), 243-252.

Santos L. H.M.L.M, Araújo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Mastos C., Montenegro M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 175, 45-95.

Santos A., Ma W, Judd S., 2011. Membrane bioreactors: Two decades of research and implementation. Desalination, 273, 148-154.

Santos L., Gros M., Rodriguez-Mozaz S., Delerue-Matos C., Pena A., Barcelo D., Montenegro M., 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. Science of the Total Environment 461-462, 302-316.

Schalhorn A., Kühl M., 1992. Clinical pharmacokinetics of fluorouracil and folinic acid. Semin Oncol. 19 (2-3), 82-92.

Schwartz T, Kohnen W, Jansen B et Obst U, 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiology Ecology 43 (3), 325-335.

Schwarzenbach R., Gschwend P., Imboden D., 2003. Environmental Organic Chemistry. Wiley-Interscience.

Schwarzenbach R., Escher B.I., Fenner K., Hofstetter T.B., Johnson A.C., von Gunten U., Wehrli B., 2007. The challenge of micropollutants in aquatic systems. Science 313, 1072–1077.

Seyhi B., Drogui P., Buelna G., Blais J., 2012. Removal of bisphenol-A from spiked synthetic effluents using an immersed membrane activated sludge process. Sep. Purif. Technol. 87, 101–109.

Seifert K., Domka F., 2004. Inhibiting Effect of Surfactants and Heavy Metal Ions on the Denitrification Process. Polish Journal of Environmental Studies 14 (1), 87-93.

Seira J., 2013. Rôle de la sorption et de la biodégradation dans l'élimination de micropolluants par des procédés d'épuration biologique : application aux molécules

anticancéreuses traitées par bioréacteur à membrane. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.

Silva E., Rajapak N., Kortenkamp A., 2002. Something from ‘‘nothing’’ - eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. Environ. Sci. Technol 36, 1751–1756.

Sipma J., Osuna B., Collado N., Monclus H., Ferrero G., Comas J., Rodriguez-Roda I., 2010. Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems. Desalination 250 (2), 653-659.

Snyder S., Westerhoff P., Yoon Y., Sedlak D., 2003. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disruptors in water. Implications for the Water Industry. Environ. Eng. Sci. 20 (5), 449–469.

Solé M., alda M., Castillo M., Porte C., Ladegaard Pederson K., Barcelo D., 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the atalonian area (NE Spain). Environ Sci Technol 34, 5076-5083.

Stevens-Garmon J., Drewes J., Khan S., McDonald J., Dickenson E., 2011. Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids. Water Research 45, 3417-3426.

Stalder T., 2012. Implication des effluents d'activités hospitalières et de la filière carnée sur la dissémination de l’antibiorésistance : dynamique des intégrons de l’émission au rejet. Thèse de doctorat, Université de Limoges.

Steger-Hartmann, Kümmerer K., Schecker J., 1996. Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by twostep solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 726 (1-2), 179-184.

Steger-Hartmann, Kümmerer K., Hartmann A., 1997. Biological Degradation of Cyclophosphamide and Its Occurrence in Sewage Water. Ecotoxicology and environmental safety 36, 174-179.

Straub J., 2010. Combined environmental risk assessment for 5-fluorouracil and capecitabine in Europe. Integr Environ Assess Manag 6, 540-566.

Suarez S., Carballa M., Omil F., Lema J., 2008. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? Environ Sci Biotechnol 7, 125-138.

Suarez S., Lema J., Omil F., 2009. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation-flocculation and flotation. Bioresource Technology 100, 2138-2146.

Suarez S., Lema J., Omil F., 2010. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. Water Research 44, 3214-3224.

Tadkaew N., Sivakumar M., Khan S., McDonald J., Nghiem L., 2010. Effect of mixed liquor pH on the removal of trace organic contaminants in a membrane bioreactor. Bioresource Technology 101, 1494-1500.

Tadkaew N., Hai F., McDonald J., Khan S., Nghiem L., 2011. Removal of trace organics by MBR treatment: The role of molecular properties. Water Research 45, 2439-2451.

Tambosi J., Sena R., Favier M., Gebhardt W., José H., Schröder H., Moreira R., 2010. Removal of pharmaceutical compounds in membrane bioreactors (MBR) applying submerged membranes. Desalination 261, 148-156.

Tardieu E., Grasmick A., Geaugey V., Manem J., 1999. Influence of hydrodynamics on fouling velocity in a recirculated MBR for wastewater treatment. Journal of Membrane Science 156 (1), 131-140.

Tauxe-Wuersch A., Alencastro L., Grandjean D., Tarradellas J., 2006. Trace determination of tamoxifen and 5-fluorouracil in hospital and urban wastewaters. Int. J. Environ. Anal. Chem. 86 (2006) 473.

Ternes T., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water research 32 (11), 3245-3260.

Ternes, T.A., 2001a. Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment, Chapter 2, 39-54.

Ternes, T.A., 2001b. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. Trends Anal. Chem. 20 (8), 419/434.

Ternes T., Herrmann N., Bonerz M., Knacker T., Siegrist H., Joss A., 2004. A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. Water Research 38, 4075-4084.

Ternes T.A., Joss A., 2006. Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances. The Challenge of Micropollutants in Urban Water Management, IWA Publishing, London.

Ternes T., Bonerz M., Herrmann N., Teiser B., Andersen H., 2007. Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. Chemosphere 66, 894-904.

Thomas K., Dye C., Schlabach M., Langford K., 2007. Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. J. Environ. Monit. 9, 1410–1418.

Thorpe K., Benstead R., Eccles P., Maack G., Williams T., Tyler C., 2008. A practicable laboratory flow-through exposure system for assessing the health effects of effluents in fish. Aquatic Toxicology, 88, p164-172.

Tsai C.T., Lai J.S., Lin S.T, 1998. Quantification of pathogenic micro-organisms in the sludge from treated hospital wastewater. Journal of Applied Micorobiology 85, 171-176.

Union Européenne, 1999. Communication de la commission au conseil et au parlement européen. Stratégie communautaire concernant les perturbateurs endocriniens, une série de substances suspectées d'influencer le système hormonal des hommes et des animaux. COM(1999) 706 final.

Urase T., Kagawa C., Kikuta T., 2005. Factors affecting removal of pharmaceutical substances and estrogens in membrane separation bioreactors. Desalination 178, 107-113.

van der Ven A., Mantel M., Vree T., Koopmans P., van der Meer J., 1994. Formation and elimination of sulfamethoxazole hydroxylamine after oral administration of sulfamethoxazole. Br J Clin Phamacol 38,147–150.

Verlicchi P., Galetti A., Petrovic M., Barcelo D., 2010. Hospitals effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. Journal f Hydrology 389 (3-4), 416-428.

Verlicchi P., Al Aukidy M., Galletti A., Petrovic M., Barcelo D., 2010. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. Science of the Total Environment 430, 109-118.

Verlicchi P., Zambello E., 2014. How efficient are constructed wetlands in removing pharmaceuticals from untreated and treated urban wastewaters? A review. Science of the Total Environment 470-471, 1281-1306.

Vieno N., Tuhkanen T., Kronberg L., 2007. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. Water Research 41, 1001 – 1012.

Vigano L., Arillo A., Bottero S., Massari A. et Mandlich A., 2001. First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). The science of The Total Environment, 269, 189-194.

Villain M., 2012. Bioréacteur à membranes pour le traitement d'eaux usées domestiques : influence des conditions environnementales et opératoires sur l'activité des biomasses et le transfert de matière. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille.

Watkinson A., Murby E., Costanzo S., 2007. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. Water Research 41, 4164-4176.

Watkinson A., Murby E., Kolpin D., Costanzo S., 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. Science of the Total Environment 407, 2711-2723.

Webb S., Ternes T., Gibert M., Olejniczak K., 2003. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. Toxicology Letters 142 Issue 3, 157-167.

Wells M., 2006. LogDow: Key to understanding and regulating waste-water-derived contaminants.Environ.Chem.3, 439–449.

Wick A., Fink G., Joss A., Siegrist H., Ternes T., 2009. Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment. Water Research 43, 1060-1074.

Wick A., Marincas O., Moldovan Z., Ternes T., 2011. Sorption of biocides, triazine and phenylurea herbicides, and UV-filters onto secondary sludge. Water Research 45, 3638-3652.

Wilén B., Keinding K., Nielsen P., 2004. Flocculation of activated sludge flocs by stimulation of the aerobic biological activity. Water Research 38, 3909-3919.

Wisniewski C., Grasmick A., Leon Cruz A., 2000. Critical particle size in membrane bioreactors: Case of a denitrifying bacterial suspension. Journal of Membrane Science 178 (1-2), 141-150.

Witzig R., Manz W., Rosenberger S., Krüger U., Kraume M., Szewzyk U., 2002. Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. Water Research 36, 394-402.

Xia S., Jia R., Feng F., Xie K., Li H., Jing D., Xu X., 2012. Effect of solids retention time on antibiotics removal performance and microbial communities in an A/O-MBR process. Bioresource Technology 106, 36-43.

Xing C., Tardieu E., Qian Y., Wen, X., 2000. Ultrafiltration membrane bioreactor for urban wastewater reclamation. Journal of Membrane Science 177 (1-2), 73-82.

Xu W., Zhang G., Li X., Zou S., Li P., Hu Z., Li J., 2007. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. Water Research 41, 4526-4534.

Yamamoto K., Hiasa M., Mahmood T., Matsuo T., 1989. Direct solid-liquid separation using hollow fiber membrane in an activated-sludge aeration tank. Water Sci technol 21, 43-54.

Yamamoto H., Nakamura Y., Moriguchi S., Nakamura Y., Honda Y., Tamura I., Hirata Y., Sekizawa J., 2009. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. Water Research 43 (2), 351-362.

Yang S., Cha J., Carlson K., 2005. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1097 (1-2), 40-53.

Yang S., Lin C., Lin A., Hong P., 2011. Sorption and biodegradation of sulfonamide antibiotics by activated sludge: Experimental assessment using batch data obtained under aerobic conditions. Water Research 45, 3389-3397.

Yi T., Harper W., 2007. The effect of biomass characteristics on the partitioning and sorption hysteresis of 17a –ethinylestradiol. Water Research 41, 1543-1553.

Yin J., Shao B., Zhang J., Li K., 2010. A preliminary study on the occurrence of cytostatic drugs in hospital effluents in Beijing, China. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 84, 39-45.

Ying G-G., Zhao J-L., Zhou L-J., et Liu S., 2013. Chapter 14 – Fate and occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment (surface water and sediment), Comprehensive Analytical Chemistry 62, 453-557.

Yoon S., Kim H., Yeom I., 2004. The optimum operational condition of membrane bioreactor (MBR): cost estimation of aeration and sludge treatment. Water Research 38, 37-46.

Yoon Y., Westerhoff P., Snyder S., Wert E., 2006. Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. J. Membr. Sci. 270, 88–100.

Yu J., Bouwer E, Coelhan M., 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. Agricultural Water Management 86, 72-80.

Zaviska F., Drogui P., Grasmick A., Azais A., Héran M., 2013. Nanofiltration membrane bioreactor for removing pharmaceutical compounds. Journal of Membrane Science 429, 121-129.

Zhang Z., Hibberd A., Zhou J., 2008. Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: Comparison between spot and passive sampling. Analytica Chimica Acta 607, 37-44.

Zhang D., Gesberg R., Ng W., Tan S., 2014. Removal of pharmaceuticas and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. Environmental Pollution 184, 620-639.

Zounkova R., Kovalova L., Blaha L., Dott W., 2010. Ecotoxicity and genotoxicity of assessment of cytoyoxic antineoplastic drugs and their metabolites. Chemosphere 81, 253-260.

Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R., Melis M., Fanelli R., 2010. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 179 (1-3). 1042-1048.

Nomenclature

Abréviation	**Dénomination**	**Unité**
5-FU	Fluorouracile	-
AOX	Composés organiques adsorbables	-
BàM	Bioréacteur à membranes	-
$BàM_E$	Bioréacteur à membranes externe	-
BaM_I	Bioréacteur à membranes immergées externe	-
$BàM_{IE}$	Bioréacteur à membranes immergées externe	-
CMI	Concentration minimale inhibitrice	$mg.L^{-1}$
CD	Codéine	-
CP	Cyclophosphamide	-
CSDU	Centre de stockage des déchets ultimes	-
DBO_5	Demande biologique en oxygène	$(mgO_2.L^{-1})$
DCO	Demande chimique en oxygène	$(mgO_2.L^{-1})$
DCOP	Demande chimique en oxygène dans le perméat	$(mgO_2.L^{-1})$
DCOS	Demande chimique en oxygène dans le surnageant	$(mgO_2.L^{-1})$
EH	Effluents hospitaliers	-
EHO	Effluents du service d'oncologie	-
EUU	Eaux usées urbaines	-
FC	Facteur de concentration	-
HPLC-UV	Chromatographie liquide haute performance avec détecteur UV	-
ICM	Agents de contraste iodés	
IF	Ifosfamide	-
LQ	Limite de quantification	$\mu g.L^{-1}$
MES	Matières en suspension	$g.L^{-1}$
MVS	Matières volatiles en suspension	$g.L^{-1}$
PNRM	Plan national sur les résidus médicamenteux	-
PNSE	Plan national santé environnement	-
SM	Sulfaméthoxazole	-
NF	Nanofiltration	-
STEP	Station d'épuration	-
TR	Taux de rétention	%
TSB	Temps de séjour des boues	j
TSH	Temps de séjour hydraulique	h
UF	Ultrafiltration	-

Symboles

Cm	Charge massique	$kg.kgMVS^{-1}.j^{-1}$
k_{biol}	Constante cinétique de biotransformation	$L.gMES^{-1}.j^{-1}$
K_D	Coefficient de distribution solide-eau	$L.kgMES^{-1}$
k_{global}	Constante d'élimination maximale	$\mu g^{1-n}.L^{n-1}.j^{-1}$
K_{oc}	Coefficient de partage carbone organique-eau	$L.kgcarboneorganique^{-1}$
K_{ow}	Coefficient de partage octanol-eau	-
Lp	Perméabilité membranaire	$L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$
OUR	Oxygen uptake rate	$mg02.h^{-1}$
$R_{colmatage}$	Résistance du colmatage	m^{-1}
SOUR	Specific Oxygen uptake rate	$mg02.gMVS^{-1}.h^{-1}$

Annexes

Annexe II-1 : Liste des médicaments humains et de leurs métabolites actifs prioritaires à rechercher dans les eaux (Affsa, 2008)

	Molécules	Métabolites
HORMONES	Lévonorgestrel	
	Estradiol	Estrone
	Progestérone	
	Ethinylestradiol	
	Gestodène	
ANTICANCEREUX	Hydroxycarbamide	
	Cytarabine	
	Cyclophosphamide	Moutarde Phosphoramide Acroléine
	Bléomycine	
	Fluorouracile	
	Carboplatine	
	Ifosfamide	Moutarde Isophosphoramide Acroléine
ANTIBIOTIQUES	Amoxicilline	
	Fosfomycine	
	Erythromycine	
	Ofloxacine	
	Doxycycline	
AINS	Acide Acétylsalicylique	Acide Salicylique
	Kétoprofène	
	Ibuprofène	Carboxy Ib./Hydroxy Ib.

	Molécules	Métabolites
NEUROLEPTIQUES	Levodopa	Dopamine
	Oxazépam	
	Fluvoxamine	
	Acide Valproïque	
	Carbamazépine	10,11 Epoxy-Carbamazépine
CARDIOVASCULAIRE	Naftodrofuryl	
	Heptaminol	
	Trimétazidine	
	Aténolol	
	Pravastatine	
	Ramipril	Ramiprilate
	Losartan	
	Amlodipine	
PC	Iobitridol	
	Gadolinium	
DIVERS	Metformine	
	Paracétamol	4-Aminophénol
	Ranitidine	
	Furosémide	
	Hydrochlorothiazide	
	Oméprazole	
	Caféine	

Annexe II-2 : Concentrations des médicaments sélectionnés dans les effluents hospitaliers

Médicament	Concentrations	Informations	Auteurs
5-FU	<5,0 ng.L^{-1} - 27 ng.L^{-1}	Prélèvement proportionnel au débit - Détecté dans 17 échantillons sur 26 (seulement les jours où 5FU est administré dans le service oncologie)	Kovalova et al., 2009
	<8,6 µg.L^{-1} - 124 µg.L^{-1}	**75 % du service d'oncologie** - Moyenne de 24h sur une cuve de stockage	Mahnik et al., 2007
	11,5 - 122 µg.L^{-1}	**75 % du service d'oncologie** - Seulement 0,55 à 4,6 du 5-FU administré est retrouvé dans les EH - Moyennes de 21 - 23,8 - 55 et 91 µg.L^{-1} sur 4 campagnes de prélèvement	Mahnik et al., 2007
	< 1,7 µg.L^{-1}	Jamais détecté dans 4 conduites principales de rejet des EH	Fürhacker et al., 2006
	< 0,015 µg.L^{-1}	7 échantillons	Tauxe-Wuersch et al., 2006
	35 et 92 ng.L^{-1}	**Service d'oncologie** - Bassin de neutralisation - 2 prélèvements sur 2 jours différents	Kosjek et al., 2013
CP	146 ng.L^{-1}	Prélèvement instantané	Steger-Hartman et al., 1996
	19 ng.L^{-1} - 4.5 µg.L^{-1}	Moyenne sur 24 h	Steger-Hartman et al., 1997
	6 - 2000 ng.L^{-1}	Prélèvement instantané	Yin et al., 2009
	0.161 ± 0.026 µg.L^{-1}	Moyenne sur 17 échantillons sur 3 mois - Fréquence de détection 71 %	Kovalova et al., 2012
	5730 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h	Gómez-Canela et al., 2012
	<2 ng.L^{-1} - 21 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h - Fréquence de détection 8 % - Pas détecté entrée et sortie de STEP.	Thomas et al., 2007
IF	24 ng.L^{-1}	Prélèvement instantané	Steger-Hartman et al., 1996
	<6 ng.L^{-1} - 1914 ng.L^{-1}	(médiane 109 ng.L^{-1})	Kümmmerer et al., 1997
	4 ng.L^{-1} - 10647 ng.L^{-1}	Prélèvement instantané - Fréquence de détection 58 %	Yin et al., 2009
	0.895 ± 0.293 µg.L^{-1}	Moyenne sur 17 échantillons sur 3 mois -Fréquence de détection 12 %	Kovalova et al., 2012
	<2 ng.L^{-1} - 338 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h - Fréquence de détection 50 %	Thomas et al., 2007
CD	moyenne de 50 µg.L^{-1}	Détectée dans moins de 60 % des échantillons. Jamais détecté dans les effluents du service d'urgence	Foster et al., 2007
SM	3.476 ± 4.588 µg.L^{-1}	Moyenne sur 17 échantillons sur 3 mois - Fréquence de détection 100 %	Kovalova et al., 2012
SM	400 - 800 - 2100 ng.L^{-1}	Détecté dans 3 hôpitaux sur 5	Brown et al., 2006
SM	<LQ - 300 ng.L^{-1}	Fréquence de détection 68 % - médiane 100 ng.L^{-1}	Watkinson et al., 2009

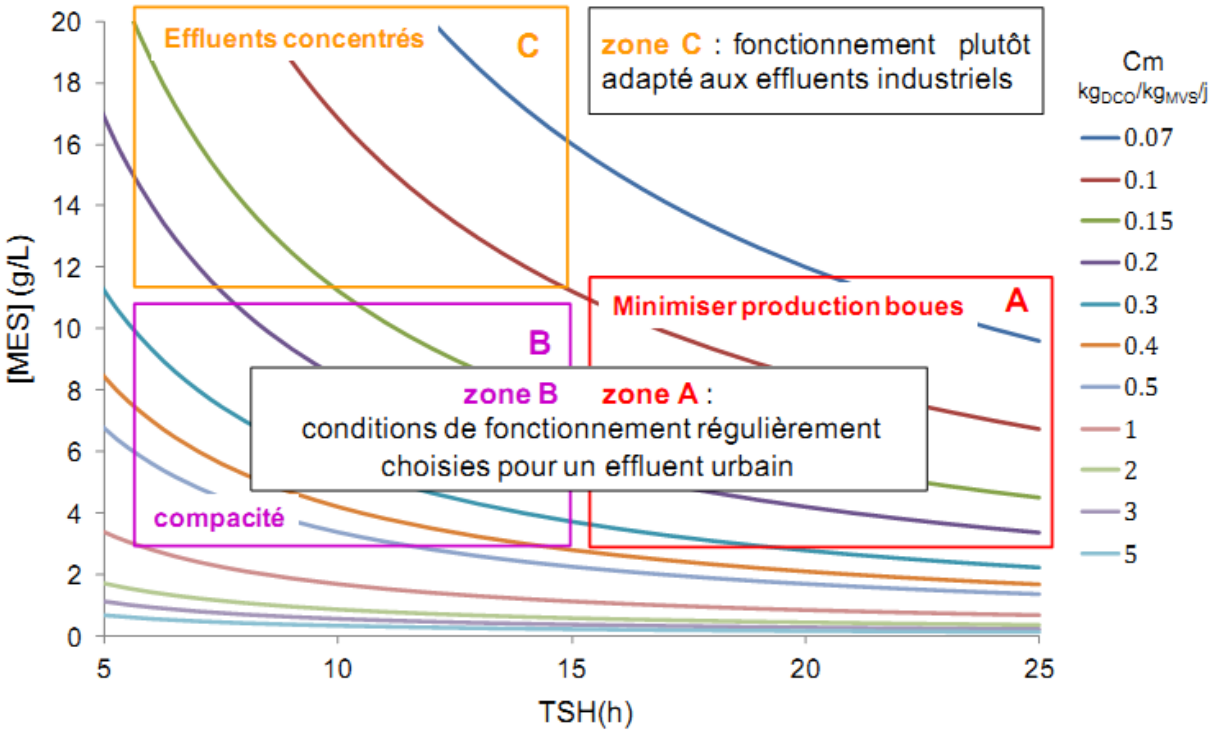
Annexe II-3 : Concentrations des médicaments sélectionnés dans les eaux usées urbaines

Médicament	Concentrations	Informations	Auteurs
5-FU	< 0,015 µg.L^{-1}	4 échantillons d'une zone résidentielle	Tauxe-Wuersch et al., 2006
	< 0,015 µg.L^{-1}	13 échantillons des affluents de 2 STEP	Tauxe-Wuersch et al., 2006
	< 38 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h - STEP conventionnelle	Martin et al., 2011
	4.7 et 14 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h - Prélèvements sur 2 jours différents	Kosjek et al., 2013
CP	<6 ng.L^{-1} - 143 ng.L^{-1}	Moyenne sur 8 h	Steger-Hartman et al., 1997
	2 ng.L^{-1} - 11 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h	Buerge et al., 2006
	< 2.1 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h	Martin et al., 2011
IF	<6 ng.L^{-1} - 29 ng.L^{-1}	Moyenne sur 1-2h	Kümmmerer et al., 1997
	1.4 ng.L^{-1} - 6 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h	Buerge et al., 2006
	3.5 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h	Martin et al., 2011
CD	2.8 - 11 µg.L^{-1}	Campagne de 1 an - moyenne 5.2 µg.L^{-1}	Gomez et al., 2007
	1732 - 32295 ng.L^{-1}	Moyenne 10321 ng.L^{-1}	Kasprzyk-Horder et al., 2009
	2496 - 12599 ng.L^{-1}	Moyenne 6954 ng.L^{-1}	Kasprzyk-Horder et al., 2009
	150 - 2087 ng.L^{-1}	Moyenne 521 ng.L^{-1}	Rosal et al., 2010
	< LQ - max 0.16 µg.L^{-1}	Médiane 0.12 µg.L^{-1}	Wick et al., 2009
	< LQ - 0.54 µg.L^{-1}	Détectée dans tous les affluents de 11 STEP allemandes - Médiane 0.22 µg.L^{-1}	Hummel et al., 2006
	18.1 - 119.7 ng.L^{-1}	Sur 5 STEP	Boleda et al., 2007
	0.055- 0.338 ng.L^{-1}	Moyenne 0.152 ng.L^{-1}	Dolar et al, 2012
SM	max 500 ng.L^{-1}	Médiane 360 ng.L^{-1} - Fréquence de détection 100 %	Watkinson et al., 2007
	179 - 1760 ng.L^{-1}	Détectée systématiquement sur 4 STEP	Lin et al., 2009
	1.09 µg.L^{-1}	SMX le plus concentré des 11 antibiotiques détectés	Yang et al., 2005
	390 - 400 - 1000 ng.L^{-1}	Détecté dans 3 affluents sur 6 STEP	Brown et al., 2006
	max 870 ng.L^{-1}	Moyenne 590 ng.L^{-1} sur 5 STEP en Croatie	Gros et al., 2006
	<LQ - 145 ng.L^{-1}	Détecté 3 fois sur 5 - 3 STEP différentes	Clara et al., 2005
	5.45 - 7.91 µg.L^{-1}	2 STEP chinoises	Peng et al., 2006
	20 ng.L^{-1}		Bendz et al., 2005
	<LQ - 1250 ng.L^{-1}	Détection dans les affluents de 7 STEP	Karthikeyan et Meyer, 2006
	250 - 640 ng.L^{-1}		Carballa et al., 2004
	246 ng.L^{-1}		Zuccato et al., 2010
	<LQ - 3000 ng.L^{-1}	Médiane 250 ng.L^{-1} - Fréquence de détection 89%	Watkinson et al., 2009
	146.5 ± 10.6 - 355.5 ± 7.2 ng.L^{-1}	Sur 2 STEP à Hong Kong	Li et al., 2009
	13 - 155 ng.L^{-1}		Pailler et al., 2009
	0.82 ± 0.23 µg.L^{-1}		Ternes et al., 2007
	16 ± 5 ng.L - 118 ± 17 ng.L^{-1}	Détecté dans affluents de 4 STEP sur 4	Xu et al., 2007
	0.25 - 1.3 µg.L^{-1})	Moyenne 0.093 µg.L^{-1}	Radjenovic et al., 2009
	298± 92.5 ng.L^{-1}		Sahar et al., 2010
	0.020 - 0.268 ng.L^{-1})	Moyenne 0.102 ng.L^{-1}	Dolar et al, 2012
	<3 - 150 ng.L^{-1}	Moyenne 29 ng.L^{-1}	Kasprzyk-Horder et al., 2009
	20 - 274 ng.L^{-1}	Moyenne 115 ng.L^{-1}	Kasprzyk-Horder et al., 2009

Annexe II-4 : Concentrations des médicaments sélectionnés dans les eaux de surface

Médicament	Concentrations	Informations	Auteurs
5-FU	< 34 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h	Martin et al., 2011
CP	<10 ng.L^{-1}	Jamais détecté dans 26 échantillons de 20 rivières différentes	Ternes, 1998
	0.07 - 0.05 - 0.15 ng.L^{-1}	Lac de Genève - Rivière Limmat à l'écoulement du lac de Genève - Rivière Limmat après la STEP	Buerge et al., 2006
	2.2 - 10.1 ng.L^{-1}		Zuccato et al., 2000
	64.8± 8 - 46.1 ± 7.2 - <LQ - <LQ ng.L^{-1}	4 points successifs après plusieurs affluents et STEP sur une rivière	Moldovan et al., 2006
	< 1.7 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h	Martin et al., 2011
IF	< 10 ng.L^{-1}		Ternes, 1998
	0.05 - 0.05 - 0.08 ng.L^{-1}	Lac de Genève - Rivière Limmat à l'écoulement du lac de Genève - Rivière Limmat après la STEP	Buerge et al., 2006
	< 1.3 ng.L^{-1}	Moyenne sur 24 h	Martin et al., 2011
CD	14 - 98 ng.L^{-1} puis 170 - 529 ng.L^{-1}	Rivière en amont puis en aval d'une STEP à lit bactérien - Moyennes de 40 ng.L^{-1} puis de 347 ng.L^{-1}	Kasprzyk-Horder et al., 2009
	<1.5 - 205 ng.L^{-1} puis 81 - 511 ng.L^{-1}	Rivière en amont puis en aval d'une STEP à boues activées - Moyennes de 40 ng.L^{-1} puis de 294 ng.L^{-1}	Kasprzyk-Horder et al., 2009
	< LQ - 0.094 µg.L^{-1}	Médiane 0.038 µg.L^{-1} - Détectée dans 10 eaux de surface sur 11	Hummel et al., 2006
	18.5 - 26.7 ng.L^{-1}	Détectée dans les 6 eaux de surface analysées	Boleda et al., 2007
	53.6 ± 9.6 - 39.6 ± 10 - 26.5 ± 7.4 - <LQ ng.L^{-1}	4 points successifs après plusieurs affluents et STEP sur une rivière	Moldovan et al., 2006
SM	<LQ	Pas détecté sur 10 points de prélèvements différents	Gros et al., 2006
	5.3 ± 4.2 ng.L^{-1}	Détecté sur 4 points différents de la rivière Arno (Italie)	Zuccato et al., 2010
	1 - 22 et <LQ - 5 ng.L^{-1}	2 rivières différentes	Pailler et al., 2009
	0.041 - 0.11 µg.L^{-1}	Détecté dans 4 puits sur 6 testés (à proximité des zones d'irrigation)	Ternes et al., 2007
	143 ± 21 ng.L^{-1}	Détecté dans une rivière sur 2	Xu et al., 2007
	<0.5 - 1 ng.L^{-1} puis < 0.5 - 8 ng.L^{-1})	Rivière en amont puis en aval d'une STEP à lit bactérien - Moyennes de 0 ng.L^{-1} puis de 2 ng.L^{-1}	Kasprzyk-Horder et al., 2009
	<0.5 - 1 ng.L^{-1} puis < 0.5 - 4 ng.L^{-1})	Rivière en amont puis en aval d'une STEP à boues activées - Moyennes de 0 ng.L^{-1} puis de 1 ng.L^{-1}	Kasprzyk-Horder et al., 2009

Annexe II-5 : Conditions de fonctionnement choisies en fonction de la Cm

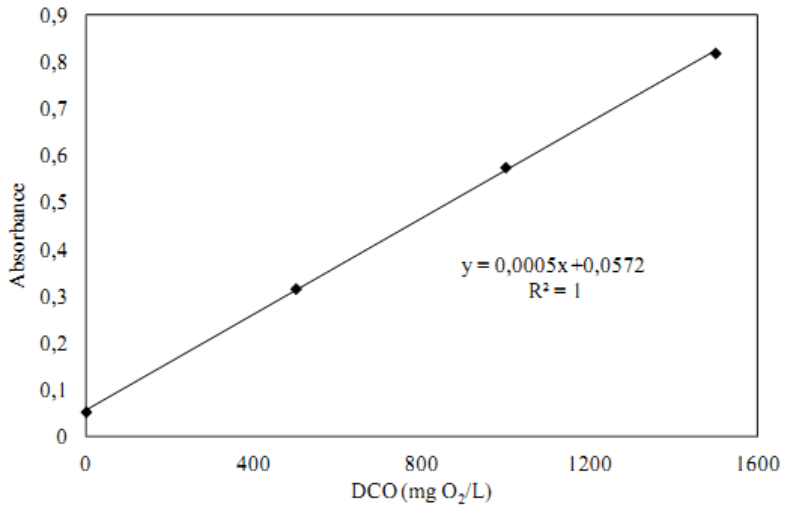


(adapté de Grasmick et al., 2007)

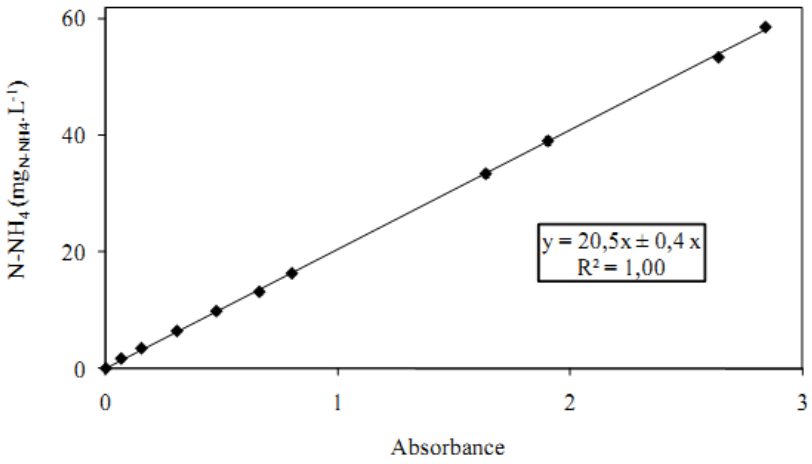
Annexe II-6 : Equipements de protection individuelle et sur l'installation

Equipements de protection individuelle
• Combinaison jetable de protection • Gants en latex manches longues à usage unique • Masque FFP3 • Lunettes de sécurité • Bottes imperméables
Equipement de protection sur le bioréacteur
• VMC sur les 3 cuves à risque (anoxie, aérobie et stockage des effluents). Le refoulement est effectué à l'extérieur de l'installation et comprend un filtre à charbon actif.

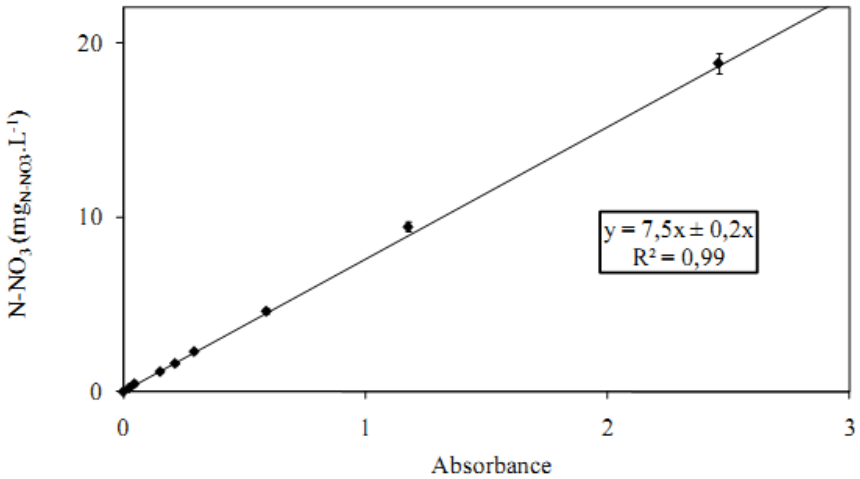
Annexe II-7 : Courbe d'étalonnage de la DCO



Annexe II-8 : Courbe d'étalonnage de l'ammonium



Annexe II-9 : Courbe d'étalonnage des nitrates



Annexe II-10 : Corrélation diamètre d'inhibition / Concentration minimale inhibitrice

Antibiotique (charge du disque)	Concentration (mg/L)	Diamètre Ø (mm)	CMI (mg/L)
Amoxicilline (25 µg)	0.12 0.5 1 2	30 25 22 19	$CMI = \exp\left[\frac{Ø - 26.333}{-4.328}\right]$
Ticarcilline (75 µg)	8 16 64	24 22 18	$CMI = \exp\left[\frac{Ø - 30}{-2.885}\right]$
Ceftriaxone (30 µg)	1 2	26 23	$CMI = \exp\left[\frac{Ø - 26}{-4.328}\right]$
Ceftazidime (30 µg)	1 4 8 32	26 21 19 15	$CMI = \exp\left[\frac{Ø - 25.371}{-3.163}\right]$
Ciprofloxacine (5 µg)	0.12 0.5 1 2	30 25 22 19	$CMI = \exp\left[\frac{Ø - 21.935}{-3.896}\right]$
Méropénem (10 µg)	2 8	22 15	$CMI = \exp\left[\frac{Ø - 25.5}{-5.049}\right]$

Annexe III-1 : Détermination de la technique d'inhibition des boues activées approprié

Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cej

Determination of sorption properties of micropollutants: What is the most suitable activated sludge inhibition technique to preserve the biomass structure?

Pierre Hamon, Maud Villain, Benoît Marrot *

Aix-Marseille Université, CNRS, M2P2 UMR 7340, 13545 Aix en Provence, France

HIGHLIGHTS

- Five activated sludge inhibition techniques were tested.
- The lowest effective concentrations of chemical inhibitor were determined.
- Chemical and thermal techniques cause alteration to the activated sludge structure.
- The gas purging technique preserves the activated sludge structure.
- There is no perfect inhibition technique for anaerobic activated sludge.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 April 2013
Received in revised form 22 July 2013
Accepted 27 July 2013
Available online 8 August 2013

Keywords:
Activated sludge inhibition
Sorption
Activated sludge structure
Deflocculation
Azide
Respiration

ABSTRACT

Apart from providing a total activated sludge (AS) inhibition, an efficient AS inhibition technique must preserve the biomass structure in order to maintain the real sorption phenomenon. Many inhibition techniques with different modes of action were used in previous studies for AS inhibition. But, the effectiveness of AS deactivation and the adverse effects on the biomass structure were rarely related. In this paper, five common AS inhibition techniques were evaluated: thermal, three chemical and gas purging techniques. The lowest chemical effective concentrations were determined in order to limit the negative impact on the AS structure. 100 $mgHg_2SO_4\ g_{TSS}^{-1}$ and 30 $mgHgCl_2\ g_{TSS}^{-1}$ within 2 h of reaction were enough to provide a complete AS inhibition. However, after 20 h of reaction a full AS inhibition has never been achieved with sodium azide at 200 $mgNaN_3\ g_{TSS}^{-1}$, even by increasing NaN_3 concentration.

The analysis of the AS apparent viscosity, the median size D_{50} of the flocs and the supernatant turbidity showed that the thermal technique destructured the AS completely. A significant AS deflocculation is induced by the three chemical reagents depending on the mode of action and the concentration used. Thermal and chemical inactivations are therefore not suitable to determine sorption properties. The only technique which kept the initial AS structure unchanged has several drawbacks since (i) a reaction might occur between the gas and the analyte of interest, and (ii) anaerobic activated sludge are not inhibited by this technique. Therefore, the establishment of anaerobic conditions without gas injection is recommended for implementing sorption experiments on aerobic AS.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In biological wastewater treatment plants (WWTPs) pollutants can theoretically be removed through several mechanisms: biotransformation, sorption to the activated sludge (AS) flocs, air-stripping and phototransformation. Biotransformation and sorption were reported as the two most important removal mechanisms for pharmaceuticals [1]. Indeed, phototransformation is limited by the high turbidity of the mixed liquor, which blocks sunlight and removal by air-stripping depends on Henry coefficient of the pollutant.

The partitioning between biotransformation and sorption is commonly evaluated by inhibiting the AS in order to avoid biotransformation mechanism. Thereafter, the sorption properties are determined by adding the pollutant into the inactivated biomass. The removal in the liquid phase is solely attributed to the sorption mechanism. Many different AS inhibition techniques

* Corresponding author. Tel.: +33 4 91 28 93 07; fax: +33 4 42 90 85 15.
E-mail address: benoit.marrot@univ-amu.fr (B. Marrot).

1385-8947/$ - see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.07.117

were used in previous studies with different modes of actions: chemical, physical, gas purging, sterilisation and freeze-drying. A correct assessment of sorption properties requires a total bacterial activity inhibition to avoid any pollutant biotransformation along with no adverse effect on the AS structure induced by the inhibition technique. An incomplete AS inhibition would involve biotransformation of the target compound and AS deflocculation could offer more possibilities for the pollutant to sorb on the AS. Thus, the mixed liquor chemistry must remain unchanged after application of the inhibition technique. It was demonstrated that a pH modification could induce a speciation of some molecules which have basic or acidic functionalities, in a more or less hydrophobic form that affects their sorption affinities [2]. The mixed liquor conductivity must remain constant as well, since the adsorption mechanism is based on electrostatic interactions.

However, the effects of the inhibition techniques were rarely evaluated in previous studies, except for sodium azide [3–6] and different chemical biocides [7]. These studies showed that sodium azide, a chemical reagent used in many works to determine sorption properties, has an impact on the AS apparent viscosity [3,5], on the sludge-water distribution of several compounds [4] as well as on the AS conductivity [7]. Sodium azide might also react with the analyte of interest and its use for sorption experiments must be carefully evaluated, especially for concentrations higher than 100 $mg_{NaN3}\ L^{-1}$ [6]. There does not seem to be any consensus about the reliability of chemical deactivation to determine sorption properties. Indeed, some authors assume that chemical reagents might have an influence on the sorption processes due to the inactivation of cells and the consecutive cell lysis or because of the possible reaction with the target compounds [6,8], whereas other works reported that sodium azide addition was not inducing cell lysis [9] or polysaccharides releases [3].

As far as chemical inhibition is concerned no clear inhibition protocols, except for sodium azide [3], and validation of the methods have been reported. The concentration and inhibition kinetic were rarely mentioned and only few information reported the AS inhibition state. In addition, the inhibitor concentrations are not always related to the same parameters (biomass concentration, weight ratio, volumetric ratio).

Regarding this situation, the aim of this study was to compare different chemical inhibitors with alternative inhibition techniques in order to suggest the most appropriate inhibition technique to determine the sorption properties. The optimal parameters of each selected inhibition technique were determined in order to reach a sufficient inhibition state and to limit the impact on the biomass structure. Among the alternative AS inhibition techniques freeze-drying (lyophilisation) and autoclaving (sterilisation) were not evaluated in the present work since they were previously reported to alter the texture of sludge flocs and thus the sorbent structure [10,11]. AS sterilisation is carried out in an autoclave at 120 °C for 30 min. Freeze-drying is applied at a vacuum pressure of 0.5 mbar and a temperature of −40 °C.

Three different chemical inhibitors used in previous studies were selected: sodium azide (NaN_3) [3–5,7,9,12,13], mercury sulphate (Hg_2SO_4) [14–16] and mercury chloride ($HgCl_2$) [17]. Sodium azide was also frequently used to inhibit microbial degradation in order to assess sorption properties of environmental contaminants to soil [18–21]. The alternative inhibition techniques were based on thermal and gas purging inhibition processes. The thermal technique applied basically consists in drying the sludge by heating [22,23]. The gas purging technique consists in injecting a gas into AS in order to force oxygen out and was used in few studies with argon [24] and nitrogen [25,26]. None of these studies stated on the reliability of these AS inhibition techniques to determine sorption properties.

2. Material and methods

2.1. Activated sludge

The activated sludge (AS) came from an urban wastewater treatment plant (Aix-en-Provence, France, 175,000 eq. inh., 35,000 $m^3\ d^{-1}$, organic load 0.12 $kg_{BOD5}\ kg_{MVS}^{-1}\ d^{-1}$). Samples were taken from the recirculation loop between the aeration tanks and the secondary clarifiers and were then transported to the laboratory with no aeration (30 min). The initial total suspended solids (TSSs) concentration varied from 3.5 to 5.1 $g\ L^{-1}$. The amount of volatile suspended solids varied from 76% to 80% for all the experiments. The AS was concentrated by gravimetric filtration using paper filters (average size pores around 100 μm) in order to obtain a TSS content of $10 \pm 1\ g\ L^{-1}$. Before any experiment was performed, sludge was aerated during 4 h without substrate addition and the oxygen uptake rate (OUR) of small samples was monitored to ensure endogenous respiration state.

2.2. Respiration inhibition

Activated sludge respirometry was monitored by the OUR calculation. Air injection is stopped and the decreasing dissolved oxygen concentrations were recorded every 10 s. The OUR is the value, which corresponds to the slope of the linear decrease of the oxygen concentration over time. The specific oxygen uptake rate (SOUR) relates the OUR depending on the mixed liquor volatile suspended solids concentration (MLVSS). A SOUR null value means that the AS inhibition state is reached because microorganisms cannot consume the dissolved oxygen. The inhibition state of the biomass was then monitored by calculating the SOUR drop for the five inhibition techniques in comparison to the initial SOUR of the AS. The dissolved oxygen concentration was measured with continuous oxygen probe (HQ 40d, Hach LDO, Germany).

2.3. Chemicals

Sodium azide (NaN_3, 99%, Sigma–Aldrich), mercury chloride ($HgCl_2$, 99.5%, Sigma–Aldrich) and mercury sulphate (Hg_2SO_4, 99%, Chem-Lab) were used as chemical inhibitors.

2.4. Thermal technique

The Thermal inhibition technique simply consists in drying the sludge. In this paper the protocol applied for thermal inhibition was established by Delgado [22]. AS is firstly centrifuged during 20 min at 5000 rpm. Solids are collected and rinsed with distilled water in order to reduce the amount of exopolymeric substances. The clean sludge is then centrifuged again during 20 min. The sludge is dried at 80 °C during 2 days to ensure the inactivation and the complete drying. The biomass is finally ground until obtaining a uniform size of grains.

The grains are put in a batch reactor with the AS supernatant to reach a concentration of 10 $g_{TSS}\ L^{-1}$. Solubilisation of the grains could not be reached after a long stirring time, the mixture remained completely heterogeneous. SOUR measurement indicated that the complete AS inhibition was achieved.

2.5. Gas purging technique

The inhibition protocol used in this study was based on the method developed by Seira et al. [25]. Firstly, oxygen was injected into AS to remove the residual substrates. Then, the aeration was stopped in order to remove the nitrates under anoxia conditions. Finally, nitrogen gas was injected to AS in order to force oxygen

out. The dissolved oxygen concentration quickly reached a null value, avoiding AS respiration.

2.6. COD and NH_4^+ degradation tests

800 mg L^{-1} (180 mg g_{TSS}^{-1}) of chemical oxygen demand (COD) as glucose and 50 mg L^{-1} (12 mg g_{TSS}^{-1}) of ammonium were added to the inhibited biomass during 2 h under aeration in order to assess the effectiveness of each inhibition technique on the removal of easily biodegradable compounds. COD and ammonium were chosen to distinguish the efficiency of the inhibition techniques on heterotrophic and autotrophic bacteria. Substrate degradation would show an incomplete inhibition of the related bacteria population.

2.7. Bioreactor and rheological devices

The bioreactor was equipped with a double helical ribbon impeller (HRI) and filled with a volume of 1.9 L of activated sludge. The impeller had a 9.5 cm diameter and height each, while the bioreactor was 12 cm in diameter. Sludge temperature was maintained constant at 20 ± 1 °C with water circulating in a double envelope.

To perform the in situ viscosity curves determination of AS suspensions, the HRI of the bioreactor was connected to a shear rate imposed rheometer (Rheomat 30, Contraves) with 30 available values of the imposed rotation speed in the range 0.408–257 rpm. The stirring torque was measured for each value of the rotation speed.

Before each torque measurement, the suspension was pre-sheared at the maximum rotation speed for 30 s to ensure its homogeneity. The rotation speed was then decreased to the desired value and the torque was recorded for 15 s after 15 s of stabilisation.

Viscosity calculations were performed with Metzner–Otto's principle. It defines an apparent viscosity η_a (Pa s) based on the generalization for non-Newtonian media of the relationship in an agitated vessel (in the laminar region) between the dimensionless power Np and the Reynolds number Re (Eq. (1)):

$$N_p = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot d^5} = \frac{K_p}{Re} = \frac{K_p \cdot \eta_a}{\rho \cdot N \cdot d^2} \text{ then } \eta_a = \frac{P}{K_p \cdot N^2 \cdot d^3} \quad (1)$$

where P (W) is the mechanical stirring power related to the agitation torque C (N m) and to the mechanical rotation rate N (s^{-1}) by the following equation:

$$P = 2 \cdot \pi \cdot N \cdot C \quad (2)$$

K_p corresponds to the laminar power curve constant and d (m) to the impeller diameter.

At a rotation rate N corresponds an effective shear rate γ_{MO} (s^{-1}) related to the rotation speed of the impeller by the Metzner–Otto dimensionless constant characterising the stirrer geometry (Eq. (3))

$$\gamma_{MO} = K_{MO} \cdot N \quad (3)$$

Values of K_p and K_{MO} constants have been determined at respectively 393 and 50. A calibration of the set-up was carried out for a previous paper [27] with two model fluids at 20 °C to determine the K_p and K_{MO} constants. The fluids used were a Newtonian solution of pure glycerol and an aqueous solution of guar at 1 wt.%.

The Ostwald power law model (Eq. (1)) has been used to represent the viscosity curves of initial and inhibited AS.

$$\tau = K\gamma^n \quad (4)$$

Both parameters of this model, i.e. the consistency index (K in Pa s^n) and flow index (n) were calculated with a simple linear regression log–log scale.

Three measurements of the rheological profile were carried out to ensure the data reproducibility.

2.8. Analytical methods

TSS were measured by centrifugation of a 30 mL sludge sample for 15 min at 13,500 rpm followed by pellet drying at 105 °C until a constant weight was obtained (24 h). TVSS were measured after 2 h at 550 °C.

The degree of sludge deflocculation was estimated by the method presented by Wilén et al. [28]. Samples of AS were taken during the inhibition reaction and centrifuged at 2000 rpm for 2 min. Supernatant turbidity was then measured as the absorbance at 650 nm.

Particle size distribution of AS was measured with a laser granulometer Mastersizer S (Malvern Instruments). It measures particle size from 0.1 μm to 900 μm. The median size (D_{50}) was recorded for every AS inhibition technique. The filtrate of the mixed liquor recovered after AS concentration was used to dilute 100 times the inhibited AS samples in order to obtain an acceptable obscuration allowing the particle size distribution measurement. Three measurements of particle size distribution and the supernatant turbidity were carried out to ensure the data reproducibility.

pH and conductivity of the mixed liquor were measured for initial AS and for every inhibition techniques.

3. Results and discussion

3.1. Determination of optimum chemical inhibitor concentrations

Very little information is provided in the literature about chemical inhibitor parameters. There is no consensus about inhibitor concentration units. In this paper the expression of inhibitor concentrations was standardised into $mg_{inhibitor}\ g_{TSS}^{-1}$. Inhibitor concentrations used in previous studies were converted into $mg_{inhibitor}\ g_{TSS}^{-1}$ when enough data were available in the papers (Table 1). As it can be seen in this table, there is also no consensus on the chemical concentration used for AS inhibition.

Concerning sodium azide a wide range of concentrations, from 0.5 mg g_{TSS}^{-1} [4] to 720 mg g_{TSS}^{-1} [5], were used in previous studies for AS inhibition. However, sodium azide was previously reported to alter biomass viscosity [3,5]. It is coherent to assume that if chemical reagents induce negative effects to the AS structure, increasing the chemical concentration would emphasize the impact on AS structure. This hypothesis was confirmed by preliminary rheological measurements carried out at different sodium azide concentrations (Fig. 1). An increase in the sodium azide concentration caused a lower AS viscosity. Thereby, the lowest effective chemical concentrations were firstly determined before comparing the impact of each inhibition technique with the AS structure.

Therefore, it is required to find for each chemical inhibitor the lowest concentration at which the complete inhibition is achieved in order to limit alteration of the AS structure. Working at the lowest effective chemical inhibitor concentration makes it possible to compare the different inhibition techniques with each other equally.

3.1.1. Sodium azide

Only little information is generally mentioned by the authors about the inhibition parameters and the reliability of the method (Table 1), except for Barbot et al. [3] who tested 3 sodium azide

Table 1
Chemical inhibitor concentrations used in previous studies.

Inhibition information	Calculated concentration	Reaction time	Comments	References
NaN_3				
0.2% w/w	2 mg g_{TSS}^{-1}	–	"based on respirometry measurement, without any cell lysis or any change in the sludge hydrophobicity"	[8]
–	–	–	–	[9]
0.2% v/v	–	–	No information on the sodium azide solution concentration – TSS = 9.01 g L^{-1}	[10]
0.9 g g_{MVLSS}^{-1}	720 mg g_{TSS}^{-1}	–	Inhibition of the respirometry activity. "no polysaccharide release, viscosity was reduced of around 40% but did not modify activated sludge sorption abilities"	[4]
200 mg g_{TSS}^{-1}	–	4 h	Inhibition of around 90% after 4 h. 0.1 et 0.35 g g_{TSS}^{-1} also tested. Decrease of the apparent viscosity	[2]
190 mL sludge – TSS = 4 g L^{-1} [NaN3] = 0.2% and 1%	0.5 mg g_{TSS}^{-1} and 2.5 mg g_{TSS}^{-1}	–	Adverse effects of sodium azide on the sludge-water distribution of several compounds	[3]
Hg_2SO_4				
0.5 mL L_{sludge}^{-1} – [Hg_2SO_4] = 200 g L^{-1} – 0.1 g $_{Hg2SO4}$ L_{sludge}^{-1} – TSS = 1-3-5-7 g L^{-1}	14 – 20 – 33 – 100 mg g_{TSS}^{-1}	–	–	[11]
[Hg_2SO_4] solution = 0.2 g L^{-1} – TSS = 1 g L^{-1}	–	–	–	[12]
1 mL Hg_2SO_4 to 200 mL_{sludge} – [Hg_2SO_4] = 20 g L^{-1} – TSS = 15 g L^{-1}	6.7 mg g_{TSS}^{-1}	–	–	[13]
$HgCl_2$				
100 mg_{HgCl2} L_{sludge}^{-1} – Xbiomass = 6.2 g_{COD} L^{-1} – TSS = 5.46 g L^{-1}	18.3 mg g_{TSS}^{-1}	–	$HgCl_2$ has a smaller influence than sliver nitrate on the measurements of the investigated compounds	[14]

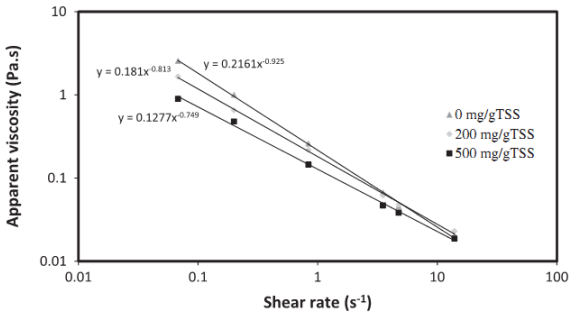


Fig. 1. Influence of azide concentration on the apparent viscosity of AS.

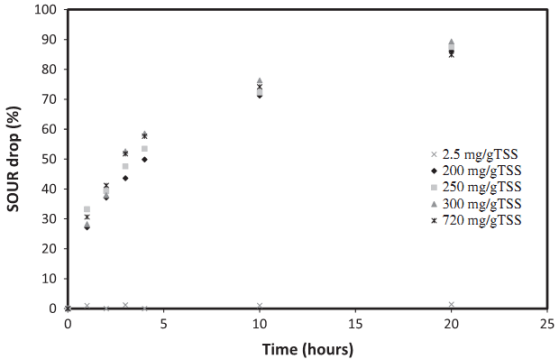


Fig. 2. SOUR drop at different sodium azide concentrations.

concentrations: 100 – 200 – 350 mg g_{TSS}^{-1}. In this study the maximum inhibition state of the microorganism respiration was obtained after addition of NaN_3 at 200 mg g_{TSS}^{-1}.

Five sodium azide concentrations were tested in this paper: the two drastic concentrations 0.5 and 720 mg g_{TSS}^{-1} and three concentrations 200 – 250 – 300 mg g_{TSS}^{-1} in order to ripen the optimum concentration found by Barbot et al. [3].

No AS inhibition was observed at 0.5 mg g_{TSS}^{-1}, this concentration being totally insufficient to impact biomass respiration. For the three concentrations 200 – 250 – 300 mg g_{TSS}^{-1} a 90% inhibition state has never been achieved after 4 h of reaction contrary to Barbot et al. [3]. 20 h were required in some experiments to reach a SOUR drop about 90% (Fig. 2). Furthermore, a poor repeatability of the results was observed, indicating that AS inhibition by sodium azide might depend on other AS parameters, such as AS initial activity or AS structure. AS inhibition with the very high sodium azide concentration (720 mg g_{TSS}^{-1}) was never above 84%, even after 20 h of reaction. It is noticeable that, in the range of the tested concentrations, an increase in the sodium azide concentration was not linked with a higher AS inhibition, meaning that beyond a threshold concentration no better AS inhibition could be reached with sodium azide.

Therefore, sodium azide seems to be inappropriate to inhibit AS because it is impossible to suggest a concentration and a reaction time allowing the achievement of a complete and systematic AS inhibition state. The concentration 200 mgNaN_3 g_{TSS}^{-1} was chosen to conduct the biomass structure comparison as no significantly better AS inhibition was achieved at higher concentrations.

3.1.2. Mercury sulphate

Hg_2SO_4 concentrations used in previous works were much lower than sodium azide concentrations (Table 1). Three concentrations of Hg_2SO_4 were tested according to the concentrations of Clara et al. [14]: 10 – 50 – 100 mg g_{TSS}^{-1} (Fig. 3). Concentrations of 10 and 50 mg g_{TSS}^{-1} provided a good AS inhibition but not complete for every test. A total AS inhibition was achieved at 100 mg g_{TSS}^{-1} in the two first hours of reaction for each test.

At half concentration and for a lower reaction length than for sodium azide the AS inhibition was complete, which indicates a different mode of action in the inhibition process. The concentration 100 mg_{Hg2SO4} g_{TSS}^{-1} was chosen for the biomass structure comparison.

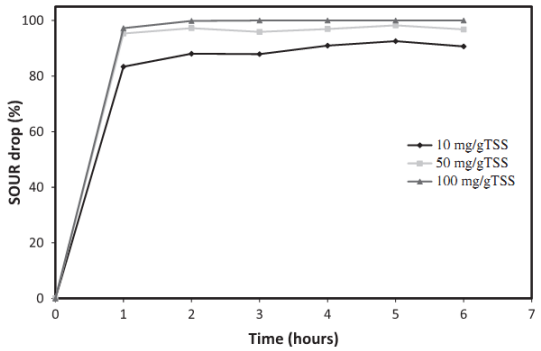


Fig. 3. SOUR drop at different mercury sulphate concentrations.

3.1.3. Mercury chloride

Only one study using $HgCl_2$ to inactivate biomass has been found [17]. Because of the lack of studies, the concentration tests of $HgCl_2$ were arbitrary set at the same concentration as for Hg_2SO_4: 10 – 50 – 100 mg g_{TSS}^{-1} (Fig. 4). The concentration of 10 mg g_{TSS}^{-1} provided a good AS inhibition but not complete for each test, whereas a complete and systematic AS inhibition was achieved at 50 and 100 mg g_{TSS}^{-1} in the two first hours of reaction. A concentration of 30 mg g_{TSS}^{-1} was tested to ripen the optimum concentration and provided a complete AS inhibition in the two first hours of reaction for each test. Mercury toxicity is known to depend on its chemical form. Therefore, the lower concentration of $HgCl_2$, in comparison with Hg_2SO_4, required inhibiting AS can be explained by the fact that mercury toxicity depends on its chemical form. The mercury (II) cation is much more toxic than the mercury (I) cation. Thus, the concentration 30 mg_{HCl2} g_{TSS}^{-1} was chosen for biomass structure comparison.

3.2. Effect of activated sludge inhibition on the biomass structure

To assess the effect of each inhibition technique on the biomass structure, the rheological profile, the supernatant absorbance and the median size D_{50} of sludge suspension were measured for the initial AS sample and for every inhibition technique when AS was considered in the inhibition state (Figs. 5 and 6 and Table 3), i.e. 2 h for Hg_2SO_4 and $HgCl_2$, 20 h for NaN_3.

The viscosity curve of the thermal inhibition technique was not represented in Fig. 5 since no rotation torque could be measured by the experimental set-up at the shear rates tested in the laminar region. Indeed, the dried and ground sludge could not solubilise at all into the supernatant and resulted in two distinctive phases, which caused an irreversible effect on the AS structure.

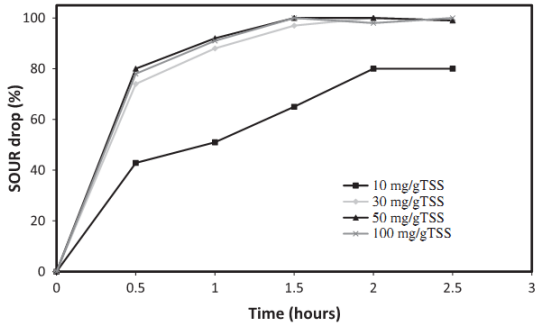


Fig. 4. SOUR drop at different mercury chloride concentrations.

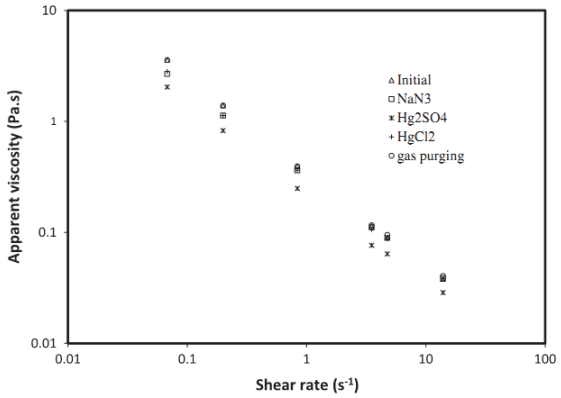


Fig. 5. Rheological behaviour of inhibited AS with the optimal chemical concentrations and the gas purging technique.

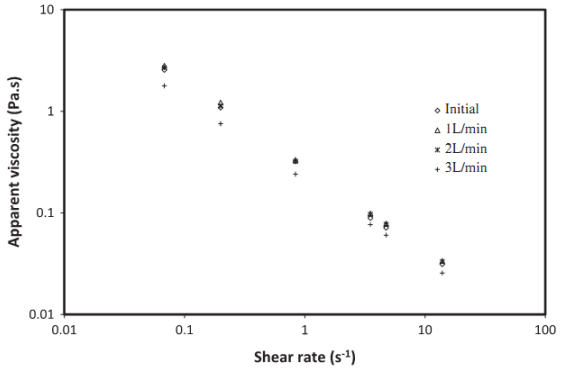


Fig. 6. Influence of N_2 flow rate on the activated sludge viscosity.

A decrease of the AS apparent viscosity is induced by the three chemical methods. At the concentrations tested to ensure biomass inhibition, NaN_3 and $HgCl_2$ have the same impact on the apparent viscosity whereas Hg_2SO_4 causes a more significant drop-off. Mercury inhibitors seem to have a stronger impact on the bioflocs structure than sodium azide although NaN_3 is 6.7 times more concentrated than $HgCl_2$. AS apparent viscosity differences between Hg_2SO_4 and $HgCl_2$ could be attributed to the higher concentration of Hg_2SO_4 required for AS inhibition.

The Ostwald law parameters confirm these observations (Table 2): a 10% decrease of the consistency index K is induced by NaN_3 and $HgCl_2$ additions at inhibiting concentrations whereas a 35% decrease of K is induced by Hg_2SO_4 addition. The flow index n increased for the 3 chemical inhibition techniques in the same order of magnitude (from 0.14 to 0.19 for $HgCl_2$ and Hg_2SO_4 and 0.20 for NaN_3). The apparent viscosity remained constant for the gas purging inhibition indicating no influence on the AS rheological behaviour. However, the nitrogen flow rate has an influence on the apparent viscosity of AS (Fig. 6). A decrease of the apparent viscosity was observed from 3 L_{N2} min^{-1} indicating a slight destructuration of AS.

In order to quantify the degree of deflocculation induced by the different inhibition techniques, the supernatant turbidity was measured for initial and inhibited samples (Fig. 7). The results were consistent with the rheological measurements. The gas purging technique did not induce any deflocculation whereas the thermal technique caused the highest deflocculation of all the tested inhibition techniques. The high degree of deflocculation induced

Table 2
Ostwald law parameters of inhibited AS with five different inhibition techniques.

Inhibition technique	Concentration ($g\ gTSS^{-1}$)	K ($Pa\ s^n$)	K decrease[a] (%)	n
Initial	–	0.35	–	0.14
NaN3	0.2	0.31	10.7 ± 0.6	0.20
Hg_2SO_4	0.1	0.22	36.6 ± 1.4	0.19
$HgCl_2$	0.03	0.31	10.7 ± 0.2	0.19
Gas purging	–	0.35	0 ± 2.2	0.15
Thermal	–	–	–	–

[a] Average and standard deviation based on three measurements.

by the thermal inhibition technique could result from the fact that sludge solids did not solubilise at all into the supernatant. The centrifugation (2 min at 2000 rpm) carried out to measure supernatant turbidity was not fast enough to bind a significant amount of sludge solids together.

It is noticeable that the deflocculation degree induced by the three chemical inhibitors is similar whereas the reaction duration is much longer for sodium azide (20 h) than for both mercury inhibitors (2 h). It confirms that mercury is much more toxic to AS than sodium azide. The evolution of the supernatant turbidity over 20 h showed that AS deflocculation was limited for sodium azide and mercury sulphate (0.06 absorbance unit) whereas mercury chloride was inducing a high AS deflocculation over time (0.16 absorbance unit). This confirms the more toxic nature of mercury (II) cation in comparison to mercury (I) cation. Therefore, $HgCl_2$ might have a higher negative effect to determine sorption properties than Hg_2SO_4 depending on the required sorption equilibrium.

The observation of the median size (D_{50}) of AS flocs for the five inhibition techniques showed that the three chemical inhibitors induced a reduction of the D_{50} (Table 3). Hg_2SO_4 caused the most significant D_{50} reduction of the chemical inhibitors with a D_{50} drop-off of 20%. $HgCl_2$ induced a 15% decrease of D_{50} probably due to the lower concentration used, in comparison to Hg_2SO_4, to inhibit biomass. Surprisingly, NaN_3 effect on D_{50} was very limited with only a D_{50} decrease of 6%, whereas NaN_3 impacts on the apparent viscosity and the deflocculation degree were identical to $HgCl_2$ impacts. The thermal technique had a drastic effect on the particle size distribution, mainly because of the grinding and the resolubilisation step. The very high D_{50} variability of the thermal inhibition technique shows the lack of homogeneity of the grinding step. Finally, the gas purging technique did not cause any alteration of D_{50}. The biomass structure has not been altered at all by this inhibition technique.

3.3. Effect of the activated sludge inhibition techniques on pH and conductivity

pH and conductivity of initial and inhibited AS were analysed (Table 4) for each inhibition techniques in order to check if the inhibition technique has an impact on these parameters that would disturb the determination of the sorption properties. The pH variation is not significant since pH remains approximately neutral for every inhibition technique. A slight increase in the conductivity is observed for $HgCl_2$ and Hg_2SO_4 but remains in the same order of magnitude as the initial AS.

NaN_3 induces a drastic increase in the conductivity which can be attributed to the high molecular concentration used (30.77 mol m^{-3} for NaN_3, 1.10 mol m^{-3} for $HgCl_2$ and 2.01 mol m^{-3} for Hg_2SO_4). Therefore, the addition of sodium azide would clearly modify the sorption properties because of the increase in conductivity. Once again, it is noteworthy that the gas purging technique has the lowest effect on both pH and conductivity.

3.4. Degradation of easily biodegradable compounds by inhibited activated sludge

The removal of 800 mg L^{-1} of COD as glucose and 50 mg L^{-1} of NH_4^+ were analysed for the five different inhibition techniques

Table 3
D50 values of initial and inhibited AS.

Inhibition technique	D50[a] (μm)	D50 decrease (%)
Initial	87.3 ± 2.1	–
Gas purging	86.6 ± 1.6	0.8
NaN_3	81.8 ± 2.4	6.3
$HgCl_2$	74.5 ± 1.1	14.7
Hg_2SO_4	69.8 ± 2.5	20.1
Thermal	118.7 ± 31.4	−36.0

[a] Average and standard deviation based on three measurements.

Table 4
pH and conductivity values of initial and inhibited AS.

Inhibition technique	pH	Conductivity ($\mu S\ cm^{-1}$)
Initial	7.12	854
Gas purging	7.17	852
Hg_2SO_4	6.99	930
$HgCl_2$	7.37	903
NaN_3	6.97	3240
Thermal	7.03	874

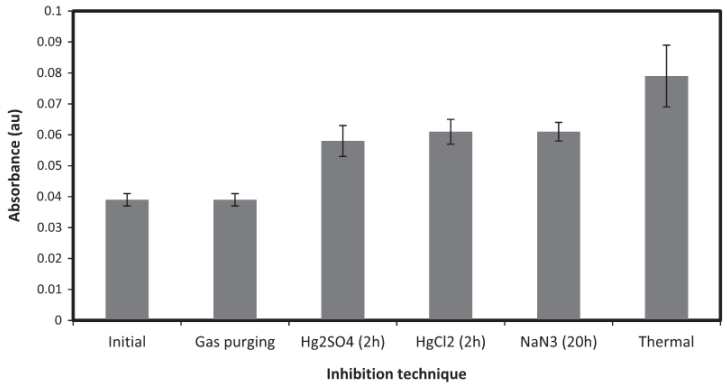


Fig. 7. Supernatant turbidity of initial and inhibited biomass.

(Table 5). An increase in COD can be observed after 2 h for every chemical inhibitor. It shows that chemical inhibition leads to a release of soluble microbial products and cell lysis. No COD removal was observed for the thermal and gas purging techniques. Ammonium concentration remained constant for both mercury reagents as well as for the thermal technique whereas a slight degradation was observed for the gas purging technique and sodium azide. The NH_4^+ degradation by sodium azide can be explained by the incomplete achieved inhibition state. One can assume that the residual SOUR after sodium azide application is partially due to autotrophic bacteria, which could perform the nitritation process. Ammonium degradation during the application of the gas purging technique was more surprising because no oxygen was present in the system. Two additional tests with the gas purging technique were performed: a control reactor with only water and NH_4^+ under continuous nitrogen injection; a reactor with AS and NH_4^+ under anaerobic conditions (without the presence of dissolved oxygen in the system) in which nitrogen was only injected at the beginning to force oxygen out. NH_4^+ degradation in water with continuous nitrogen injection was similar to NH_4^+ degradation in AS with continuous nitrogen injection. It pointed out that a reaction of NH_4^+ with N_2 occurred. NH_4^+ concentration remained constant in AS under anaerobic conditions and confirmed that N_2 reacted with NH_4^+.

3.5. Reversibility of the inhibition techniques

The reversibility of the 5 inhibition techniques was assessed 24 h after reaching the AS inhibition state by monitoring AS respirometry. Only the gas purging technique allows the recovery of a full AS activity immediately after reinjecting oxygen. No AS respiration could be recovered after inhibition by the thermal technique and both mercury reagents indicate the irreversibility of these inhibition processes causing bacteria decease. A slight AS respiration was observed with NaN_3 that can be linked to the incomplete AS state inhibition achieved with this chemical reagent. Therefore, chemical and thermal inhibition techniques cause irreversible damage on AS activity whereas the gas purging technique is the only technique investigated in this study, which allows a totally reversible inhibition process.

Table 5
COD and NH_4^+ removal efficiency for inhibited AS.

Inhibition technique	COD removal efficiency (%)	NH_4^+ removal efficiency (%)
Gas purging	0.0	14.3
Hg_2SO_4	−11.4	−0.7
$HgCl_2$	−9.9	0.9
NaN_3	−8.2	23.4
Thermal	0.0	0.0

3.6. Ranking of the tested activated sludge inhibition techniques

A recap chart of the adverse effects of the five inhibition techniques on AS structure and mixed liquor chemistry parameters investigated is presented in Table 6. Measurements of the apparent viscosity, the supernatant turbidity and the particle size distribution make it possible to rank the five AS inhibition techniques investigated in this study. The thermal inhibition technique alters drastically the AS structure resulting in a two distinct phases solution with a high floc sizes variability. Indeed, the grinding and the resolubilisation steps of the dried sludge seem crucial to recover the sludge matrix. These two steps are difficult to perform, even being extremely cautious. It explains the impossibility to measure the viscosity at low shear rates (in the laminar region) as well as the large variability of the floc sizes. The thermal inhibition technique is definitely not suitable to assess sorption properties as it damages the floc structure irreversibly. Therefore, sorption of thermally inhibited sludge would absolutely not represent the actual sorption phenomenon occurring in WWTP.

The three chemical inhibitors altered the biomass structure in a more reasonable way than the thermal inhibition. AS was very sensitive to mercury as it is shown by the respiration inhibition kinetics and by the AS structure parameters. Only 2 h were required to ensure biomass inhibition at low mercury concentration whereas AS inhibition was much more difficult to control with sodium azide: complete AS inhibition has never been achieved and an increase in the NaN_3 concentration did not induce a more complete and faster AS inhibition. NaN_3 addition involved a very limited decrease of the D_{50} of the AS flocs. Besides, NaN_3 is the only chemical reagent investigated that did not inhibit the nitritation process. One can assume that part of autotrophic bacteria was not inhibited by NaN_3 addition which could explain the residual SOUR, being in the same order of magnitude independently of the initial NaN_3 concentration. Conversely, the complete and systematic AS inhibition obtained at low mercury concentrations could be the result of the high toxicity effect of mercury on cells. Therefore, mercury induces an important reduction of D_{50} which increases the contact for the reaction between mercury and the bacteria, leading to a full AS inhibition. The significant increase in the supernatant turbidity of AS inhibited with $HgCl_2$ after 20 h of reaction suggests that $HgCl_2$ alters less AS structure than Hg_2SO_4 only within a short time. Therefore, $HgCl_2$ is more suitable than Hg_2SO_4 to determine sorption properties immediately after the 2 h of reaction required for AS inhibition. Depending on the sorption equilibrium time, AS inhibition by Hg_2SO_4 would be a better option to limit AS destructuration. After 2 h of reaction the limited effect of $HgCl_2$, in comparison to Hg_2SO_4, on AS apparent viscosity and on the D_{50} can only be attributed to the lower concentration used. The increase in COD observed for the three chemical reagents after 2 h of contact with glucose confirmed the achieved inhibition state and the cell lysis induced to the biomass.

Table 6
Recap chart of adverse effects to the biomass structure and the mixed liquor chemistry induced by AS inhibition techniques.

Inhibition technique	AS respirometry	Viscosity	Supernatant turbidity	D50	pH	Reversibility	COD	NH_4^+	Ranking
Inhibition technique	AS respirometry	Viscosity	Supernatant turbidity	D50	pH	Reversibility	COD	NH_4^+	Ranking
Gas purging	/	/	/	/	/	/	/	-	1
NaN_3	-	-	-	-	/	-	-	-	3
$HgCl_2$	/	-	-	--	/	-	-	/	2
Hg_2SO_4	/	--	-	--	/	-	-	/	3
Thermal	/	---	--	---	/	-	/	/	5

/ No effect.
-, --, --- Effect degree (from low to high effect).

$HgCl_2$ seems to be the most appropriate chemical reagent for biomass inactivation as its low required concentration allows limits the adverse effects on the AS structure but only within a short time. In comparison, NaN_3 alters AS structure in the same order of magnitude as $HgCl_2$. But the difficulty to achieve a sufficient AS inhibition, which may lead to a degradation of metabolisable compounds by autotrophic bacteria, as well as the longer reaction time required makes NaN_3 less appropriate for the determination of sorption properties. However, AS inhibition by $HgCl_2$ will not allow the determination of the exact sorption properties occurring in WWTP.

The gas purging inhibition technique does not induce any effect on the biomass structure. The AS initial properties are kept unchanged after injecting nitrogen in the bioreactor. In addition, this inhibition technique is really easy to implement and, after the aerated and non-aerated phases, the inhibition state is immediately reached as the dissolved oxygen concentration is quasi instantaneously null. Only the nitrogen flow rate must be controlled in order to avoid AS deflocculation. However, it does not consist in a limiting factor since a low nitrogen flow rate is sufficient to quickly force oxygen out. Nevertheless, a gas reaction with the analyte of interest, as observed with nitrogen and ammonium, is possible and would alter the determination of sorption properties. Therefore a reaction of the gas and the analyte of interest must be totally excluded before starting the sorption experiments. The easiest way to avoid this type of reaction would simply consist in determining the sorption properties under anaerobic conditions with an inert gas or without gas injection. Indeed, the gas purging technique only consists in removing the dissolved oxygen from the system, i.e. working under anaerobic conditions. The null dissolved oxygen concentration must be controlled to make sure that there are no biotransformation possibilities since oxygen transfer to biomass might occur because of the required stirring.

However, anaerobic bacteria are not inhibited by the gas purging technique. The anaerobic bacteria fraction in activated sludge of aerobic processes can be considered as negligible because bacteria are always in contact with free and/or bound oxygen in the wastewater treatment plant. Working under anaerobic conditions is therefore appropriated for aerobic AS inhibition. There is no perfect inhibition technique for anaerobic AS. Experiments on anaerobic activated sludge inhibition should focus on chemical inhibition techniques.

4. Conclusion

The impact of five different AS inhibition techniques on AS structure was investigated in this study. The results allow to conclude the reliability of these inhibition techniques to determine the sorption properties.

The thermal technique by drying the sludge damages irreversibly the AS structure and is not suitable to assess sorption properties. Chemical inhibition causes adverse effects, which can be limited by determining the lowest effective concentration at which biomass inhibition is ensured. However, AS structure is altered even at low chemical reagents concentrations. Therefore, chemical inactivation, used in many studies, is not appropriate to determine sorption properties because sorption on altered biomass would not represent the real sorption mechanisms. The gas purging technique was the only AS inhibition technique investigated in this study which kept the biomass properties unchanged. However, a reaction between the gas and the analyte of interest might occur which would alter the sorption assessment. The establishment of anaerobic conditions without the use of gas purging avoided the possible reaction of the gas with the investigated pollutant. However, the gas purging technique is not appropriated for anaerobic AS since this technique only consists in forcing the oxygen out of the system. Chemical inhibition by HgCl2 could be the best compromise for anaerobic AS inhibition.

References

[1] T.A. Ternes, M.-L. Janex-Habibi, T. Knacker, N. Kreuzinger, H. Siegrist, Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse. POSEIDON, detailed report related to the overall duration. Contract No. EVK1-CT-2000-00047, 2006.

[2] N. Tadkaew, M. Sivakumar, S.J. Khan, J.A. McDonald, L.D. Nghiem, Effect of mixed liquor pH on the removal of trace organic contaminants in a membrane bioreactor, Bioresour. Technol. 101 (2010) 1494–1500.

[3] E. Barbot, I. Seyssiecq, N. Roche, B. Marrot, Inhibition of activated sludge respiration by sodium azide addition: effect on rheology and oxygen transfer, Chem. Eng. J. 163 (2010) 230–235.

[4] A. Wick, O. Marincas, Z. Moldovan, T.A. Ternes, Sorption of biocides, triazine and phenylurea herbicides, and UV-filters onto secondary sludge, Water Res. 45 (2011) 3638–3652.

[5] L. Clouzot, P. Doumenq, N. Roche, B. Marrot, Kinetic parameters for 17α-ethinylestradiol removal by nitrifying activated sludge developed in a membrane bioreactor, Bioresour. Technol. 101 (2010) 6425–6431.

[6] B. Chefetz, K. Stimler, M. Schechter, Y. Drori, Interactions of sodium azide with triazine herbicides: Effect on sorption to soils, Chemosphere 65 (2006) 352–357.

[7] J. Stevens-Garmon, J.E. Drewes, S.J. Khan, J.A. McDonald, E.R.V. Dickenson, Sorption of emerging trace compounds onto wastewater sludge solids. Appendix B: Preliminary inactivation comparisons, Water Res. 45 (2011) 3417–3426.

[8] P. Gaillardon, Influence of soil moisture on long-term sorption of diuron and isoproturon, Pestic. Sci. 47 (1996) 347–354.

[9] T. Yi, W.F. Harper, The effect of biomass characteristics on the partitioning and sorption hysteresis of 17α-ethinylestradiol, Water Res. 41 (2007) 1543–1553.

[10] M. Barret, H. Carrère, E. Latrille, C. Wisniewski, D. Patreau, Micropollutant and sludge characterization for modelling sorption equilibria, Environ. Sci. Technol. 44 (2010) 1100–1106.

[11] A.E. Berns, H. Philipp, H.D. Narres, P. Burauel, H. Vereecken, W. Tappe, Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy, Eur. J. Soil Sci. 59 (2008) 540–550.

[12] J. Chen, X. Huang, D. Lee, Bisphenol A removal by a membrane bioreactor, Process Biochem. 43 (2008) 451–456.

[13] A. Wick, G. Fink, A. Joss, H. Siegrist, T.A. Ternes, Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment, Water Res. 43 (2009) 1060–1074.

[14] M. Clara, B. Strenn, E. Saracevic, N. Kreuzinger, Adsorption of bisphenol-A, 17β-estradiole and 17α-ethinylestradiole to sewage sludge, Chemosphere 56 (2004) 843–851.

[15] J.Y. Kim, K. Ryu, E.J. Kim, W.S. Choe, G.C. Cha, I. Yoo, Degradation of bisphenol A and nonylphenol by nitrifying activated sludge, Process Biochem. 42 (2007) 1470–1474.

[16] B. Seyhi, P. Drogui, G. Buelna, J.F. Blais, Removal of bisphenol-A from spiked synthetic effluents using an immersed membrane activated sludge process, Sep. Purif. Technol. 87 (2012) 101–109.

[17] M. Maurer, B.I. Escher, P. Richle, C. Schnaffer, A.C. Alder, Elimination of β-blockers in sewage treatment plants, Water Res. 41 (2007) 1614–1622.

[18] S.K. Maeng, S.K. Sharma, C.D.T. Abel, A. Magic-Knevez, G.L. Amy, Role of biodegradation in the removal of pharmaceutically active compounds with different bulk organic matter characteristics through managed aquifer recharge: Batch and column studies, Water Res. 45 (2011) 4722–4736.

[19] H. Chen, S. Chen, H. Zhao, Y. Zhang, Sorption of polar and nonpolar organic contaminants by oil-contaminated soil, Chemosphere 73 (2008) 1832–1837.

[20] C. Liang, Z. Dang, B. Xiao, W. Huang, C. Liu, Equilibrium sorption of phenanthrene by soil humic acids, Chemosphere 63 (2006) 1961–1968.

[21] M.A. Chappell, B.E. Porter, C.L. Price, B.A. Pettway, R.D. George, Differential kinetics and temperature dependence of abiotic and biotic processes controlling the environmental fate of TNT in simulated marine systems, Mar. Pollut. Bullet. 62 (2011). pp. 1736-17.

[22] L. Delgado, Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux: élimination et influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le procédé. Thèse Génie des Procédés, INP Toulouse, 2009. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000816/01/delgado.pdf>.

[23] H.R. Andersen, M. Hansen, J. Kjølholt, F. Stuer-Lauridsen, T. Ternes, B. Halling-Sørensen, Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment, Chemosphere 61 (2005) 139–146.

[24] T. Ternes, N. Hermann, M. Bonerz, T. Knacker, H. Siegrist, A. Joss, A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (K_D) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge, Water Res. 38 (2004) 4075–4084.

[25] J. Seira, C. Sablayrolles, M. Montrejaud-Vignolles, H. Carrere, D. Patureau, C.Albasi, C. Joannis-Cassan, Quantification de l'adsorption de molécules

médicamenteuses (anticancéreuses) sur des boues biologiques: impact de la nature des boues. Personnal communication, Congrès SFGP Lille, 2011.
[26] M. Hörsing, A. Ledin, R. Grabic, J. Fick, M. Tysklind, J.C. Jansen, H.R. Andersen, Determination of sorption of seventy-five pharmaceuticals in sewage sludge, Water Res. 45 (2011) 4470–4482.
[27] I. Seyssiecq, B. Marrot, D. Djerroud, N. Roche, In situ triphasic rheological characterisation of activated sludge, in an aerated bioreactor, Chem. Eng. J. 142 (2008) 40–47.
[28] B.M. Wilén, K. Keinding, P.H. Nielsen, Flocculation of activated sludge flocs by stimulation of the aerobic biological activity, Water Res. 38 (2004) 3909–3919.

Résumé

Si les risques liés à la présence de résidus médicamenteux dans l'environnement sont encore méconnus, les premiers cas avérés et l'introduction récente de trois médicaments (2013) sur une liste de surveillance de l'UE imposent d'ores et déjà le développement de procédés de traitement capables d'éliminer cette pollution spécifique. C'est dans ce contexte que le traitement des effluents d'un service d'oncologie par un bioréacteur à membranes a été évalué dans cette thèse. Les effluents collectés sont caractérisés par une importante variabilité de la charge polluante et des concentrations médicamenteuses très élevées, parfois supérieures à 1 $mg.L^{-1}$. Ces conditions n'ont pas favorisé le développement continu de la biomasse épuratrice. Il a toutefois été démontré que la toxicité de ces effluents n'est pas proportionnelle à la charge appliquée puisqu'une charge massique supérieure à 0.20 $kgDCO.kgMVS^{-1}.j^{-1}$ permet la croissance de la biomasse. Le colmatage des membranes a permis une rétention significative des médicaments sélectionnés. L'élimination des médicaments sélectionnés a par ailleurs été systématiquement améliorée par les boues acclimatées avec notamment le développement de capacités de biotransformation sur des molécules parfois uniquement éliminées par sorption dans les stations d'épuration.

Mots clés : résidus médicamenteux, bioréacteur à membranes, anticancéreux, inhibition, colmatage, biotransformation, sorption.

Abstract

The risks concerning the presence of pharmaceutical residues into the environment are still unknown. However, the first confirmed cases and the recent introduction of three drugs (2013) on a surveillance list of EU already require the development of processes able to remove this specific pollution. It is against that background that oncological ward wastewater treatment by a membrane bioreactor was investigated in this thesis. These effluents are characterized by a very variable charge and high pharmaceutical concentrations, sometimes above 1 $mg.L^{-1}$. These conditions did not favor the continuous development of the biomass. However, it could be demonstrated that the toxicity of these effluents is not related to the applied charge since a food to microorganisms ratio above 0.20 $kgCOD.kgMLVSS^{-1}.d^{-1}$ allows biomass growth. Membrane fouling played a major role in the significant retention of the investigated drugs. In comparison to unacclimated activated sludge from WWTP pharmaceutical removal was systematically enhanced by the acclimated biomass with the development of biotransformation possibilities.

Keywords: pharmaceutical residues, oncology, cytostatic, inhibition, membrane bioreactor, biotransformation, sorption.