

**CONTRAT DE RECHERCHE**

**AGENCE DE L'EAU RHIN-MEUSE**

et

**ENSAIA**

**UNIVERSITE DE METZ**

**RAPPORT FINAL**

**MOBILITE D'HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES  
OU DE LEURS METABOLITES DANS UN SOL AYANT RECU DES  
BOUES D'EPURATION**

**Réalisation de microlysimètres et évaluation de la mutagénicité**

**ETUDE 1996 - 1998**

**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE d'AGRONOMIE  
& des INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES (ENSAIA)**

**Prof. M. SCHIAVON**

**2, Avenue de la Forêt de Haye, BP 172.**

**54505 VANDOEUVRE LES NANCY.**

**Tél 03 83 59 59 59 Fax 03 83 59 58 04**

et

**CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT (C.S.E.)**

**Prof. P. VASSEUR**

**Collaborateurs : C. RAST, M.O. FOUCHECOURT, S. VANDEWEGHE**

**1, rue des Récollets. BP 4025.**

**57040 METZ Cédex.**

**Tél 03 87 75 81 81. Fax 03 87 75 81 89.**

## RESUME

L'objectif général de l'étude est l'évaluation du risque de transfert vers les eaux souterraines des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) contenus dans les boues de stations d'épuration, lors d'une application sur un sol agricole. Ce risque a été apprécié par le caractère mutagène et la teneur en HAPs des percolats générés à partir de sols traités.

L'étude a été réalisée à l'aide de colonnes de sols dont la structure naturelle a été respectée. Les colonnes de sols ont été placées à l'extérieur, exposées aux intempéries et percolées par les eaux de pluies. La mutagénicité a été évaluée à l'aide du test d'Ames en milieu liquide (test de fluctuation), cette méthode s'étant révélée très sensible lors d'une étude préliminaire de la mutagénicité de HAPs type (benzo(a)pyrène, benzo(b) fluoranthène, anthracène, dibenz(a,h)anthracène).

La première étude de percolation conduite en 1997 n'a pas permis d'évaluer la migration de polluants provenant des boues. En effet, toutes les colonnes qu'il s'agisse de sols témoins ou traités relarguaient des percolats mutagènes. L'étude du sol des parcelles ayant servi à la préparation des colonnes a confirmé le caractère mutagène intrinsèque de ces sols « agricoles ». Nous avons donc recherché des parcelles de sol réellement vierges de tout traitement phytosanitaire antérieur, et testé leur qualité avant de relancer la seconde série d'essais de percolation. Nous avons simultanément vérifié que les boues à étudier libéraient bien des lixiviats mutagènes, détectables par le test mis en oeuvre.

La 2ème partie de l'étude a été recommencée début août 1997. Les colonnes ont été laissées se stabiliser plusieurs mois. La vérification de la qualité du sol a été effectuée sur les percolats recueillis en janvier. Le traitement par les boues a eu lieu en février 1998. Plusieurs séries de percolats ont été analysées d'avril à fin septembre. En juillet et en août, compte tenu d'une sécheresse particulièrement marquée en Lorraine, les eaux pluviales n'ont pas suffi à percoler les colonnes de manière suffisante pour pouvoir procéder aux analyses programmées au cours de ces deux mois. Il a fallu faire des aspersion d'eau de ville à deux reprises, pour avoir un volume de percolats satisfaisant.

Le dosage des HAPs n'a pas révélé la présence de ces substances dans les eaux de percolation. Les essais de mutagénicité n'ont pas permis de déceler un caractère mutagène lié au traitement des sols par les boues. Un caractère mutagène a été trouvé dans les échantillons témoins ou traités obtenus après aspersion d'eau de ville en août : cette positivité est apparue résulter de la qualité de l'eau de robinet utilisée, qui s'est révélée mutagène.

Les tests Mutatox ont donné des résultats surprenants, qui témoignaient d'une mutagénicité élevée des premiers échantillons, provenant aussi bien des colonnes témoins que des colonnes traitées. L'existence d'un facteur chimique dans les percolats qui interférait avec les résultats du test, était évident. Ce facteur n'a pu être identifié au cours de cette étude.

En conclusion, aucune mobilité des HAPs n'a pu être mise en évidence dans les eaux de percolation au cours des neuf mois qui ont suivi l'application des boues aux sols des colonnes. Le résultat des analyses de HAPs et celui des tests d'Ames de fluctuation sont restés négatifs lorsque les colonnes ont été percolées par les eaux pluviales. Une positivité a par contre été observée après aspersion des sols par l'eau de ville en août, ce qui s'est expliqué par le caractère mutagène de l'eau. Ce résultat confirme la sensibilité du test d'Ames en milieu liquide.

Il est difficile enfin de recommander l'utilisation du test Mutatox pour le suivi de la qualité des sols, tant que les facteurs interférant avec la réponse du test n'auront pas été identifiés.

## SOMMAIRE

<b>I. INTRODUCTION</b>	4
<b>II. MATERIEL ET METHODES</b>	4
II.1. Préparation des colonnes	4
II.2. Dosage des HAPs dans les percolats	6
II.3. Essais de mutagénicité	7
Test d'Ames	
Test Mutatox	
II.4. Echantillons analysés	9
Substances testées (HAPs)	
Percolats	
Extraits organiques des percolats	
Sols et boues de station d'épuration	
<b>III. RESULTATS</b>	10
III.1. Sensibilité des essais de mutagénicité aux HAPs étudiés	10
III.2. Essais de percolation. 1 <sup>ère</sup> série	11
II.2.a. Percolats	
Tests d'Ames	
Tests Mutatox	
II.2.b. Extraits organiques testés avec le test d'Ames	12
III.3. Essais des sols	12
La Bouzule (2 <sup>ème</sup> échantillon/ mai 97)	
Sols de parcelles non traitées sur le site de la Bouzule	
pélosol	
sol brun sous prairies	
III.4. Essais des boues	12
III.5. Essais de percolation. 2 <sup>ème</sup> série	13
II.5.a. Essais de mutagénicité sur percolats et extraits organiques	
Tests d'Ames	
Tests Mutatox	
II.5.b. Analyse des HAPs dans les percolats	14
<b>IV. DISCUSSION</b>	14
<b>V. CONCLUSION</b>	15
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	16
<b>TABLEAUX 2 à 13</b>	
<b>FIGURES 1 et 2</b>	
<b>ANNEXES A (tableaux A1 à A5) : 1<sup>ère</sup> étude. Percolats / Tests d'Ames</b>	
<b>B (tableaux B1 à B5) : 1<sup>ère</sup> étude. Percolats / Tests d'Ames</b>	
<b>C (tableaux C1 à C3) : Test de mutagénicité (Ames) des sols et des boues</b>	
<b>D (tableaux D1 à D11) : 2<sup>ème</sup> étude. Percolats et ext. organiques / Tests d'Ames</b>	
<b>E (tableaux E1 à E5) : 2<sup>ème</sup> étude. Percolats et eaux / Tests Mutatox</b>	



## I. INTRODUCTION

L'étude a pour objet d'évaluer le risque de transfert vers les eaux souterraines des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) contenus dans les boues d'épuration, en cas d'application sur des sols agricoles. L'agriculture utilise en effet comme amendement organique et fertilisant une partie des boues produites par les stations d'épuration domestiques. Afin d'évaluer la mobilité des HAPs dans les sols, une étude a été menée à l'aide de colonnes de sol à structure naturelle, qui seront traitées à l'aide d'une boue provenant d'une station urbaine, et en suivant la qualité des eaux pluviales ayant percolé les colonnes. Les percolats ont été analysés pour leur caractère mutagène et leur teneur en HAPs.

La mutagénicité est évaluée à l'aide du test d'Ames en milieu liquide (test de fluctuation). Des tests Mutatox ont été réalisés en parallèle dans certains cas. Le test d'Ames de fluctuation a été choisi à la suite d'une étude préliminaire ayant montré que les conditions en milieu liquide augmentaient beaucoup la sensibilité du test d'Ames.

L'étude préliminaire comparant la sensibilité du test d'Ames mis en œuvre dans les conditions standards sur milieu gélosé à celles du test en milieu liquide et du test Mutatox, a été réalisée sur les HAPs suivants : benzo(a)pyrène (BaP), benzo(b)fluoranthène (BbF), anthracène, dibenzanthracène (DBA).

La première étude de percolation a été lancée en 1996. Les colonnes ont été traitées début 1997, puis les percolats analysés pendant six mois. Cette étude a permis d'identifier certains problèmes liés à l'utilisation de sols agricoles. La deuxième étude, lancée à la suite de la précédente en août 1997, a été conduite jusque fin septembre 1998.

Les boues ont été ajoutées au sol des colonnes à des doses conformes à la réglementation. Le décret du 29 août 1988 : norme NFU 44041 (AFNOR) fixe les modalités d'épandage des boues de stations d'épuration urbaines. Il définit la quantité maximale épandable, qui est de 30 tonnes de matières sèches /ha / an sur 10 ans. Lors de la première étude, le traitement a été de l'ordre de 7,5 tonnes de boues /ha. Dans la deuxième étude, il était équivalent à la valeur maximale de 30 t MS/ha / an sur 10 ans.

Les teneurs en HAPs des boues sont réglementées compte tenu du caractère mutagène et cancérigène de nombreux représentants de la catégorie des dérivés polycycliques comptant plus de 4 cycles aromatiques accolés. Les valeurs limites en fluoranthène, benzo(b)fluoranthène et benzo(a)pyrène ont été définies par le décret du 8 janvier 1998.

## II. MATERIEL ET METHODES

### II. 1. PREPARATION DES COLONNES DE SOLS A STRUCTURE NATURELLE

#### 1<sup>ère</sup> étude 96-97

Dix colonnes de Sol Brun Lessivé (diamètre 24 cm, hauteur 60 cm) ont été prélevées le 3 avril 1996 sur la parcelle expérimentale de « La Bouzule » (54 Champenoux) [photo 1]. Les caractéristiques physicochimiques du sol retenu pour cette expérimentation sont données dans le tableau 1.

Ces colonnes ont été immédiatement ramenées à l'ENSAIA à Nancy pour être équipées d'un système permettant la collecte des percolats. Elles ont été ensuite placées à l'extérieur, dans un grand bac rempli de terre assurant leur maintien en position verticale et leur régulation thermique. La base de chaque colonne a été alors reliée à un récipient en verre de 10 l et la mesure du volume des percolats a été assurée après chaque évènement pluvieux.

Compte tenu de la pluviométrie enregistrée jusqu'au 27 janvier 1997, on a pu estimer que 6 colonnes fonctionnaient de manière similaire ; cinq d'entre elles ont été sélectionnées pour la poursuite de l'expérimentation.

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques du sol brun lessivé utilisé au cours des deux études

	Profondeur cm	pH eau	granulométrie (%)			CEC me/100g	% Matière organique
			Argiles	Limons	Sables		
1 <sup>ère</sup> étude	0-20	6,2	29	55	15	14,2	1,4
	25-40	6,5	32	50	16	12,8	
	40-60	6,6	38	47	14	16,7	
2 <sup>ème</sup> étude	5-20	6,3	27	54	17		2,7
	20-40	6,4	34	50	14		0,4

### ***Traitement des colonnes***

Les 5 colonnes sélectionnées ont été traitées le mardi 28 janvier 1997, à raison de 30 tonnes de boues humides par hectare. Celles-ci ont été incorporées dans les 5 premiers cm de sol.

### ***Collecte des percolats***

La pluviométrie a été relativement faible au début de l'étude, une période de sécheresse hivernale ayant succédé à quelques semaines de froid intense. La majorité des percolats a été obtenue à partir d'avril 97. Le calendrier des prélèvements et les volumes récupérés sont mentionnés dans le tableau 2a. Un volume total de 10 l environ a été recueilli de janvier à mi-juin.

Les percolats collectés ont été envoyés au C.S.E. à Metz, le jour de la collecte ou quelques jours plus tard. Les essais de mutagénicité et les extractions organiques ont été commencés le jour même ou le lendemain de l'arrivée des échantillons au laboratoire.

Les percolats ont été gardés à 4°C et à l'obscurité, ou congelés à -20°C, pendant toute la durée des essais.

### **2<sup>ème</sup> étude 97-98**

La 2<sup>ème</sup> série d'essais de percolation a été conduite selon un principe identique à celui de la première étude. Les conditions expérimentales résumées dans le tableau 3 sont dans l'ensemble équivalentes. Elles diffèrent cependant sur les points suivants :

- prélèvement du sol brun lessivé (début août 98) sur une parcelle du domaine de la Bouzule ***en prairie et exempt de tout traitement depuis 1972,***
- ***contrôle des percolats du sol avant l'application des boues,*** afin de vérifier l'absence de mutagénicité des percolats avant traitement des colonnes
- application des boues à raison de ***30 t de matières sèches /ha/an*** dans les cinq premiers cm de sol des colonnes « traitées », au lieu de 30 t de matières humides /ha/an dans la 1<sup>ère</sup> étude.
- utilisation de ***six colonnes,*** comprenant 3 colonnes témoins (au lieu de 2 précédemment) et 3 traitées
- ***aspersion des colonnes par l'eau de ville à deux reprises,*** afin de pallier à la sécheresse.

### ***Traitement des colonnes***

Chaque colonne « traitée » a reçu 518 g de boues humides, ce qui équivaut à 136 g de matières sèches, sur une surface de 452 cm<sup>2</sup> (diamètre des colonnes 24 cm). L'humidité relative des boues utilisées a été mesurée et évaluée à 73,7%.

### ***Collecte des percolats***

Les conditions climatiques, et notamment la sécheresse de l'année 1998, ont été peu favorables à l'obtention des percolats. De ce fait, certains prélèvements avaient un volume réduit et il a fallu dans certains cas procéder à une irrigation artificielle par aspersion lorsqu'aucun percolat ne pouvait être obtenu après 4 semaines, par suite d'une pluviométrie très basse, voire nulle. L'eau de ville a été utilisée pour ces aspersion, qui ont été réalisées en juillet et en août 98. En effet, l'année 1998 a été marquée par deux périodes particulièrement sèche en Lorraine : février-mars et juillet-août.

Le volume des percolats recueillis est reporté dans le tableau 2b. Lorsque le volume est supérieur à 1250 ml, 250 à 500 ml sont prélevés pour l'analyse des HAPs par HPLC et 1000 ml sont apportés au CSE de Metz pour la réalisation des essais de mutagénicité.

Lorsque le volume est inférieur à 1l, le prélèvement d'une aliquote pour analyse des HAP n'est pas effectué.

Si l'on considère une porosité du sol de l'ordre de 50% et si l'on fait abstraction des circulations préférentielles et de l'eau « immobile », le renouvellement total de l'eau de la colonne a été obtenu approximativement à la date du 20 juillet 98.

Le calendrier des opérations au cours des deux séries d'étude est résumé dans le tableau 3.

## **II. 2. Dosage des HAPs**

### ***- Extraction***

250 ml de percolats sont extraits 3 fois successivement par agitation pendant 5 min en présence de 50 ml de dichlorométhane. Les 3 extraits sont regroupés, puis le dichlorométhane est évaporé à sec sous vide à basse température (30°C). Les résidus sont solubilisés dans 1 ml d'acétonitrile en vue d'analyse (facteur de concentration = 250).

### ***- Dosage***

Le dosage est effectué par HPLC sur un appareil Varian équipé d'un détecteur à barette de diodes dans les conditions suivantes :

- . détection : 268 nm
- . éluant : acétonitrile-eau
- . débit : 0,8 ml/min
- . gradient :     0 min : 60-40  
                  15 min : 90-10  
                  16 min : 95-5
- . durée du chromatogramme : 30 min
- . temps d'équilibration : 6 min
- . colonne : Merck, RP 18,
- . injection automatique 20 µl

Dans ces conditions, la limite de quantification est inférieure à 0,1 µg/l d'eau.

## II.3. ESSAIS DE MUTAGENICITE

### III.3.a. TEST D'AMES ou ESSAI DE MUTATION REVERSE SUR BACTERIES *Salmonella typhimurium his<sup>-</sup>*

#### Principe du test d'Ames

Ce test est réalisé sur mutants *Salmonella typhimurium his<sup>-</sup>* (Ames *et al.*, 1975). Ces mutants sont incapables de synthétiser l'histidine et de pousser sur un milieu gélosé dépourvu de cet acide aminé. Exposées à des substances mutagènes, ces bactéries "mutants" peuvent retourner à l'état "sauvage", récupérant simultanément la capacité de synthétiser l'histidine.

Le principe du test consiste à exposer en milieu gélosé, ces bactéries pendant 48 heures à 37°C à différentes concentrations de l'échantillon à analyser. Les essais sont réalisés avec et sans activation métabolique (S9). La fraction S9 contient les enzymes et les cofacteurs nécessaires à la biotransformation des mutagènes qui ne sont actifs que par leurs métabolites.

Des contrôles positifs et des témoins "solvant" et témoins "stérilité" sont effectués simultanément.

Le caractère mutagène direct ou indirect est établi en fonction de la présence ou non d'activation métabolique exogène dans le milieu d'essai :

- si une réponse positive est obtenue en l'absence d'activation métabolique (-S9), on peut considérer que les substances responsables sont des mutagènes "directs",
- si une activation métabolique (+ S9) est nécessaire pour que s'exprime le caractère mutagène, il s'agit de mutagènes "indirects".

***Comme les conditions expérimentales favorisent la croissance bactérienne, il est indispensable d'éviter toute contamination du milieu d'essai qui introduirait des bactéries autres que *Salmonella typhimurium his<sup>-</sup>* et fausserait les résultats. Un traitement de stérilisation par filtration sur membranes (0,22µm) a donc été appliqué aux échantillons bruts avant les essais.***

Le test d'Ames est réalisé classiquement en milieu gélosé selon Maron et Ames (1983). Nous avons suivi les recommandations de ces auteurs pour la mise en œuvre de ces essais dans l'étude préliminaire des HAPs.

Une méthode en milieu liquide, appelée « test de fluctuation », a été proposée récemment afin d'accroître les performances de l'essai.

#### Méthodologie du test de fluctuation ou test d'Ames en milieu liquide

Le test de fluctuation est effectué sur les mêmes souches de mutants *Salmonella typhimurium his<sup>-</sup>* que celles préconisées par Ames. Il se différencie de la méthode classique par les conditions expérimentales suivantes :

- exposition des bactéries en milieu liquide (5 jours à 37°C) et non sur un milieu gélosé (48h),
- détection de la croissance des mutants réverses par virage au jaune du violet de bromocrésol.
- essai en microplaques (de 96 puits), avec une microplaque par concentration testée.

Ce test a pour avantages de :

- (1) permettre une lecture aisée des résultats (virage de l'indicateur coloré détectable à l'oeil nu).

(2) présenter une sensibilité accrue par rapport au test d'Ames classique sur gélose, dans la mesure où le contact entre les micropolluants de l'échantillon testé et les bactéries est favorisé en milieu liquide.

(3) être plus rapide pour ce qui concerne la lecture.

Le test est réalisé à pH 7,2 sur les souches TA 98 et TA 100.

Des contrôles de stérilité et des contrôles positifs sont effectués parallèlement aux tests des échantillons à analyser.

Les substances utilisées comme contrôles positifs sont les suivantes :

. *sans activation métabolique*

NF : 2-nitrofluorène : 0,3 à 0,5 µg/ml pour TA 98

NaN<sub>3</sub> : azide de sodium : 25 ng/ml pour TA 100

. *avec activation métabolique*

BaP : benzo(a)pyrène : 0,3 à 0,5 µg/ml.

L'échantillon est testé à différentes concentrations comprises entre 0 et 100%, avec ou sans activation métabolique (S9). Après l'ajout de l'inoculum bactérien, le milieu est réparti dans les 96 puits de la microplaque. Les microplaques sont incubées à 37°C.

Après cinq jours d'incubation, les microplaques sont lues pour déterminer le nombre de puits positifs (jaunes). Le milieu initialement mauve, vire au jaune par suite de l'acidité du milieu due à la croissance bactérienne. Les résultats sont exprimés par le nombre de puits de la microplaque où la croissance des mutants réverses a été suffisamment importante pour entraîner le virage de l'indicateur coloré. Pour chaque concentration, le résultat est comparé au témoin.

Un test du chi-deux est réalisé pour l'interprétation statistique des résultats. Une concentration est considérée donner un résultat positif si le nombre de puits colorés en jaune dans les microplaques «essais» dépasse le nombre limite donné par une table du chi-deux, lequel est fonction du nombre de puits positifs des microplaques «témoins». Une table établie par Gilbert (1980) donne directement le seuil de positivité à partir de la valeur des témoins.

Un échantillon est déclaré mutagène lorsque :

- la positivité testée par le test du chi-2, est obtenue pour deux concentrations successives,
- une relation dose effet est observée,
- et que la positivité est confirmée sur les deux souches (TA 98 ou TA 100) ou confirmée

au cours de la série d'essais répliquée.

Si l'une de ces conditions fait défaut, un caractère mutagène peut être seulement suspecté et le résultat est considéré à la limite de la positivité (résultat marqué (+) dans le tableau récapitulatif).

Lorsque le résultat est positif pour une seule concentration (valeur isolée non confirmée avec l'autre souche ou dans la série d'essai dupliqué), le caractère non mutagène de l'échantillon ne peut être affirmé (résultat marqué (-) dans le tableau récapitulatif).

### **II.3.b. TEST MUTATOX SUR BACTERIES mutants *Vibrio fischeri*.**

Ce test a été développé à partir des travaux de Ulitzur (1986) par la Société Microbics (maintenant dénommée « Azur Environnement »). Le test utilise les mutants non luminescents *Vibrio fischeri* (souche M 169). En présence d'agents mutagènes, les bactéries peuvent subir une mutation reverse qui les fait récupérer leur propriété de luminescence.

La luminescence est mesurée à l'aide d'un bioluminomètre identique à celui utilisé dans le test Microtox. Les essais sont réalisés à l'aide de réactifs lyophilisés gardés à -20°C et reconstitués au moment de l'emploi. Le protocole est décrit dans le manuel MUTATOX™ (Microbics, 1993).

Comme dans le test d'Ames, les essais sont réalisés avec ou sans activation métabolique, c'est-à-dire avec ou sans ajout du mélange S9 mix contenant les enzymes et les cofacteurs nécessaires à la biotransformation des xénobiotiques. Les essais en présence de S9 mix requièrent une étape d'incubation préalable du milieu enzymatique avec l'échantillon pendant 45 minutes à 35°C. L'exposition des bactéries à l'échantillon, avec et sans S9, se fait en milieu liquide à 27°C pendant 24 heures. La luminescence est mesurée à intervalles réguliers dès 16 heures d'exposition.

L'échantillon est testé à différentes concentrations obtenues par dilutions successives du milieu le plus concentré. Il n'est pas nécessaire de stériliser les échantillons analysés avant de réaliser ces essais. Les contrôles positifs sont les suivants :

- sans activation métabolique : 9 AA testé aux concentrations de 10 à 0,02 µg/mL
- avec activation métabolique : BaP testé aux concentrations de 5 à 0,25 µg/mL

Un potentiel mutagène est suspecté dans les cas où (i) la luminescence induite est au moins deux fois supérieure à celle mesurée dans les témoins et (ii) où cette induction est trouvée dans au moins deux concentrations différentes de l'échantillon analysé.

#### II.4. ECHANTILLONS ANALYSES.

##### - *Substances chimiques*

Benzo(a)pyrène : B-1760 Sigma (lot 44 H 2617)

Benzo(b)fluoranthène : H-128N AccuStandard Inc. (lot CAP-27981-50)

Anthracène : H-110N AccuStandard Inc. (lot 06726AW)

Dibenz(a,h)anthracène : H-135N AccuStandard Inc. (lot EGM-30717-70)

Les solutions de ces substances ont été préparées dans le DMSO (Merck 1.02952)

Plusieurs séries d'essais ont dû être réalisées afin de cerner la gamme des concentrations mutagènes sur les mutants bactériens utilisés dans les essais et d'évaluer les seuils de positivité éventuelle. Les concentrations testées vont de 0.01 à 100, 250 ou 1000 µg/boîte ou µg/ml.

##### - *Percolats*

Plusieurs séries de percolats ont été testées. Leurs caractéristiques et le calendrier des essais réalisés sont résumés sur le tableau 4.

**La réalisation des essais Ames** en milieu liquide nécessite une filtration stérilisante sur membrane 0,45µ. La plupart des percolats a dû être filtrée sur plusieurs membranes (préfiltre, 1,2µ, 0,45µ) pour pallier au colmatage quasiment systématique des filtres lors de la première étude. Compte tenu de l'élimination d'une fraction non négligeable des micropolluants lors de ces étapes de filtration, (i) nous n'avons pas poussé la stérilisation jusqu'à la filtration sur 0,22µ lorsque cela n'était pas indispensable ; (ii) nous avons complété les essais sur échantillons filtrés, par des essais sur la fraction organique des percolats bruts non filtrés.

Chaque série d'essais a été dupliquée. Afin d'éviter toute modification liée à la contamination bactérienne, les percolats bruts ont été filtrés avant leur stockage à 4°C ou à -20°C.

Les percolats ont été analysés bruts **sans filtration à l'aide du test Mutatox.**

Les *extraits organiques* ont été préparés par extraction liquide-liquide des percolats par le dichlorométhane, suivie d'une élimination du solvant et d'une reprise du résidu par le DMSO. Les concentrations testées, exprimées en volume équivalent de percolat sont de l'ordre de celles étudiées avec les échantillons bruts.

L'extraction organique permet de s'affranchir des problèmes de contamination ; toutefois elle ne permet pas d'extraire les micropolluants minéraux non solubles en milieu apolaire.

### ***Sols et boues d'épuration***

Le *sol de la Bouzule* a été échantillonné une seconde fois début mai 1997, au même endroit que celui du premier prélèvement, afin de tester la qualité du sol ayant servi à la préparation des colonnes.

Deux autres parcelles de sol n'ayant jamais été traitées sur le site de la Bouzule ont été échantillonnées courant juin : *pelosol* et *sol sous prairie (sol brun)*.

Un aliquot de la *boue d'épuration* utilisée pour le traitement des colonnes a été testé également afin de vérifier le caractère mutagène des micropolluants extractibles par l'eau dans ces boues.

La lixiviation par l'eau des matrices, sols et boues, a été réalisée dans des conditions suivantes :

- 16 h d'agitation (une seule extraction a été réalisée au lieu de trois),
- décantation de l'extrait aqueux, suivie de une ou plusieurs centrifugations de 15 min. à une vitesse de rotation comprise entre 3000 et 8000 tr/min. (6500 en général), afin d'éliminer les matières en suspensions et de réduire le colmatage lors de la filtration sur membrane (0,45 $\mu$ ).

Plusieurs lixiviats ont été préparés pour un même échantillon, en utilisant des quantités différentes de matrice solide par litre d'eau d'extraction :

- 10, 40, 50 et 100 g/l (tableau 4)

Les caractéristiques des échantillons testés et les essais de mutagénicité mis en oeuvre sur les différents percolats sont présentés dans le tableau 4.

## **III. RESULTATS**

### **III.1. Sensibilité des essais de mutagénicité : Ames en milieu gélosé ou liquide, et Mutatox**

Les essais réalisés en présence d'activation métabolique ont montré que :

- le benzo(a)pyrène s'est révélé mutagène avec les trois essais mis en oeuvre. Le seuil de sensibilité en milieu gélosé est de 0,2  $\mu$ g/bte dans les essais 1 et 2 (tableau 5). Il a pu être abaissé à 0,05  $\mu$ g/bte en optimisant la concentration de S9. La sensibilité est plus élevée avec le test en milieu liquide, une réponse positive ayant été enregistrée avec 0,1  $\mu$ g/ml dans les conditions standards et à 0,01  $\mu$ g/ml dans les conditions optimisées. Avec le test Mutatox, la mutagénicité du BaP est obtenue avec 0,12  $\mu$ g/ml.

- le benzo(b)fluoranthène a été négatif avec le test d'Ames en milieu gélosé, sauf pour le premier essai avec la souche TA100 à la concentration de 0,2  $\mu$ g/bte. Avec le test de fluctuation en milieu liquide, une positivité a été obtenue pour 0,05  $\mu$ g/ml. Le test Mutatox n'a révélé la positivité du BbF pour 25  $\mu$ g/ml.

- l'anthracène a été négatif dans tous les essais, quelle que soit la concentration testée.

- le dibenzo(a,h)anthracène s'est montré mutagène uniquement avec le test d'Ames en milieu liquide, avec un seuil de positivité à 0,25 µg/ml dans les conditions optimisées. Il a été négatif avec le test d'Ames en milieu gélosé et le test Mutatox.

Les seuils de positivité obtenus pour les trois HAPs avec les différents essais sont récapitulés dans le tableau 6.

Ces résultats témoignent de la sensibilité supérieure du test d'Ames en milieu liquide pour l'évaluation de la mutagénicité des substances chimiques.

### **III.2. Essais des percolation. 1<sup>ère</sup> étude**

La synthèse des résultats des essais sur les percolats (tests d'Ames et Mutatox) et sur les extraits organiques est donnée dans le tableau 7.

#### **III.2.a. Mutagénicité des percolats**

##### ***- Résultats des tests d'Ames.***

Les résultats de chaque essai sont détaillés en annexe A (tableaux A1 à A5). Les résultats sont synthétisés dans le tableau 8 .

L'examen de l'ensemble des résultats montre qu'il n'y a pas de différences nettes entre la réponse des colonnes témoins (T5 et T8) et celle des colonnes traitées (E3, E9 et E10), ni de mutagénicité supérieure des percolats de sols amendés par les boues par rapport aux témoins.

Les percolats témoins donnent même une réponse positive plus marquée que celle des percolats des sols traités dans certains cas, notamment dans la première série d'essais.

Dans les séries d'essais 3 et 4, le caractère mutagène des percolats « essais » et « témoins » recueillis en avril et mai est important, mais aucune différence entre témoins et essais n'a pu être mise en évidence.

Les résultats sont négatifs dans les séries 5 et 6, soit après 8 à 9 litres d'eau percolée, sauf pour ce qui concerne le témoin T8 de la série 6.

##### ***- Résultats des tests Mutatox.***

Ce test a été mis en oeuvre à partir de la 4<sup>ème</sup> série d'essais afin de vérifier la positivité enregistrée avec le test d'Ames.

Les résultats du test Mutatox confirment le caractère fortement mutagène des percolats de la série d'essais 4 (tableau 9). La mutagénicité est nettement plus élevée dans les percolats non filtrés que dans ceux filtrés sur membrane 0,45µ, ainsi qu'il ressort de la comparaison effectuée sur l'échantillon T5 de la série 4 : la positivité apparaît à la concentration de 1,5% avec le percolat non filtré, tandis qu'elle est enregistrée à la concentration de 100% avec celui filtré.

La mutagénicité est retrouvée dans tous les percolats de la série 5 testés avec activation métabolique, mais elle est beaucoup plus atténuée que dans la série 4.

Au cours de la série 6, la positivité marquée du percolat T8 notée avec le test d'Ames est confirmée. Dans cette série d'essais, le percolat E10 apparaît mutagène au test Mutatox.

La mutagénicité des deux échantillons T8 et E10 est retrouvée dans les percolats ultérieurs (série 7). Pour les autres échantillons, la positivité est faible et à la limite de la significativité.

### III.2.b. Mutagénicité des extraits organiques testés avec le test d'Ames

Les extraits organiques ont été testés au cours des séries d'essais 3 et 4. Les résultats sont détaillés dans les annexes B.

Les réponses se sont révélées négatives sauf pour T5 (séries 3 et 4) et pour E9 (série 4) ; pour ces deux échantillons, l'induction des mutants reverses reste peu importante toutefois, et à la limite de la significativité.

### III.3. Essais des sols

L'activité des percolats témoins, qui s'est montrée comparable sinon supérieure à celle des sols traités par les boues, nous a amenés à nous interroger sur la composition et la qualité du sol utilisé pour la préparation des colonnes.

◆ *Le sol de la Bouzule*, échantillonné une nouvelle fois début mai 97 à l'endroit choisi pour le premier prélèvement, s'est révélé générer des percolats mutagènes (tableau 10 et annexe C1).

*Les tests d'Ames ont mis en évidence le caractère mutagène élevé des lixiviats à 50 et 100 g/l, avec un degré d'activité supérieur pour celui à 100 g/l.* L'extrait à 10 g/l a donné une réponse négative ou très faible.

La réponse des essais Mutatox est moins marquée que celle des tests d'Ames ; elle est positive après activation métabolique avec le lixiviat à 100 g/l à la concentration de 100% dans le milieu d'essai, alors qu'une activité importante était notée avec le test d'Ames à la concentration de 25% avec les lixiviats à 50 et 100 g/l.

◆ *D'autres parcelles de sol n'ayant jamais été traitées par des pesticides ou des fertilisants*, ont été échantillonnées sur le site de la Bouzule. Le caractère mutagène des lixiviats a été recherché afin de déterminer si des substances naturelles pouvaient être incriminées.

*Les lixiviats à 50 et 100 g/l de deux types de sol, pélosol et sol sous prairie (sol brun de nature identique à celui utilisé pour la préparation des colonnes) sont restés négatifs avec le test d'Ames* (résultats en annexe C2). *Le prélèvement du sol pour la deuxième série d'essais de percolation sera donc effectué au niveau de cette parcelle sous prairie qui est restée exempte de tout traitement depuis 1972.*

### III.4. Essais des boues

Les lixiviats des boues préparées par agitation de 10 et 40 g de boues par litre d'eau, se sont montrés particulièrement mutagènes, et ce dès la concentration de 25% dans le milieu d'essai (annexe C3). L'activité mutagène est plus prononcée encore avec le lixiviat à 40 g/l. Ces résultats témoignent de la présence de micropolluants mutagènes mobilisables par l'eau, dans les échantillons de boues de station d'épuration testées dans cette étude.

### III.5. Essais de percolation. 2<sup>ème</sup> étude

#### II.5.a. Mutagénicité des percolats et des extraits organiques

##### - *Test d'Ames*

Les résultats sont synthétisés dans les tableaux 11 et 12, et détaillés en annexe D.

\* Les résultats obtenus sur les eaux percolées avant tout traitement par les boues sont restés négatifs (tableau 11).

\* Après épandage des boues :

Jusque fin juin 98, c'est-à-dire jusqu'à la quatrième série d'essais (inclus), on n'obtient pas de résultats significatifs avec les percolats provenant des colonnes traitées (tableau 12). Les résultats positifs sont discutables, c'est-à-dire sans répétabilité ou sans relation dose-effet. Il apparaît même que la positivité des échantillons serait plus accentuée dans les colonnes témoins, notamment la colonne III, que dans celles traitées.

Les essais du mois de juillet, après le premier arrosage artificiel des colonnes, ne mettent pas en évidence de mutagénicité des échantillons, si l'on fait exception du percolat de la colonne IV : la positivité obtenue en l'absence d'activation métabolique permettrait d'exclure l'hypothèse d'un effet lié aux HAPs. Les résultats obtenus avec la colonne traitée VI sont ambigus et ne peuvent être retenus comme positifs.

Après la deuxième série d'arrosage artificiel le 19/8/98, une positivité nette a été obtenue pour les échantillons provenant de la colonne témoin V (avec et sans activation métabolique) et des colonnes traitées I et VI, au cours des essais dupliqués, avec ou sans activation métabolique. Le caractère mutagène de l'eau de la ville de Nancy utilisée pour les aspersion suggère que la positivité des percolats pourrait être liée à celle de l'eau. Lors des essais suivants (29/8) la positivité est retrouvée pour la colonne témoin V, tandis qu'aucun caractère mutagène notable n'est enregistré dans les colonnes traitées.

Les essais du mois de septembre ne donnent pas plus de réponse positive dans les colonnes traitées, qu'au cours des essais antérieurs.

##### - *Test Mutatox*

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 13 et détaillés en annexe E.

La première série de percolats obtenus en avril a donné des résultats extrêmement positifs sur tous les échantillons, indifféremment témoins et traités. La luminescence a même atteint des chiffres de l'ordre de 10000 unités relatives de luminescence dans les percolats de la colonne témoin I. La luminescence était nettement plus élevée sans activation métabolique, qu'avec S9, aussi bien dans les colonnes témoins que traitées (tableau E1 en annexeE).

Dans les percolats du 5 mai, les pics de luminescence atteignaient des valeurs relativement plus faibles, n'excédant pas 3800 dans les percolats traités et 3300 dans les témoins. Les résultats des essais Mutatox effectués sur les extraits organiques concentrés de ces percolats sont restés par contre quasiment négatifs. Ceci pourrait indiquer que des substances minérales ou polaires, non

extractibles par les solvants apolaires comme le dichlorométhane, sont responsables de la réversion des mutants *Vibrio fischeri* observée dans les percolats (tableau E2 bis).

Dans les échantillons prélevés les 12 et 18 juin, des réponses positives ont encore été enregistrées dans les percolats des colonnes témoins et traitées. Cependant les résultats témoignaient d'un caractère mutagène plus important dans les colonnes IV et VI (traitées par les boues) que dans les témoins III et V (tableaux E3 et E4).

En juillet, la positivité des percolats des colonnes traitées reste élevée, tandis que celle des colonnes témoins se maintient au niveau des prélèvements antérieurs (tableau E5).

### **II.5.b. Analyse des HAPs dans les percolats**

En fonction des volumes de percolats obtenus, le dosage des HAPs a été réalisé seulement sur les échantillons du 12/04, 3/05, 20/07 et 19/08.

Dans tous les cas, ces dosages se sont avérés négatifs dans les conditions de quantification mises en œuvre.

L'ensemble des chromatogrammes est semblable à celui obtenu sur l'échantillon du 19/08/98 pour la colonne 6 (figure 1). Par référence au chromatogramme des étalons (1 ppm) (figure 2), on note pour l'essai un ensemble de produits à caractère plus ou moins polaire en début d'éluion et l'absence de tout produit aux temps de rétention des HAPs. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu à partir de terres d'anciennes usines à gaz, qui bien que très riches en HAPs, donnent des percolats dépourvus d'HAPs.

## **IV. DISCUSSION**

**Les résultats de la 1<sup>ère</sup> étude** ont montré qu'il existait peu de différences entre la réponse des percolats témoins et celle des échantillons issus de colonnes traitées.

Ce caractère mutagène ne pouvait donc être imputé aux HAP des boues, la positivité étant aussi importante dans les témoins et les traités.

Le caractère mutagène du 2<sup>ème</sup> échantillon du sol de la Bouzule, prélevé sur la parcelle ayant servi à la préparation des colonnes, nous conduit à avancer l'hypothèse que la mutagénicité serait due aux substances utilisées antérieurement dans les traitements agricoles (fertilisants, pesticides,...). Il pourrait s'agir de dérivés polaires, car la mutagénicité est nulle, sinon très faible dans les extraits organiques, alors qu'elle pouvait être très élevée dans les percolats bruts correspondants.

Des constituants naturels des sols ne semblent pas être responsables de la mutagénicité observée : en effet, les lixiviats des sols de composition identique à ceux étudiés, mais provenant de parcelles n'ayant jamais été traitées, sont restés négatifs.

Au cours de la première étude, les résultats des tests d'Ames sur les percolats étaient confirmés par ceux des tests Mutatox (tableau 7). La sensibilité des essais Mutatox sur les percolats paraissait supérieure à celle des essais Ames : ce qui pouvait s'expliquer par le fait que le test Mutatox est réalisé sur échantillons non filtrés au contraire des essais Ames qui nécessitent une filtration stérilisante.

**Au cours de la 2<sup>ème</sup> étude** recommencée en utilisant des colonnes de sol indemnes de tout traitement depuis une vingtaine d'années et traitées avec des quantités de boues 4 fois plus élevées que lors de la 1<sup>ère</sup> étude, les résultats n'ont pas été plus probants et n'ont pas permis de démontrer un transfert des HAPs dans les sols par l'eau de percolation.

Plusieurs questions se sont posées lors de l'interprétation des essais Ames. Elles concernent le fait que :

(i) les résultats positifs obtenus au cours d'un premier essai ne se répètent pas toujours lors du deuxième essai. Une modification de la composition de l'échantillon peut être invoquée : toutefois les échantillons ont été gardés à 4°C et à l'obscurité, et les analyses répétées moins de 72h après de 1<sup>er</sup> essai.

(i) des réponses positives ont pu être enregistrées dans les colonnes témoins, sans et/ou avec activation métabolique : l'hypothèse que des substances naturelles des sols soient responsables de ces effets positifs ne peut être exclue. On peut penser à la présence d'histidine qui résulterait de la décomposition des matières organiques par les bactéries. L'histidine a la propriété d'induire la réversion des mutants bactériens, ce que nous avons d'ailleurs vérifié expérimentalement,

(iii) les eaux de ville se sont révélées mutagènes en août.

Les processus de potabilisation de l'eau à partir d'eaux de surface mis en œuvre dans les usines de traitement de l'eau utilisent soit la chloration, soit l'ozonation, afin d'assurer une bonne qualité bactériologique de l'eau. Ces processus engendrent la formation d'un ensemble de composés organiques, à de très faibles concentrations, comme des organochlorés, dont une fraction est volatile et peut présenter un potentiel mutagène. Normalement, ces composés sont éliminés par les traiteurs d'eau grâce à des filtres au charbon actif. Mais il est possible que ces filtres soient absents ou en mauvais état. De tels composés ont déjà été détectés au CSE par le test d'Ames « classique » sur des fractions organiques concentrées d'échantillons d'eau du robinet. Le test de fluctuation étant beaucoup plus sensible que le test d'Ames « classique », il pourrait détecter la présence de ces micropolluants mutagènes dans les échantillons bruts.

Cette hypothèse serait à vérifier par une étude plus approfondie sur des échantillons d'eau du robinet de Nancy, en étalant les prélèvements dans le temps, et en confrontant les résultats du test de fluctuation et du test d'Ames classique.

Pour ce qui concerne le test Mutatox, il est clair qu'une ou plusieurs substances présentes dans les sols et entraînées avec l'eau de percolation interfèrent avec la réponse du test. Il a été vérifié évidemment que les eaux pluviales n'entraînaient aucune positivité du test.

## V. CONCLUSION

Aucune mobilité des HAPs n'a pu être mise en évidence dans les eaux de percolation au cours des neuf mois qui ont suivi l'application des boues aux sols des colonnes. Le résultat des analyses de HAPs et celui des tests d'Ames de fluctuation est resté négatif lorsque les colonnes traitées ont été percolées par les eaux pluviales. Une positivité a par contre été observée après aspersion des sols par l'eau de ville en août, ce qui s'est expliqué par le caractère mutagène de l'eau.

Il est difficile de recommander l'utilisation du test Mutatox pour le suivi de la qualité des sols, tant que les facteurs interférant avec la réponse du test n'ont pas été identifiés.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR ( Association Française pour la Normalisation), 1985. Boues des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines. Norme Française NFU 44-041.

AMES B. N., McCANN J. & YAMASAKI E., 1975, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/ mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Research*, 31, 347-364.

GILBERT R. I., 1980, The analysis of fluctuation tests, *Mutation Research*, 74, 238-239.

J. O. C. E., 1986. Directive du Conseil n° 86-278 du 12 juin 1986 relative à la protection de l'environnement, et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture.

J. O., 1998. Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues d'épuration sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées.

MARON D. M. & AMES B. N., 1983, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research*, 113, 173-215.

ULITZUR S., 1986, Bioluminescence test for genotoxic agents, *Methods in Enzymology*, 133, 264-274.