

# Projet BIOTECH « Biocides, Occurrence, Traitement et Effluents Hospitaliers »

## PHASE 2 : Etude de la stabilité et du devenir des biocides dans les eaux résiduaires et les systèmes d'assainissement

### Rapport scientifique

**Auteur (organisme)** Marie DEBORDE (IC2MP UMR CNRS 7285), sophie BOURCIER (LCM UMR CNRS 9168), Stéphane BOUCHONNET (LCM UMR CNRS 9168), Cyril PRINTEMPS-VACQUIER (Veolia Eau - Centre Régional Atlantique), Florence LASEK (IC2MP UMR CNRS 7285).

**Novembre 2018**

Document élaboré dans le cadre de l'appel à projets « Innovation et changements de pratiques – Lutte contre les micropolluants des eaux urbaines » :



En partenariat avec :



- **AUTEURS**

**Marie DEBORDE**, Maître de Conférences (IC2MP UMR CNRS 7285), [marie.deborde@univ-poitiers.fr](mailto:marie.deborde@univ-poitiers.fr)

**Nathalie KARPEL VEL LEITNER**, Directeur de Recherche (IC2MP UMR CNRS 7285), [nathalie.karpel@univ-poitiers.fr](mailto:nathalie.karpel@univ-poitiers.fr)

**Florence LASEK**, Doctorante (IC2MP UMR CNRS 7285), [florence.lasek@univ-poitiers.fr](mailto:florence.lasek@univ-poitiers.fr)

**Sylvie LIU**, Assistant Ingénieur (IC2MP UMR CNRS 7285), [sylvie.liu@univ-poitiers.fr](mailto:sylvie.liu@univ-poitiers.fr)

**Cyril PRINTEMPS-VACQUIER**, Responsable bureau d'études techniques (Veolia Eau - Centre Régional Atlantique), [cyril.printemps-vacquier@veolia.com](mailto:cyril.printemps-vacquier@veolia.com)

**Christelle PAGOTTO**, Ingénieure Qualité Assainissement (Veolia Eau - DTF), [christelle.pagotto@veolia.com](mailto:christelle.pagotto@veolia.com)

**Philippe PLAIRE**, Responsable développement Poitou-Charentes (Veolia Eau – Centre Régional Atlantique), [philippe.plaire@veolia.com](mailto:philippe.plaire@veolia.com)

**Hervé REISSER**, Ingénieur Qualité de l'eau et des Milieux Aquatiques (Veolia - DTP), [hervé.reisser@veolia.com](mailto:hervé.reisser@veolia.com)

**Thierry TROTOUIN**, Responsable Marchés industriels (Veolia Eau – Centre Régional Toulouse Pyrénées), [thierry.trotouin@veolia.com](mailto:thierry.trotouin@veolia.com)

**Sophie CORMERY**, Responsable de l'équipe Qualité des Rejets (Grand Poitiers), [sophie.cormery@grandpoitiers.fr](mailto:sophie.cormery@grandpoitiers.fr)

**Nathalie DELLA-VALLE**, Responsable du centre d'activité Traitement des Eaux Usées Qualité des Rejets (Grand Poitiers), [nathalie.della-valle@grandpoitiers.fr](mailto:nathalie.della-valle@grandpoitiers.fr)

**Sarah THEVENOT**, Maître de Conférences et Practicien Hospitalier (CHU Poitiers), [s.thevenot@chu-poitiers.fr](mailto:s.thevenot@chu-poitiers.fr)

**Ludovic BLANCHIER**, Coordonnateur Environnement (CHU Poitiers), [ludovic.blanchier@chu-poitiers.fr](mailto:ludovic.blanchier@chu-poitiers.fr)

**Olivier CASTEL**, Maître de Conférences et Practicien Hospitalier (CHU Poitiers), [olivier.castel@chu-poitiers.fr](mailto:olivier.castel@chu-poitiers.fr)

**Stéphane BOUCHONNET**, Ingénieur de Recherche (LCM), [stephane.bouchonnet@polytechnique.edu](mailto:stephane.bouchonnet@polytechnique.edu)

**Sophie BOURCIER**, Ingénieure de Recherche (LCM), [sophie.bourcier@polytechnique.edu](mailto:sophie.bourcier@polytechnique.edu)

**Edith NICOL**, Ingénieure d'Etude (LCM), [edith.nicol@polytechnique.edu](mailto:edith.nicol@polytechnique.edu)

**Svetlana VUJOVIC**, Post-Doctorante (LCM), [svetlana.vujovic@polytechnique.edu](mailto:svetlana.vujovic@polytechnique.edu)

**Christophe GENTY**, Ingénieur d'Etude (LCM), [christophe.genty@polytechnique.edu](mailto:christophe.genty@polytechnique.edu)

**Florence PONTLEVOY**, Directrice de Technavox filiale SEREP (SEREP), [florence.pontlevoy@serep.fr](mailto:florence.pontlevoy@serep.fr)

**Olivier ROSSELET**, Chargé d'affaires (SEREP), [olivier.rosselet@serep.fr](mailto:olivier.rosselet@serep.fr)

**Gaëtan RAUWEL**, Directeur Recherche et Développement (Laboratoires ANIOS), [G.Rauwel@anios.com](mailto:G.Rauwel@anios.com)

- **CORRESPONDANTS**

**AFB : Olivier PERCEVAL**, Chargé de missions écotoxicologie (AFB), [olivier.perceval@afbiodiversite.fr](mailto:olivier.perceval@afbiodiversite.fr)

**Agence de L'Eau Loire Bretagne : Magali BARNIER**, Service collectivités et Industrie (Agence de l'Eau Loire Bretagne), [Magali.BARNIER@eau-loire-bretagne.fr](mailto:Magali.BARNIER@eau-loire-bretagne.fr)

**Hakim TALEB**, Chargé d'interventions Spécialisé Industries (Agence de l'Eau Loire Bretagne), [Hakim.TALEB@eau-loire-bretagne.fr](mailto:Hakim.TALEB@eau-loire-bretagne.fr)

**Droits d'usage** : accès libre

**Niveau géographique** : national

**Couverture géographique** : Agglomération de Poitiers

**Niveau de lecture** : professionnels et experts



- **RESUME**

L'objectif de la phase 2 du projet BIOTECH, qui s'est déroulée de janvier 2016 à octobre 2018, a été d'étudier la stabilité et le devenir des biocides dans les eaux résiduaires, mais également, d'évaluer les éventuels impacts des biocides sur la biomasse des stations d'épuration et les milieux.

Pour cela, les eaux résiduaires constituant une matrice complexe particulière, pouvant inclure des matières en suspension, des matières organiques dissoutes, voire un résiduel de chlore non négligeable (issu des protocoles de désinfection des locaux au niveau des rejets hospitaliers), une étude laboratoire de la stabilité et du devenir des biocides les plus spécifiques des activités de soins par hydrolyse, chloration et adsorption en milieux complexes a été réalisée. Puis 2 campagnes de prélèvements à différents moments de la journée au niveau du site du CHU et de la station d'épuration du Grand Poitiers ont été menées. A partir de ce travail, les fluctuations des quantités de biocides rejetées sur 24 h ont pu être appréciées. De même, une première estimation des quantités adsorbées sur les matières en suspension a été obtenue. Enfin, les produits de dégradation susceptibles d'être générés lors du rejet de biocides en présence d'un résiduel de chlore ont été identifiés et l'impact du protocole de chloration utilisé pour la désinfection des locaux (i.e. utilisation de l'eau de javel ou du dichloroisocyanurate de sodium) sur leur formation et l'écotoxicité vis-à-vis de *Vibrio fischeri* ont été évalués.

Parallèlement, pour les 5 biocides retrouvés dans le réseau lors des campagnes de la phase 1 du projet, une estimation des quantités journalières maximales susceptibles d'être rejetées dans le milieu par temps sec ou de pluie (via la station d'épuration et les déversoirs d'orage) a été réalisée. De même, quelques analyses terrains en sortie de station d'épuration et au niveau d'un déversoir d'orage ont été menées suite à des prélèvements par capteurs passifs. Enfin, une évaluation de l'impact de ces substances sur la biomasse des stations d'épuration et les milieux a été réalisée.

- **MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE) : BIOCIDES, DEVENIR, STABILITE, TOXICITE, EAUX RESIDUAIRES, STATION D'EPURATION, MILIEUX**



- **STUDY OF THE STABILITY AND FATE OF BIOCIDES IN WASTEWATER AND WASTEWATER TREATMENT PLANT**
- **ABSTRACT**

The objective of Phase 2 of the BIOTECH project, which ran from January 2016 to October 2018, was to study the stability and fate of biocides in wastewater, but also, evaluate the possible impacts of biocides on the biomass of wastewater treatment plants and environments.

To attempt this goal, the wastewater constituting a particular complex matrix, which may include suspended solids, dissolved organic matter, or even a significant non-negligible chlorine residual (resulting from the disinfection protocols of the premises at the level of hospital discharges), a laboratory study of the stability and fate of the most specific biocides of care activities by hydrolysis, chlorination and adsorption in complex environments was carried out. Then, two sampling campaigns were conducted over a 24 h period throughout the entire Poitiers University Hospital sewage system and the wastewater treatment plant of Poitiers. From these results, daily discharge trends of biocides were appreciated. Similarly, a first estimate of the amounts adsorbed on suspended solids has been obtained. Finally, the degradation products likely to be generated when biocides are discharged in the presence of residual chlorine have been identified and the impact of the chlorination protocol used for the disinfection of premises (i.e. sodium hypochlorite or sodium dichloroisocyanurate) on their formation and the ecotoxicity towards *Vibrio fischeri* were evaluated.

In parallel, for the 5 biocides found in the network during the Phase 1 campaigns of the project, an estimate of the maximum daily quantities likely to be released into the environment in dry or rainy weather (*via* the wastewater treatment plant and storm weir) was carried out. Similarly, field analyzes at the outlet of the treatment plant and at a storm weir were conducted following passive sensor sampling. Finally, an evaluation of the impact of these substances on the biomass of the treatment plants and the environments was carried out.

- **KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA): BIOCIDES, FATE, STABILITY, TOXICITY, WASTEWATER, TREATMENT PLANT, ENVIRONMENTS**

## • SYNTHÈSE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE

Le projet BIOTECH, financé par l'AFB et l'Agence de l'Eau Loire Bretagne, a été retenu dans le cadre de l'appel à projets intitulé « Innovation et changements de pratiques – Lutte contre les micropolluants des eaux urbaines ». Dans le cadre de ce projet de recherche, la Communauté d'Agglomération de Grand Poitiers, les Laboratoires Anios (un des principaux fabricants mondiaux de biocides), le CHU de Poitiers ainsi que des partenaires privés du secteur du traitement des eaux (Veolia Eau et Serap-Technavox) et des organismes de recherche (LCM et IC2MP) se sont associés pour évaluer les rejets de biocides et leur devenir dans les réseaux, mais également pour proposer des solutions, allant de la prévention à la source au traitement, pour limiter ces rejets.

Dans le cadre de ce travail, 8 substances biocides (i.e. deux ammoniums quaternaires, une amine, un biguanide, deux isothiazolinones, un parabène et un alcool), choisies parmi les plus fréquemment utilisés par les établissements de santé en France sont étudiés (Tableau A).

Tableau A Liste des molécules retenues dans le cadre du projet BIOTECH

Famille	Nom de la substance active	Indications	Consommations en France /an
Ammonium quaternaire	DIDAC : Chlorure de didécyldiméthylammonium	Détergent désinfectant de l'instrumentation Détergent-désinfectant de surface	1000 tonnes
Ammonium quaternaire	ABDAC : Chlorure de Benzalkonium	Antiseptique et désinfectant pour la peau Détergent-désinfectant de surface	700 tonnes
Amine	Bis (aminopropyl) laurylamine	Détergent-désinfectant de surface	400 tonnes
Biguanide	Digluconate de Chlorhexidine	Antiseptique et désinfectant pour la peau Détergent-désinfectant de l'instrumentation	150 tonnes
Isotiazolinone	MIT et CMIT : Méthylisothiazolone et Chlorométhylisothiazolone	Conservateur	< 20 tonnes chacun 30 à 50 tonnes (en mélange)
Parabène	Méthylparabène	Conservateur	30 tonnes
Alcool	Alcool benzylique	Conservateur	100 tonnes

Source des données pour les consommations : Laboratoires Anios

Lors de la phase 1 du projet, 5 de ces 8 substances ont été observées dans le réseau d'assainissement de l'Agglomération de Poitiers (Figure A). Les ammoniums quaternaires (avec des concentrations de l'ordre de quelques dizaines de mg/L) et l'alcool benzylique (avec des concentrations moindres, de l'ordre de quelques dizaines de µg/L) ont été retrouvés en majorité au niveau du réseau d'assainissement jusqu'en entrée de station d'épuration. Pour ces molécules, le CHU serait le plus gros contributeur en DIDAC et en alcool benzylique. Toutefois, pour l'alcool benzylique, tout comme l'ABDAC, une émission plus diffuse provenant notamment du rejet des particuliers serait également observée. Enfin, bien que retrouvés de façon plus ponctuelle au niveau du réseau, tout comme le DIDAC, le digluconate de chlorhexidine et le bis(aminopropyl)laurylamine proviendraient majoritairement des activités de soins.

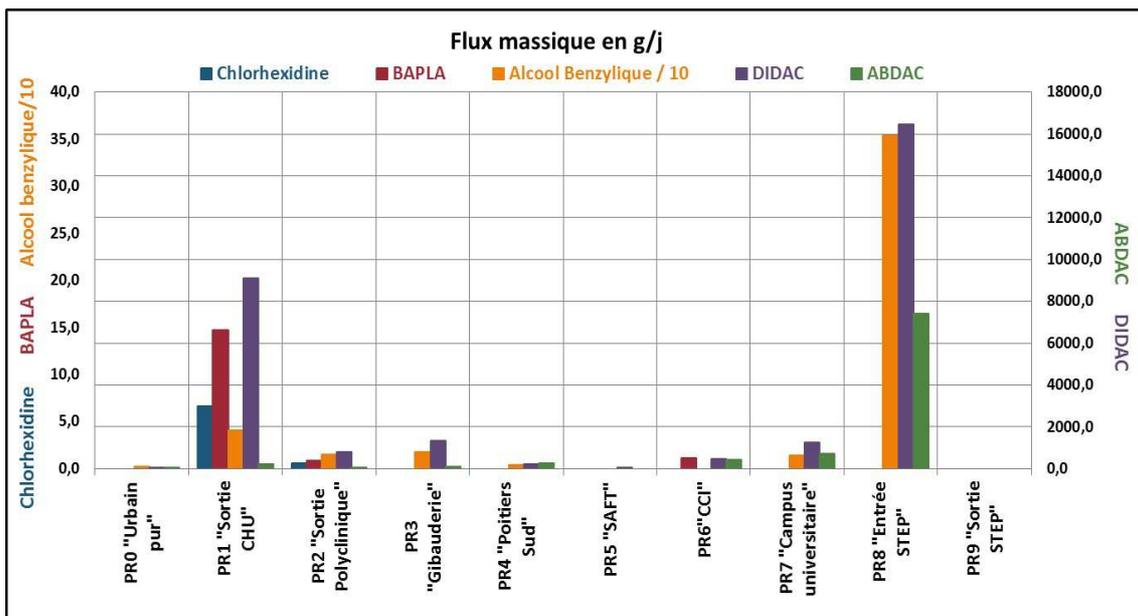


Figure A : Flux massiques obtenus pour les 5 biocides retrouvés dans le réseau dans le cadre du projet BIOTECH au niveau des différents points de prélèvements retenus pour les campagnes réseaux de la phase 1  
 Source des données : Veolia Eau et IC2MP

L'objectif de la phase 2 du projet BIOTECH, qui s'est déroulée de janvier 2016 à août 2018, a été d'étudier la stabilité et le devenir des biocides dans les eaux résiduaires, mais également, d'évaluer les éventuels impacts des biocides sur la biomasse des stations d'épuration et les milieux.

Pour cela, les eaux résiduaires constituant une matrice complexe particulière, pouvant inclure des matières en suspension, des matières organiques dissoutes, voire un résiduel de chlore non négligeable (issu des protocoles de désinfection des locaux au niveau des rejets hospitaliers), une étude laboratoire de la stabilité et du devenir des biocides les plus représentatifs d'une activité de soins (i.e. DIDAC, digluconate de chlorhexidine et bis(aminopropyl)laurylamine) par hydrolyse, chloration et adsorption en milieux complexes a tout d'abord été réalisée. Puis 2 campagnes de prélèvements à différents moments de la journée au niveau du site du CHU et de la station d'épuration du Grand Poitiers ont été menées. A partir de ce travail, une émission continue de biocides sur 24 h avec des quantités rejetées plus importantes en journée du fait de la plus forte activité de soins et de nettoyage durant cette période a été observée au niveau du CHU et de la station d'épuration. En termes de stabilité, il a clairement été mis en évidence que les biocides pouvaient s'adsorber sur les matières en suspension dans les eaux résiduaires. Sur le terrain, des quantités non négligeables (de 18 à 47%) des biocides retrouvés dans les rejets seraient adsorbés sur les matières en suspension. De même, en présence d'un résiduel de chlore, certains biocides pourraient se dégrader pour générer des produits de transformation, *a priori* plus actifs vis-à-vis de *V. fischeri*. Lors des campagnes de prélèvements, certains de ces sous-produits ont pu être observés en phase aqueuse. Au niveau du site du CHU, la formation de ces composés n'est pas significativement différentes selon le protocole utilisé pour la désinfection des locaux (i.e. eau de javel ou dichloroisocyanurate de sodium). De même, aucun impact sur la toxicité des effluents n'a été observé suivant le protocole employé.

Parallèlement, pour les 5 biocides retrouvés dans le réseau (i.e. DIDAC, ABDAC, alcool benzylique, digluconate de chlorhexidine et bis(aminopropyl)laurylamine), une estimation des quantités journalières maximales susceptibles d'être rejetées dans le milieu par temps sec ou de pluie (*via* la station d'épuration et les déversoirs d'orage) a été réalisée au regard des résultats obtenus lors des campagnes réseau, et des volumes susceptibles d'être déversés dans le milieu. Dans ces conditions, il a été estimé que le maximum des flux déversés par temps sec pourrait être de l'ordre d'une centaine de g/j pour le DIDAC, l'ABDAC et l'alcool benzylique contre une dizaine de g/j pour les autres

molécules. Par temps de pluie, de plus grandes quantités de biocides (jusqu'à 1198 g/j pour le DIDAC) seraient susceptibles être déversées dans les milieux. Lors d'analyses terrain, aucune exploitation des données n'a pu être obtenue en sortie de station d'épuration, en raison de phénomènes d'adsorption sur les matériaux encadrant les phases adsorbantes des capteurs passifs utilisés lors des prélèvements. Toutefois, des rejets de DIDAC et d'ABDAC (biocides les plus retrouvés et les plus concentrés au niveau du réseau) ont pu être observés au niveau d'un des déversoirs d'orage les plus émetteurs sur le système d'assainissement de Poitiers.

Enfin, une évaluation de l'impact de ces substances en mélange sur la biomasse des stations d'épuration et les milieux a été réalisée. Concernant ce point, il a été montré que la biomasse de station ne serait pas sensible à la présence de biocides. Par contre, pour les concentrations moyennes en biocides constatées dans les réseaux, il ressort une toxicité au regard des tests de toxicité aiguë (sur *Daphnia magna* et *Vibrio fischeri*). Sur les algues vertes (test de toxicité chronique), il semblerait que les biocides puissent à l'opposé avoir un effet favorable à leur croissance.

Pour en savoir plus :

Ce travail pluripartenarial a fait l'objet de :

- **6 communications orales**

Printemps-Vacquier C., Nicolas-Herman N., Pagotto C., Plaire P., Reisser H., Trotouin T., Cormery S., Della-Valle N., Ayraud Thévenot S., Blanchier L., Castel O., Deborde M., Karpel Vel Leitner N., Lasek F., Bouchonnet S., Bourcier S., Nicol E., Vujovich S., Rauwel G. Pontlevoy F. (2016) « Identification des principaux émetteurs de biocides dans le système de collecte des eaux usées de la Communauté d'Agglomération du Grand Poitiers et évaluation de la contribution du CHU à ces rejets ». *In Recueil de conférences des journées Informations Eaux, 22<sup>ème</sup> édition, Poitiers, France, 11-13 octobre 2016.*

Printemps-Vacquier C., Nicolas-Herman T., Pagotto C., Plaire P., Reisser H., Trotouin T., Cormery S., Della-Valle N., Ayraud Thevenot S., Blanchier L., Castel O.,\_Rauwel G. ; Lasek F., Karpel Vel Leitner N., Deborde M. (2017) « Identification des principaux émetteurs de biocides à l'échelle d'une agglomération » *12<sup>ème</sup> congrès international du GRUTTEE, Strasbourg, France, 24-26 octobre 2017.*

Lasek F.; Karpel Vel Leitner N., Ayraud-Thevenot S., Blanchier L., Castel O., Rauwel G., Deborde M. (2017) « Rejets de produits biocides issus des activités de santé dans un réseau d'eaux usées : Etude d'un centre hospitalier universitaire » *12<sup>ème</sup> congrès international du GRUTTEE, Strasbourg, France, 24-26 octobre 2017.*

Vujovic S., Bouchonnet S., Nicol E., Bourcier S., Lasek F., Karpel Vel Leitner N., Deborde M. (2017) "Stability of selected biocides in wastewater and structural elucidation of obtained transformation products" *2nd International Caparica Conference on Pollutant Toxic Ions and Molecules, Caparica, Portugal, 6-9 Novembre 2017*

Pontlevoy F., Lasek F., Karpel Vel Leitner N., Blanchier L., Ayraud-Thevenot S., Castel O., Printemps Vacquier C., Plaire P., Pagotto C., Reisser H., Trotouin T., Rauwel G., Deborde M. (2018) « BIOTECH Project : Hospital effluents treatment by oxidation with ozone and catalytic ozonation processes – elimination of biocides » *In Proceedings of IOA International conference, Advances in Science and Engineering for Industrial Applications of Ozone and Related Oxidants, International ozone Association, Lausanne, Switzerland, September 5-7, 2018.*

Pontlevoy F., Lasek F., Karpel Vel Leitner N., Blanchier L., Ayraud-Thevenot S., Castel O., Rauwel G., Deborde M. (2018) « Campagne d'étude sur site de traitement des biocides dans des effluents du secteur de la santé, par procédé d'Ozonation Catalytique Supporté, OCS® » *In Recueil de conférences des journées Informations Eaux, 23<sup>ème</sup> édition, Poitiers, France, 9-11 octobre 2018.*

- **2 posters**

IC2MP, LCM, Grand Poitiers, Centre Hospitaliers Universitaire de Poitiers, Veolia Eau, Serep-Technavox, Laboratoires Anios. « Projet BIOTECH : Biocides, Occurrence, Traitement et Effluents Hospitaliers » Salon Aquaterritorial sur la gestion de l'eau de la région Grand Est, *Mulhouse, France, 21-22 septembre 2016.*

Lasek F., Deborde M., Karpel Vel Leitner N., Printemps-Vacquier C., Nicolas-Herman T., Pagotto C., Plaire P., Reisser H., Trotouin T., Ayraud-Thevenot S., Blanchier L., Castel O., Cormery S., Della-Valle N., Rauwel G. « Principaux émetteurs de produits biocides à l'échelle d'une agglomération : contribution d'un établissement hospitalier » *Conférence Eau et Santé, Lyon, France, 20 mars 2017.*

- **1 article**

Lasek F., Karpel Vel Leitner N., Rauwel G., Blanchier L., Castel O., Ayraud-Thevenot S., Deborde M. (2018) « Discharge of biocidal products from healthcare activities into a sewage system – a case study at a french university hospital » *Environmental Science and Pollution Research, in press.*

**Contacts :**

**IC2MP** : Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers UMR CNRS 7285 (M. Deborde : [marie.deborde@univ-poitiers.fr](mailto:marie.deborde@univ-poitiers.fr)) (porteur du projet)

**Veolia Eau** (C. Printemps-Vacquier : [cyril.printemps-vacquier@veolia.com](mailto:cyril.printemps-vacquier@veolia.com)) (coordinateur de la phase 1 du projet)

**Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers** (S. Thevenot : [s.thevenot@chu-poitiers.fr](mailto:s.thevenot@chu-poitiers.fr))

**Grand Poitiers** : Communauté d'Agglomération (N. Della-Valle : [nathalie.della-valle@grandpoitiers.fr](mailto:nathalie.della-valle@grandpoitiers.fr))

**Laboratoires ANIOS** : Fabricant de biocides (G. Rauwel: [G.Rauwel@anios.com](mailto:G.Rauwel@anios.com))

**Serep - Technavox** : Traitement industriel des eaux (F. Pontlevoy : [florence.pontlevoy@serep.fr](mailto:florence.pontlevoy@serep.fr))

**LCM** : Laboratoire de Chimie Moléculaire UMR CNRS 9168 (S. Bouchonnet : [stephane.bouchonnet@polytechnique.edu](mailto:stephane.bouchonnet@polytechnique.edu))

• **SOMMAIRE**

<b>1. Rappel du contexte et des objectifs .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Suivi de l'évolution des rejets.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Etude laboratoire de la stabilité et du devenir des biocides sélectionnés en milieux complexes.....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Etude cinétique d'hydrolyse, de chloration et d'adsorption .....	12
2.1.2. Identification et suivi des produits de transformation .....	16
<b>2.2. Mise au point analytique pour l'extraction des biocides sélectionnés des MES</b>	<b>26</b>
2.2.1. Estimation des quantités adsorbées .....	26
2.2.2. Protocole d'extraction .....	27
2.2.3. Tests préliminaires.....	27
2.2.4. Etude de l'impact des paramètres d'extraction et choix des conditions d'extraction	29
<b>2.3. Etude terrain du devenir des biocides dans les eaux résiduaires.....</b>	<b>32</b>
2.3.1. Points de prélèvements .....	32
2.3.2. Méthodes de prélèvements et d'analyses employées.....	34
2.3.3. Campagnes d'analyses.....	35
<b>3. Evaluation des risques pour les milieux.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Evaluation des quantités de biocides déversées dans le milieu naturel par le système d'assainissement.....</b>	<b>40</b>
3.1.1. Démarche .....	40
3.1.2. Application de la démarche aux résultats des campagnes 2015-2016 .....	42
3.1.3. Etude terrain complémentaire.....	43
<b>3.2. Evaluation de la toxicité des biocides sur la biomasse de la STEP et les milieux</b>	<b>47</b>
3.2.1. Approche expérimentale et description des tests employés .....	47
3.2.2. Résultats.....	48
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>51</b>
<b>5. Bibliographie .....</b>	<b>53</b>
<b>6. Table des illustrations .....</b>	<b>54</b>
<b>7. Annexes .....</b>	<b>56</b>
<b>7.1. Résultats des paramètres globaux obtenus lors des 2 campagnes au niveau du CHU et de la station d'épuration du Grand Poitiers .....</b>	<b>56</b>
<i>Source des données : CHU de Poitiers.....</i>	<i>56</i>
<b>7.2. Concentrations obtenues pour les 3 biocides les plus spécifiques des activités de soins lors des 2 campagnes au niveau du CHU et de la station d'épuration du Grand Poitiers.....</b>	<b>57</b>
<b>7.3. Teneurs en biocides les plus spécifiques des activités de soins dans les MES lors des 2 campagnes au niveau du CHU et de la station d'épuration du Grand Poitiers .....</b>	<b>58</b>

## PROJET BIOTECH – PHASE 2

### 1. Rappel du contexte et des objectifs

Les biocides, rassemblant des désinfectants et des détergents-désinfectants, sont très largement employés, notamment dans les établissements de santé. Toutefois, en raison des principes actifs qu'ils contiennent, substances susceptibles de détruire les membranes biologiques, ces produits possèdent un fort potentiel écotoxique et sont suspectés d'être à l'origine de la toxicité de certains effluents vis-à-vis des organismes aquatiques. Déversés dans les réseaux collectifs, ces composés pourraient donc impacter le fonctionnement des stations d'épuration (STEP) dont la plupart utilise des traitements biologiques. Par ailleurs, mal éliminés au niveau des STEP, ces composés pourraient induire des déséquilibres dans l'environnement (Takasaki *et al.*, 1994a ; Takasaki *et al.*, 1994b ; Bailey *et al.*, 1999 ; Leung, 2001 ; Tatarzako *et al.*, 2002 ; Boillot, 2008 ; Zhang *et al.*, 2015).

L'objectif du projet BIOTECH est d'étudier la présence et le devenir de composés biocides dans les réseaux de collecte d'eaux usées urbaines, mais également d'évaluer, à l'échelle d'une agglomération, la contribution d'un établissement de soins (CHU) et de proposer des solutions pour limiter ces rejets. Pour cela, outre les tâches de coordination et de bilan et valorisation, 3 tâches scientifiques, correspondant aux phases 1 à 3 du projet ont été définies.

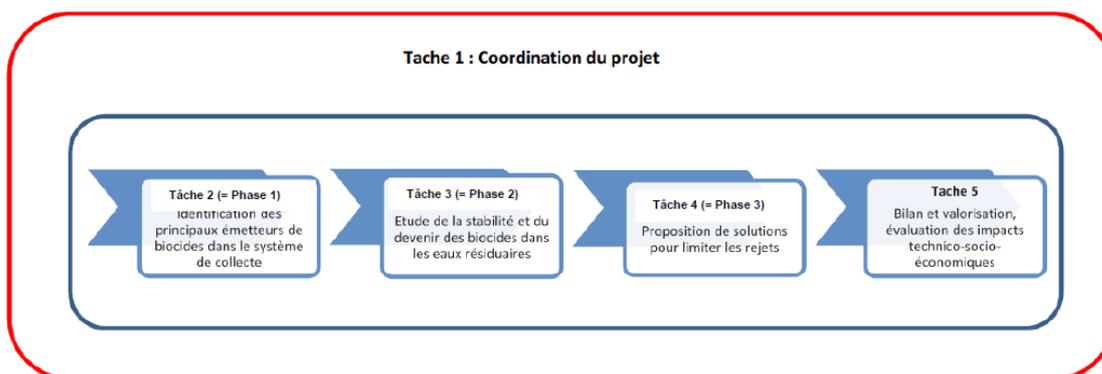


Figure 1 : Différentes tâches du projet BIOTECH

Lors de la phase 1 du projet (réalisée de mars 2015 à juillet 2016), 8 substances biocides (i.e. deux ammoniums quaternaires, une amine, un biguanide, deux isothiazolinones, un parabène et un alcool), choisies parmi les biocides les plus fréquemment utilisés par les établissements de santé en France ont été étudiés. Pour l'ensemble de ces substances, une cartographie des émetteurs potentiels (*via* l'outil ACTIPOL – Veolia Eau) et la réalisation d'enquêtes de terrain ont permis d'établir un premier bilan des sources et de localiser les acteurs stratégiques. A partir de ces résultats, des points de prélèvement sur le réseau ont été choisis et deux campagnes d'analyses ont eu lieu. Ces campagnes ont permis de mettre en évidence les biocides les plus retrouvés dans le réseau, mais également, de confirmer de manière générale les secteurs d'activité émetteurs et, à l'échelle d'une Communauté d'Agglomération comme celle du Grand Poitiers leurs contributions respectives. Enfin, cette approche a permis de mettre en évidence que certains biocides tels que les ammoniums quaternaires et l'alcool benzylique pourraient être rejetés par les particuliers. Pour ces molécules, une première évaluation de la part due aux rejets domestiques a été réalisée. Parallèlement, sur le site du CHU, une étude plus poussée de la présence dans les rejets des trois molécules les plus spécifiques d'une activité de soins a été réalisée. En prenant en considération les débits, pour chacune de ces substances, les flux massiques journaliers ont alors été déterminés et comparés aux quantités journalières consommées au niveau de chaque bâtiment du site. A partir de ces résultats, une discussion sur les pratiques ou les usages responsables de ces rejets a été initiée (Rapport phase 1).

Dans ce rapport, les résultats de la phase 2, portant sur l'étude de la stabilité et du devenir des biocides dans les eaux résiduaires sont présentés. Le planning suivi pour cette phase est décrit dans le tableau ci-dessous :



### 2.1.1. Etude cinétique d'hydrolyse, de chloration et d'adsorption

#### ➤ Protocole expérimental et conditions analytiques

Afin d'évaluer la stabilité des biocides en matrice complexe, des expériences d'hydrolyse, de chloration et d'adsorption ont été réalisées en laboratoire avec des concentrations en biocides initiales comparables à celles observées sur le site du CHU lors des campagnes d'analyses réalisées lors de la tâche 2 (phase 1) du projet (i.e. 2000 µg/L pour le DIDAC et 100 µg/L pour le digluconate de chlorhexidine et le bis(aminopropyl)laurylamine).

Pour chacune de ces expériences, de façon à s'approcher au mieux des conditions réelles, une matrice aqueuse de référence correspondant à l'eau d'entrée (après dégrillage et deshuilage) d'une petite station d'épuration située à proximité de Poitiers (i.e Saint Julien l'Ars – 2500 Equivalent Habitant) a été utilisée. Dans cette matrice, des concentrations en biocides négligeables, inférieures aux limites de quantification ont été mesurées. Les paramètres globaux de cette eau ainsi que ceux obtenus en entrée de la station d'épuration de Poitiers et à la sortie du site du CHU sont présentés dans le Tableau 3. Ils sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus lors des campagnes de prélèvements réseau réalisées au cours de la tâche 2 (phase 1) (Tableau 13 – Rapport phase 1).

**Tableau 3 : Paramètres globaux obtenus à l'entrée de la station d'épuration de Poitiers, à la sortie du site du CHU et pour la matrice de référence (i.e. eau d'entrée de STEP de Saint-Julien l'Ars) utilisée pour les tests de stabilité**

	pH	MES mg/L	DCO mg O <sub>2</sub> /L	DBO5 mg O <sub>2</sub> /L
<b>Sortie du CHU*</b>	8,3	250	750	260
<b>Entrée de STEP de Poitiers*</b>	7,9	340	761	230
<b>Matrice de référence</b> (entrée de STEP de Saint Julien l'Ars)	7,7	330	790	400

Source des données : IC2MP et Veolia Eau

Nota bene : \* résultats obtenus lors des campagnes de prélèvements réseau de la phase 1 (tâche 2) du projet

Pour la chloration, outre cette matrice de référence, des expériences utilisant de l'eau de distribution ont également été réalisées pour étudier l'impact de la chloration en l'absence de matière organique. Dans ces conditions, de façon à éliminer le chlore résiduel contenu dans l'eau du robinet, le prélèvement a été suivi d'une filtration de l'eau sur filtre d'acétate de cellulose (0,45 µm) la veille de l'expérience. Au niveau du CHU, les protocoles des désinfections pouvant être réalisés en utilisant de l'eau de javel ou des pastilles de dichloroisocyanurate de sodium, l'impact de ces 2 modes de désinfection sur la stabilité des 3 biocides a été étudié. Pour chaque manipulation, quelle que soit la matrice employée, des concentrations initiales en chlore disponible de 4 mg/L ont été utilisées. Ces concentrations ont été choisies en considérant les débits journaliers et les quantités maximales de chlore actif susceptibles d'être libérées, estimées à partir des consommations annuelles d'eau de javel et de dichloroisocyanurate de sodium au niveau des différents bâtiments du CHU (Tableau 4). Cependant, il est à noter que de plus faibles doses de chlore sont appliquées en pratique lors de l'utilisation de pastilles de dichloroisocyanurate.

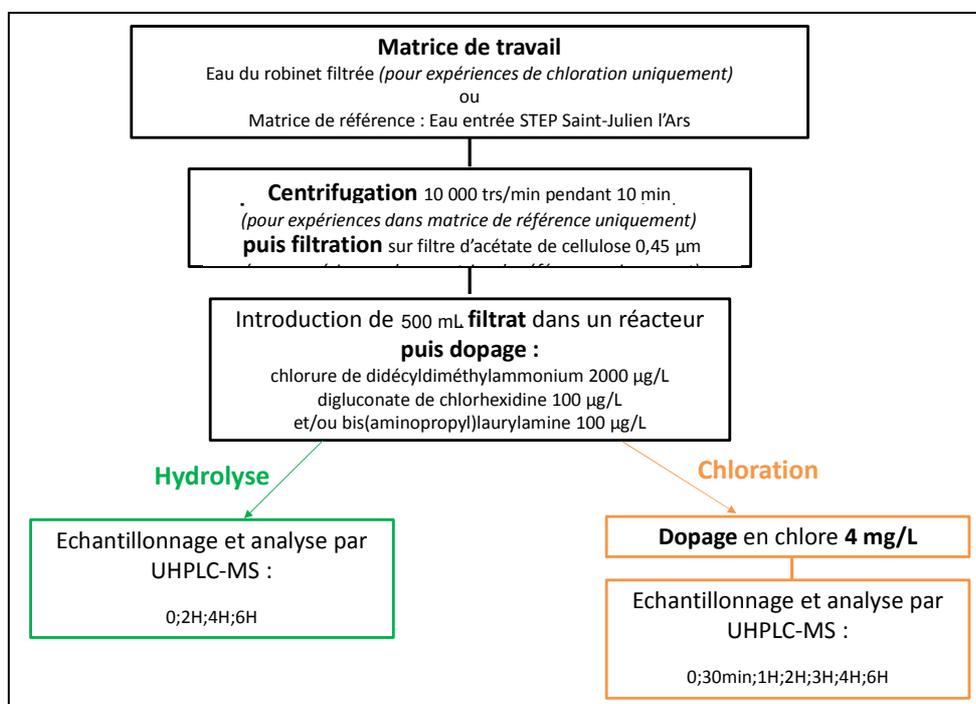
**Tableau 4 : Estimations des quantités maximales de chlore actif susceptibles d'être libérés au niveau des différents bâtiments du CHU (estimations réalisées à partir des consommations sur la période du 1 janvier au 31 décembre 2015)**

	Sortie du site	Blanchisserie	Tour Jean Bernard
Eau de javel 2,6% (en L)	28 012	27 404	608
Eau de javel 30% (en L)	2 160	2 160	-
Extrait d'eau de javel 9,6% (en L)	4 560	-	-
<i>(utilisation ponctuelle par les plombiers pour la désinfection du réseau)</i>			
Dichloroisocyanurate de sodium (pastilles contenant 1,73 g de chlore actif)	50 250	3 300	46 950
<b>Quantités annuelles de chlore actif susceptibles d'être rejetées (en g)</b>	<b>1 915 541</b>	<b>1 395 114</b>	<b>70 401</b>
<b>Concentrations moyennes (en mg/L)*</b>	<b>3,9 à 5,5</b>	<b>4,5 à 6,3</b>	<b>0,7 à 1,0</b>

Source des données : CHU de Poitiers

Nota bene : \*concentrations estimées en considérant la moyenne des débits retrouvés au niveau de ces différents points lors des campagnes de prélèvements de la phase 1 (tâche 2) (Tableau p 55 – Rapport Phase 1) et une consommation sur 5 à 7 jours

Dans ces conditions, **lors de l'étude d'hydrolyse et de chloration**, un même protocole a été suivi. Pour cela, pour chaque expérience, la matrice de travail a, si besoin, tout d'abord été débarrassée de ses matières en suspension suite à un traitement par centrifugation et filtration sur filtre en acétate de cellulose (0,45 µm). 50 mL de cette matrice ont ensuite été introduits dans un réacteur en verre puis dopés en biocides sous agitation. Pour les expériences d'hydrolyse, des prélèvements réguliers pendant 6 h ont alors été réalisés puis analysés par UHPLC/MS après dilution au 1/5 selon la méthode développée lors de la tâche 2 du projet (paragraphe 5.2.1 du rapport de la phase 1 (tâche 2)). Lors des expériences de chloration, un ajout de chlore (i.e. eau de javel ou dichloroisocyanurate de sodium) puis des prélèvements réguliers pendant 6 h ont été effectués. La Figure 2 représente le protocole suivi pour ces manipulations.



**Figure 2 : Protocole expérimental suivi pour les expériences de chloration et d'hydrolyse**  
Source des données : IC2MP

Concernant **l'étude d'adsorption**, pour chaque expérience, 500 mL d'eau d'entrée de la STEP de Saint Julien, non préalablement traités ont été introduits dans un réacteur en verre. A  $t = 0$  min, un dopage en biocide a été réalisé sous agitation. Puis, à intervalles de temps réguliers, des prélèvements ont été réalisés puis analysés par UHPLC/MS après centrifugation et dilution au 1/5 (paragraphe 5.2.1 du rapport de la phase 1 (tâche 2) du projet). Pour étudier l'influence du pH et de la teneur en matières en suspension, quelques expériences réalisées à partir d'eau d'entrée de la STEP de Saint-Julien diluée avec de l'eau centrifugée puis filtrée ont été menées. De même, quelques manipulations après ajustement du milieu à pH 8,5 ont été effectuées. Lors de cette étude, des expériences préliminaires en présence d'un agent stérilisant (azoture d'azote 20 g/L) ont été réalisées en suivant le même protocole de manière à s'assurer de l'absence de phénomène de biodégradation.

De façon à confirmer les résultats obtenus, pour chaque type d'expérience (i.e. hydrolyse, chloration, adsorption), des répliques ont été réalisés.

### ➤ Résultats

Les Figures 3 et 4 présentent les résultats obtenus dans ces conditions lors de **l'étude d'hydrolyse et de chloration**.

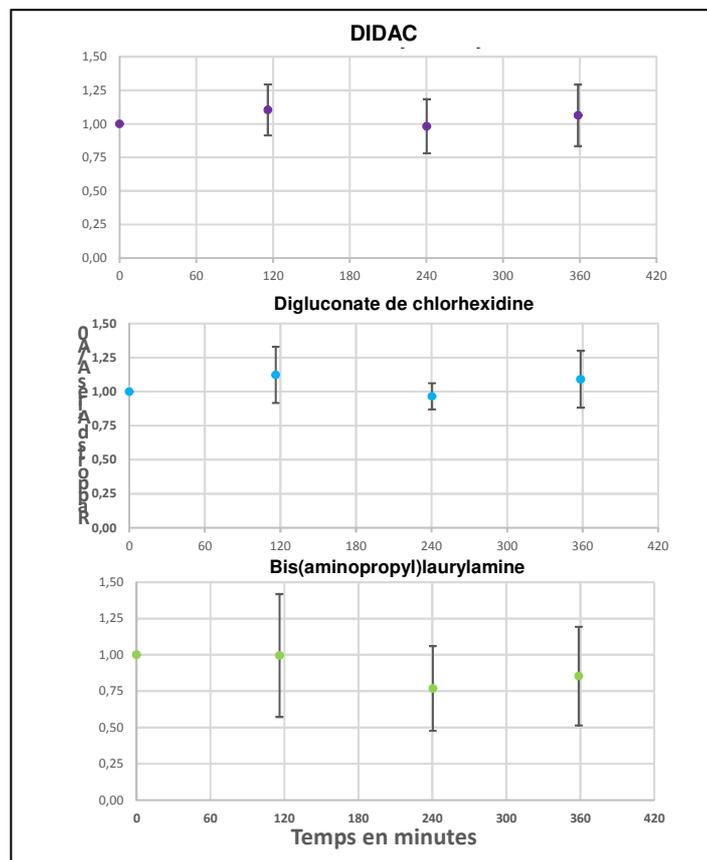


Figure 3 : Etude de la stabilité du DIDAC, du digluconate de chlorhexidine et du bis(aminopropyl)laurylamine en matrice complexe : pH = 8 ;  $[DIDAC]_0 = 2000 \mu\text{g/L}$  et  $[bis(aminopropyl)laurylamine]_0 = [digluconate\ de\ chlorhexidine]_0 = 100 \mu\text{g/L}$  (résultats obtenus suite à la réalisation de 3 manipulations)  
Source des données : IC2MP

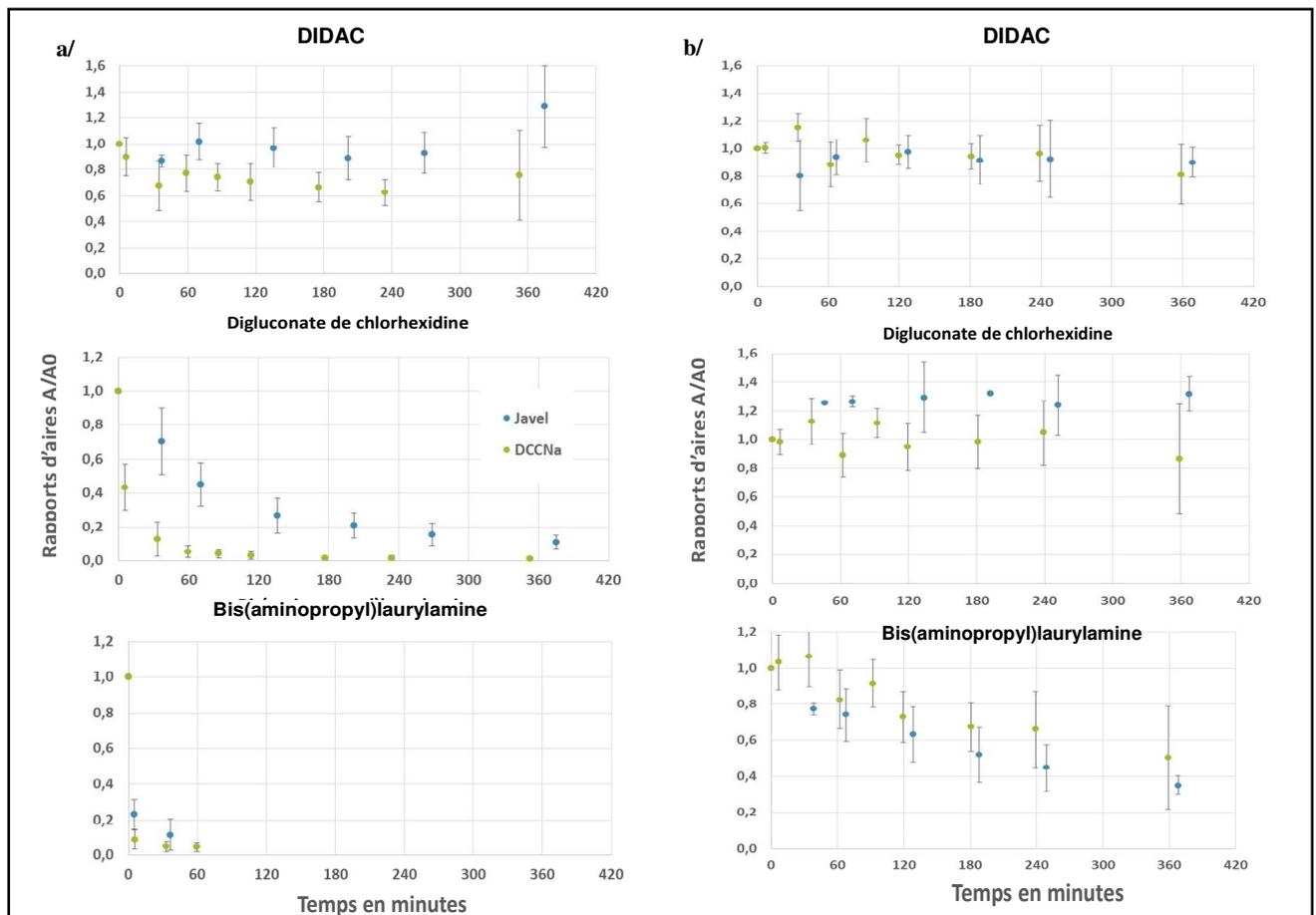


Figure 4 : Etude de l'évolution du DIDAC, du digluconate de chlorhexidine et du bis(amino)propyl laurylamine au cours de la chloration : pH = 8 ; [Chlore disponible]<sub>0</sub> = 4 mg/L ; [DIDAC]<sub>0</sub> = 2000 µg/L et [bis(amino)propyl]laurylamine]<sub>0</sub> = [digluconate de chlorhexidine]<sub>0</sub> = 100 µg/L a/ dans l'eau du robinet (résultats obtenus suite à la réalisation de 3 manipulations); b/ en matrice complexe (résultats obtenus suite à la réalisation de 4 manipulations)  
Source des données : IC2MP

Ces résultats montrent pour les 3 molécules étudiées, une grande stabilité en matrice sur une durée de 6 h (Figure 3). En présence de chlore en revanche, une dégradation possible du digluconate de chlorhexidine et du bis(amino)propyl laurylamine peut être observée (Figure 4). Cette dégradation, progressive dans le cas du digluconate de chlorhexidine et quasi instantanée ( $\geq 70\%$  après 5 minutes de réaction) pour le bis(amino)propyl laurylamine dans l'eau du robinet, serait beaucoup plus lente voire négligeable (pour le digluconate de chlorhexidine) en matrice complexe du fait de la consommation en chlore de l'eau plus importante. Ces résultats, obtenus dans de fortes conditions de chloration (tant au niveau concentration que durée de chloration), laissent donc envisager dans les rejets du CHU, une dégradation négligeable par le chlore du chlorure de didécyl diméthyl ammonium et du digluconate de chlorhexidine.

Concernant les phénomènes d'**adsorption** susceptibles de se produire, la Figure 5 suivante présente quelques exemples de résultats obtenus à pH 7,2. Pour une même teneur en MES, des résultats comparables ont été observés après stérilisation du milieu par de l'azide de sodium. Dans les conditions expérimentales étudiées, une biodégradation négligeable des molécules est donc observée et une adsorption possible sur les matières en suspension est notée. Cette adsorption serait de 6,3 à 8,9 µg/mg de MES pour le DIDAC, 0,4 à 0,6 µg/mg de MES pour le digluconate de chlorhexidine et 0,7 à 1,0 µg/mg de MES pour le bis(amino)propyl laurylamine à pH 7,2, pour les concentrations initiales en biocides et MES étudiés. Pour les mêmes concentrations, des résultats comparables ont été obtenus à pH 8,5.

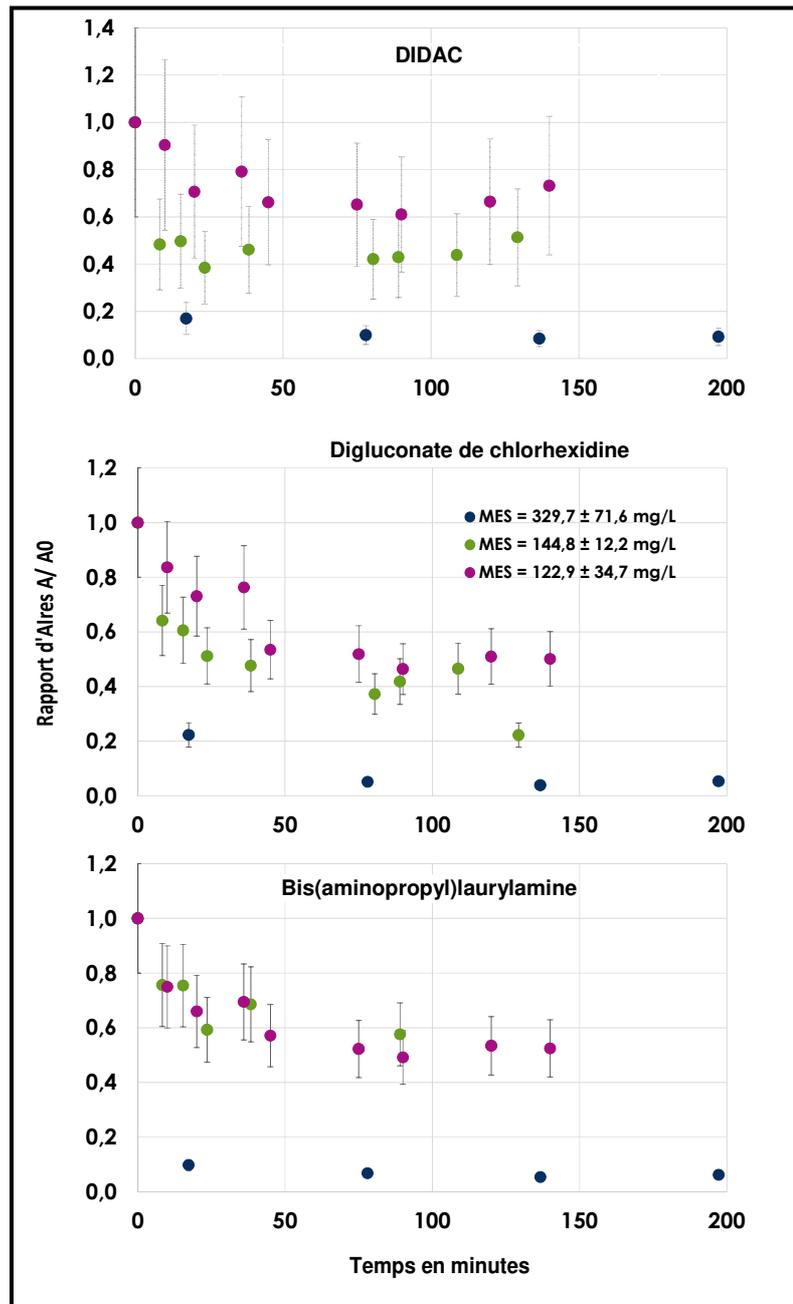


Figure 5 : Etude de l'adsorption du DIDAC, du digluconate de chlorhexidine et du bis(aminopropyl)laurylamine en matrice complexe : pH = 7,2 ; [DIDAC]<sub>0</sub> = 2000 µg/L et [bis(aminopropyl)laurylamine]<sub>0</sub> = [digluconate de chlorhexidine]<sub>0</sub> = 100 µg/L  
Source des données : IC2MP

### 2.1.2. Identification et suivi des produits de transformation

Pour les molécules susceptibles de se dégrader au cours de la chloration (i.e. digluconate de chlorhexidine et bis(aminopropyl)laurylamine), une identification des sous-produits rémanents susceptibles de se retrouver dans les effluents hospitaliers ou le réseau collectif a été réalisée. De même, un suivi de leur évolution et de l'écotoxicité globale du milieu au cours de la chloration a été effectué lorsqu'une dégradation en matrice a été suspectée.

➤ Protocole expérimental et conditions analytiques

Pour cela, des expériences de chloration dans l'eau du robinet et dans la matrice de référence (i.e. eau d'entrée de la STEP de Saint Julien l'Ars) préparées tel que décrit dans la Figure 2 ont été réalisées. Pour chaque expérience, dans plusieurs réacteurs contenant 10 mL de cette matrice dopée en biocides (5 mg/L), différentes doses de chlore (i.e. eau de javel ou dichloroisocyanurate de sodium) ont été ajoutées de manière à obtenir différents pourcentages de dégradation. Après consommation totale du chlore résiduel ( $\approx 48$  h), les pourcentages de dégradation en biocides ont été déterminés puis l'identification des sous-produits d'oxydation et le suivi de l'écotoxicité ont été réalisés.

De façon à permettre l'identification des produits de transformation, chaque prélèvement a été analysé par couplage GC-MS et LC-MS.

Les analyses GC-MS ont été réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse Varian 450GC équipé d'un passeur d'échantillons CP8400 et couplé à une trappe ionique VARIAN 240MS fonctionnant en ionisation interne. Les composés ont été séparés sur une colonne capillaire "VF-Xms" (VARIAN) de 60 m de long avec un diamètre interne de 0.25 mm et une épaisseur de phase stationnaire de 0.25  $\mu\text{m}$ . 2  $\mu\text{L}$  d'échantillon ont été injectés à 50  $\mu\text{L s}^{-1}$ . La température de l'injecteur a été fixée à 280  $^{\circ}\text{C}$  ; de l'hélium ultra pur (99.999 %) a été utilisé comme gaz vecteur à un débit constant autorégulé à 1.4  $\text{mL min}^{-1}$ . La température de colonne a été programmée comme suit : 50  $^{\circ}\text{C}$  pendant 1 min, montée 280  $^{\circ}\text{C}$  à 15  $^{\circ}\text{C/min}$ , palier de 5 min à 280  $^{\circ}\text{C}$ , montée à 10  $^{\circ}\text{C/min}$  jusqu'à la température finale de 300  $^{\circ}\text{C}$ , palier de 20 min, pour une durée totale d'analyse de 43 minutes. Les températures de l'enceinte, des électrodes de la trappe ionique et de la ligne de transfert ont été respectivement fixées à 100  $^{\circ}\text{C}$ , 200  $^{\circ}\text{C}$  et 280  $^{\circ}\text{C}$ . Le spectromètre de masse a été calibré avec les ions résultant de l'ionisation électronique (EI) de la perfluorotributylamine (PFTBA). Les expériences d'ionisation chimique (CI) ont été réalisées avec le méthanol pour gaz d'ionisation. Les spectres de masse ont été enregistrés avec le régulateur électronique de gain (AGC) avec des valeurs de cible respectivement fixées à 20.000 et 5.000 en EI et CI. Le courant d'émission a été porté à 10  $\mu\text{A}$  en EI et 50  $\mu\text{A}$  en CI. La tension du multiplicateur d'électrons a été automatiquement fixée à 2200 V pour un gain de 105. Les spectres ont été enregistrés sur une gamme de balayage de rapports masse/charge de  $m/z$  50 à  $m/z$  500 à une fréquence de 0.33 sec/scan.

Pour les analyses LC-MS, un module Acquity (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, France) a été utilisé avec une colonne analytique Pursuit XRs Ultra 2.8  $\mu\text{m}$  C18 50 x 2.0 mm (Varian, Les Ulis, France). Les paramètres de la méthode utilisée pour les séparations chromatographiques réalisées au LCM sont donnés dans le Tableau 5. Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées sur un Q-TOF Premier équipé d'une source d'électronébulisation de type "Z-spray" (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, France). Les meilleurs rapports signal sur bruit ont été obtenus suite à l'optimisation des paramètres de source comme suit : tension de cône à 20 V, tension appliquée au capillaire à 2,6 kV, tension d'extraction du cône à 2 V et guide d'ions à 2,4 V. Les températures de source et de désolvatation ont été respectivement fixées à 120  $^{\circ}\text{C}$  et 450  $^{\circ}\text{C}$ . L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation à 70  $\text{L.h}^{-1}$  et de désolvatation à 700  $\text{L.h}^{-1}$ . Le volume injecté était de 10  $\mu\text{L}$ . L'argon a été utilisé comme gaz de collision, à un débit de 0,28  $\text{mL min}^{-1}$ , correspondant à une pression d'environ 4  $10^{-3}$  mBar. Pour les expériences réalisées en mode MS/MS, des énergies de collision ont été testées entre 10 et 30 eV. Les mesures de masse exactes ont été réalisées avec le mode dit "W" et l'interface dite "LockSpray". Une solution de sulfadiméthoxine a été utilisée comme calibrant interne à un débit de 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . La fréquence du "LockSpray" a été fixée à 10 s. Dans ces conditions, le logiciel MassLynx a permis la détermination des masses exactes et des compositions élémentaires des ions. La molécule protonée a été choisie pour les corrections de masse ( $\text{MH}^+$   $m/z$  311,0814). La tolérance pour la détermination des formules brutes à partir des masses exactes a été fixée à 5 ppm.

Tableau 5 : Gradient chromatographique utilisé en couplage LC-MS

Temps (min)	Débit (mL/min)	A% (H <sub>2</sub> O + acide formique 0.1%)	B% (CH <sub>3</sub> OH + acide formique 0.1%)
0	0.2	80	20
8	0.2	20	80
10	0.2	0	100
12	0.2	80	20

Source des données : LCM

Pour le suivi de l'écotoxicité, le test d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri* a été employé (NF EN ISO 11348-3). Pour cela, un blanc contenant la matrice de travail (i.e. eau du robinet ou matrice de référence préparée tel que décrit dans la Figure 2) a été utilisé. Pour chaque échantillon 2% (m/V) de NaCl ont été ajoutés et un ajustement à pH 7 a été réalisé. Dans ces conditions, pour chaque échantillon, les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au blanc utilisé.

### ➤ Résultats

Dans ces conditions, aucun produit de transformation n'a été observé par analyses LC-MS lors de la chloration de la chlorhexidine. En revanche, les chromatogrammes enregistrés en GC-MS des solutions chlorées de chlorhexidine montrent l'apparition progressive de chloroaniline (Figure 6). Ce résultat est en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature (Zong and Kirsch, 2012).

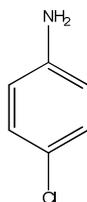


Figure 6 : Produit de transformation observé lors de la chloration de la chlorhexidine : para-chloroaniline  
Sources des données : LCM

Concernant le bis(aminopropyl)laurylamine, les résultats des analyses réalisées en LC-MS montrent que ce composé se dégrade pour fournir 5 sous-produits (Tableau 6). Il est à noter que plusieurs de ces sous-produits sont coélués et que seule l'extraction des courants ioniques permet de les dénombrer sans ambiguïté.

Le Tableau 6 donne les temps de rétention, les compositions élémentaires et les structures proposées pour les sous-produits du bis(aminopropyl)laurylamine.

Tableau 6 : Temps de rétention, compositions élémentaires et structures proposées pour les sous-produits de chloration du bis(aminopropyl)laurylamine

Composés	Composition élémentaire (Ion moléculaire)	Tr (min)	m/z expérimentale	m/z théorique calculée	mDa	ppm	BDE*	Structure proposée
Bis(aminopropyl)laurylamine	C <sub>18</sub> H <sub>42</sub> N <sub>3</sub>	3,8	300,3383	300,3379	0,4	1,3	-0,5	
I	C <sub>18</sub> H <sub>40</sub> N <sub>3</sub>	5,3	298,3223	298,3222	0,1	0,3	0,5	
II		5,4						
III	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> N <sub>3</sub>	6,2	296,3056	296,3066	-1,0	-3,4	1,5	
IV	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> N <sub>3</sub> O	7,3	310,2869	310,2858	1,1	3,5	2,5	
V	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O	7,3	297,2903	297,2906	-0,3	-1,0	1,5	

\*BDE Double bond equivalency  
Source des données: LCM

Les spectres de collision des ions moléculaires, enregistrés en ESI positif (tension de cône de 25 V) sont présentés sur la Figure 7.

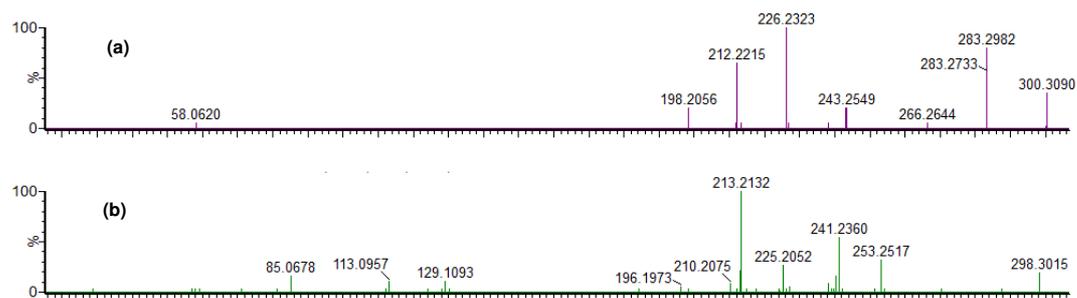


Figure 7 : Spectres de masse de collision enregistrés en ESI positif pour le bis(aminopropyl)laurylamine et ses 5 sous-produits de chloration. (a) MS/MS avec isolation de m/z 300 (tr = 3.8 min), Vcoll. = 30 eV ; (b) MS/MS avec isolation de m/z 298 (tr = 5.3 min), Vcoll. = 30 eV ; (c) MS/MS avec isolation de m/z 296 (tr = 5.4 min), Vcoll. = 20 eV ; (d) MS/MS avec isolation de m/z 296 (tr = 6.2 min), Vcoll. = 20 eV ; (e) MS/MS avec isolation de m/z 310 (tr = 7.3 min), Vcoll. = 30 eV ; (f) MS/MS avec isolation de m/z 297 (tr = 7.3 min), Vcoll. = 30 eV  
Source des données : LCM

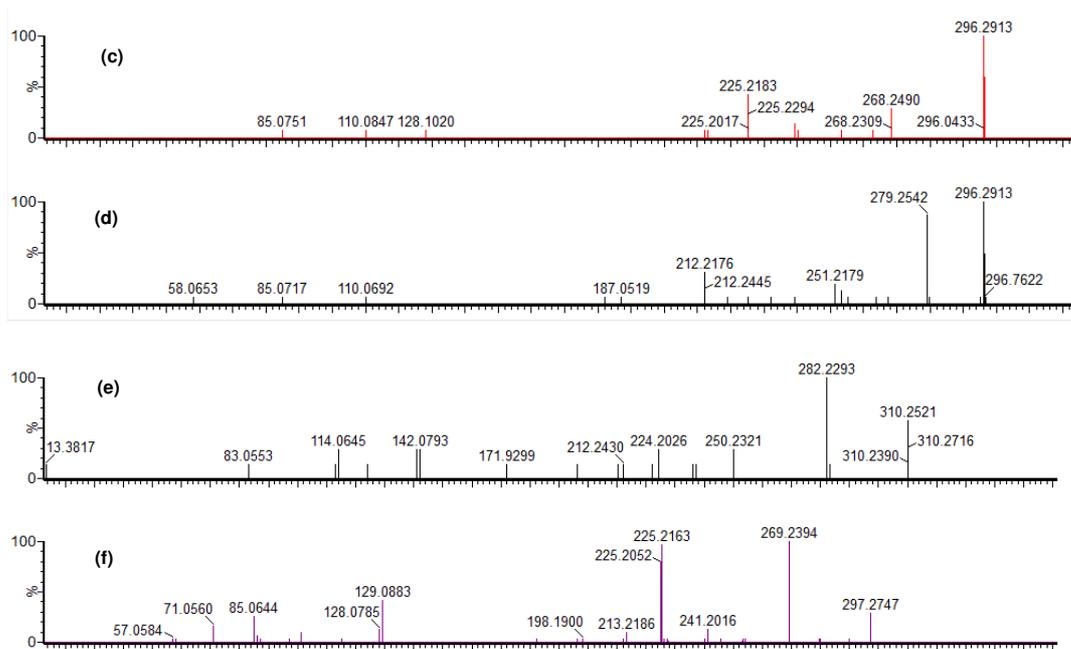


Figure 7 (suite) : Spectres de masse de collision enregistrés en ESI positif pour le bis(aminopropyl)laurylamine et ses 5 sous-produits de chloration. (a) MS/MS avec isolation de m/z 300 (tr = 3.8 min), Vcoll. = 30 eV ; (b) MS/MS avec isolation de m/z 298 (tr = 5.3 min), Vcoll. = 30 eV ; (c) MS/MS avec isolation de m/z 296 (tr = 5.4 min), Vcoll. = 20 eV ; (d) MS/MS avec isolation de m/z 296 (tr = 6.2 min), Vcoll. = 20 eV ; (e) MS/MS avec isolation de m/z 310 (tr = 7.3 min), Vcoll. = 30 eV ; (f) MS/MS avec isolation de m/z 297 (tr = 7.3 min), Vcoll. = 30 eV  
Source des données : LCM

Dans le cas du bis(aminopropyl)laurylamine, les mécanismes de dissociation par collisions de la forme protonée lors des analyses LC-MS sont donnés sur la Figure 8.

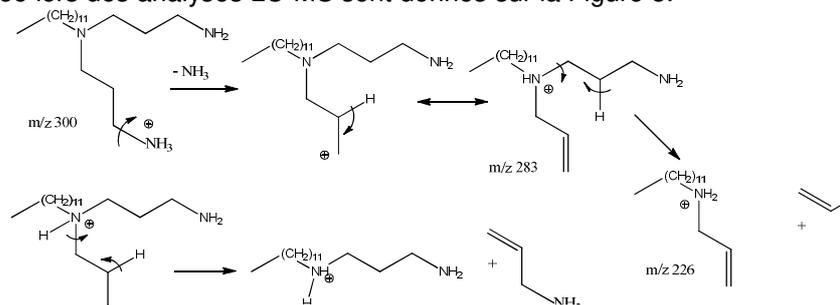


Figure 8 : Mécanismes de dissociation par collisions du bis(aminopropyl)laurylamine protoné  
Source des données : LCM

Pour le composé I, l'ion m/z 298 de composition élémentaire  $\text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{N}_3$  correspond à un ion moléculaire qui a perdu deux hydrogènes par rapport à la bis(aminopropyl)laurylamine protonée. Contrairement à la molécule de bis(aminopropyl)laurylamine protonée, m/z 298 ne perd pas  $\text{NH}_3$  en collision, ce qui signifie qu'un des sites de protonation est modifié par rapport à la structure du bis(aminopropyl)laurylamine et/ou que la stabilisation de l'ion  $[\text{MH-NH}_3]^+$  n'est plus possible. Par ailleurs, une perte de 57 uma ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$ ) est observée à partir de m/z 298. Cette fragmentation peut s'expliquer à partir d'un sel d'ammonium quaternaire qui pourrait être formé par cyclisation suite à la réaction de l'acide hypochloreux sur le bis(aminopropyl)laurylamine. Les mécanismes de dissociation de l'ion moléculaire sont présentés sur la Figure 9.

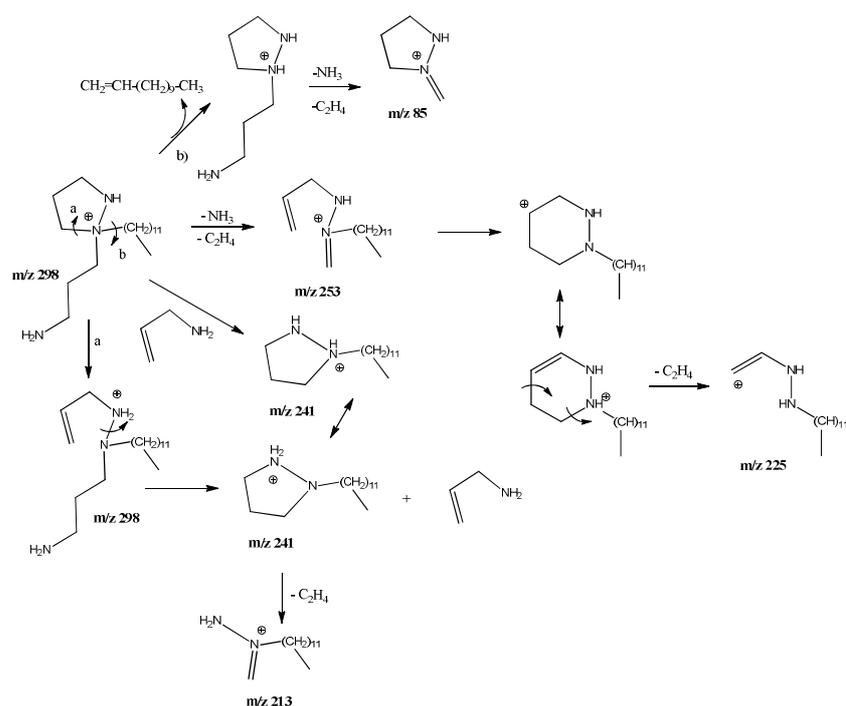


Figure 9 : Mécanismes associés à la fragmentation obtenue par CID de l'ion moléculaire  $m/z$  298 observé à 5,3 min  
Source des données : LCM

Comme pour le composé I (Figure 9), on peut noter que l'ion  $m/z$  85 de composition élémentaire  $C_4H_9N_2$  est présent sur les spectres de collision des ions moléculaires des composés II, III et V, alors qu'un ion  $m/z$  83 ( $C_4H_7N_2$ ) est observé pour le composé IV. Pour l'ensemble des produits de transformation, on peut supposer que ces ions sont diagnostiques de la présence du cycle à 5 atomes.

Pour les produits II, III, IV et V, les structures chimiques et les mécanismes de dissociations par collision des ions moléculaires obtenus lors des analyses LC-MS sont présentés dans les Figures 10, 11, 12 et 13.

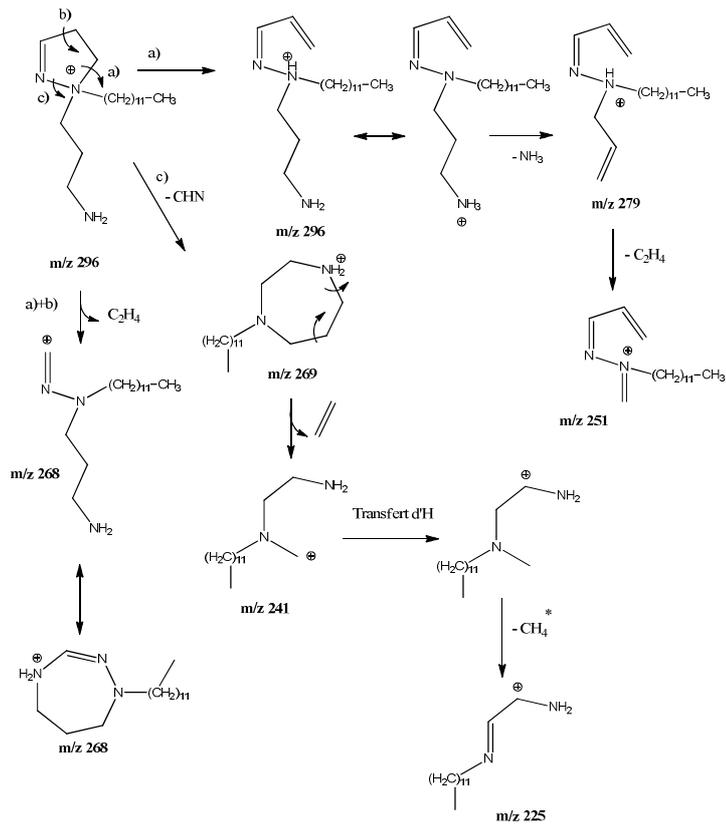


Figure 10 : Mécanismes associés à la fragmentation obtenue par CID de l'ion  $m/z$  296 obtenu à 5,4 min  
Source des données : LCM

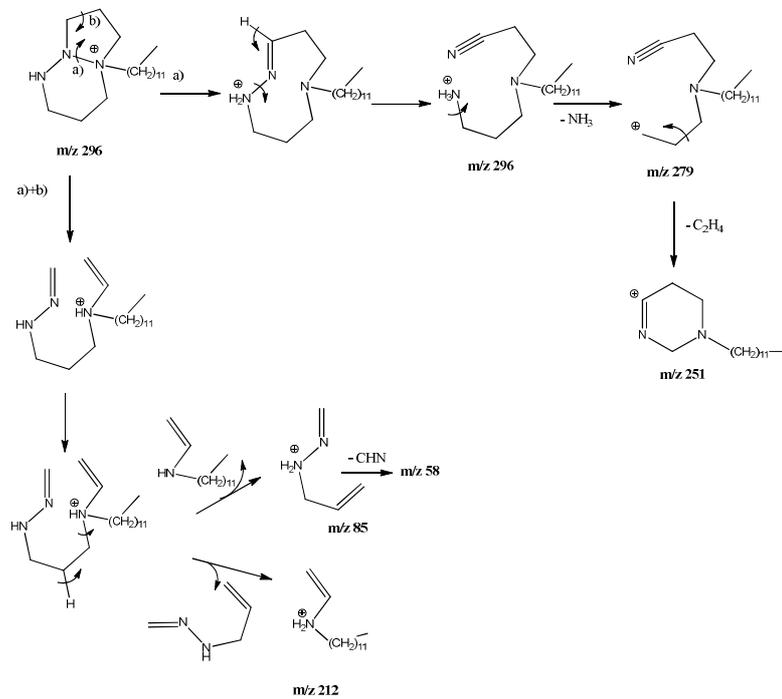


Figure 11 : Mécanismes associés à la fragmentation obtenue par CID de l'ion  $m/$  296 observé à 6,2 min  
Source des données : LCM

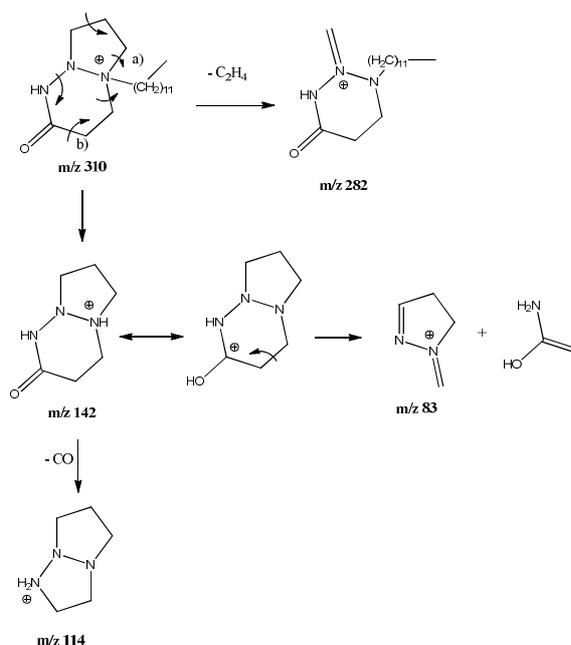


Figure 12 : Mécanismes associés à la fragmentation obtenue par CID de l'ion  $m/z$  310 observé à 7,3 min  
Source des données : LCM

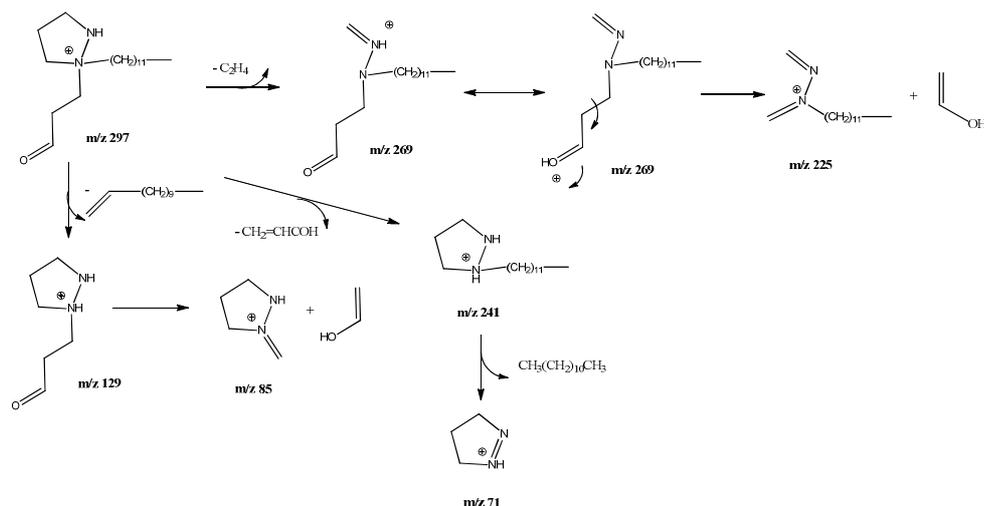


Figure 13 : Mécanismes associés à la dissociation par CID de l'ion  $m/z$  297 obtenu à 7,3 min  
Source des données : LCM

Sur la base des données de la littérature portant sur la réaction du chlore avec les composés organiques (Deborde et von Gunten, 2008 ; Abia *et al.*, 1998) le chemin réactionnel présenté dans la Figure 14 a été proposé. Ainsi, au cours de la chloration, l'ensemble de ces sous-produits pourraient provenir d'une attaque électrophile initiale du chlore sur une des fonctions amines primaires du bis(aminopropyl)laurylamine. Un intermédiaire A monochloraminé serait alors généré.

Au sein de cet intermédiaire, par réaction intra-moléculaire, la chloramine réactive pourrait alors à son tour réagir par attaque nucléophile sur la fonction amine tertiaire pour donner le composé I. Par attaque électrophile du chlore sur la fonction amine primaire restante de ce composé, l'intermédiaire B serait alors formé (voie 1). Cet intermédiaire donnerait, à son tour (i) soit le composé III suite à l'attaque nucléophile de la fonction chloramine sur la fonction amine restante puis le composé IV, (ii) soit le composé V.



Le composé IV, très minoritaire a été observé uniquement en présence d'eau de javel. Pour les autres sous-produits, la Figure 15 montre l'évolution de leur formation observée pour différentes doses de chlore appliquées dans l'eau du robinet et dans la matrice de référence. Dans ces conditions, un décalage dans la formation des sous-produits est observé en matrice complexe en raison de la plus forte demande en chlore. Quelle que soit la matrice étudiée (i.e. eau du robinet ou matrice de référence), de plus grandes quantités de composé II et une moins grande proportion de composé I semblent se former en présence d'eau de javel qu'en présence de dichloroisocyanurate de sodium. Cette différence, observée suivant le protocole de désinfection, pourrait en partie s'expliquer par des concentrations en chlore libre plus importantes en présence d'eau de javel qu'en présence de dichloroisocyanurate de sodium pour une même dose de chlore disponible appliquée. Lors de l'utilisation du dichloroisocyanurate de sodium, en effet, une libération progressive du chlore est observée suite à des déplacements d'équilibres chimiques. Cette libération progressive du chlore pourrait défavoriser la formation de l'intermédiaire F à l'origine du composé II.

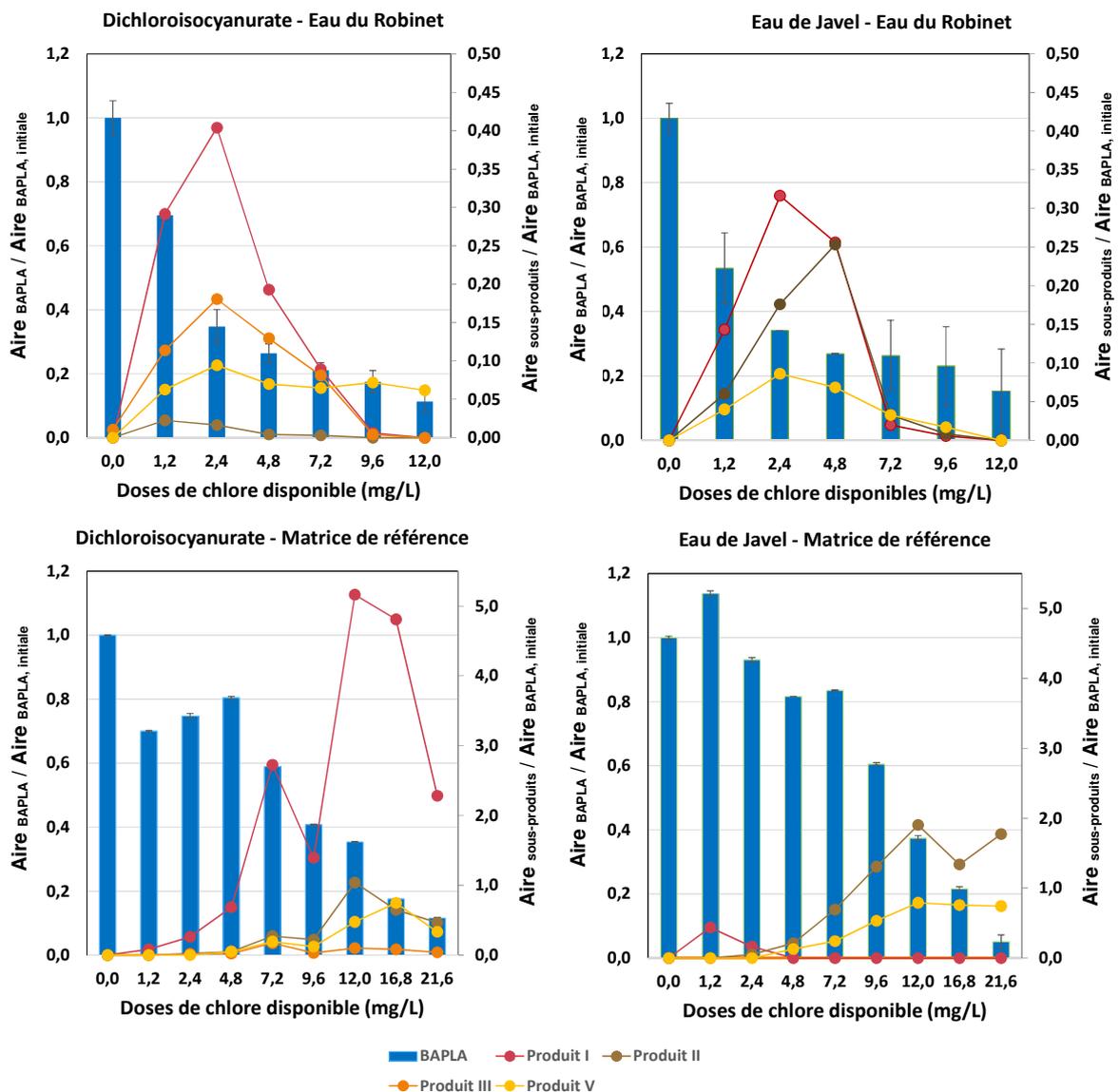


Figure 15: Evolution du bis(aminopropyl)laurylamine (BAPLA) et des produits de transformation au cours de la chloration pH = 7,2 ; [bis(aminopropyl)laurylamine]<sub>0</sub> = 5000 µg/L. Sources des données : LCM et IC2MP

Enfin, la Figure 16 présente l'évolution de l'écotoxicité vis-à-vis de *Vibrio fisheri* pour différentes doses de chlore appliquées dans l'eau du robinet et dans la matrice de référence. En termes d'écotoxicité, une augmentation de la toxicité vis-à-vis de *Vibrio fisheri* est observée au cours de la chloration quels que soient la matrice et le protocole de désinfection employés.

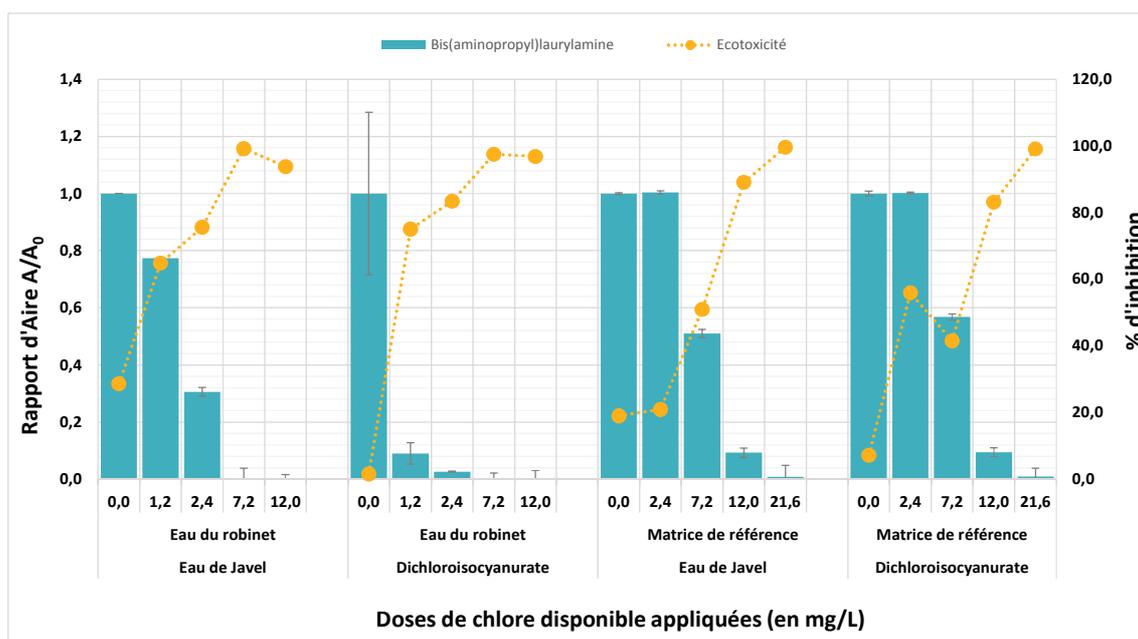


Figure 16 : Evolution de la toxicité vis-à-vis de *Vibrio fisheri* au cours de la chloration du bis(aminopropyl)laurylamine pH = 7,2 ; [bis(aminopropyl)laurylamine]<sub>0</sub> = 5000 µg/L (résultats obtenus pour une dilution au 1/2 des échantillons au contact des bactéries)  
Sources des données : IC2MP

## 2.2. Mise au point analytique pour l'extraction des biocides sélectionnés des MES

Pour les 3 biocides les plus spécifiques d'une activité de soins (i.e. digluconate de chlorhexidine, bis(aminopropyl)laurylamine et DIDAC), une adsorption significative sur les MES ayant été observée lors de l'étude laboratoire, une mise au point analytique a été réalisée pour évaluer les quantités adsorbées sur les MES lors des campagnes terrain. Les étapes suivantes ont alors été suivies :

### 2.2.1. Estimation des quantités adsorbées

Des échantillons d'eau d'entrée de la station d'épuration de Saint Julien l'Ars située à proximité de Poitiers (servant de matrice de référence et contenant des concentrations négligeables en biocides – se reporter au Tableau 2) ont été dopés avec les biocides d'intérêt aux concentrations suivantes : 5 mg/L pour le bis(aminopropyl)laurylamine et la chlorhexidine, 2,5 mg/L pour le DIDAC. Après un minimum de 6 heures sous agitation, 20 mL d'échantillon ont été centrifugés à 10.000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant a été directement analysé par LC-MS dans les conditions de solution suivantes : à 800 µL d'échantillon ont été ajoutés 200 µL d'un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH/FA (80:20:0,1%). Dans ce qui suit, les quantités de biocides adsorbées ont été estimées en soustrayant les concentrations mesurées en solution dans la phase aqueuse en étalonnage externe par rapport aux concentrations initialement introduites dans l'eau de référence.

### 2.2.2. Protocole d'extraction

Le protocole d'extraction utilisé dans cette partie est décrit dans la Figure 17. Après centrifugation et filtration de l'eau de référence dopée en biocides (voir ci-dessus), les solides sont séchés sous flux d'azote à 50 °C. L'extraction sous ultrasons (Ultrasonic 460/H) est réalisée dans un mélange MeOH/HCl. Les conditions d'extraction (durée, température et volume de solvant) ont fait l'objet d'un protocole d'optimisation décrit ci-après. Après extraction, la phase liquide est évaporée sous azote à 50 °C ; le résidu est repris par 1000 µL d'un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH/FA (80:20:0,1%) de manière à ce que les conditions d'analyse soient les mêmes que celles décrites au paragraphe précédent.

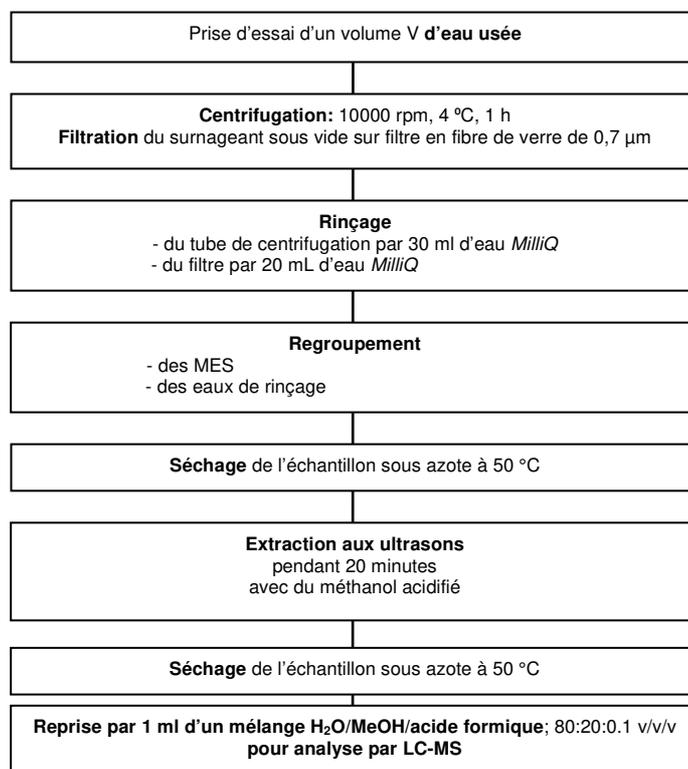


Figure 17: Protocole d'extraction retenu pour les campagnes de prélèvements  
Source des données : LCM

### 2.2.3. Tests préliminaires

Des tests préliminaires ont tout d'abord été effectués avec deux prises d'essai d'eau usée : 20 et 50 mL. Il s'agissait de tester 8 combinaisons de paramètres : 30 et 50 °C pour la température d'extraction, 20 et 50 mL pour le volume de solvant d'extraction, 20 et 60 minutes pour le temps d'extraction aux ultrasons. La comparaison des rendements est présentée sur la Figure 18.

Lors de ces premiers tests, la combinaison [température de 30 °C, volume de solvant de 20 mL et temps d'extraction de 20 minutes] a fourni le meilleur compromis pour les trois molécules mais la variabilité était globalement faible sur l'ensemble des combinaisons testées.

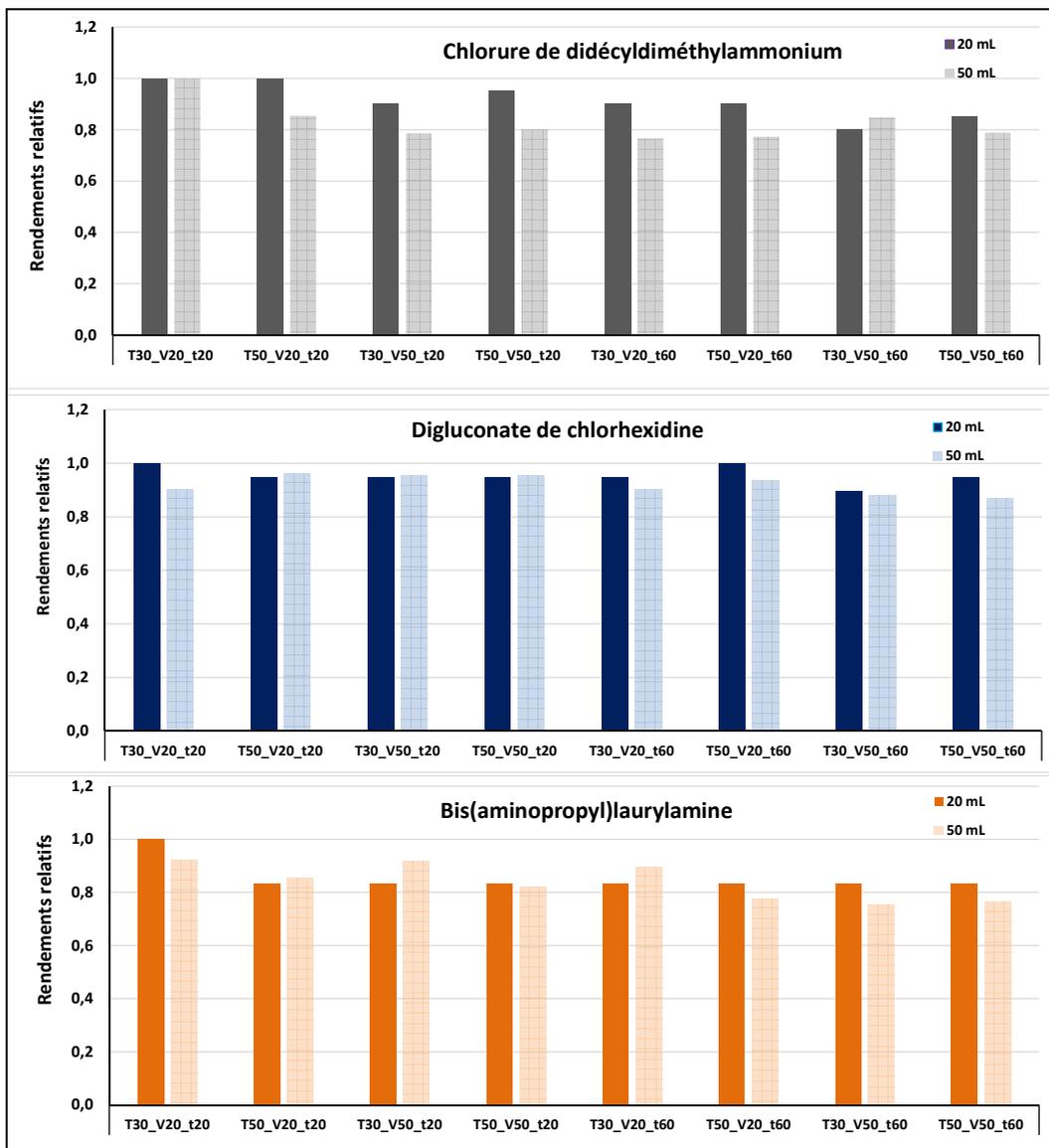


Figure 18 : Comparaison des rendements d'extraction en fonction des différentes combinaisons de paramètres testés (T : température, 30 et 50 °C ; V : volume de solvant d'extraction : 20 et 50 mL ; t : temps d'extraction aux ultra-sons, 20 et 60 min)  
Source des données : LCM

Une deuxième série de tests a consisté pour un volume de prise d'essai de 20 mL, à faire varier la proportion d'acide chlorhydrique entre 2 et 40% en volume dans le mélange d'extraction MeOH/HCl. La Figure 19 présente les résultats obtenus.

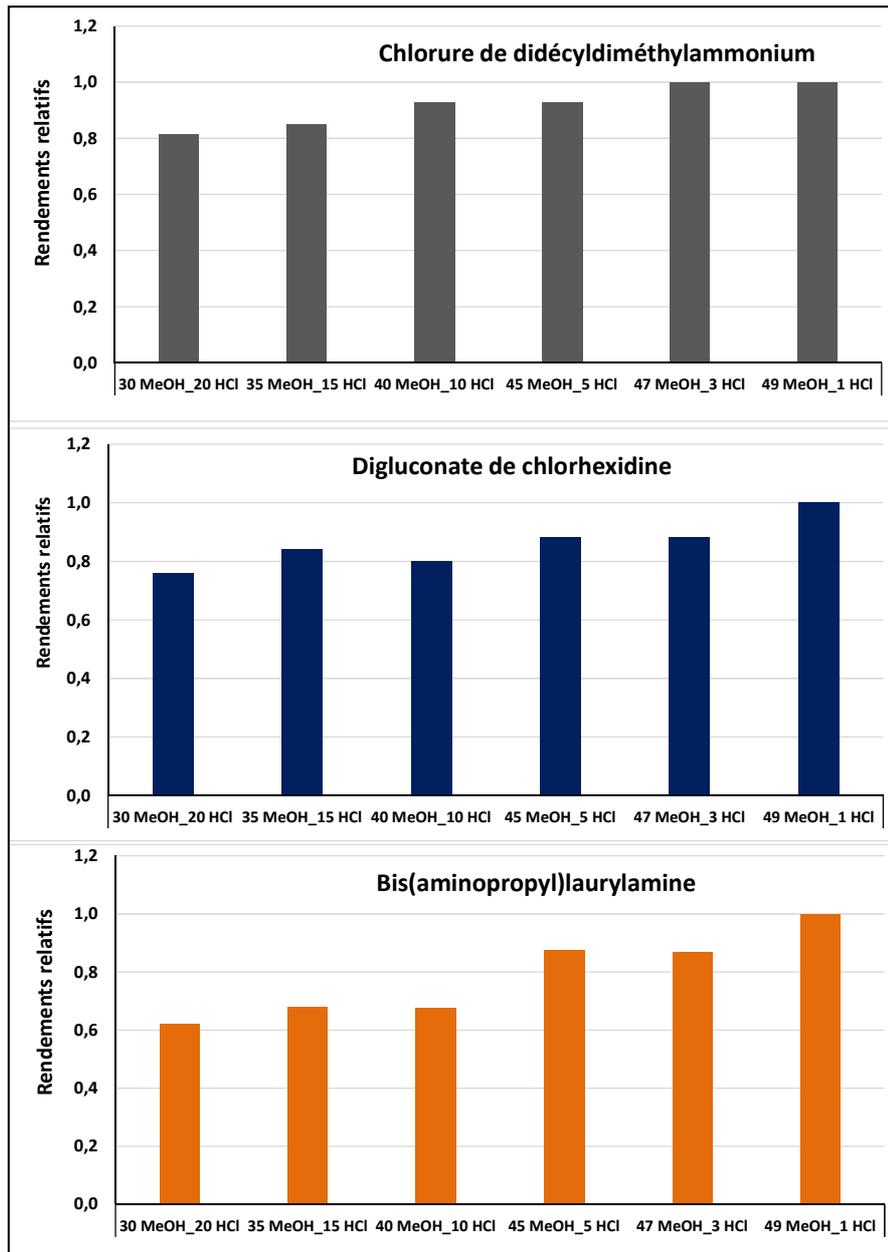


Figure 19 : Comparaison des rendements d'extraction en fonction de la proportion d'acide chlorhydrique dans le mélange d'extraction MeOH/HCl (volume de prise d'essai 20 mL)  
Source des données : LCM

Ces résultats montrent une tendance selon laquelle une proportion de 2% de HCl dans le mélange MeOH/HCl fournit systématiquement le meilleur rendement d'extraction pour chacun des biocides étudiés. Cette proportion a donc été conservée pour l'ensemble des tests ultérieurs.

#### 2.2.4. Etude de l'impact des paramètres d'extraction et choix des conditions d'extraction

Suite aux résultats présentés ci-dessus, 8 combinaisons de paramètres ont été testées pour un volume de prise d'essai de 20 mL et une acidification par HCl à 2%.

La Figure 20 compare les rendements d'extraction obtenus pour le digluconate de chlorhexidine, le bis(aminopropyl)laurylamine et le DIDAC en fonction des différentes combinaisons de paramètres testées. Ces résultats montrent, pour le digluconate de chlorhexidine que le meilleur rendement est obtenu pour la combinaison [température de 30 °C, volume de solvant de 50 mL et temps d'extraction de 20 minutes]. Dans le cas du DIDAC, le meilleur rendement, est obtenu

pour la combinaison [température de 50 °C, volume de solvant de 50 mL et temps d'extraction de 20 minutes]. Enfin, dans le cas du bis(aminopropyl)laurylamine les meilleurs rendements, sont obtenus avec des combinaisons de paramètres opposées : [température de 30 °C, volume de solvant de 20 mL et temps d'extraction de 20 minutes] et [température de 50 °C, volume de solvant de 50 mL et temps d'extraction de 60 minutes].

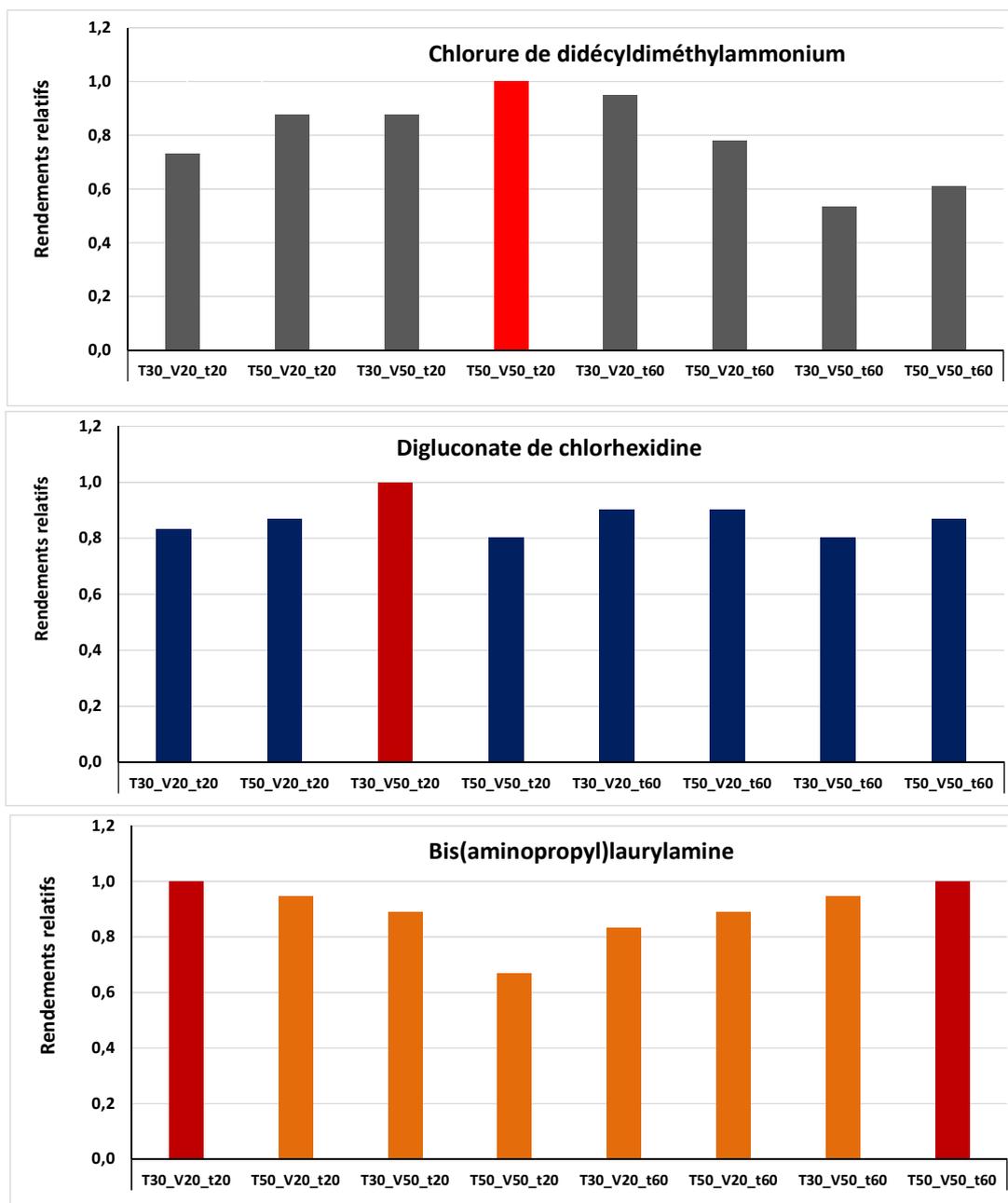


Figure 20 : Comparaison des rendements d'extraction obtenus pour la chlorhexidine, le bis(aminopropyl)laurylamine et le DIDAC en fonction des différentes combinaisons de paramètres testées (volume de prise d'essai : 20 mL ; acidification par HCl du solvant d'extraction : 2%)  
Source des données : LCM

De même, le Tableau 7 présente la synthèse des résultats obtenus dans les conditions du plan d'expérience.

Tableau 7 : Bilan des expériences pour les 3 biocides étudiés

Température (°C)	Volume (mL)	Temps (min)	Comparaison des rendements (en ratio)		
			Chlorhexidine	Bis(aminopropyl) laurylamine	DIDAC
30	20	20	0,83	1	0,73
30	20	20	0,87	0,94	0,78
50	20	20	0,87	0,94	0,88
50	20	20	0,93	0,83	0,83
30	50	20	1	0,89	0,88
30	50	20	0,97	0,89	0,88
50	50	20	0,80	0,67	1
50	50	20	0,87	0,78	0,98
30	20	60	0,9	0,83	0,95
30	20	60	0,9	0,89	0,93
50	20	60	0,9	0,89	0,78
50	20	60	0,93	0,78	0,73
30	50	60	0,8	0,94	0,54
30	50	60	0,73	0,89	0,49
50	50	60	0,87	1	0,61
50	50	60	0,93	0,94	0,56

Source des données : LCM

A partir de ces résultats, il apparaît clairement que les conditions optimales d'extraction diffèrent significativement d'un biocide à l'autre. Il est à noter toutefois que l'amplitude des variations est faible.

Deux combinaisons de paramètres semblent constituer un bon compromis pour l'extraction simultanée des 3 composés : [température de 50 °C, volume de solvant de 20 mL et temps d'extraction de 20 minutes] et [température de 30 °C, volume de solvant de 50 mL et temps d'extraction de 20 minutes].

Lors des campagnes de prélèvements, la première de ces 2 méthodes [température de 50 °C, volume de solvant de 20 mL et temps d'extraction de 20 minutes] a été retenue car elle est moins consommatrice de solvant et parce qu'il est plus facile de stabiliser la température du bain à ultrasons à 50 °C qu'à 30 °C en raison du chauffage exercé par les générateurs de l'appareil.

De manière à avoir un bon échantillonnage, un plus gros volume de prise d'essai (250 mL) a été utilisé. Ainsi, le protocole décrit dans la Figure 21 a été employé.

Dans ces conditions, une extraction significative des molécules est observée au regard des incertitudes et de la qualité des blancs analytiques. Cependant, il est à noter que de faibles rendements d'extraction ( $\leq 10\%$ ) sont obtenus dans ces conditions pour les 3 biocides étudiés.

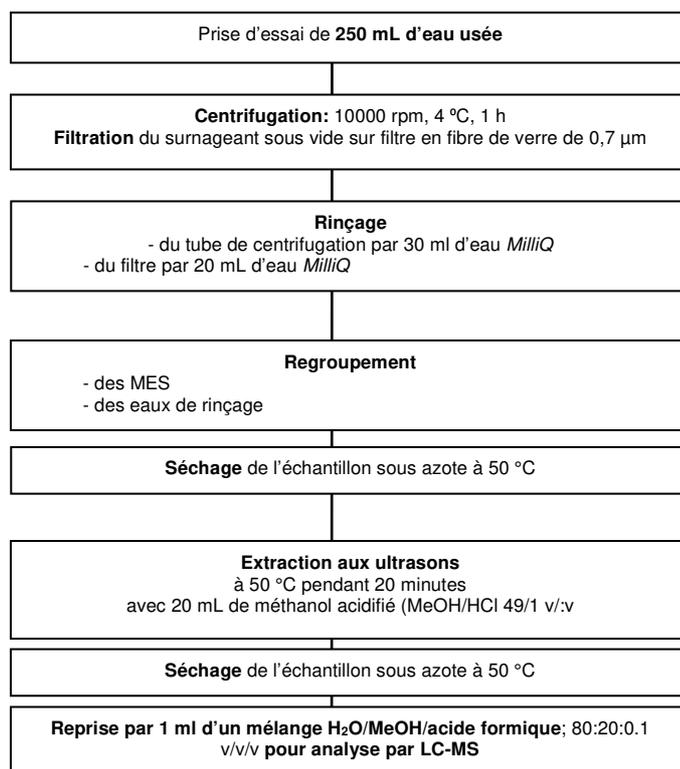


Figure 21 : Protocole d'extraction retenu pour les campagnes de prélèvements  
Source des données : LCM

## 2.3. Etude terrain du devenir des biocides dans les eaux résiduaires

En complément de l'étude laboratoire, 2 campagnes de prélèvements ont été menées les 26 septembre et 17 octobre 2017 au niveau du site du CHU et de la station d'épuration de Grand Poitiers pour étudier le devenir des biocides dans les eaux résiduaires. Lors de ces campagnes, le dosage en phase aqueuse et particulaire des trois molécules biocides les plus spécifiques des activités de soins (i.e. chlorure de didécyldiméthyl ammonium, digluconate de chlorhexidine et bis(aminopropyl) laurylamine) ainsi que la mesure des paramètres globaux des eaux (i.e. DCO, MES, DBO<sub>5</sub>, pH...) ont été réalisés à différents moments de la journée. De même, une recherche des sous-produits de chloration et un suivi de l'écotoxicité ont été effectués.

### 2.3.1. Points de prélèvements

Lors de ces campagnes, les points de prélèvements suivants ont été choisis :

- 3 points de prélèvements sur le site du CHU incluant le point de sortie du site (f) et 2 points situés sur les 2 principaux réseaux du site utilisant de l'eau de javel ou du dichloroisocyanurate de sodium (i.e. points (e) et (a) respectivement sur la Figure 22)
- 3 points de prélèvements au niveau de la station d'épuration de Grand Poitiers (entrée, milieu et sortie)



Figure 22 : Réseaux d'eaux usées et différents points de prélèvements considérés dans le cadre du projet BIOTECH au niveau du CHU de Poitiers  
Sources des données : CHU de Poitiers

Au niveau du CHU, il est à noter que des remaniements au niveau des services et des bâtiments ont été réalisés par rapport à la tâche 2 (phase 1) du projet : Les services de cardiologie, de pneumologie et la blanchisserie rejetant initialement dans le réseau sud (utilisant de l'eau de javel), ont été déplacés sur le site. Ainsi, pour ces campagnes,

- la blanchisserie, qui a été délocalisée, ne rejette plus au niveau du site
- le point (e) à proximité de l'ancienne blanchisserie et situé sur le réseau sud utilisant de l'eau de javel, ne récupère que les eaux de la cité gériatrique, du pôle de cancérologie et de la pharmacie centrale.
- le point (a) dit « Tour Jean Bernard » récolte quant à lui les eaux du bâtiment principal du CHU (dont celles du service de pneumologie et du satellite technique (réanimations, blocs opératoires).
- Enfin, le point (f) situé à la sortie du site récupère l'ensemble des eaux du CHU et du Centre Hospitalier Henri Laborit (établissement psychiatrique)

### 2.3.2. Méthodes de prélèvements et d'analyses employées

En milieu de station d'épuration, 1 seul prélèvement moyen 24 h a été réalisé en raison des longs temps de séjour. Pour les autres points en revanche, de façon à apprécier les variations de concentrations au cours de la journée, des prélèvements à différents moments de la journée ont été effectués.

Ainsi, au niveau du CHU, des prélèvements moyens sur 1 h répartis sur 4 créneaux correspondant à des périodes d'activité différentes ont été réalisés :

- de 9 à 10 h : démarrage des activités de soins, hygiéniques et ménagères
- de 13 à 14 h : arrêt des interventions opératoires et des blocs
- de 17 à 18 h : arrêt des activités ménagères
- de 0 à 1 h : activité réduite (soins d'urgences et de nécessité uniquement)

En entrée et en sortie de STEP, 5 prélèvements moyens de 6 à 10 h, 10 à 14 h, 18 à 22 h et 22 à 6 h ont été effectués.

Pour chacun des échantillons, **les paramètres globaux** (i.e. pH, DCO, DBO, MES) ont été analysés et une évaluation de l'écotoxicité a été effectuée selon les protocoles décrits dans les normes NF EN ISO 10523, NF ISO 15705, NF EN 1899-1, NF EN 872 et NF EN ISO 11348-3. De même, un suivi en phase aqueuse et particulière des biocides et des sous-produits a été réalisé.

Pour cela, une analyse par UHPLC/MS après dilution au 1/5 ou 1/2, selon la méthode développée lors de la tâche 2 du projet (paragraphe 5.2.1 du rapport de la phase 1 (tâche 2)), a été utilisée pour **l'analyse des biocides en phase aqueuse**.

Pour **l'extraction des biocides des MES**, le protocole mis en place dans le cadre de ce projet et décrit dans le paragraphe 2.2 a été employé (Figure 21). Pour chaque échantillon, ce protocole a été réalisé en triplicat à partir d'un volume de 250 mL. Pour l'échantillon de boues activées, 2 fois 100 mL de solvant d'extraction ont été utilisés.

Concernant **la recherche et le suivi des sous-produits**, il avait été initialement prévu que, lors des campagnes, ces analyses soient réalisées par couplage LC-MS avec l'analyseur Q-TOF (*Quadrupole - Time-Of-Flight*) « Premier » Waters® du LCM mais cet appareil, d'ancienne génération, fournit des limites de détection trop élevées vis-à-vis des molécules ciblées au regard des concentrations auxquelles ces dernières sont présentes dans les échantillons. C'est pourquoi, les échantillons ont été analysés sur le système de couplage LC-MS avec analyseur FT-ICR MS (*Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*) du LCM. Pour cela, un spectromètre de masse à ultra haute résolution FT-ICR SolarixXR 9.4T (Bruker Daltonics) couplé avec une chromatographie liquide à haute pression Alliance 2695 (Waters) a été utilisé et la méthodologie suivante a été employée : 10 µL d'échantillon sont injectés et séparés sur une colonne C<sub>18</sub> Pursuit XR<sub>s</sub>Ultra (2.8 µm, 50 x 2.0 mm, Agilent). L'élution se fait via un gradient de solvants A et B à un débit de 0.1 ml/min (A : H<sub>2</sub>O, acide formique 0.1% ; B : Méthanol, acide formique 0.1%) le gradient augmente de 20% en B à 80 % en B en 10 minutes, puis monte à 100% en B en 2 minutes et enfin retourne à 20% en B jusqu'à 30 minutes afin d'équilibrer la colonne pour l'injection suivante. Le couplage entre la LC et le spectromètre de masse se fait via une source électrospray utilisée en mode positif. La tension appliquée sur le capillaire est de 4300 V et sur le cône de -500 V. La température de désolvatation est de 300°C avec un débit d'azote en gaz de séchage de 4 L/min et une pression de 1 bar en gaz de nébulisation. Les ions sont accumulés dans l'hexapôle sur une durée de 0.2 s. Les paramètres de détections ont été fixés pour obtenir une résolution de 4 Mpts sur la gamme de masse  $m/z$  57 à  $m/z$  1000 en mode broadband, pour une fréquence d'acquisition d'environ 1 scan par seconde. Pour les expériences de MS/MS, l'ion précurseur a été sélectionné dans le quadripôle puis fragmenté en CID avec une énergie de collision entre 0 et 20 V. Les compositions élémentaires ont été obtenues avec une tolérance inférieure à 5 ppm *via* le logiciel DataAnalysis.

Enfin, pour chaque échantillon, une **évaluation de l'écotoxicité** a été réalisée. Cette approche, a été effectuée en utilisant le test d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri* (NF EN ISO 11348-3). Pour cela, pour chaque échantillon, 2 taux de dilution au contact des bactéries ont été testés (1/2 et 1/20).

### 2.3.3. Campagnes d'analyses

Les résultats des **paramètres globaux** obtenus lors des campagnes de prélèvements sont présentés dans la Figure 23 et en annexe 7.1.

Ces résultats montrent des valeurs de pH légèrement plus importantes au niveau du CHU qu'au niveau de la STEP (i.e. pH 8,0 +/- 0,3 au niveau du CHU contre 7,5 +/- 0,2 au niveau de la STEP), sans grandes modifications au cours de la journée quel que soit le point de prélèvement considéré.

Pour les 2 campagnes, mais de façon plus prononcée lors de la première, de plus fortes concentrations en MES sont observées en entrée de STEP qu'au niveau du CHU (i.e. 497 +/- 122 mg/L en entrée de STEP contre 261 +/- 104 mg/L au niveau du CHU lors de la première campagne). Quel que soit le créneau horaire considéré, de faibles teneurs en MES (< 10 mg/L) sont observées en sortie de STEP.

Enfin, concernant la DCO et la DBO5, des valeurs en DCO légèrement plus faibles semblent être observées durant la nuit (i.e. entre 22 h et 6 h) quel que soit le point de prélèvement considéré. Au niveau du CHU et en entrée de STEP, des rapports de DCO/DBO5 allant de 1,8 à 4,5 ont été obtenus pour tous les prélèvements.

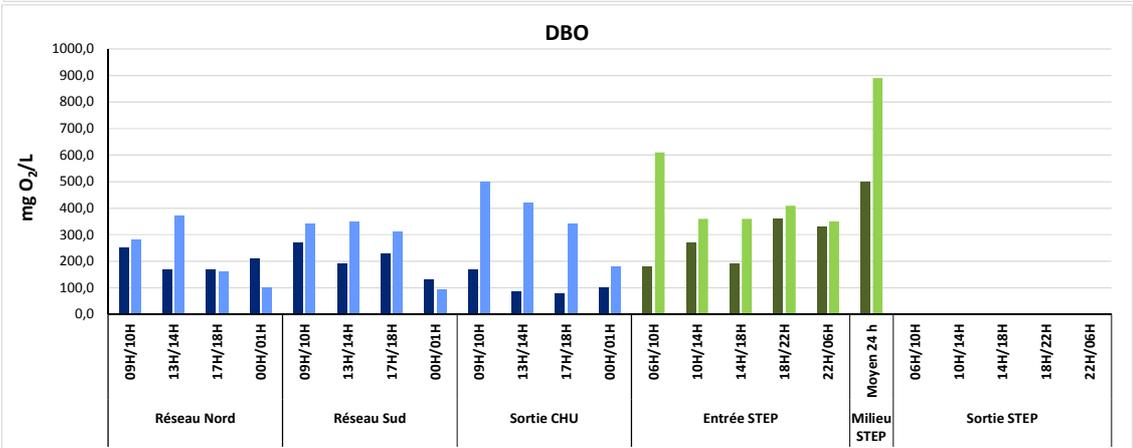
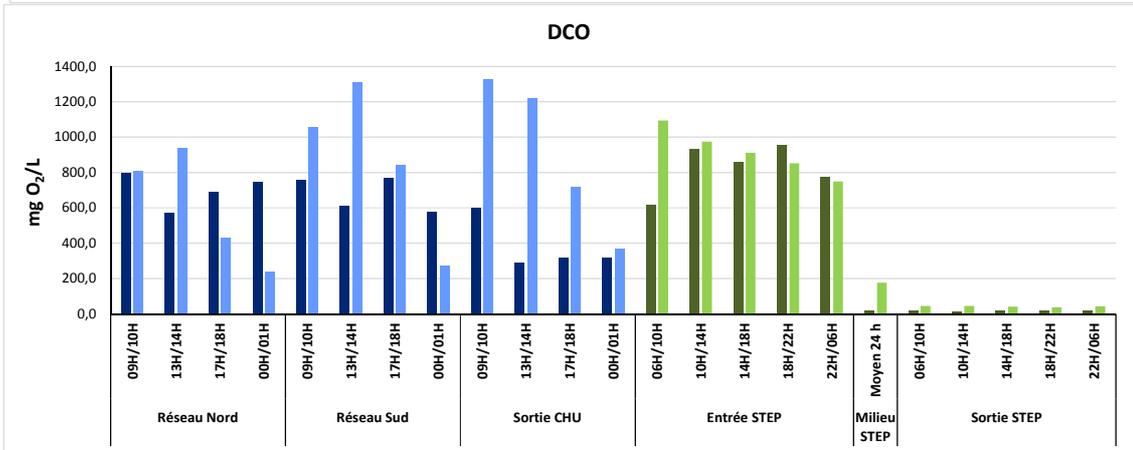
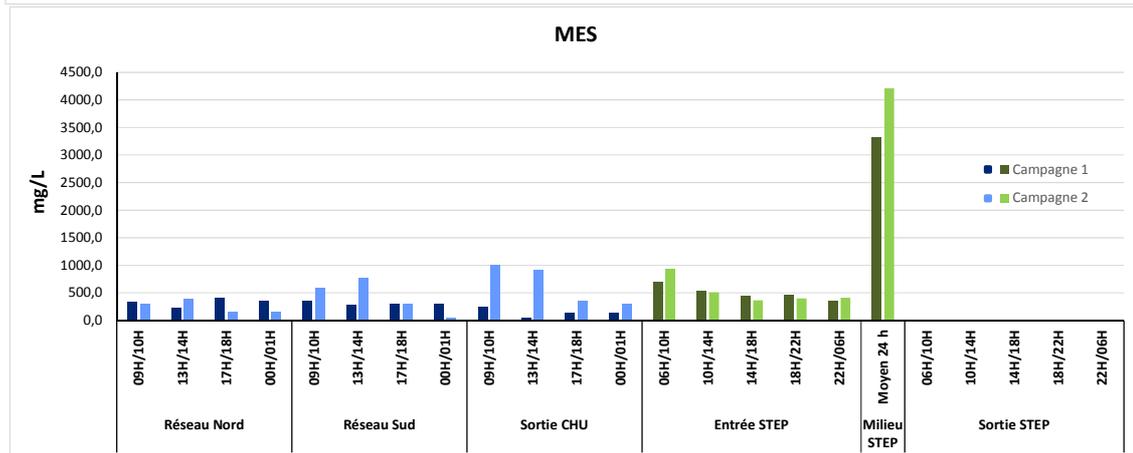
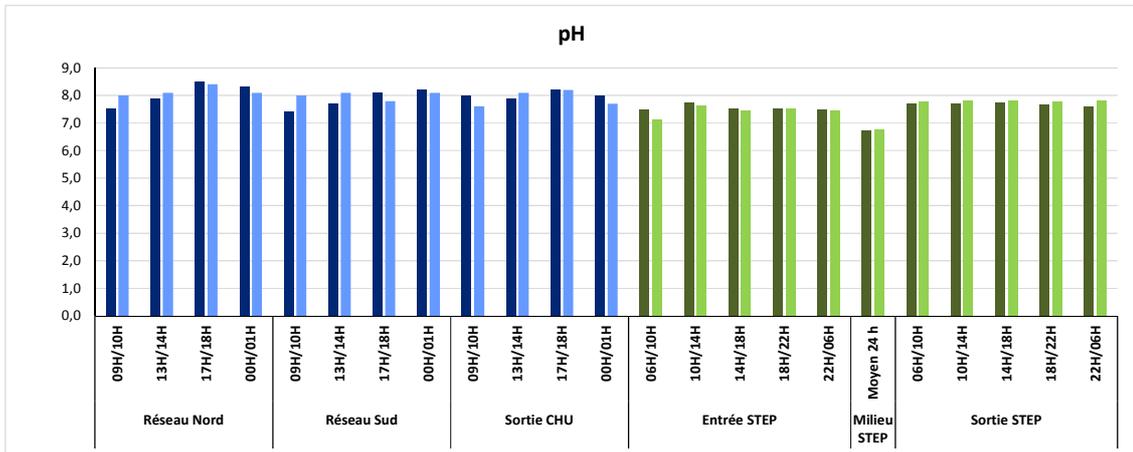


Figure 23 : Paramètres globaux obtenus lors des campagnes de prélèvements au niveau du site du CHU de Poitiers et de la STEP de Grand Poitiers  
Sources des données : CHU de Poitiers et Grand Poitiers

Outre les paramètres globaux, une analyse **des 3 biocides** les plus spécifiques d'une activité de soins a également été effectuée lors de ces campagnes de prélèvements. De même, une recherche des sous-produits de chloration du bis(aminopropyl)laurylamine a été réalisée. Pour les 3 biocides les plus spécifiques d'une activité de soins, les résultats obtenus en phase aqueuse et dans les matières en suspension sont présentés dans les Figures 24, 25 ainsi qu'en annexes 7.2 et 7.3.

En **phase aqueuse**, ces résultats montrent une émission continue de biocides sur 24 h au niveau du CHU. En terme de concentrations, des valeurs comparables à celles retrouvées lors des campagnes de la phase 1 (tâche 2) du projet (Annexe 7.2) ont été observées. Toutefois, des concentrations légèrement plus importantes au niveau du réseau nord qu'au niveau du réseau sud peuvent être notées (Annexe 7.2). Cette tendance, non précédemment observée lors des campagnes de la tâche 2 (phase 1) du projet, pourrait en grande partie s'expliquer par les remaniements au niveau des services et des bâtiments réalisés au niveau du site. Lors de ces dernières campagnes, contrairement aux précédentes, le rejet d'eaux usées par les services de pneumologie, de cardiologie et la blanchisserie ne sont en effet plus collectés au niveau du réseau sud. Concernant les variations journalières, pour toutes les molécules, les plus petites quantités émises sont observées la nuit sur le créneau 0 – 1 h, durant la période de plus faible activité de nettoyage des surfaces et de désinfection au niveau du site (Figure 24). Pour le bis(aminopropyl)laurylamine, servant essentiellement au nettoyage et à la désinfection des surfaces, seule l'activité ménagère est responsable de ses rejets. Cette activité étant régulière de 9h-18h, les rejets sont relativement constants sur cette période ( $3,6 \pm 1,1$  g/h). Dans le cas du DIDAC, employé pour le nettoyage et la désinfection des surfaces ainsi que pour la désinfection de l'instrumentation et du linge, un pic des rejets en journée sur la période de 13h-14H peut être noté lors des 2 campagnes. Ce pic pourrait en partie s'expliquer par la fin de l'activité des blocs opératoires majoritairement réalisée en première partie de journée. Ponctuellement de plus fortes quantités de DIDAC pour la désinfection des locaux et de l'instrumentation seraient alors consommées. Enfin, la chlorhexidine est rejetée de façon relativement constante de 9 à 18 h. Ce produit est utilisé pour la désinfection de l'instrumentation mais est également en tant qu'antiseptique pour la peau (notamment pour les douches pré- et post-opératoires). Ces activités se superposant sur la période de 9 à 18 h, il est difficile de les différencier dans les rejets de chlorhexidine. Pour ce composé, les rejets au cours de la nuit sont plus importants que pour les autres molécules (i.e. entre 15% et 75 % environ des rejets journaliers à la sortie du site). En termes de concentrations, aucune tendance significative entre le jour et la nuit n'est observée (Annexe 7.2). Cette absence d'impact sur les concentrations pourrait en partie s'expliquer par la diminution des débits pendant la nuit (Annexe 7.1).

Au niveau de la station d'épuration, les 3 molécules ont été détectées en entrée de STEP. A ce niveau, des concentrations de l'ordre de quelques  $\mu\text{g/L}$  pour le bis(aminopropyl)laurylamine, le digluconate de chlorhexidine, et quelques centaines de  $\mu\text{g/L}$  de chlorure de didécyldiméthylammonium ont été relevées sans qu'aucune différence significative jour/nuit ne soit observée (Annexe 7.2). En termes de flux massiques cependant, pour les 3 molécules, de plus grandes quantités ont été retrouvées en phase aqueuse sur le créneau 10 – 22 h, période correspondant au niveau de l'agglomération, à la période de plus grande activité humaine (Figure 24). En milieu et en sortie de STEP, aucune des molécules n'a été observée en phase aqueuse. En accord avec les résultats de la tâche 2 (phase 1) du projet, une élimination partielle, voire totale de ces composés suite à des phénomènes de dégradation et/ou d'adsorption peut donc être envisagée.

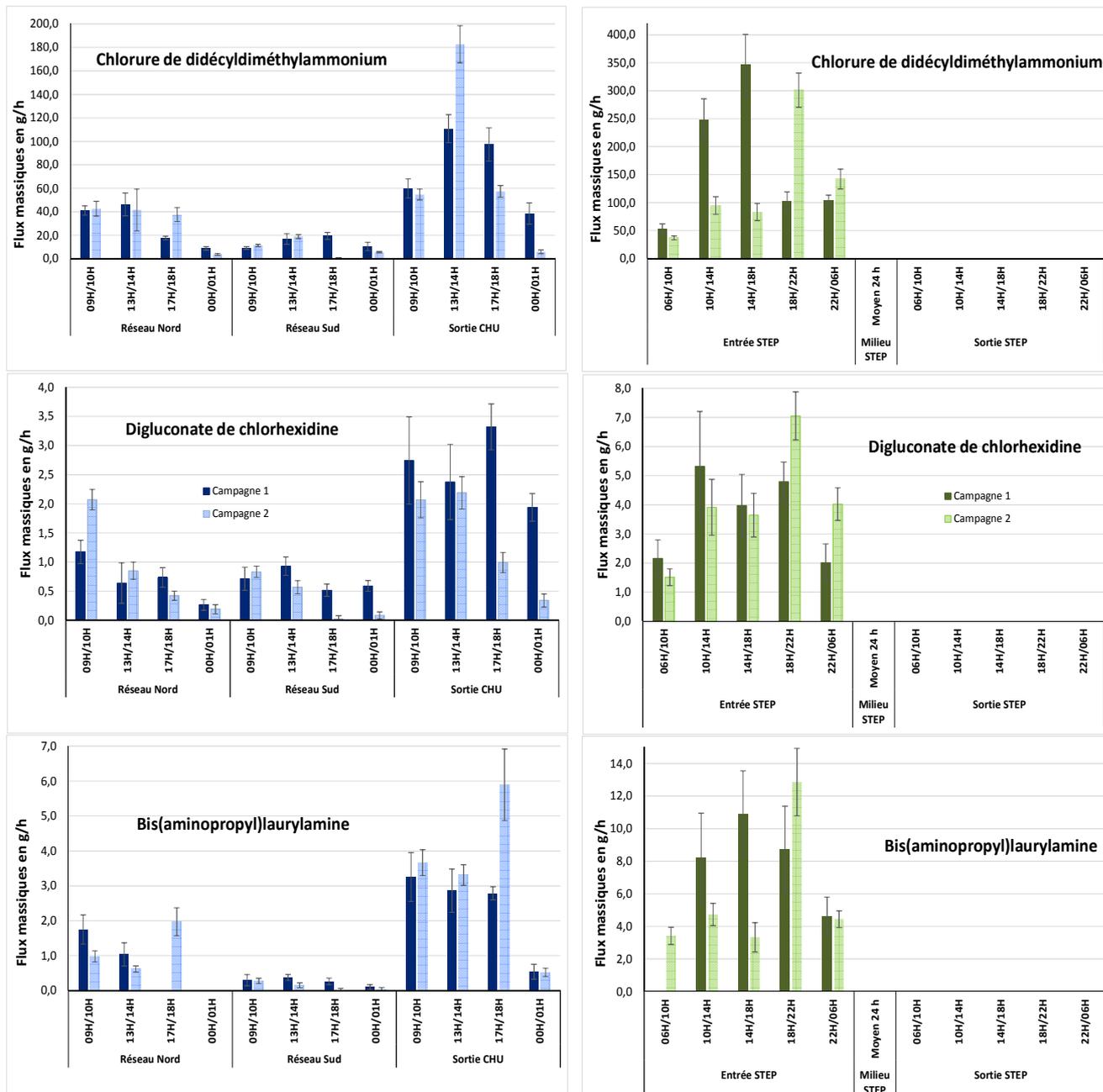


Figure 24 : Quantités retrouvées en phase aqueuse lors des campagnes de prélèvements pour les 3 biocides les plus spécifiques d'une activité de soins  
Sources des données : IC2MP

**En phase particulière**, le DIDAC et la chlorhexidine ont été retrouvés dans tous les échantillons du CHU ainsi qu'en entrée et en milieu de STEP lors des campagnes d'analyses. Au niveau du CHU, des teneurs de l'ordre de 1184 à 31110 ng/mg ont été mesurées pour le DIDAC et de 23 à 501 ng/mg pour le digluconate de chlorhexidine avec le protocole d'extraction utilisé. Pour ces 2 molécules, des concentrations un peu plus faibles (de 359 à 4739 ng/mg pour le DIDAC et de 10 à 56 ng/mg pour le digluconate de chlorhexidine) seraient observées en entrée et en milieu de STEP (Figure 25 et Annexe 7.3). En sortie de STEP, ces résultats n'ont pas pu être exploités, en raison des plus faibles teneurs en MES des différents échantillons prélevés et de plus grandes incertitudes générées. De même, lors de ces campagnes, les teneurs en bis(aminopropyl)laurylamine des MES n'ont pas pu être déterminées en raison des trop faibles concentrations obtenues dans les extraits pour ce composé.

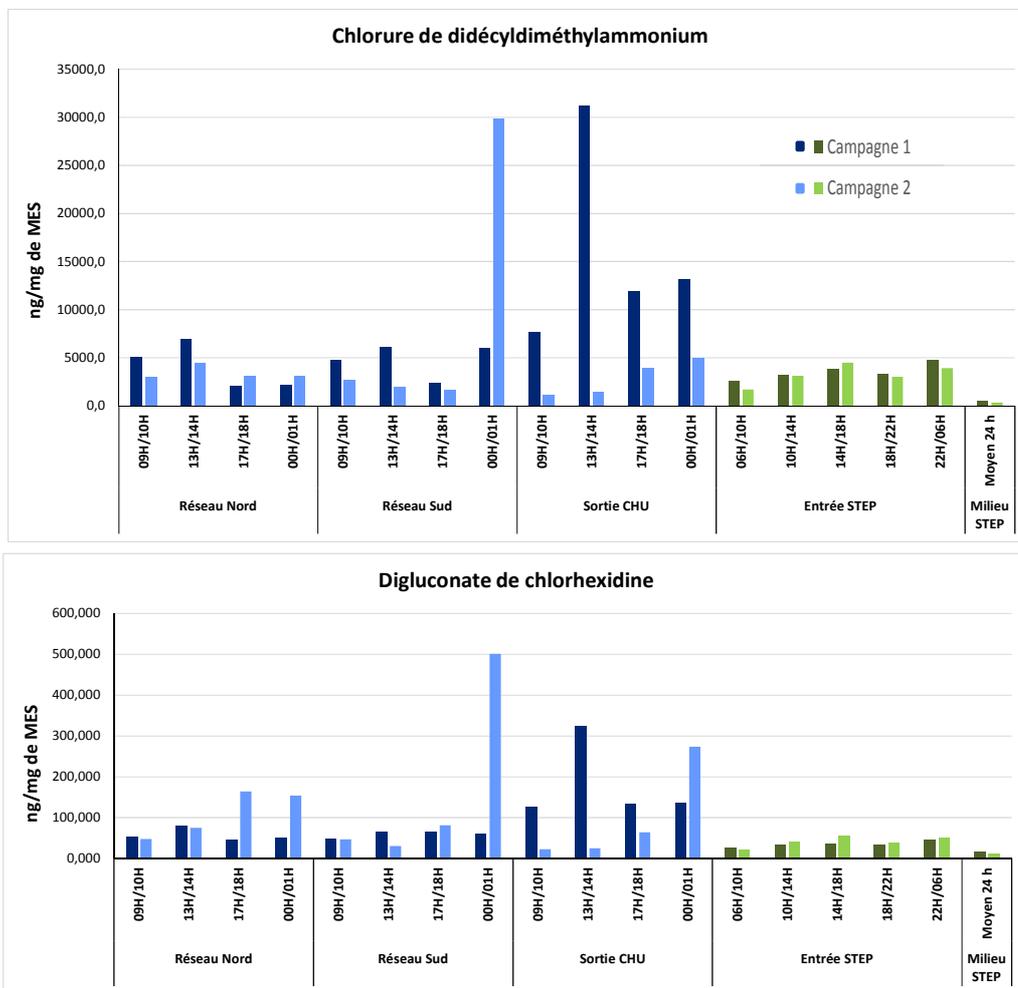


Figure 25 : Tenueurs en biocides dans les MES obtenues lors des campagnes de prélèvements pour le DIDAC et le digluconate de chlorhexidine. Sources des données : LCM

Pour confirmer ces résultats, des analyses complémentaires ont été effectuées en double (par le LCM et l'IC2MP) sur des extraits obtenus à partir de prélèvements moyens réalisés à la sortie du CHU ainsi qu'en entrée de STEP à la suite de ces campagnes. Dans ces conditions, des teneurs de l'ordre de 1900 ng/mg pour le DIDAC, 115 ng/mg pour le digluconate de chlorhexidine et 210 ng/mg pour le bis(aminopropyl)laurylamine ont été relevées à la sortie du CHU alors que seul le digluconate de chlorhexidine a été observé à une teneur de 39 ng/mg en entrée de STEP. Lors de ces dernières analyses, la teneur en biocides des MES a également été déterminée sur un prélèvement de boue au niveau de l'épaississeur de la STEP. A ce niveau, des concentrations de l'ordre de 1366 et 562 ng/mg ont été déterminées respectivement pour le digluconate de chlorhexidine et le bis(aminopropyl)laurylamine.

Outre une contamination de la phase aqueuse par les biocides, ces résultats montrent donc une contamination de la phase particulaire des eaux résiduaires. A la sortie du CHU, sur un prélèvement moyen 24 h, 18 %, 37 % et 47 % des quantités de DIDAC, de digluconate de chlorhexidine et de bis(aminopropyl)laurylamine retrouvées dans les rejets seraient adsorbées (si l'on considère les concentrations moyennes obtenues à la sortie du CHU lors des campagnes de prélèvements de la tâche 2 (phase 1) du projet) (Figure 26).

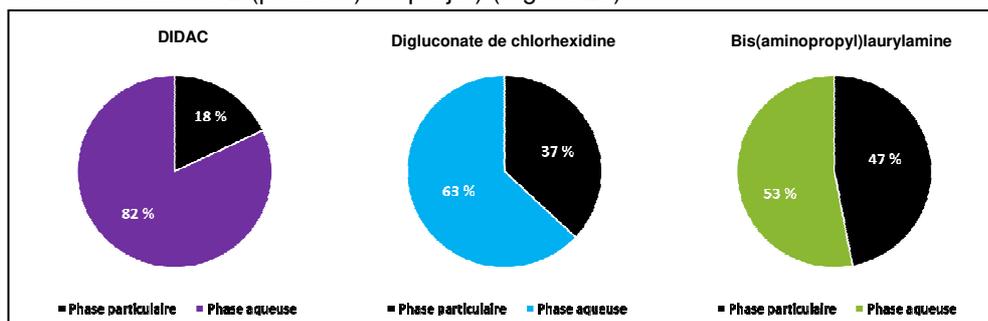


Figure 26 : Répartition des biocides entre la phase aqueuse et la phase particulaire à la sortie du CHU. Sources des données : LCM et IC2MP

Enfin, la recherche **des sous-produits de chloration du bis(aminopropyl)laurylamine et le suivi de l'activité biologique** dans chacun des échantillons ont été effectués.

Concernant les produits de dégradation du bis(aminopropyl)laurylamine, les 4 produits majoritairement observés lors de l'étude laboratoire (i.e. produits I, II, III et V – paragraphe 2.1.2), ont pu être retrouvés au niveau du CHU. Cependant, leur présence ne concernait parfois que certains échantillons. A ce niveau, aucune tendance n'a clairement pu être mise en évidence d'un réseau à l'autre. Le protocole de désinfection des locaux (i.e. eau de javel ou dichloroisocyanurate) ne semblerait donc pas influencer la formation de ces composés.

L'activité biologique de chacun des échantillons vis-à-vis de *Vibrio fischeri* est présentée dans la Figure 27. En raison de la saturation de la réponse obtenue lors de l'application directe de ce test pour certains échantillons, 2 taux de dilution des échantillons au contact des bactéries ont été testés. Dans ces conditions, les résultats ne montrent pas de différence significative d'un réseau à l'autre et d'un horaire à l'autre au niveau du CHU. Au niveau de la station d'épuration, une réponse plus importante en entrée de STEP qu'au niveau du CHU est observée. A ce niveau encore, aucune différence significative n'est notée d'un créneau horaire à l'autre. Une nette diminution de l'écotoxicité en milieu puis en sortie de station d'épuration est notée

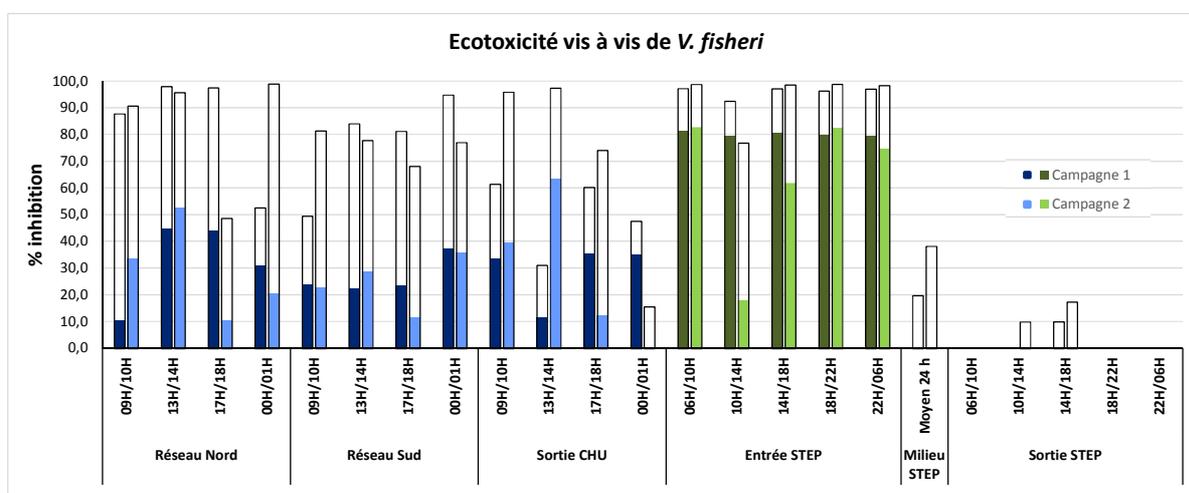


Figure 27 : Activité biologique vis-à-vis de *Vibrio fischeri* obtenues lors des campagnes pour chacun des points de prélèvements : résultats présentés en blanc obtenus pour une dilution au 1/2 des échantillons au contact des bactéries et résultats colorés obtenus après dilution au 1/20 des échantillons  
Sources des données : IC2MP

### 3. Evaluation des risques pour les milieux

#### 3.1. Evaluation des quantités de biocides déversées dans le milieu naturel par le système d'assainissement

##### 3.1.1. Démarche

Par **temps sec**, le seul rejet vers le milieu naturel est le rejet d'eau traitée de la station d'épuration (point d'autosurveillance A4 ; Figure 28).

Ainsi par temps sec, la quantité de biocides déversée chaque jour se calcule de la manière suivante :

$$\text{Volume journalier en A4} \times \text{concentration en biocides en A4} \quad (1)$$

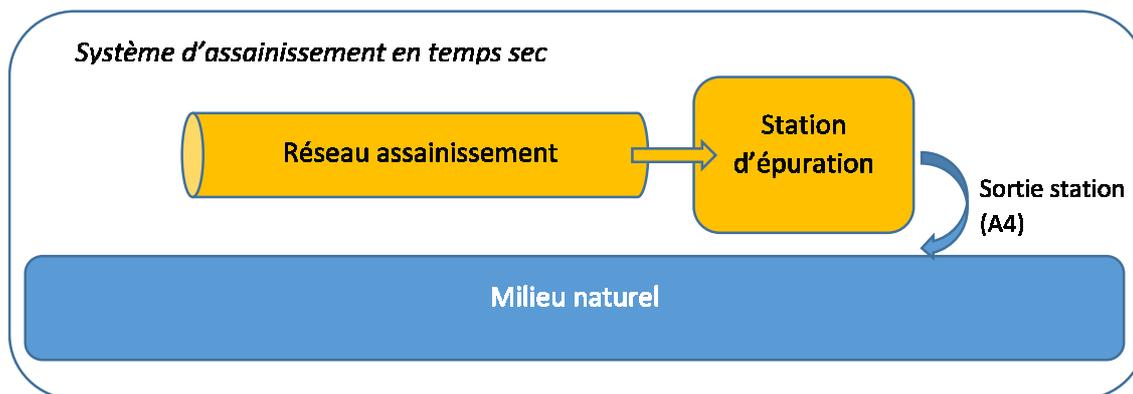


Figure 28: Rejets de biocides via le système d'assainissement en temps sec  
Source des données : Veolia Eau et Grand Poitiers

Par **temps de pluie**, viennent s'ajouter au rejet en sortie de station (point A4) les déversements possibles au niveau :

- des déversoirs d'orage (DO) présents sur le réseau (points A1) ;
- et du by-pass présent en entrée de station (point A2) (Figure 29).

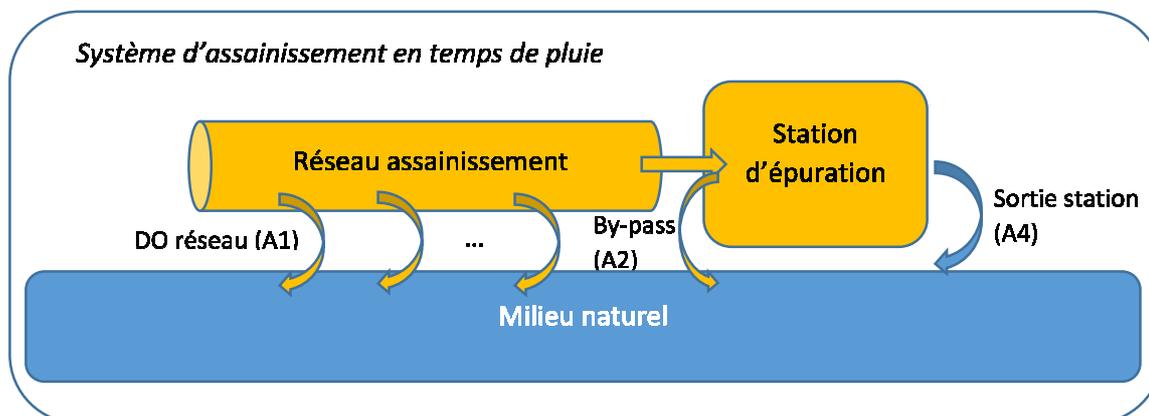


Figure 29 : Rejets de biocides via le système d'assainissement en temps de pluie  
Source des données : Veolia Eau et Grand Poitiers

Le réseau d'assainissement de Poitiers compte 155 points de déversement A1 au milieu, dont 25 soumis à autosurveillance. Il s'agit des différents déversoirs en réseaux d'eaux usées et unitaires ou trop-pleins de postes de relèvement collectant par temps sec une Charge Brute de Pollution Organique (CBPO) supérieure ou égale à 120 kg/j de DBO5. Cette surveillance est encadrée par l'arrêté du 21 juillet 2015 et la note technique du 7 septembre 2015. Actuellement, seuls 3 DO sur les 25 disposent de l'instrumentation requise permettant l'enregistrement du temps de déversement journalier pour les DO compris entre 120 et 600 kg/j de DBO5 et l'enregistrement en continu des débits déversés pour ceux supérieurs à 600 kg/j de DBO5. Ces 3 DO sont ceux dit de Fontaine, Vouneuil et St Benoit. Le point A2 est quant à lui instrumenté.

Sans connaissance spécifique des concentrations déversées au niveau des DO, la réglementation autorise l'utilisation des concentrations en entrée de station (point A3) pour calculer les flux déversés. Ainsi, par temps de pluie, la quantité de biocides déversée chaque jour peut se calculer de la manière suivante :

$$[(V_j \text{ en A1+A2}) \times \text{conc en A3}] + [(V_j \text{ en A4}) \times \text{conc en A4}] \quad (2)$$

où  $V_j$  est le volume journalier.

### 3.1.2. Application de la démarche aux résultats des campagnes 2015-2016

Dans le cadre de cette étude, les résultats des 2 campagnes de prélèvements de la tâche 2 (phase 1) du projet réalisées par temps sec puis temps de pluie ont été exploités à partir de cette démarche, pour évaluer les quantités de biocides déversées dans le milieu naturel par le système d'assainissement.

**Par temps sec**, lors de la première campagne réalisée en décembre 2015 (Cf. rapport de phase 1 du projet), aucun des 8 biocides recherchés (DIDAC, ABDAC, Bis(aminopropyl)laurylamine, digluconate de chlorhexidine, alcool benzylique, méthylparabène, MIT et CMIT) n'avait été quantifié dans le rejet de la station (point A4). Ils étaient tous inférieurs aux limites de quantification analytiques. Ainsi, si on fait l'hypothèse que la concentration rejetée était de 50% de la limite de quantification (choix communément réalisé lors des campagnes réglementaires RSDE), et en considérant l'équation (1) les flux déversés en biocides le jour de l'analyse ont été les suivants :

- ABDAC = DIDAC = Bis(aminopropyl)laurylamine = alcool benzylique =  $16820^a \text{ m}^3/\text{j} \times 10 \mu\text{g}/\text{L} \times 50\% = \mathbf{84,1 \text{ g/j}}$
- Digluconate de chlorhexidine =  $16820^a \text{ m}^3/\text{j} \times 1,8 \mu\text{g}/\text{L} \times 50\% = \mathbf{15,1 \text{ g/j}}$
- MIT = CMIT =  $16820^a \text{ m}^3/\text{j} \times 1 \mu\text{g}/\text{L} \times 50\% = \mathbf{8,4 \text{ g/j}}$
- Méthylparabène =  $16820^a \text{ m}^3/\text{j} \times 2 \mu\text{g}/\text{L} \times 50\% = \mathbf{16,8 \text{ g/j}}$

**Par temps de pluie**, tous les volumes déversés aux points A1 n'étant actuellement pas connus, faute d'instrumentation, les données disponibles sur les 3 DO réseau suivis ont été utilisées. Sur les années 2015 et 2016, le volume déversé au niveau de ces 3 points A1 représente 0,22% de la somme des volumes comptabilisés au niveau des 3 points A1, du point A2 et du point A3 (Tableau 8).

Tableau 8 : Volumes déversés sur les années 2015-2016 au niveau des points A1, A2, A3 et A4

	Cumul volume 2015-2016 (m <sup>3</sup> )
A1 - DO Fontaine	4 088
A1 - DO Vouneuil	15 185
A1 - DO St Benoit	12 080
A2 - By-pass entrée station	40 970
A3 - Entrée station	14 016 426

Source des données : Veolia Eau et Grand Poitiers

Parallèlement, la réglementation demande au maître d'ouvrage du système de collecte de choisir entre l'un des 3 critères suivants pour juger chaque année la conformité de son système de collecte :

- Rejets par temps de pluie **inférieurs à 5% des volumes** d'eaux usées produits par l'agglomération d'assainissement durant l'année ;
- Rejets par temps de pluie **inférieurs à 5% des flux** de pollution produits par l'agglomération d'assainissement durant l'année ;
- **Moins de 20 jours de déversement** constatés durant l'année au niveau du chaque DO soumis à autosurveillance réglementaire.

Ainsi, si on retient l'hypothèse maximale de 5% en volumes et 20 jours de déversement par an, en considérant X, le cumul de volume en 2015-2016 (en m<sup>3</sup>) déversé au niveau du réseau :

$$5\% = X / (X + \text{Vol A2} + \text{Vol A3})$$

ou encore  $X = 0,05 (\text{Vol A2} + \text{Vol A3}) / 0,95 = 739 863 \text{ m}^3$

soit un volume journalier moyen de  $739 863 / 40 \text{ jours} = 18 497 \text{ m}^3/\text{j}$

Dans ces conditions, pour une journée moyenne de temps de pluie, le volume journalier déversé par l'ensemble des 25 DO réseau n'excéderait donc pas **18 497 m<sup>3</sup>/j**.

Lors de la seconde campagne réalisée en mai 2016 en temps de pluie, seuls les 3 biocides les plus représentatifs des activités de soins (i.e. DIDAC, bis(aminopropyl)laurylamine, et digluconate

<sup>a</sup> Valeur de débit obtenue en sortie de STEP par temps sec lors de la phase 1 du projet (Tableau 13 Rapport Phase 1)

de chlorhexidine) ont été recherchés. Lors de cette campagne, aucune de ces 3 molécules n'a été observée dans le rejet de station (point A4) et seul le DIDAC a été quantifié en entrée de STEP (point A3) (46 µg/L contre 930 µg/L en temps sec lors de la campagne de décembre 2015). Pour ces 3 molécules, suivant la même approche que pour le temps sec et en appliquant la formule (2), les flux suivants seraient alors émis sur une journée moyenne de temps de pluie :

- DIDAC =  $((18497 \text{ m}^3/\text{j} + 1024 \text{ m}^3/\text{j}) \times 46 \text{ µg/L}) + (60080^b \text{ m}^3/\text{j} \times 10 \text{ µg/L} \times 50\%) = \mathbf{1198 \text{ g/j}}$
- Bis(aminopropyl)laurylamine =  $(18497 \text{ m}^3/\text{j} + 1024 \text{ m}^3/\text{j} + 60080^b \text{ m}^3/\text{j}) \times 10 \text{ µg/L} \times 50\% = \mathbf{398 \text{ g/j}}$
- Digluconate de chlorhexidine =  $(18497 \text{ m}^3/\text{j} + 1024 \text{ m}^3/\text{j} + 60080^b \text{ m}^3/\text{j}) \times 1,8 \text{ µg/L} \times 50\% = \mathbf{71,6 \text{ g/j}}$

### 3.1.3. Etude terrain complémentaire

Les prélèvements moyens 24 heures réalisés lors des campagnes de 2015-2016 n'ont pas permis de quantifier de biocides dans les eaux traitées de la station, que ce soit en temps sec ou en temps de pluie. Ainsi, dans cette partie, il a été choisi de voir si des capteurs passifs, de par leur capacité à rester plus longtemps au contact de l'effluent (de plusieurs jours à plusieurs semaines), permettraient de capter suffisamment de biocides pour qu'une quantification soit ensuite possible en laboratoire.

Pour ce faire, un POCIS commercialisé par la société Affinisep a été utilisé. La composition de ce POCIS est présentée dans la Figure 30.

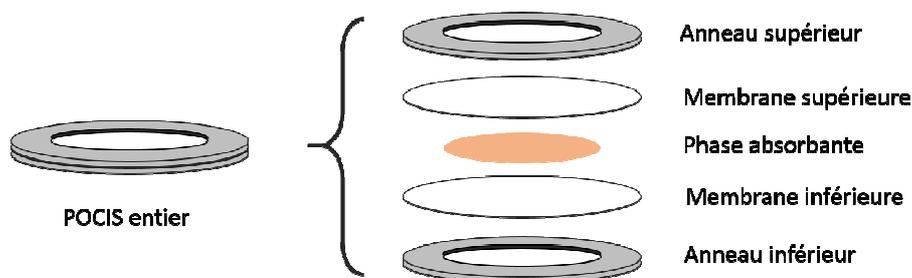
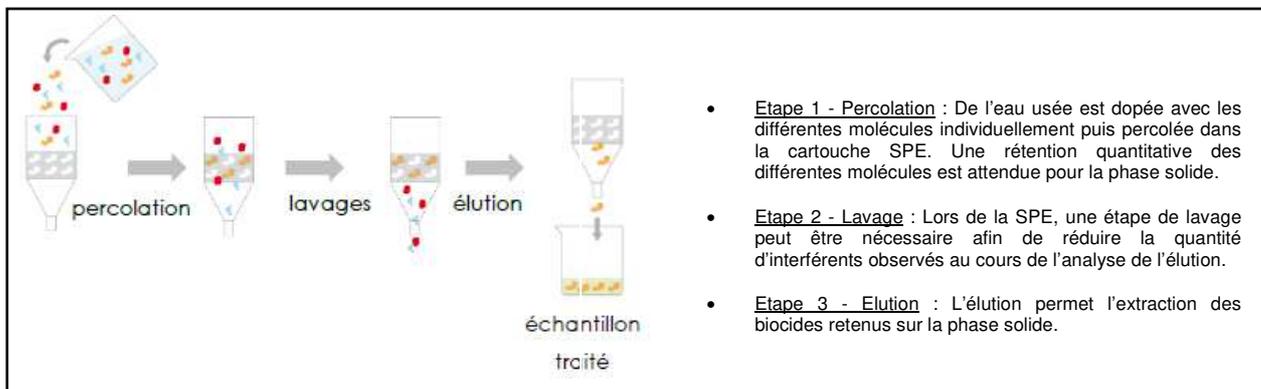


Figure 30: Composition d'un POCIS  
Source des données : Veolia Eau

Afin de valider la capacité du POCIS à retenir les biocides, **une étude en laboratoire** a été menée préalablement à sa mise en œuvre terrain à Poitiers. Pour cela, des tests réalisés, à l'aide de cartouches dites SPE (Figure 31), ont été menés sur une matrice d'eau usée dopée avec des concentrations connues en biocides (après des tests préalables réalisés en matrice eau ultra pure). Lors de ces tests, les 5 biocides retrouvés dans le réseau de Poitiers lors des campagnes de 2015-2016 (i.e. DIDAC, bis(aminopropyl)laurylamine, digluconate de chlorhexidine, ABDAC et alcool benzylique) ont été étudiés. Le MIT, CMIT et méthylparabène, jamais retrouvés lors des campagnes de 2015-2016, ont été d'emblée écartés du test. Dans ces conditions, l'étude en laboratoire a permis de déterminer, après rétention sur la phase absorbante et élution des composés en phase aqueuse, le pourcentage de récupération pour chaque molécule. Cette étude a été réalisée en partenariat avec Affinisep.



- **Etape 1 - Percolation** : De l'eau usée est dopée avec les différentes molécules individuellement puis percolée dans la cartouche SPE. Une rétention quantitative des différentes molécules est attendue pour la phase solide.
- **Etape 2 - Lavage** : Lors de la SPE, une étape de lavage peut être nécessaire afin de réduire la quantité d'interférents observés au cours de l'analyse de l'élution.
- **Etape 3 - Elution** : L'élution permet l'extraction des biocides retenus sur la phase solide.

Figure 31 : Principe de la SPE  
Source des données : Veolia Eau

Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus lors de cette étude en laboratoire.

Tableau 9 : Pourcentage de récupération par molécule

Biocides	Pourcentage de récupération
ABDAC	85%
DIDAC	70%
Bis(aminopropyl)laurylamine	35%
Digluconate de chlorhexidine	85%

Source des données : Veolia Eau

Lors de cette étude, l'alcool benzylique n'a finalement pas pu être mesuré par analyse LC/MS dans les conditions développées pour les 4 autres biocides.

Pour les autres composés, ces résultats montrent que la phase solide / absorbante choisie permet de retenir à un niveau satisfaisant les composés en matrice eau usée. En effet, l'élution de cette phase solide, à l'aide d'un mélange de méthanol et d'acétonitrile avec 2% d'acide formique, permet en moyenne la récupération de plus de 70% des composés présents dans la solution, à l'exception toutefois du Bis(aminopropyl)laurylamine. Le plus faible pourcentage de récupération pour ce dernier est dû à des incertitudes plus importantes que pour les autres composés lors de son analyse.

Sur la base de ces résultats, 3 POCIS ont été **mis en œuvre à Poitiers** :

- Le premier au niveau du canal de rejet des eaux traitées de la station d'épuration
- Le deuxième dans le canal de comptage des eaux brutes (entrée) de la station
- Et le troisième au niveau d'un des déversoirs d'orage sur le réseau déversant le plus fréquemment (il s'agit du DO Saint Benoît)

Pour cela, une cage de protection contenant un portoir pouvant accueillir jusqu'à 3 POCIS a été installée au niveau de chaque point (Figure 32).

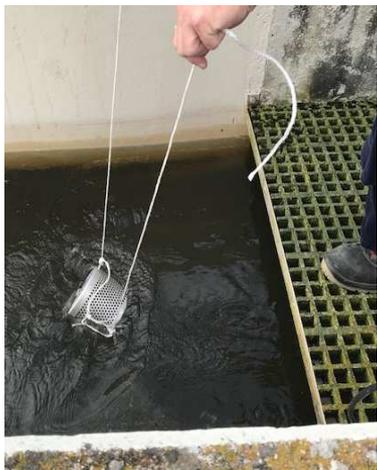


Figure 32 : Cage de protection et portoir à POCIS utilisés lors de l'étude terrain  
Source des données : Veolia Eau

Les photos ci-dessous (Figure 33) montrent, pour chaque point, l'état du dispositif (i.e. cage, portoir et POCIS) à chaque étape, c'est à dire :

- à la pose
- à la dépose (après la période d'imprégnation ou de mise en contact avec l'effluent)
- et une fois démonté avant envoi aux laboratoires pour élution puis analyse des biocides

### Sortie STEP



*Pose du POCIS*



*Dépose*



*Avant élution/analyse*

### Entrée STEP



*Pose du POCIS*



*Dépose*



*Avant élution/analyse*

### Déversoir d'Orage



*Pose du POCIS*

*(pas de photos disponibles à la dépose et avant envoi pour élution/analyse)*

**Figure 33 : Etat du dispositif (i.e. cage, portoir et POCIS) à la pose, dépose et une fois démonté avant élution et analyse des biocides**  
 Source des données : Veolia Eau

A l'issue de ces étapes, pour chaque POCIS, le protocole d'éluion des biocides a ensuite été réalisé par Affinisep (fournisseur du POCIS et spécialiste du protocole d'éluion des biocides). Puis, les biocides ont été analysés dans les éluats récupérés (échantillon de 120 mL).

Lors de l'étude terrain, les deux POCIS en entrée et en sortie de la station d'épuration ont été installés le 2 juillet et retirés le 17 juillet 2018. Dans ces conditions, les volumes journaliers et la pluviométrie enregistrés sur la période sont présentés dans le Tableau 10.

Le POCIS sur le DO Saint Benoît a été positionné le même jour que les deux premiers. En raison de l'absence de déversement sur la période du 2 au 17 juillet cependant, ce POCIS a été retiré un peu plus tard (le 10 septembre). Ainsi, sur cette période, ce 3<sup>ème</sup> POCIS a pu capter des déversements dus à plusieurs épisodes pluvieux après le 17 juillet. Toutefois malheureusement, du fait d'un problème technique, Grand Poitiers (exploitant du réseau et de la station d'épuration) n'a pas été en mesure de récupérer les volumes journaliers déversés au niveau du DO sur cette période.

Tableau 10 : Volumes journaliers entrée/sortie station et pluviométrie sur la période d'imprégnation des POCIS en station

Date	Débits (en m <sup>3</sup> /j)		Pluviométrie (en mm)
	Entrée STEP	Sortie STEP	
02/07/2018	15790	16460	4,4
03/07/2018	15180	14590	0,0
04/07/2018	10530	9670	1,1
05/07/2018	22850	22390	10,0
06/07/2018	16110	15640	0,0
07/07/2018	14100	13670	0,0
08/07/2018	13420	13160	0,0
09/07/2018	14620	14480	0,0
10/07/2018	14550	14430	0,0
11/07/2018	14240	14120	0,0
12/07/2018	14280	14020	0,0
13/07/2018	14320	13390	0,0
14/07/2018	12850	11900	0,0
15/07/2018	12440	11610	0,0
16/07/2018	16230	15880	5,2

Source des données : Veolia Eau et Grand Poitiers

A partir de ce travail, suite à l'éluion et l'analyse des biocides, aucun des composés recherchés n'a été mis en évidence en entrée et à la sortie de la station d'épuration, les résultats des analyses obtenues étant tous inférieurs aux limites de quantification (c'est-à-dire < 5 µg/L pour le DIDAC et l'ABDAC, < 2 µg/L pour le bis(aminopropyl)laurylamine, < 1 µg/L pour le digluconate de chlorhexidine, et < 50 µg/L pour l'alcool benzylique).

Ces résultats pouvant confirmer ceux obtenus en sortie de STEP lors des campagnes de la phase 1 du projet, sont en revanche en désaccord avec ceux obtenus précédemment en entrée de STEP sur des prélèvements moyens et montrant systématiquement la présence de DIDAC, ABDAC, alcool benzylique, voire bis(aminopropyl)laurylamine et digluconate de chlorhexidine.

Si la mise en œuvre de tels POCIS a été vérifiée en laboratoire, quelques doutes sur les résultats obtenus lors de l'étude terrain sont alors apparus. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer la non détection des molécules pourrait être leur possible rétention sur les membranes supérieure et inférieure qui retiennent la phase absorbante. Ce type de phénomène avait également été observé lors de la préparation d'échantillons par filtration avant analyse (cf paragraphe 5.2.2 rapport phase 1).

Ainsi, pour le 3<sup>ème</sup> POCIS (celui positionné au niveau du DO Saint Benoît), retiré plus tardivement que les deux premiers, un protocole d'éluion a été testé pour également désorber les biocides potentiellement retenus sur les membranes. Pour cela, suite à l'éluion de la phase solide, les membranes coupées en morceaux ont été trempées dans la solution éluee avec l'objectif de désorber les molécules. L'analyse des biocides dans l'éluat a ensuite été réalisée.

Dans ces conditions, les 2 molécules retrouvées aux plus fortes concentrations dans le réseau d'eaux usées lors des campagnes de la phase 1, ont pu être détectées dans l'éluat à des concentrations de 25 µg/L pour l'ABDAC et de 46 µg/L pour le DIDAC. Pour chacun des 3 autres biocides, une concentration inférieure à leur limite de quantification a été déterminée.

Ce second protocole d'élution, *a priori* plus adapté pour l'élution des biocides sur le terrain, semble donc confirmer la rétention possible des biocides sur les membranes utilisées pour maintenir la phase absorbante.

Au regard de ces résultats, des rejets possibles de DIDAC et d'ABDAC au niveau des bassins d'orage seraient donc observés. Toutefois, aucune mesure de quantités rejetées n'a pu malheureusement être réalisée en raison des différents problèmes techniques rencontrés lors de l'étude terrain.

### 3.2. Evaluation de la toxicité des biocides sur la biomasse de la STEP et les milieux

#### 3.2.1. Approche expérimentale et description des tests employés

**Pour juger de la toxicité des biocides sur le milieu récepteur**, 3 types de test d'écotoxicité ont été utilisés :

- Un test d'**inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*** suivant la norme NF EN ISO 6341, qui se réalise sur 24 heures et qui est un test de **toxicité aiguë** (à court terme) ;
- Un test d'**inhibition de la croissance de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*** suivant la norme NF EN ISO 8692, qui se réalise sur 72 heures et qui est un test de **toxicité chronique** (à long terme).
- Un test d'**inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri*** suivant la norme NF EN ISO 11348, qui se réalise sur 30 minutes et qui est un test de **toxicité aiguë**

Les tests utilisant des daphnies sont les plus utilisés en écotoxicologie, du fait notamment, de leur facilité d'utilisation. Ce test a pour objectif d'évaluer la toxicité aiguë du produit testé pour la faune aquatique (micro-crustacés). Ce test permet de déterminer la concentration du produit testé qui, en 24 h, immobilise 50% des daphnies (*Daphnia magna*) mises en expérimentation (concentration efficace initiale inhibitrice, CE 50i - 24 h).

L'essai d'inhibition de la croissance algale vise quant à lui à évaluer la toxicité chronique du produit testé pour la flore aquatique. Il consiste à mesurer la croissance (sous microscope) de l'algue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* après 72h d'exposition au produit. Certains composés ont pour effet d'inhiber la croissance de l'algue, révélant ainsi leur toxicité vis-à-vis des végétaux aquatiques.

Enfin, le test utilisant les bactéries luminescentes *Vibrio fischeri* est un test rapide communément employé pour évaluer la toxicité aiguë d'échantillons d'eaux telles que les eaux usées. Il permet de déterminer la concentration de l'échantillon testé qui génère 50% d'inhibition de la luminescence après 30 min de temps d'incubation.

Pour chacun d'entre eux, 5 échantillons ont été testés :

- Echantillon 1 : Eau usée (EU) prélevée bien en amont sur le réseau de Poitiers, au niveau du point PR0 (Cf. rapport de phase 1 du projet), qui correspond à un effluent purement domestique, dans lequel on retrouve toutefois des traces de biocides (résultats de la campagne de temps sec de décembre 2015 : 238 µg/L d'ABDAC, 164 µg/L de DIDAC, 22 µg/L d'alcool benzylique) ;
- Echantillon 2 : échantillon 1 dopé en biocides suivant le 1<sup>er</sup> niveau présenté dans le tableau ci-dessous ;
- Echantillon 3 : échantillon 1 dopé en biocides suivant le 2<sup>nd</sup> niveau présenté dans le tableau ci-dessous ;
- Echantillon 4 : eau ultrapure (EUP) dopée en biocides suivant le 1<sup>er</sup> niveau ;
- Echantillon 5 : eau ultrapure (EUP) dopée en biocides suivant le 2<sup>nd</sup> niveau.

Pour ces échantillons, les 2 niveaux de dopage ont été déterminés en considérant les concentrations de biocides retrouvées aux différents points du réseau lors des campagnes de la tâche 2 (phase 1) réalisées par temps sec sur le réseau en décembre 2015 et à la sortie du site du CHU de Poitiers les 13, 26 janvier et 14 juin 2016 (Cf. rapport de phase 1 du projet). Le 1<sup>er</sup> niveau correspond aux **valeurs moyennes** pondérées par le volume retrouvé en chaque point du réseau, et le 2<sup>nd</sup> niveau, aux **valeurs maximales** retrouvées (Tableau 11).

Tableau 11 : Niveaux de dopage en biocides utilisés pour les tests d'écotoxicité

Biocides	1 <sup>er</sup> niveau :	2 <sup>nd</sup> niveau :
	Concentration moyenne (µg/L)	Concentration maximale (µg/L)
ABDAC	512	2 900
DIDAC	2 283	7 800
Bis(aminopropyl)laurylamine	16	60
Digluconate de chlorhexidine	11	79
Alcool benzylique	27	130

Source des données : Veolia Eau

Le 1<sup>er</sup> niveau de dopage a été choisi de façon à pouvoir tester la toxicité d'un mélange de biocides (cocktail) représentatif de ce que nous retrouvons en différents points du réseau d'assainissement de Poitiers. L'objectif du 2<sup>nd</sup> niveau est de se placer dans le cas le plus défavorable (*worst case* en anglais) où un effluent intégrerait chacune des 5 substances biocides à sa valeur maximale retrouvée dans le réseau.

**Pour juger de la toxicité des biocides sur la biomasse de la station d'épuration**, des tests respirométriques sur un échantillon de boues activées (ou de liqueur mixte) prélevé à la STEP de Poitiers ont été entrepris.

Ce type de tests permet d'appréhender une éventuelle inhibition de la biodégradation par la biomasse. Pour cela, un mélange aqueux composé de sels nutritifs, d'un volume précis d'échantillon à tester et d'un inoculum, est mis sous agitation dans un flacon hermétique pendant 2 jours. L'oxygène consommé par les bactéries durant la biodégradation, est mesuré automatiquement à intervalle de temps régulier. Il s'agit d'essais dits de Respirométrie Manométrique.

Dans le cadre du projet BIOTECH, les 3 premiers échantillons utilisés pour les tests d'écotoxicité (tamisé à 1µm pour éliminer les grossiers) ont été testés. Pour cela, plusieurs essais ont été réalisés en parallèle :

- Deux essais à blanc (témoin inoculum)
- Deux essais de référence avec une solution de Benzoate de Sodium à 10,013 g/L, de façon à vérifier l'activité de l'inoculum.
- Test n°1 : Deux essais (A et B) sur l'échantillon 1
- Test n°2 : Deux essais (C et D) sur l'échantillon 1 dopé au 1<sup>er</sup> niveau en biocides
- Test n°3 : Deux essais (E et F) sur l'échantillon 1 dopé au 2<sup>nd</sup> niveau en biocides

Lors de la réalisation de ces tests, des respiromètres OxiTop-C 12 postes de marque WTW ont été utilisés. Toutes les solutions d'essais ont été conservées à l'obscurité en incubateur à une température de 21°C +/- 1°C. Les apports en sels nutritifs et inoculum étaient identiques pour tous les essais. L'inoculum utilisé était la boue activée de la station d'épuration de Poitiers après lavages et remise en suspension dans le milieu réactionnel (eau ultrapure + sels nutritifs).

### 3.2.2. Résultats

#### ➤ Toxicité aiguë

Les résultats des tests d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* et d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri* sont présentés dans le Tableau 13. Pour ces essais, plusieurs échantillons avec l'ajout d'un volume croissant de l'échantillon testé ont été préparés. A titre d'exemple, le Tableau 12 présente le détail des résultats du test d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* avec l'échantillon 1, constitué d'eau usée uniquement. Dans le cas de ce test, ces résultats permettent de déterminer 3 « concentrations » qui s'expriment toute en % :

- **Concentration minimale correspondant à 100% d'immobilisation** (ex. aucune dans le cas des données du tableau ci-dessous : à savoir que même pour un mélange réactionnel composé à 90% de l'échantillon à tester, une immobilisation totale des daphnies n'a pas été constatée) ;
- **Concentration maximale correspondant à 0% d'immobilisation** (ex. 30% dans le cas des données du tableau ci-dessous) ;

- **CE50i-24h, qui est la Concentration Efficace Inhibitrice immobilisant 50% de *Daphnia magna* en 24 heures**, calculée à partir de la courbe Gausso-logarithmique du % d'immobilisation fonction de la concentration en %.

Tableau 12: Exemple de résultats obtenus avec le test d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* pour l'échantillon 1

Concentration (%)	Immobilisation (%)
0	0
1	0
2	0
4	0
8	0
15	0
30	0
50	10
75	40
90	90

Source des données : Veolia Eau

Les valeurs obtenues selon cette approche pour le test d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* sont synthétisées dans le Tableau 13. De même, les résultats obtenus lors du test d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri* sont présentés dans ce tableau. Dans ce dernier test, selon une approche comparable, les résultats sont exprimés en concentrations provoquant une diminution de 20 % (CE20) et 50 % (CE50) de la luminescence.

Tableau 13 : Bilan des résultats obtenus pour les 5 échantillons

	<i>Daphnia magna</i>			<i>V. fischeri</i>	
	Conc min avec 100% d'immobilisation	Conc max avec 0% d'immobilisation	CE50i-24h	CE20	CE50
ECH 1 : EU	Aucune	30%	77,9%	5%	15%
ECH 2 : EU + niveau 1 en biocides	90%	50%	71%	2%	9%
ECH 3 : EU + niveau 2 en biocides	90%	15%	57,3%	1%	3%
ECH 4 : EUP + niveau 1 en biocides	16%	8%	12,4%	11%	25%
ECH 5 : EUP + niveau 2 en biocides	3,8%	1%	2,93%	5%	8%

Source des données : Veolia Eau et IC2MP

D'une manière générale, ces résultats montrent que :

- La présence de biocides dans l'échantillon d'eau usée augmente sa toxicité vis-à-vis des daphnies et de *Vibrio fischeri* ;
- Plus la concentration en biocides de l'échantillon (d'eau usée ou d'eau ultrapure) est élevée et plus la toxicité vis-à-vis des daphnies et de *Vibrio fischeri* est importante ;
- Les biocides se révèlent plus toxiques vis-à-vis des daphnies lorsqu'ils sont en mélange dans l'eau ultrapure, que dans l'eau usée alors que l'effet inverse est observé avec *Vibrio fischeri*. On peut émettre l'hypothèse que la matière organique présente dans l'eau usée interagit avec une partie des biocides, ainsi leur effet en est modifié.

D'autre part, la classification ci-dessous est celle habituellement utilisée pour interpréter les résultats de tests d'écotoxicité (classification issue de diverses publications et de documents des Agences de l'eau et de la DREAL) (Tableau 14).

Tableau 14 : Classification habituellement utilisée pour interpréter les résultats des tests d'écotoxicité

Résultat	EC50 > 100%	100% > EC50 > 50%	50% > EC50 > 10%	EC50 < 10%
Interprétation	Effluent non toxique	Effluent faiblement toxique	Effluent toxique	Effluent très toxique

Source des données : Agences de l'Eau et DREAL

Ainsi, sur ces bases, selon les résultats obtenus avec le test d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*, les effluents transitant dans les réseaux d'assainissement de Poitiers correspondraient à un « effluent faiblement toxique » pour le milieu naturel. L'échantillon 3, qui pour rappel correspond au cas le plus défavorable, avec un CE50i-24h de 57,3% rentrerait également dans cette catégorie.

A partir des résultats obtenus avec *Vibrio fischeri*, l'échantillon d'eau usée serait considéré comme « toxique », voire « très toxique » dès le premier niveau de dopage. Ces résultats montrant une toxicité plus importante vis-à-vis des bactéries que des crustacées sont en accord avec l'activité biocide des molécules étudiées dans le cadre du projet BIOTECH.

➤ Toxicité chronique

Les résultats des tests d'inhibition de la croissance de l'algue *Pseudokirchneriella subcapita* sont présentés dans le tableau 15.

Pour ce test, les résultats sont exprimés en concentrations provoquant une réduction de 20 % (CE20) et 50 % (CE50) du taux de croissance algale par rapport à un témoin. De même, les valeurs de concentration sans effet observé (CSEO), correspondant à la concentration d'essai testée la plus élevée ne provoquant pas d'inhibition significative du taux de croissance algale par rapport au témoin, sont indiquées. Ce terme est équivalent à celui de NOEC en Anglais (No Observed Effect Concentration) ou encore à la concentration maximale correspondant à 0% d'immobilisation utilisée pour les tests réalisés sur *Daphnia magna*.

Tableau 15 : Bilan des résultats obtenus pour les 5 échantillons

Echantillons testés	<i>Pseudokirchneriella subcapita</i>		
	CE20	CE50	CSEO
ECH 1 : EU	5,1%	16,1%	2,2%
ECH 2 : EU + niveau 1 en biocides	5,4%	11,8%	2,2%
ECH 3 : EU + niveau 2 en biocides	23,4%	64,2%	11%
ECH 4 : EUP + niveau 1 en biocides	9,9%	12,1%	3,7%
ECH 5 : EUP + niveau 2 en biocides	38%	49,3%	18%

Source des données : Veolia Eau

Aussi étrange que cela puisse paraître, ces résultats semblent montrer une stimulation de la croissance des algues par les biocides.

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer ces résultats :

- Les biocides pourraient réagir ou interagir avec certains constituants de la matrice (e.g. polluants) capables d'inhiber la croissance algale. Un effet bénéfique serait alors observé.
- Ou les biocides constitueraient un substrat organique facilement assimilable et utilisé par les algues (i.e. type de biocides auquel les algues ne sembleraient pas sensibles)

Les résultats obtenus pour les échantillons d'eau ultrapure (EUP) tendraient à valider la seconde explication.

➤ Toxicité sur la biomasse de la station d'épuration

Les résultats obtenus lors de la réalisation des tests respirométriques sont présentés dans la Figure 34. Dans cette figure, le % de biodégradation a été calculé par rapport à la DCO initiale de l'essai correspondant.

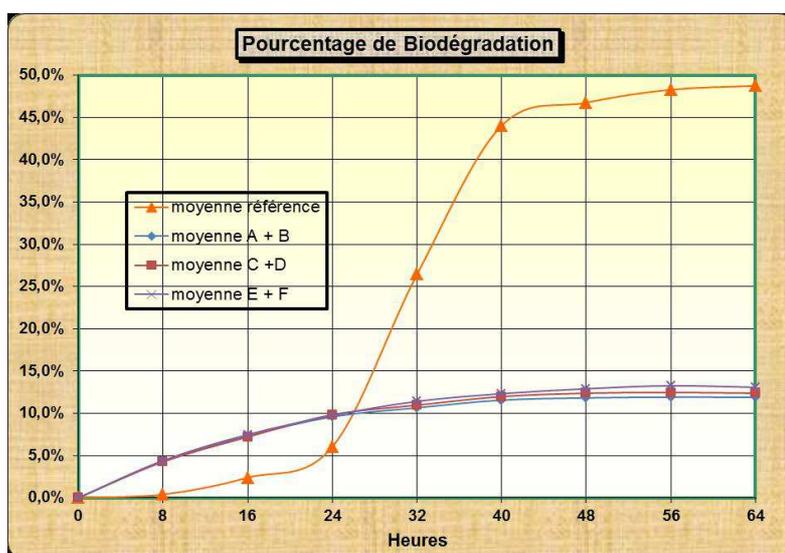


Figure 34 : Pourcentages de biodégradation obtenus lors de la réalisation des tests respirométriques (A + B : eau usée ; C + D : eau usée dopée au 1<sup>er</sup> niveau en biocides ; E + F : eau usée dopée au 2<sup>ème</sup> niveau en biocides)  
Source des données : Veolia Eau

Des résultats comparables sont observés quelle que soit le niveau de dopage en biocides utilisé. Au vu de ces résultats, on peut donc conclure que le dopage des échantillons d'effluent brut urbain par les biocides sélectionnés aux deux niveaux de concentration choisis n'a pas d'impact significatif sur l'activité de la biomasse.

#### 4. Conclusion

En conclusion, pour les biocides les plus représentatifs d'une activité de soins (i.e. DIDAC, digluconate de chlorhexidine et bis(aminopropyl)laurylamine), une émission continue de ces substances sur 24 h, avec des quantités rejetées plus importantes en journée du fait de la plus forte activité de soins et de nettoyage durant cette période, a été observée au niveau du CHU et en entrée de la station d'épuration.

En termes de stabilité et de devenir dans les eaux résiduaires, à partir de l'étude laboratoire et des campagnes terrains il a clairement été mis en évidence que :

- Ces substances pouvaient s'adsorber sur les matières en suspension dans les eaux résiduaires. Cette adsorption serait de l'ordre de quelques  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de MES pour le DIDAC, et de plusieurs centaines de  $\text{ng}/\text{mg}$  de MES pour le digluconate de chlorhexidine et le bis(aminopropyl)laurylamine à la sortie du CHU. Sur le terrain, des quantités non négligeables des biocides retrouvés dans les rejets seraient donc adsorbées sur les matières en suspension. A la sortie du CHU, il a été évalué que 18 %, 37 % et 47 % des quantités de DIDAC, de digluconate de chlorhexidine et de bis(aminopropyl)laurylamine retrouvées dans les rejets se retrouveraient au niveau de la phase particulaire.
- En présence d'un résiduel de chlore (issu des protocoles de désinfection des locaux au niveau des rejets hospitaliers), certains biocides pourraient se dégrader pour générer des produits de transformation, *a priori* plus actifs vis-à-vis de *V. fisheri*. Lors des campagnes de prélèvements, certains de ces sous-produits ont pu être observés en phase aqueuse. Au niveau du site du CHU, le protocole utilisé pour la désinfection des locaux (i.e. eau de javel ou dichloroisocyanurate de sodium) ne semble pas influencer la formation de ces composés. De même, aucun impact sur la toxicité des effluents n'a été observé suivant le protocole employé.

Parallèlement, pour les 5 biocides retrouvés dans le réseau (i.e. DIDAC, ABDAC, alcool benzylique, digluconate de chlorhexidine et bis(aminopropyl)laurylamine),

- Une estimation des quantités journalières maximales susceptibles d'être rejetées dans le milieu par temps sec ou de pluie (via la station d'épuration et les déversoirs d'orage) a été réalisée au regard des résultats obtenus lors des campagnes réseau, et des volumes susceptibles d'être déversés dans le milieu. Dans ces conditions, il a été estimé que les flux maximaux déversés par temps sec ne dépasseraient pas une centaine de  $\text{g}/\text{j}$  pour le DIDAC, l'ABDAC et l'alcool benzylique et une dizaine de  $\text{g}/\text{j}$  pour les autres molécules. Par temps de pluie, de plus grandes quantités de biocides (jusqu'à 1198  $\text{g}/\text{j}$  pour le DIDAC) pourraient être déversées dans les milieux.
- Quelques analyses terrain en sortie de station d'épuration et au niveau d'un déversoir d'orage ont été menées suite à des prélèvements par capteurs passifs. Lors de ces campagnes aucun biocide n'a pu être détecté en sortie de STEP sans pouvoir réellement conclure sur l'absence de rejets vers le milieu récepteur en raison de l'adsorption des molécules sur les matériaux encadrant les phases adsorbantes et non sélectivement sur les phases adsorbantes des capteurs passifs ayant subi le protocole d'extraction. Cependant, pour l'un des déversoirs d'orage les plus émetteurs sur le système d'assainissement de Poitiers, l'analyse de l'éluat de la globalité du dispositif a permis d'identifier la présence de DIDAC et d'ABDAC. Seuls les rejets de ces molécules (substances les plus retrouvées et les plus concentrées au niveau du réseau) pourraient alors être observées au niveau des déversoirs d'orage. Ces rejets directs au milieu naturel ayant lieu lors des forts épisodes pluvieux, ces biocides seraient ainsi retrouvés à de faibles concentrations compte tenu de leur importante dilution par les eaux usées.
- Une évaluation de l'impact de ses substances en mélange sur la biomasse des stations d'épuration et les milieux a été réalisée. Concernant ce point, il a été montré que la biomasse

de station ne serait pas sensible à la présence de biocides. Par contre, pour les concentrations moyennes en biocides constatées dans les réseaux, il ressort une toxicité au regard des tests de toxicité aiguë (sur *Daphnia magna* et *Vibrio fischeri*). Sur les algues vertes (test de toxicité chronique), il semblerait que les biocides puissent à l'opposé avoir un effet favorable à leur croissance.

## 5. Bibliographie

**Abia L., Armesto X.L., Canle M.L., Garcia M.M, Santaballa J.A.** (1998) Oxidation of aliphatic amines by aqueous chlorine. *Tetrahedron*, 54:521–530.

**Bailey H.C., Elphick J.R., Potter A., Chao E., Zak B.** 1999: Acute toxicity of antiseptic chemical DDAC and IPBC, alone and in combination, to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Water Research*, 33, 2410-2414.

**Boillot C.** 2008 : Evaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Thèse de l'INSA de Lyon.

**Deborde M., von Gunten U.** (2008) « Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment : kinetics and mechanisms: A critical review » *Water Research*, 42, 13-51.

**International Organization for Standardization** (1998) Water quality - Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD<sub>n</sub>) - Part 1: Dilution and seeding method with allylthiourea addition. NF EN 1899-1. AFNOR

**International Organization for Standardization** (2002) Water quality - Determination of the chemical oxygen demand index (ST-COD) - Small-scale sealed-tube method. ISO 15705. AFNOR

**International Organization for Standardization** (2005) Water Quality - Determination of suspended solids - Method by filtration through glass fibre filters. NF EN 872. AFNOR

**International Organization for Standardization** (2009) Water quality - Sampling guide for monitoring quality of waters in the environment - Part 3: Sampling of ground water. FD T90-523. AFNOR

**International Organization for Standardization** (2012a) Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. NF EN ISO 6341. AFNOR.

**International Organization for Standardization** (2012b) Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. NF EN ISO 8692. AFNOR.

**International Organization for Standardization** (2012c) Water quality - Determination of pH. NF EN ISO 10523. AFNOR

**Leung H.W.** 2001 : Ecotoxicology of glutaraldehyde : Review of environmental fate and effects studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49, 26-39.

**Takasaki A., Hashida T., Fujiwara S., Kato K.I., Nishihara T.** 1994a : Bacterial action of a quaternary ammonium disinfectant didecyldimethyl ammonium chloride, against *Staphylococcus aureus*. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, 40, 344-350.

**Takasaki A., Hashida T., Kato K.I., Moriyama T., Nishihara T.** 1994b: Action of a quaternary ammonium on cell membrane of *Staphylococcus aureus*. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, 40, 520-526.

**Tarazako N., Yamamoto K., Iwasaki K.** 2002: Subacute toxicity of woodpreservatives, DDAC and BAAC, in several aquatic organisms. *Journal of Health Science*, 48, 359-365.

**Zhang C., Cui F., Zeng G.M., Yang Z.Z., Yu Z.G., Zhu M.Y., Shen L.Q.** 2015 : Quaternary ammonium compounds (QACs) : A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Science of the Total Environment*, 518-519, 352-362.

## 6. Table des illustrations

Figure 1 : Différentes tâches du projet BIOTECH.....	10
Figure 2 : Protocole expérimental suivi pour les expériences de chloration et d'hydrolyse.....	13
Figure 3 : Etude de la stabilité du DIDAC, du digluconate de chlorhexidine et du bis(aminopropyl)laurylamine en matrice complexe : pH = 8 ; [DIDAC] <sub>0</sub> = 2000 µg/L et [bis(aminopropyl)laurylamine] <sub>0</sub> = [digluconate de chlorhexidine] <sub>0</sub> = 100 µg/L (résultats obtenus suite à la réalisation de 3 manipulations).....	14
Figure 4 : Etude de l'évolution du DIDAC, du digluconate de chlorhexidine et du bis(aminopropyl)laurylamine au cours de la chloration : pH = 8 ; [Chlore disponible] <sub>0</sub> = 4 mg/L ; [DIDAC] <sub>0</sub> = 2000 µg/L et [bis(aminopropyl)laurylamine] <sub>0</sub> = [digluconate de chlorhexidine] <sub>0</sub> = 100 µg/L a/ dans l'eau du robinet (résultats obtenus suite à la réalisation de 3 manipulations); b/ en matrice complexe (résultats obtenus suite à la réalisation de 4 manipulations).....	15
Figure 5 : Etude de l'adsorption du DIDAC, du digluconate de chlorhexidine et du bis(aminopropyl)laurylamine en matrice complexe : pH = 7,2 ; [DIDAC] <sub>0</sub> = 2000 µg/L et [bis(aminopropyl)laurylamine] <sub>0</sub> = [digluconate de chlorhexidine] <sub>0</sub> = 100 µg/L.....	16
Figure 6 : Produit de transformation observé lors de la chloration de la chlorhexidine : para chloroaniline.....	18
Figure 7 : Spectres de masse de collision enregistrés en ESI positif pour le bis(aminopropyl)laurylamine et ses 5 sous-produits de chloration. (a) MS/MS avec isolation de m/z 300 (tr = 3.8 min), Vcoll. = 30 eV ; (b) MS/MS avec isolation de m/z 298 (tr = 5.3 min), Vcoll. = 30 eV ; (c) MS/MS avec isolation de m/z 296 (tr = 5.4 min), Vcoll. = 20 eV ; (d) MS/MS avec isolation de m/z 296 (tr = 6.2 min), Vcoll. = 20 eV ; (e) MS/MS avec isolation de m/z 310 (tr = 7.3 min), Vcoll. = 30 eV ; (f) MS/MS avec isolation de m/z 297 (tr = 7.3 min), Vcoll. = 30 eV. Source des données : LCM.....	19
Figure 8 : Mécanismes de dissociation par collisions du bis(aminopropyl)laurylamine protoné.....	20
Figure 9 : Mécanismes associés à la fragmentation obtenue par CID de l'ion moléculaire m/z 298 observé à 5,3 min.....	21
Figure 10 : Mécanismes associés à la fragmentation obtenue par CID de l'ion m/z 296 obtenu à 5,4 min.....	22
Figure 11 : Mécanismes associés à la fragmentation obtenue par CID de l'ion m/ 296 observé à 6,2 min.....	22
Figure 12 : Mécanismes associés à la fragmentation obtenue par CID de l'ion m/ 310 observé à 7,3 min.....	23
Figure 13 : Mécanismes associés à la dissociation par CID de l'ion m/z 297 obtenu à 7,3 min.....	23
Figure 14 : Chemin réactionnel proposé lors de la chloration du bis(aminopropyl)laurylamine.....	24
Figure 15: Evolution du bis(aminopropyl)laurylamine (BAPLA) et des produits de transformation au cours de la chloration pH = 7,2 ; [bis(aminopropyl)laurylamine] <sub>0</sub> = 5000 µg/L.....	25
Figure 16 : Evolution de la toxicité vis-à-vis de <i>Vibrio fisheri</i> au cours de la chloration du bis(aminopropyl)laurylamine pH = 7,2 ; [bis(aminopropyl)laurylamine] <sub>0</sub> = 5000 µg/L (résultats obtenus pour une dilution au 1/2 des échantillons au contact des bactéries).....	26
Figure 17: Protocole d'extraction retenu pour les campagnes de prélèvements.....	27
Figure 18 : Comparaison des rendements d'extraction en fonction des différentes combinaisons de paramètres testés (T : température, 30 et 50 °C ; V : volume de solvant d'extraction : 20 et 50 mL ; t : temps d'extraction aux ultra-sons, 20 et 60 min).....	28
Figure 19 : Comparaison des rendements d'extraction en fonction de la proportion d'acide chlorhydrique dans le mélange d'extraction MeOH/HCl (volume de prise d'essai 20 mL).....	29
Figure 20 : Comparaison des rendements d'extraction obtenus pour la chlorhexidine, le bis(aminopropyl)laurylamine et le DIDAC en fonction des différentes combinaisons de paramètres testées (volume de prise d'essai : 20 mL ; acidification par HCl du solvant d'extraction : 2%).....	30
Figure 21 : Protocole d'extraction retenu pour les campagnes de prélèvements.....	32
Figure 22 : Réseaux d'eaux usées et différents points de prélèvements considérés dans le cadre du projet BIOTECH au niveau du CHU de Poitiers.....	33
Figure 23 : Paramètres globaux obtenus lors des campagnes de prélèvements au niveau du site du CHU de Poitiers et de la STEP de Grand Poitiers.....	36
Figure 24 : Quantités retrouvées en phase aqueuse lors des campagnes de prélèvements pour les 3 biocides les plus spécifiques d'une activité de soins.....	38
Figure 25 : Teneurs en biocides dans les MES obtenues lors des campagnes de prélèvements pour le DIDAC et le digluconate de chlorhexidine.....	39
Figure 26 : Répartition des biocides entre la phase aqueuse et la phase particulaire à la sortie du CHU.....	39
Figure 27 : Activité biologique vis-à-vis de <i>Vibrio fisheri</i> obtenues lors des campagnes pour chacun des points de prélèvements : résultats présentés en blanc obtenus pour une dilution au 1/2 des	

échantillons au contact des bactéries et résultats colorés obtenus après dilution au 1/20 des échantillons.....	40
Figure 28: Rejets de biocides via le système d'assainissement en temps sec.....	41
Figure 29 : Rejets de biocides via le système d'assainissement en temps de pluie .....	41
Figure 30: Composition d'un POCIS .....	43
Figure 31 : Principe de la SPE .....	44
Figure 32 : Cage de protection et portoir à POCIS utilisés lors de l'étude terrain .....	44
Figure 33 : Etat du dispositif (I.e. cage, portoir et POCIS) à la pose, dépose et une fois démonté avant élution et analyse des biocides .....	45
Figure 34 : Pourcentages de biodégradation obtenus lors de la réalisation des tests respirométriques (A + B : eau usée ; C + D : eau usée dopée au 1 <sup>er</sup> niveau en biocides ; E + F : eau usée dopée au 2 <sup>ème</sup> niveau en biocides).....	50

Tableau 1 : Planning prévisionnel (en orange) et planning suivi (en rouge) pour la phase 2 du projet BIOTECH (de novembre 2015 à août 2018) .....	11
Tableau 2 : Structures chimiques et principales indications des 3 biocides les plus spécifiques des activités de soins .....	11
Tableau 3 : Paramètres globaux obtenus à l'entrée de la station d'épuration de Poitiers, à la sortie du site du CHU et pour la matrice de référence (i.e. eau d'entrée de STEP de Saint-Julien l'Ars) utilisée pour les tests de stabilité.....	12
Tableau 4 : Estimations des quantités maximales de chlore actif susceptibles d'être libérés au niveau des différents bâtiments du CHU (estimations réalisées à partir des consommations sur la période du 1 janvier au 31 décembre 2015).....	13
Tableau 5 : Gradient chromatographique utilisé en couplage LC-MS .....	18
Tableau 6 : Temps de rétention, compositions élémentaires et structures proposées pour les sous-produits de chloration du bis(aminopropyl)laurylamine.....	19
Tableau 7 : Bilan des expériences pour les 3 biocides étudiés .....	31
Tableau 8 : Volumes déversés sur les années 2015-2016 au niveau des points A1, A2, A3 et A4.....	42
Tableau 9 : Pourcentage de récupération par molécule .....	44
Tableau 10 : Volumes journaliers entrée/sortie station et pluviométrie sur la période d'imprégnation des POCIS en station .....	46
Tableau 11 : Niveaux de dopage en biocides utilisés pour les tests d'écotoxicité.....	48
Tableau 12: Exemple de résultats obtenus avec le test d'inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna</i> pour l'échantillon 1.....	49
Tableau 13 : Bilan des résultats obtenus pour les 5 échantillons .....	49
Tableau 14 : Classification habituellement utilisée pour interpréter les résultats des tests d'écotoxicité .....	49
Tableau 15 : Bilan des résultats obtenus pour les 5 échantillons .....	50

## 7. Annexes

### 7.1. Résultats des paramètres globaux obtenus lors des 2 campagnes au niveau du CHU et de la station d'épuration du Grand Poitiers

Points de prélèvements	Créneaux horaires	Campagne 1						Campagne 2					
		Débits L/h	pH	MES mg/L	DCO mgO2/L	DBO en mgO2/L	DCO/DBO	Débits L/h	pH	MES mg/L	DCO mgO2/L	DBO en mgO2/L	DCO/DBO
Réseau Nord	09H/10H	13990	7,5	330,0	800,0	250,0	3,2	13820	8,0	290,0	810,0	280,0	2,9
	13H/14H	11820	7,9	230,0	570,0	170,0	3,4	11940	8,1	380,0	940,0	370,0	2,5
	17H/18H	9230	8,5	400,0	690,0	170,0	4,1	9550	8,4	150,0	430,0	160,0	2,7
	00H/01H	3410	8,3	360,0	750	210	3,6	3460	8,1	150,0	240,0	100,0	2,4
Réseau Sud	09H/10H	14346	7,4	350,0	760,0	270,0	2,8	16786	8,0	590,0	1060,0	340,0	3,1
	13H/14H	17605	7,7	280,0	610,0	190,0	3,2	18113	8,1	770,0	1310,0	350,0	3,7
	17H/18H	12804	8,1	300,0	770,0	230,0	3,3	760	7,8	290,0	840,0	310,0	2,7
	00H/01H	6106	8,2	300,0	580,0	130,0	4,5	3038	8,1	46,0	270,0	93,0	2,9
Sortie CHU	09H/10H	57876	8,0	250,0	600,0	170,0	3,5	47106	7,6	1000,0	1330,0	500,0	2,7
	13H/14H	55865	7,9	53,0	290,0	87,0	3,3	42003	8,1	910,0	1220,0	420,0	2,9
	17H/18H	34904	8,2	140,0	320,0	80,0	4,0	22030	8,2	360,0	720,0	340,0	2,1
	00H/01H	16426	8,0	140,0	320,0	99,0	3,2	11388	7,7	300,0	370,0	180,0	2,1
Entrée STEP	06H/10H	450000	7,5	685,0	617,0	180,0	3,4	397500	7,1	940,0	1094,0	610,0	1,8
	10H/14H	872500	7,7	530,0	932,0	270,0	3,5	910000	7,6	510,0	975,0	360,0	2,7
	14H/18H	780000	7,5	445,0	859,0	190,0	4,5	775000	7,5	365,0	912,0	360,0	2,5
	18H/22H	695000	7,5	465,0	957,0	360,0	2,7	775000	7,5	400,0	852,0	410,0	2,1
	22H/06H	420000	7,5	360,0	772,0	330,0	2,3	462500	7,5	410,0	750,0	350,0	2,1
Milieu STEP	Moyen 24 h	652917	6,7	3310,0	18,2	500,0		620417	6,8	4210,0	177,0	890,0	
Sortie STEP	06H/10H	437500	7,7	3,6	20,2	2,0		345000	7,8	4,4	44,9	3,0	
	10H/14H	912500	7,7	8,8	13,8	2,0		917500	7,8	3,2	44,7	<2	
	14H/18H	802500	7,7	2,8	17,5	2,0		752500	7,8	3,2	41,3	3,0	
	18H/22H	697500	7,7	4,4	18,4	3,0		717500	7,8	2,8	36,9	2,0	
	22H/06H	533750	7,6	0,8	17,4	3,0		495000	7,8	2,8	41,9	<2	

Source des données : CHU de Poitiers

## 7.2. Concentrations obtenues pour les 3 biocides les plus spécifiques des activités de soins lors des 2 campagnes au niveau du CHU et de la station d'épuration du Grand Poitiers

Points de prélèvements	Créneaux horaires	Dilution pour analyses	Concentrations* en µg/L							
			DIDAC		Digluconate de chlorhexidine		bis(aminopropyl)laurylamine			
			Campagne 1	Campagne 2	Campagne 1	Campagne 2	Campagne 1	Campagne 2		
Réseau Nord	09H/10H	1/5	2936,6 +/- 281,0	3086,4 +/- 452,2	83,9 +/- 10,7	149,9 +/- 9,1	125,2 +/- 26,3	70,8 +/- 8		
	13H/14H		3921,0 +/- 819,1	3477,0 +/- 1491,3	53,9 +/- 25,2	71,1 +/- 8,2	87,4 +/- 24	51,7 +/- 3,1		
	17H/18H		1915,5 +/- 151,6	3939,4 +/- 622,9	79,7 +/- 12,9	44,0 +/- 3,1	< LQ	206,3 +/- 36,6		
	00H/01H		2594,4 +/- 395,1	1092,3 +/- 193,6	77,6 +/- 12,4	54,6 +/- 8,8	< LQ	< LQ		
Réseau Sud	09H/10H	1/2	638,4 +/- 72,6	675,0 +/- 57,6	49,7 +/- 10,3	49,6 +/- 2,8	20,8 +/- 7,6	16,5 +/- 1,5		
	13H/14H		958,9 +/- 253,3	1042,1 +/- 93,0	52,8 +/- 6,1	31,3 +/- 3,5	21,1 +/- 2,1	8,3 +/- 1,2		
	17H/18H		1519,9 +/- 236,0	1088,4 +/- 75,7	40,2 +/- 4,4	34,0 +/- 1,5	20,3 +/- 3,5	11,7 +/- 1,7		
	00H/01H		1730,7 +/- 568,1	1862,8 +/- 172,8	96,5 +/- 7,3	27,9 +/- 3,2	15,4 +/- 3,2	9,9 +/- 1,9		
Sortie CHU	09H/10H	1/5	1035,4 +/- 138,1	1160,7 +/- 97,8	47,4 +/- 12,1	43,9 +/- 5,5	56,2 +/- 11,2	77,8 +/- 6,8		
	13H/14H		1984,0 +/- 213,8	4349,9 +/- 376,7	42,5 +/- 10,7	52,1 +/- 5,4	51,2 +/- 10,2	78,8 +/- 5,9		
	17H/18H		2786,1 +/- 406,0	2608,5 +/- 222,7	95,1 +/- 9,9	45,0 +/- 5,6	79,8 +/- 4	267,5 +/- 44,2		
	00H/01H		2345,8 +/- 545,2	520,6 +/- 132,2	118,0 +/- 11,4	29,8 +/- 5,4	32,7 +/- 10,1	45,8 +/- 6,1		
Entrée STEP	06H/10H	1/2	119,4 +/- 18,1	92,7 +/- 8,7	4,8 +/- 1,3	3,8 +/- 0,6	< LQ	8,6 +/- 1,2		
	10H/14H		285,0 +/- 42,1	103,9 +/- 17,1	6,1 +/- 2,1	4,3 +/- 1,0	9,4 +/- 3,1	5,2 +/- 0,7		
	14H/18H		444,5 +/- 69,3	107,3 +/- 19,8	5,1 +/- 1,3	4,7 +/- 0,9	14,0 +/- 3,3	4,3 +/- 1,1		
	18H/22H		147,6 +/- 23,4	388,4 +/- 39,6	6,9 +/- 0,9	9,1 +/- 1,0	12,6 +/- 3,7	16,6 +/- 2,6		
	22H/06H		246,5 +/- 22,9	307,0 +/- 38,2	4,8 +/- 1,4	8,7 +/- 1,1	11,0 +/- 2,7	9,6 +/- 1,0		
Milieu STEP	Moyen 24 h	1/2	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ		
Sortie STEP	06H/10H	1/2	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ		
	10H/14H		< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ		
	14H/18H		< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ		
	18H/22H		< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ		
	22H/06H		< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ		
LQ** en µg/L		1/5	300,0		10,0		30,0			
		1/2	50,0		2,0		4,0			

Source des données : IC2MP

Nota bene : \*Analyse après centrifugation des échantillons ; \*\* la valeur affichée tient compte de la dilution utilisée pour faire les analyses

### 7.3. Teneurs en biocides les plus spécifiques des activités de soins dans les MES lors des 2 campagnes au niveau du CHU et de la station d'épuration du Grand Poitiers

Points de prélèvements	Créneaux horaires	Teneur dans les MES en ng/mg			
		DIDAC		Digluconate de chlorhexidine	
		Campagne 1	Campagne 2	Campagne 1	Campagne 2
Réseau Nord	09H/10H	5090,1	3020,8	53,5	47,9
	13H/14H	6949,3	4432,7	80,0	74,6
	17H/18H	2020,8	3108,9	44,4	164,1
	00H/01H	2146,4	3120,4	49,7	154,2
Réseau Sud	09H/10H	4715,4	2678,8	48,7	46,6
	13H/14H	6042,9	1932,7	64,8	30,6
	17H/18H	2320,1	1606,7	64,5	81,5
	00H/01H	6034,2	29840,1	60,7	501,5
Sortie CHU	09H/10H	7650,5	1184,0	124,8	22,8
	13H/14H	31110,0	1464,5	322,8	25,0
	17H/18H	11910,7	3896,6	133,7	64,0
	00H/01H	13155,1	4942,9	135,2	273,6
Entrée STEP	06H/10H	2570,6	1701,1	25,3	21,6
	10H/14H	3155,6	3110,0	33,0	39,3
	14H/18H	3835,2	4495,4	35,9	55,6
	18H/22H	3301,3	3023,0	31,9	38,0
	22H/06H	4738,7	3909,4	45,5	49,1
Milieu STEP	Moyen 24 h	546,5	546,5	15,9	10,1

Source des données : LCM



Agence Française pour la Biodiversité

Hall C – Le Nadar  
5, square Félix Nadar  
94300 Vincennes

01 45 14 36 00

[www.afbiodiversite.fr](http://www.afbiodiversite.fr)



Agence de l'Eau Loire Bretagne

Délégation Centre-Loire  
9, avenue Buffon  
CS 36339  
45063.Orléans Cedex 2

02 38 51 73 73

[www.eau-loire-bretagne.fr](http://www.eau-loire-bretagne.fr)