

Appel d'offre interne ECCOREV 2012



Effet de nanomatériaux sur l'efficacité des procédés de traitement des eaux usées par boue activée

Acronyme : **SLUDGE**

Axe ECCOREV concerné	AXE 4 : écodynamique et toxicologie environnementale		
Nom des coordinateurs	<i>Isabelle Seyssiecq</i>	<i>Melanie Auffan</i>	<i>Catherine Santaella</i>
Laboratoire membre d'ECCOREV	M2P2 UMR-6181	CEREGE UMR-6635	LEMIRE UMR-7265
Courriel des coordinateurs	<i>isabelle.seyssiecq@univ.u-3mrs.fr</i>	<i>auffan@cerège.fr</i>	<i>catherine.santaella@cea.fr</i>
Téléphone des coordinateurs	04 42 90 85 09	04 42 97 15 43	04 42 25 77 13

Résumé

À ce jour, le relargage dans l'environnement de nanoparticules (NPs) issues des nanotechnologies ne fait aucun doute. Une fois relarguées par un usage domestique, urbain ou encore industriel, les NPs seront transportées vers des stations de traitement des eaux usées (STEP). De nombreuses NPs possédant des effets cytotoxiques vis-à-vis des bactéries, nous proposons dans ce projet SLUDGE, d'étudier comment des NPs arrivant dans une STEP peuvent perturber les communautés bactériennes constituant les boues activées et altérer le fonctionnement des bioréacteur.

La diversité et la complémentarité des compétences des trois partenaires (M2P2, LEMIRE et CEREGE) permettront d'apporter des données novatrices sur l'effet de NPs sur l'efficacité des procédés de traitement des eaux usées.

Le Contexte

Même si le relargage dans l'environnement de nanoparticules (NPs) issues des nanotechnologies ne fait aucun doute, peu d'études ont réussi à estimer les rejets et doses probables dans le milieu naturel (Gottschalk et al. 2011). En 2009, Mueller et al. ont été les premiers à modéliser le relargage potentiel de NPs dans l'environnement (Mueller et al. 2009). Seules les NPs de TiO_2 possédaient une PEC (*predicted environmental concentrations*) supérieure au $\mu\text{g/L}$ (0.7-16 $\mu\text{g/L}$). Dans un cours d'eau, des mesures de concentration de NPs de TiO_2 issues de la lixiviation d'enduits muraux ont confirmé ces données (Kaegi et al. 2010). Une étude plus récente estime que dans le pire des scénarii, les quantités de NPs dans le Rhin en Suisse seraient de 0,01-1,6 $\mu\text{g/l}$ pour le TiO_2 et encore plus faible pour les NPs de ZnO ou d'Ag (Gottschalk et al. 2011). Si ces résultats se confirment, cela traduira le fait que la toxicité aiguë des NPs ne génère pas un problème environnemental majeur. En revanche, les risques d'apports chroniques de faibles doses de NPs dans des zones d'accumulation demandent à être étudiés attentivement.

Une fois relarguées dans l'environnement par un usage domestique, urbain ou encore industriel, les NPs seront transportées vers des stations de traitement des eaux usées (STEP). Les STEP jouent donc un rôle important dans le contrôle de la dispersion des NPs dans l'environnement. Une étude prédit qu'entre 2008 et 2012, les concentrations de NPs dans des sols traités avec des boues de STEP aux USA augmenteront de 0,1 à 0,5 mg.kg^{-1} pour les NPs de TiO_2 , de 6.8 à 22.3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les NPs de ZnO , et de 2,3 à 7,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les NPs d'Ag (Gottschalk et al. 2009). De telles NPs d' Ag_2S ont été directement observées dans des boues de STEP (Figure 1) (Kim et al. 2010).

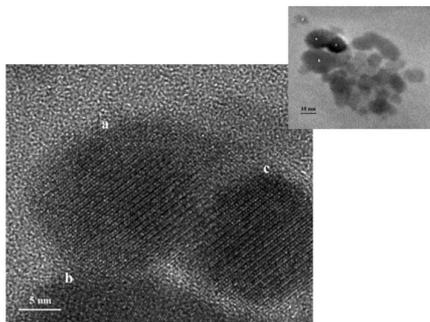


Figure 1. Photo de NPs de sulfure d'argent observées au TEM haute résolution dans les boues d'une unité de traitement des eaux du Midwest des US (d'après (Kim et al. 2010)).

La plupart des STEP utilisent des procédés de traitement biologique à partir de boues activées. Dans ce cas, l'activité microbienne contrôle la dégradation des polluants inorganiques et organiques. Or de nombreuses NPs possèdent des effets cytotoxiques (e.g. Ag, TiO_2 , ZnO , ZnS , CdSe , CeO_2). Ces effets dépendent de la nature chimique, de la stabilité chimique et colloïdales des NPs mais aussi des propriétés de surface des membranes cellulaires e.g. (Auffan et al. 2009; Thill et al. 2006; Zeyons et al. 2009). Des questions se posent donc sur la nature des interactions entre des NPs arrivant dans une STEP et les communautés bactériennes constituant les boues activées (e.g. modification de la structure des boues, perturbation des communautés bactériennes). De tels effets réduiraient l'efficacité des traitements biologiques et le relargage potentiel de polluants dans l'environnement.

Dans ce projet **SLUDGE**, nous proposons d'étudier comment des NPs cytotoxiques arrivant dans un bioréacteur pilote perturbent son fonctionnement. Plus précisément nous regarderons *i)* comment les NPs affectent les propriétés d'une boue activée (e.g. rhéologie, diversité microbienne, structuration de la boue), et *ii)* quelles sont les propriétés physico-chimiques des NPs qui contrôlent ces effets (e.g. aggrégation, dissolution, complexation de surface).

Le projet :

Les quantum dots (QD) sont un bon exemple de NPs candidates pour cette étude. Ils sont utilisés dans le domaine biomédical (imagerie, ciblage, vectorisation de médicaments) (Michalet et al. 2005) mais aussi dans l'électronique, l'opto-électronique et l'énergie solaire (Sanderson et al. 2009). Ce sont des semi-conducteurs dont les propriétés (absorption, émission) dépendent de la composition chimique (e.g. ZnO, ZnS, CdSe, CdTe) et de la taille. Plusieurs études menées sur des cultures bactériennes pures e.g. montrent que les NPs peuvent interagir soit avec les exopolymères soit directement avec les parois des bactéries et en se réduisant ou s'oxydant relarguer des ions toxiques ou encore induire un stress oxydatif. Dans le cas des QD, l'activité cytotoxique vis-à-vis de bactéries Gram+ et Gram- est principalement liée au relargage d'ions toxiques (Zn^+ , Cd^{2+} ...) (Fang et al. 2010; Huang et al. 2008; Jones et al. 2008; Kloepfer et al. 2005; Li et al. 2011; Premanathan et al. 2011). En revanche, la question de l'internalisation des QD par les bactéries reste ouverte (dissolution/reprécipitation, transport via les porines ou des récepteurs spécifiques lorsque les QDs sont fonctionnalisés).

A ce jour, bien que la plupart des études soient menées sur des cultures pures, quelques études ont concerné les effets des QD sur des communautés bactériennes. Par exemple, des NPs de ZnO dans les sols (0.05, 0.1, et 0.5 $mg.g^{-1}$ de sol) induisent une altération de la structure de la communauté bactérienne, une diminution de la biomasse et une diminution de l'activité enzymatique après 60 jours (Gé et al. 2008). Il est donc probable que de telles NPs présentent une activité cytotoxique affectant le métabolisme et la diversité des micro-organismes dans les boues, et par conséquent, le bon fonctionnement des bioréacteurs.

Le but du projet **SLUDGE** sera de comprendre comment le fonctionnement d'un bioréacteur pilote est affecté par la présence de NPs cytotoxiques. Plus spécifiquement, nous proposons de répondre aux questions suivantes :

- 1- Quel est le devenir physico-chimique de NPs dans un bioréacteur contenant des boues activées ?
- 2- Quels sont les effets induits par des NPs cytotoxiques sur le fonctionnement du bioréacteur ?
- 3- Quel sont les groupes de bactéries qui sont les plus impactés par la présence de NPs dans le bioréacteur ?
- 4- Quel est le bilan en terme d'efficacité de fonctionnement d'une boue de station d'épuration

Nous proposons de travailler avec 2 types de QDs: des QDs de CdSe/ZnS fonctionnalisés et non fonctionnalisés en surface. Cela permettra de mettre en évidence le rôle de l'enrobage dans l'activité antimicrobienne et le comportement physico-chimique des NPs dans le bioréacteur. Ces QDs seront fournies par Philippe Barthélémy de l'université Victor Segalen Bordeaux 2 (ChemBioMed, INSERM U869). Les échantillons seront livrés et conservés dans leur milieu de dispersion à la fin de la synthèse.

Pour cette étude, nous utiliserons un bioréacteur, du M2P2, de 10 litres, aéré en permanence à un débit d'air de 200 L/min. Dans ce bioréacteur, une biomasse épuratoire aérobie de traitement des eaux à une concentration de 20 g/L sera maintenue et développée. Ce réacteur sera alimenté avec un effluent synthétique à une charge polluante de 0,2 à 0,3 kg de DCO par kg de matière en suspension et par jour afin de mimer les conditions de fonctionnement d'une station d'épuration des eaux usées urbaines à moyenne charge. L'âge des boues du réacteur sera maintenu à 20 jours par des retraits quotidiens de biomasse afin de permettre la mise en place d'une flore microbienne. Il est prévu de faire fonctionner le bioréacteur sur une période supérieure à 2 mois afin de s'assurer de la stabilité de la biomasse obtenue. Des périodes d'anoxie seront mises en place régulièrement afin d'assurer une dénitrification de l'effluent.

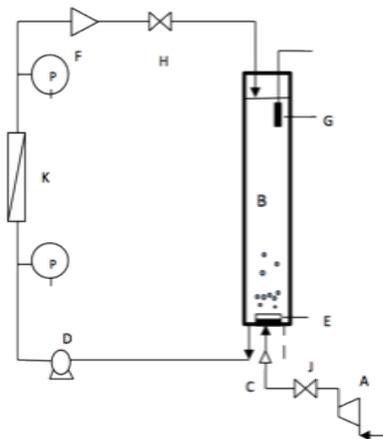


Figure 3. Schéma du bioréacteur : A : compresseur; B: bioreacteur; C: débitmètre air ; D : pompe de recirculation; E: poreux d'aération, F: débitmètre liquide; G: oxymètre ; H: vanne liquide; J: vanne gaz ; K: membrane.

Le suivi du fonctionnement du bioréacteur portera sur des paramètres d'activité de la biomasse et dévolution de la structure des floccs, à savoir:

- L'évolution de la concentration en biomasse (MES),
- L'évolution de la concentration en Carbone Organique Total (COT) et Azote Total (TN) de l'effluent,
- L'évolution de la concentration en Exopolysaccharides (EPS) dans les floccs bactériens et en polysaccharides dans l'effluent (PS),
- L'évolution du comportement et des paramètres rhéologiques des boues.

Les propriétés physico-chimiques des NPs (agrégation, dissolution, spéciation des atomes de surface) seront contrôlées en fonction des caractéristiques du bio-réacteur (e.g. taux d'oxygénation, présence de bactéries filamenteuses). En appui des techniques d'analyse chimique (ICP-AES, ICP-MS) pour la mesure des ions relargués en solution, et de caractérisation classiques des particules (HRTEM, DRX, diffusion dynamique de la lumière), le partenaire 1 mettra en œuvre des méthodes de caractérisation locale qui apportent des informations cruciales sur la spéciation des atomes de surface et la cristallinité comme l'absorption des rayons X. Des demandes de temps de faisceau sur synchrotron seront faites pour le deuxième semestre 2012 afin d'être opérationnel dès les premiers mois de l'étude. Ces outils permettront de suivre la biotransformation des NPs au sein du bioréacteur. De plus, des imageurs 2D et 3D utilisant les rayons X seront utilisés afin d'étudier finement la distribution des NPs dans les floccs.

L'impact des NPs sur la structure des communautés bactériennes des boues activées exposées ou non aux NPs, sera déterminé par extraction d'ADN des floccs de boues activées. Le gène *rrs* codant pour l'ARNr 16S sera amplifié avec des amorces universelles. La séquence des amplifiats sera caractérisée par une technique de séquençage « haut débit », le pyroséquençage. Cette technique s'affranchit des étapes de clonage et permet d'estimer la biodiversité en terme d'abondance et de richesse et la structure des communautés. Les prélèvements de boues activées seront effectués en fin de cycle d'épuration et/ou en fonction des mesures de l'évolution de la biomasse. L'observation des boues activées en microscopie confocale à balayage laser pourra permettre de localiser les NPs et d'estimer leur répartition entre la matière organique, les cellules et les exopolymères, après marquage par des sondes.

La diversité et la complémentarité des compétences des trois partenaires permettront d'apporter des données novatrices sur l'effet de NPs sur l'efficacité des procédés de traitement des eaux usées. Cela nous permettra d'évaluer l'importance d'une possible accumulation des NPS dans ces zones et de contribuer à la modélisation des risques environnementaux liés aux Nanotechnologies. Ce projet exploratoire a plusieurs implications : il permet de développer une forte coordination avec DUKE et le centre US-CEINT dans le cadre d'une thèse en co-tutelle AMU et DUKE mais aussi de préparer un projet dans le cadre soit d'un programme européen soit ANR futur.

Ce projet s'intègre à la fois dans l'axe 4 "Ecotechnologies et développement durable" et dans l'axe 3 « **Ecodynamique et toxicologie environnementale** » de la FR-ECCOREV, puisque qu'il renforce les liens entre des physico-chimistes, des spécialistes des procédés, et des biologistes afin de prédire l'impact des NPs et de favoriser le développement des nanotechnologies de façon durable.

Personnes impliquées

M2P2	I. Seyssiecq	Maitre de Conférences	Génie de Procédés
CEREGE	M. Auffan A. Masion JY. Bottero	CR2-CNRS CR1-CNRS DRCE-CNRS	Physico-chimie
LEMIRE	C. Santaella M. Bertrand	CR1-CNRS Tech-CNRS	Microbiologie-Imagerie Analyse de la diversité-Pyroséquençage
AMU-DUKE	L. Barton	Doctorante	

Porteur M2P2 : Isabelle Seyssiecq

Maître de Conférences en 62ème section, IUT de Marseille, UMR 7340.

Enseignements: C / TD et TP de génie des procédés (opérations unitaires, transfert de chaleur...), TP en Instrumentation / Régulation. **Public:** étudiants en DUT Chimie et en Licence professionnelle Gestion et contrôle des procédés chimiques.

Thème de recherche depuis 2002 (laboratoire M2P2 UMR 6181):

Etude des propriétés rhéologiques des boues de station d'épuration, appliquée à l'optimisation des procédés de traitement des eaux usées.

Administratif: IUT Marseille, au sein du département chimie (200 étudiants inscrits en DUT) : **Directeur d'études de seconde année depuis septembre 2010.** Fonctions antérieures: Responsable des relations internationales : stage et poursuites d'études à l'international, 10ans, puis Responsable des poursuites d'études pendant 2 ans.

UMR 7340: membre élu représentant du collège B au conseil de l'UMR, 4 ans (2005-2008) UPCAM : membre titulaire représentant du collège B au sein de la commission de spécialiste 62ème section de l'Université Paul Cézanne Aix-Marseille (UPCAM) puis depuis 2008, au Comité de Sélection de la 62ème section de l'UPCAM.

Most significant publications:

E. Barbot, I. Seyssiecq, N. Roche, B. Marrot, "Inhibition of activated sludge respiration by sodium azide addition: Effect on rheology and oxygen transfer", *Chemical Engineering Journal* 163 (2010) 230–235.

Mori M., Isaac J., Seyssiecq I.*, Roche N., Effect of measuring geometries and of Exocellular Polymeric Substances on the rheological behaviour of sewage sludge, *chemical engineering research and design*, 86 (2008) 554 – 559.

Seyssiecq, I.*, Marrot, B., Djerroud, D., Roche, N., In-situ tri-phasic rheological characterisation of activated sludge in an aerated bioreactor, *Chemical Engineering Journal*, 142 (2008) 40–47.

Porteur LEMIRE : Catherine SANTAELLA

Chargée de Recherche CNRS
HdR depuis 1995

Née le 31 janvier 1963 à Villeurbanne (69), Mariée, deux enfants

Biologie Végétale et Microbiologie Environnementale, UMR 7265 CNRS-CEA-Univ Marseille
Laboratoire d'Écologie Microbienne de la Rhizosphère et des Environnements Extrêmes (LEMIRE)

Thématiques de Recherche Développées

Rhizosphère et interactions plantes-bactéries

Impact environnemental de nanoparticules et nanomatériaux

Rôle de biofilms dans l'interaction plante-éléments trace et nanoparticules

Publications en rapport avec le projet

The exopolysaccharide of *Rhizobium sp.* YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. Catherine Santaella, Mathieu Schue, Odile Berge, Thierry Heulin and Wafa Achouak. *Environ. Microbiol.* 2008, 10(8), 2150-2163.

Modulation of metabolism and switching to biofilm prevail over exopolysaccharide production in the response of *Rhizobium alarii* to cadmium. Mathieu Schue, Agnes Fekete, Philippe Ortet, Catherine Brutesco, Thierry Heulin, Philippe Schmitt-Kopplin, Wafa Achouak and Catherine Santaella. *PLoS ONE* 6(11): e26771.

Ecotoxicity of inorganic nanoparticles: from unicellular organisms to invertebrates. M. Auffan, C. Santaella, A. Thiéry, C. Paillès, J. Rose, W. Achouak, A. Thill, A. Masion, M. Wiesner, J-Y Bottero. In *Encyclopedia of nanotechnology*, Eds Springer, 2012, xxx.

Porteur CEREGE : Mélanie AUFFAN

32 ans, CR2-CNRS

Academic and professional experience:

2004-2007: PhD in Geosciences of the Environment (Aix-Marseille University).

2007-2009: Research Associate at Duke University, North Carolina, USA.

Since 2009: Member of the CEINT steering committee (NSF-EPA) Center for the Environmental Implications of Nanotechnology.

Since 2009: Member of the GDRi-iCEINT (CEA-CNRS) international consortium for the environmental implications of nanotechnology

Most significant publications: 21 scientific articles

Auffan M, Achouak W, Rose J, Chaneac C, Waite DT, Masion A, Woicik J, Wiesner MR, Bottero JY. 2009a. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity towards *Escherichia coli*. *Environmental Science and Technology* 42(17):6730-6735.

Auffan M, Bottero JY, Chaneac C, Rose J. 2010. Inorganic manufactured nanoparticles: How their physico-chemical properties influence their biological effects in aqueous environments. *Nanomedicine* 5(6):999-1007.

Auffan M, Rose J, Orsiere T, De Meo M, Thill A, Zeyons O, Proux O, Masion A, Chaurand P, Spalla O, Botta A, Wiesner MR, Bottero JY. 2009b. CeO₂ nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts in vitro. *Nanotoxicology* 3(2):161-171.

Auffan M, Rose J, Wiesner MR, Bottero JY. 2009c. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential toxicity in vitro. *Environmental Pollution* 157:1127-1133.

Demande financière

Aide total demandée a ECCOREV : 6000 euros

- Aide demandée par le M2P2 : **2000 euros**

Type de mesure / produit	Coût unitaire	Nombre d'échantillons	Total (€HT)
Mesures pour le suivi du fonctionnement du bioréacteur	16 €HT/jour	70	1000 €HT
Alimentation du bioréacteur en substrat synthétique	13 €HT/jour	70	1000 €HT
TOTAL			2000 €HT

- Aide demandée par le CEREGE : **2000 euros**

L'aide demandée correspond principalement aux coûts des analyses ICP, XAS et MET.

Type de mesure / produit	Coût unitaire	Nombre d'échantillons	Total (€HT)
ICP-MS	100 €HT/heure	~ 30	800 €HT
XAS	Frais de mission	2 jours	300 €HT
MET	450 €HT par jour	2 jours	900 €HT
TOTAL			2000 €HT

- Aide demandée par le LEMIRE : **2000 euros**

Réactifs biologie moléculaire (kit d'extraction d'ADN et PCR) : 500 €

Pyroséquençage : 1500 €.

Imagerie

Annexe 1: Références citées

- Auffan M, Achouak W, Rose J, Chaneac C, Waite DT, Masion A, Woicik J, Wiesner MR, Bottero JY. 2009. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity towards *Escherichia coli*. *Environmental Science and Technology* 42(17):6730-6735.
- Fang XH, Yu R, Li BQ, Somasundaran P, Chandran K. 2010. Stresses exerted by ZnO, CeO₂ and anatase TiO₂ nanoparticles on the *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Colloid and Interface Science* 348(2):329-334.
- Gottschalk F, Ort C, Scholz RW, Nowack B. 2011. Engineered nanomaterials in rivers : exposure scenarios for Switzerland at high spatial and temporal resolution. *Environmental Pollution* 159(12):3439-3445.
- Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW, Nowack B. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environ Sci Technol* 43(24):9216-22.
- Huang Z, Zheng X, Yan D, Yin G, Liao X, Kang Y, Yao Y, Huang D, Hao B. 2008. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir* 24:4140-4144.
- Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. 2008. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 279(1):71-76.
- Kaegi R, Sinnert B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Mueller E, Vonbank R, Bollner M, Burkhardt M. 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environmental Pollution* 158(9):2900-2905.
- Kim B, Park C-S, Murayama M, Hochella MF. 2010. Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products. *Environmental Science & Technology* 44(19):7509-7514.
- Kloepfer JA, Mielke RE, Nadeau JL. 2005. Uptake of CdSe and CdSe/ZnS quantum dots into bacteria via purine-dependent mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology* 71(5):2548-2557.
- Li M, Zhu LZ, Lin DH. 2011. Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: Mechanism and the influence of medium components. *Environmental Science & Technology* 45(5):1977-1983.
- Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 307(5709):538-544.
- Mueller NC, Som C, Nowack B. Exposure modeling of engineered nanoparticles. *Nanotech conference & expo 2009, vol 1, technical proceedings - nanotechnology 2009: Fabrication, particles, characterization, mems, electronics and photonics*. Crc Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, 159-162 pp. (2009).
- Premanathan M, Karthikeyan K, Jeyasubramanian K, Manivannan G. 2011. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 7(2):184-192.
- Thill A, Zeyons O, Spalla O, Chauvat F, Rose J, Auffan M, Flank AM. 2006. Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environ. Sci. Technol.* 40(19):6151-6156.
- Zeyons O, Thill A, Chauvat F, Menguy N, Cassier-Chauvat C, Oreat C, Daraspe J, Auffan M, Rose J, Spalla O. 2009. Direct and indirect CeO₂ nanoparticles toxicity for *E. coli* and *Synechocystis*. *Nanotoxicology* 3(4):284-295.