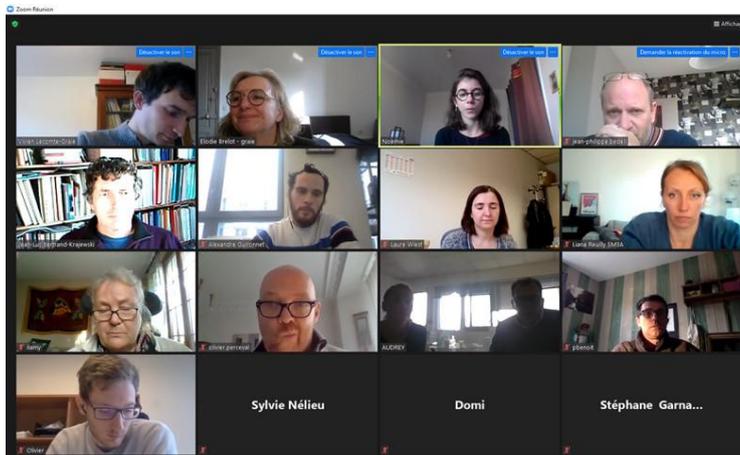


Participants

Présents

- ENTPE : Jean-Philippe BEDELL, Olivier ROQUES
- GRAIE : Elodie BRELOT, Vivien LECOMTE
- INRAe Narbonne : Dominique PATUREAU
- INRAe Versailles-Grignon : Pierre BENOIT, Isabelle LAMY, Sylvie NELIEU
- INSA : Jean-Luc BERTRAND-KRAJEWSKI, Noémie PERNIN
- ISA : Laure WIEST, Alexandre GUIRONNET
- OFB : Stéphane GARNAUD, Olivier PERCEVAL
- SM3A : Liana REUILLY
- Syndicat SRB : Olivier LAURENT, Audrey ROCH (en début de réunion uniquement)
- UNILIM : Christophe DAGOT



Excusé : Fabien ABAD, Agence de l'Eau RMC

Ordre du jour

Introduction, contexte et état d'avancement :

- Etat d'avancement
- Valorisation RISMEAU et SIPIBEL
- Les actualités locales : Syndicat des Eaux des Rocailles et de Bellecombe et SM3A
- Actualités autour du projet

Base de données RISMEAU

Préparation du site d'expérimentation [Actions 2 et 5]

- Présentation des installations et des manips en cours par Noémie PERNIN, INSA
- Discussion sur les objectifs et verrous à lever
- Échanges sur la coordination autour du dispositif expérimental

Développement de méthodes analytiques [Action 1 – P1]

- Méthodologie des analyses en screening sur les intrants et résultats préliminaires, par Alexandre Guironnet, ISA

Caractérisation écotoxicologique des intrants et de leurs éluats [Action 2 – P2 et Action 4]

- Toxicités aiguës et avancements sur les MAFORs boue et fumier, par Olivier Roques, ENTPE
- Impacts de la MAFOR boue sur les vers de terre et les MO du sol, par Sylvie Nelieu, INRAe Versailles-Grignon
- Home garden : essai d'encagement d'*Eisenia fetida*, par Jean-Philippe BEDELL, ENTPE

Organisation de la suite du projet

*L'ensemble des diaporamas présentés lors de cette réunion sont en **annexe**.*

Etat d'avancement

Rappel des 3 volets de Rismeau

- Etude préalable bassin versant de l'Arve, financée par le SM3A
- Télésphore – financé par l'agence de l'eau RMC
- Perséphone – financé par l'OFB

Le Graie fait un point administratif et financier de RISMEAU (cf. diaporama en annexe). A noter que :

- l'**INSA** a obtenu une ½ bourse de thèse via H2O'Lyon, qui sera investie dans trois postes principaux : augmentation du budget d'analyses, augmentation du budget déplacements (les déplacements Lyon <-> Haute-Savoie sont nombreux) et construction d'un pilote en colonne
- le **SM3A** peut apporter des moyens financiers supplémentaires au projet, en cas de besoin.

En raison des périodes de confinement successives, certaines expérimentations du projet ont dû être décalées de plusieurs mois. Olivier PERCEVAL (OFB) indique qu'une prolongation de la durée du projet Perséphone de 6 mois à un an n'est pas problématique, compte-tenu du contexte sanitaire actuel.

⇒ **Le Graie sollicitera auprès de l'OFB une demande d'avenant à la convention de Perséphone pour une prolongation de la durée du projet de 12 mois.**

Elodie BreLOT indique que la convention Télésphore avec l'Agence de l'Eau RMC est plus « souple » et ne nécessite donc pas de demande de prolongation.

Les moyens humains déployés sur RISMEAU, en plus des permanents sont :

- Noémie Pernin, doctorante INSA Lyon à partir de juillet 2020
- Tiphaine Lellain, stagiaire INRAE Versailles-Grignon de janvier à juin 2020
- Olivier Roques, doctorant ENTPE à partir d'octobre 2019
- Alexandre Guironnet, doctorant ISA (50 % Perséphone) à partir de septembre 2018
- Deux étudiants en PIRD au sein de l'INSA Lyon – mi-temps de septembre 2020 à janvier 2021

Valorisation de RISMEAU et de SIPIBEL

Le Graie est intervenu lors de plusieurs **conférences** pour présenter SIPIBEL et RISMEAU : Université Lyon III (janvier 2020), séminaire ASTEE (septembre 2020) et séminaire du projet Interreg DIADeM (octobre 2020). Yves Lévi (Univ. Paris Sud) a également présenté SIPIBEL lors de la conférence du réseau Santé Environnement d'Île de France ce jour.

Jean-Luc Bertrand-Krajewski (INSA Lyon) indique que le projet de publication d'un **data paper** permettant de valoriser les 55 000 données de SIPIBEL est toujours en cours. Il reste encore un travail pour :

- finaliser l'article en lui-même
- et mettre à disposition l'ensemble des données en accès public en ligne : en effet, à ce jour, seules les données physico-chimiques du projet ont été mises en ligne sur le site du Réseau Norman (la plateforme Norman ne permet pas encore de mettre en ligne les données d'antibiorésistance et de bioessais de SIPIBEL)

Le **site internet** de SIPIBEL va connaître une mise à jour prochainement pour mettre en ligne l'ensemble des livrables du projet SIPIBEL-RILACT. Une newsletter devrait également être envoyée prochainement par le Graie : son contenu et la cible sont encore à définir en collaboration avec l'OFB.

Les actualités locales

Olivier Laurent et Audrey Roch présentent les actualités du SRB. **La STEP de Bellecombe** connaît actuellement des travaux d'extension de 32 000 à 75 000 EH, avec la construction à venir d'un digesteur. La STEP traite les effluents de la fromagerie locale (10 000 EH), pour l'instant sur une file séparée.

L'[arrêté du 30 avril 2020](#) établi en raison de la crise COVID impose une hygiénisation des boues avant épandage. Les boues de la STEP de Bellecombe sont séchées sous serre solaire, ce qui n'est pas considéré comme une hygiénisation : depuis mars 2020, elles ne peuvent donc plus être épandues et sont envoyées en co-compostage (sans traçabilité). En collaboration avec l'INSA, le SRB a donc réalisé cet automne des analyses des boues pour tenter de démontrer l'efficacité du séchage solaire vis-à-vis du Coronavirus. Trois lots de boues ont été prélevés le 5 octobre avec des temps de séchage de 5, 12, 20 et 43 jours. Les analyses sont en cours.

Le SRB évoque également ses différends avec un éleveur mettant en cause les boues dans une contamination par des bactéries productrices de shigatoxines. Les analyses réalisées jusqu'à présent n'ont pas mis en évidence la présence de ces bactéries dans les boues épandues.

Les actualités de l'OFB

L'OFB est en phase de préparation de son nouveau **contrat d'objectif pour la recherche** (programme scientifique à 5 ans). Plusieurs sous-groupes thématiques ont été constitués, dont un sur « la maîtrise des risques liés aux pollutions et aux pathogènes » : celui-ci fait le lien avec le principe « One Health » mis en lumière dans le nouveau plan national Santé Environnement (PNSE4) en cours de consultation.

A ce stade, l'assainissement et plus globalement l'eau n'apparaissent plus comme une priorité. La justification est que beaucoup de connaissances et d'outils ont été développés sur le milieu aquatique sous l'impulsion de la DCE. La priorité actuelle semble donc être **le milieu terrestre**.

Des moyens seront cependant toujours déployés pour soutenir des projets sur les thématiques de « la biosurveillance », des « méthodologies innovantes » et des « contaminants d'intérêt émergent ».

Par ailleurs, l'OFB va continuer à diversifier les **moyens de contractualisation** en mettant l'accent sur les coopérations avec les grands établissements publics, les appels à manifestation d'intérêt (AMI) et les appels à projets RDI... et en « levant le pied » petit à petit sur les subventions.

Autres actualités

Le sujet de l'épandage des boues de STEP est au cœur de l'actualité avec :

- une consultation en cours des parties prenantes sur le « Décret relatif aux critères de qualité agronomique et d'innocuité selon les conditions d'usage pour les matières fertilisantes et les supports de culture » : nouveaux seuils, nouveaux paramètres (plastiques, bioessais...). Le Graie a consulté les partenaires scientifiques de RISMEAU en amont de la réunion.
- [la consultation de la Commission Européenne](#) sur « la perception des citoyens européens sur l'épandage des boues » ouverte jusqu'à mars 2021.

Point sur les données produites dans le cadre du projet

Le Graie et les partenaires RISMEAU font le point sur les données produites dans le cadre de RISMEAU :

	Physico-chimie	Bioessais	Microbio/ADN
TELESPHORE	Eau, sol et MAFOR (ISA et LAEPS) + capteurs (INSA)	X	X
PERSEPHONE	Vers de terre, sol et MAFOR (ISA, INRAE, ENTPE)	Toxicité VDT et activité enzymatique (ENTPE, INRAE)	Eau, sol et MAFOR (UNILIM)
ANALYSES COVID	Boues (Labo. Dépt + ISA)	X	Boues (UNILIM + labo dtp)
ETUDE ARVE	Ech. Intégratifs et eau (ISA)	X	X

L'ensemble des données produites dans le cadre de TéléspHore et Perséphone doivent être bancarisées dans une base de données.

Concernant les données issues de l'étude menée sur l'Arve, Liana REUILLY indique que le besoin du SM3A est uniquement d'obtenir un rapport, à présenter aux élus. Il n'y a pas besoin de bancariser ces données (d'autant plus qu'il y a possiblement une clause de confidentialité sur ces données). Dominique Patureau (INRAE Narbonne) souligne cependant l'importance de pouvoir accéder à ces données en cas de besoin.

⇒ Le Graie intégrera l'étude Arve dans la base de métadonnées de la ZABR (Zone Atelier Bassin du Rhône) et assurera un stockage des données afin de pouvoir les fournir sur demande et avec l'autorisation du SM3A

Christophe Dagot (UNILIM) indique pour sa part qu'il n'y a pas d'intérêt à bancariser les futures données issues des analyses COVID menées sur les boues, car l'objectif est de montrer qu'il y a absence du virus. L'Université de Limoges fait partie du réseau Obépine et a déjà fait validé son protocole d'analyses COVID dans les eaux... mais pas encore dans les boues (d'où l'absence de résultats à ce jour).

Des échanges d'échantillons à prévoir

Les présentations et discussions au cours de l'après-midi font état de plusieurs échanges d'échantillons (MAFOR, sol, vers de terre) à prévoir entre l'ENTPE, l'INRAE Versailles-Grignon, l'Université de Limoges et l'ISA. L'Université de Limoges peut faire appel à un transporteur frigorifique spécialisé en cas de besoin.

Choix de l'outil base de données à utiliser

Le Graie présente l'outil base de données DOMINEAU développé dans le cadre de SIPIBEL en partenariat avec l'OFB. Il s'agit d'un outil Excel avec macros, inspiré du format du réseau européen NORMAN. Il est adapté à la saisie de données physico-chimiques et biologiques (bioessais et microbiologie) issues de campagnes de prélèvements.

Jean-Luc Bertrand-Krajewski (INSA) fait part de ses réticences à utiliser cet outil pour bancariser les données RISMEAU :

- le format de la base ne permet pas d'intégrer les données issues de capteurs ou bien des données particulières (analyses spectro, graphiques...)
- l'extraction des données pour utilisation dans Matlab est jugée complexe

Il propose d'utiliser/redévelopper un outil davantage adapté aux besoins du projet. Dominique Patureau dispose de bases de données « de suivi de process » au sein de son laboratoire, mais il reste à voir si elles sont adaptées aux données RISMEAU. Elle propose de prévoir un temps d'échange sur l'outil à utiliser.

⇒ Ce sujet fera l'objet d'un prochain café RISMEAU

Expérimentations in situ

Noémie PERNIN (INSA Lyon) présente les installations et manipulations en cours sur le site d'expérimentation situé à côté de la STEP de Bellecombe (cf. diaporama en annexe).

Suite à la finalisation du système de suivi cet été, le dispositif expérimental est désormais opérationnel. Les premiers épandages de boues (issues de la serre de séchage de la STEP de Bellecombe) et de lisier ont eu lieu début novembre et le premier prélèvement d'eau infiltré a été réalisé durant la semaine du 23 novembre. Les prélèvements d'eau auront lieu une fois par semaine et les prélèvements de sol une fois par semestre. Des capteurs in situ permettront d'ici peu d'évaluer le niveau d'eau dans les bidons à distance, et ainsi d'éviter les déplacements inutiles et contrôles visuels par le SRB.

Pierre BENOIT (INRAE) évoque l'importance de suivre la densité apparente du sol, compte tenu de la reconstitution du sol qui a été réalisée.

Audrey ROCH (SRB) attire l'attention des chercheurs sur les épisodes neigeux qui auront lieu cet hiver et qui changeront la temporalité des infiltrations en eau.

Les participants échangent concernant les besoins de surveillance et de prélèvements sur site :

- **Prélèvements d'eau** : les prélèvements d'eau dans les bidons sont réalisés jusqu'à une fois par semaine (tout dépend de la pluie). En règle générale, c'est Noémie qui gèrera ces prélèvements, mais il faudrait un relais sur place pour pouvoir réaliser ponctuellement ces prélèvements en cas d'indisponibilité (environ 1 fois par mois).
- **Engagement vers de terre au printemps 2021** : Jean-Philippe Bedell (ENTPE) évoque le besoin d'intervention ponctuelle des acteurs locaux en cas de sécheresse ou autre situation d'urgence.

Le SRB donne son accord pour intervenir en cas de situation d'urgence et pour réaliser ponctuellement les prélèvements d'eau, sur sollicitation. Liana Reully indique que le SM3A pourrait potentiellement également passer sur site en cas de besoin.

- ⇒ **Noémie organisera une rencontre sur site avec le SRB (et le SM3A s'il souhaite participer) lors d'un prochain déplacement en Haute-Savoie afin d'expliquer en détail le protocole de prélèvement d'eau.**
- ⇒ **Noémie sollicitera les partenaires scientifiques du projet afin de recenser les besoins en échantillons de chacun des laboratoires** (utilisation des documents issus des campagnes de prélèvements SIPIBEL).

Pilote sur colonne

En parallèle, la construction d'un prototype de pilote sur colonne est en cours, en coopération avec deux étudiants PIRD : ce sujet pourra faire l'objet d'un prochain café RISMEAU.

Alexandre GUIRONNET (ISA) présente la méthodologie des analyses en screening sur les intrants et les résultats préliminaires (cf. diaporama en annexe).

Quatre matrices ont été étudiées : sol, boues de STEP, fumier et lisier bovins (ce dernier est majoritairement liquide). Une base de données de 160 médicaments vétérinaires a été utilisée.

22 molécules (antibiotiques et biocides vétérinaires) ont été détectées et confirmées dans les lisiers (dont 15 en commun avec les boues) contre 18 dans le fumier. Une dizaine de molécules restent encore à confirmer. Pour l'instant, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les pratiques des agriculteurs (données issues de l'étude de la chambre d'Agriculture) et les substances retrouvées, hormis pour la Chlorhexidine.

Le lisier numéro 4 a été choisi pour l'expérimentation d'épandage sur site car les aires du pic chromatographique sont un peu plus importantes (et plus facile à traiter que les autres échantillons de lisier). Au sein du lisier, l'ensemble des molécules ont été retrouvées dans la phase solide (rien dans la phase liquide).

Pour l'instant, les médicaments humains (comme le diclofénac qui a déjà été retrouvé dans des lisiers dans le cadre d'autres projets) n'ont pas été analysés.

Les produits de dégradation et métabolites n'ont pas encore été étudiés. Laure WIEST (ISA) indique qu'elle va commencer à faire des recherches bibliographiques sur le sujet... mais alerte sur l'"explosion potentielle" du nombre de molécules à suivre.

- ⇒ **L'ISA va rechercher la présence de médicaments humains dans les échantillons de MAFOR déjà analysés.**
- ⇒ **L'ISA fera passer la liste des molécules recherchées et détectées aux partenaires de projet. Un café RISMEAU pour se tenir sur le sujet afin de s'accorder sur la liste des molécules à analyser pour le reste du projet.**

L'INRAE insiste sur la nécessité de contrôler le pH des échantillons analysés malgré l'utilisation de tampons : Alexandre va réaliser ces mesures à partir des échantillons congelés.

Toxicités aiguës et avancements sur le MAFORs boue et fumier

Olivier ROQUES présente les premiers résultats de sa thèse (cf. diaporama en annexe). Trois MAFOR sont étudiées à travers des bioessais utilisant *Eisenia Fetida* comme espèce modèle :

- **les boues de STEP** : les tests de létalité mettent en évidence une DL50 13 fois supérieure à la dose d'épandage. Le test de reproduction est en cours. Le test d'évitement et les analyses de bioaccumulation de résidus de médicaments à venir.
- **le fumier** : seul le traitement de l'échantillon a été réalisé jusqu'à présent (broyage et homogénéisation).
- **le lisier** : à venir (l'ENTPE était en attente des résultats de l'ISA présentés ci-avant pour déterminer le lisier à étudier).

Impacts de la MAFOR boue sur les vers de terre et les MO du sol

Sylvie NELLIEU (INRAE Versailles Grignon) présente les premiers résultats des travaux menés par l'INRAE Versailles Grignon (cf. diaporama en annexe), qui portent sur :

- la caractérisation de l'impact de MAFORs (**boue et fumier**) sur le vers de terre *Apporectodea caliginosa* et les micro-organismes du sol
- l'estimation de la bioaccumulation de métaux liés au MAFOR ainsi que la fourniture d'échantillons (issus d'exposition) pour des analyses de résidus de médicaments et d'antibiorésistance

Le protocole adopté a pour objectif de **minimiser le facteur confondant « nourriture »** (compensation en carbone par du crottin) car les nutriments présents dans les MAFOR peuvent « booster » l'activité des vers de terre et masquer certains effets toxiques.

Les premiers tests ont été réalisés sur les boues. Ils mettent en évidence des effets significatifs sur la reproduction à 3 mois à une concentration de 2 % de boue (moins de cocons, délai de naissances, faible taux de naissances) mais pas à 1 %.

Les essais sur temps plus courts n'ont pas révélé d'effets significatifs sur la létalité, la biomasse et l'évitement aux concentrations étudiées. Sur 14 jours, la bioaccumulation du cuivre et du zinc n'est pas affectée.

Aucun effet net n'a été observé sur les activités enzymatiques du sol.

Les tests sur fumier seront menés en 2021.

Des échanges portent sur différents points du **protocole analytique** adopté par l'ENTPE et l'INRAE :

- le protocole de préparation de l'échantillon de lisier, qu'il est prévu d'égoutter avant analyse : les équipes de recherche s'accordent sur l'intérêt d'étudier dans le cadre d'un des tests au moins, la **phase liquide et la phase solide du lisier**. Ceci sera réalisé dans le cadre de la thèse d'Olivier Roques.
- le protocole d'intégration de l'échantillon de MAFOR dans le sol étudié : c'est quelque chose qu'il reste encore à travailler (le fumier est jugé peu assimilable car les particules sont très grosses).
- la mise en lien des **espèces modèles étudiées** avec les espèces présentes sur site. Jean-Philippe BEDELL (ENTPE) indique avoir observé la présence d'espèces endogées et épigées sur site, sans pouvoir toutefois les identifier. Le fait d'étudier deux espèces différentes (*Eisenia fetida* -vers épigé- et *Apporectodea caliginosa* – vers endogé) est une réelle richesse pour le projet.

Home garden : essai d'encagement d'*Eisenia fetida*

Jean-Philippe BEDELL (ENTPE) présente ses essais d'encagement de vers de terre menés chez lui (avec beaucoup d'ingéniosité !) pendant la période de confinement du printemps 2020 (cf. diaporama en annexe).

Les résultats de cette expérimentation démontrent que l'emprisonnement (= les vers de terre ne s'échappent pas), la survie et la reproduction des vers de terre sont possibles dans ces conditions. Le protocole est validé (même s'il reste des questions concernant la durée d'encagement ou la matière organique mise à disposition) et pourra être utilisé lors des encagements réalisés sur site au printemps 2021.

Organisation de la suite du projet

Rapport d'avancement Perséphone

Le Graie a transmis en amont de la réunion une version 0 du rapport d'avancement annuel Perséphone à compléter par les partenaires concernés (ISA, ENTPE, INRAE Versailles Grignon, Université de Limoges et Graie). Olivier PERCEVAL (OFB) indique que le rapport doit être transmis début décembre car il conditionne le versement de l'OFB. Aucun autre livrable n'est nécessaire à ce stade.

⇒ **Les partenaires de Perséphone doivent compléter le rapport d'avancement d'ici début décembre, pour transmission du rapport par le Graie à l'OFB.**

Récapitulatif « A faire »

priorité	A faire	Qui ?
1	Fixer le thème du prochain Café Meau-Ris	Graie, sur consultation des partenaires
1	Compléter le rapport annuel Perséphone	Graie, ISA, ENTPE, INRAE Versailles, Université de Limoges
2	Solliciter une demande de prolongation de 12 mois du projet Perséphone auprès de l'OFB	Graie
2	Solliciter les partenaires pour fixer la date de la prochaine réunion plénière au printemps 2021	Graie
2	Finaliser le rapport de l'étude préalable de l'Arve	JLBK (INSA)
2	Des échanges d'échantillons de MAFOR, sol, vers de terre	Entre l'ENTPE, l'INRAE Versailles, l'Université de Limoges et l'ISA
2	Organiser une rencontre sur site INSA-SRB (+ SM3A si souhait de participer) pour expliquer le protocole de prélèvement d'eau	Noémie (INSA)
2	Solliciter les partenaires scientifiques du projet afin de recenser les besoins en échantillons de chacun des laboratoires	Noémie (INSA)
2	Rechercher la présence de médicaments humains dans les échantillons de MAFOR	ISA
2	Faire passer la liste des molécules recherchées et détectées dans les MAFOR à l'ensemble des partenaires du projet	ISA
3	Data paper SIPIBEL et mise en ligne des données	JLBK (INSA) et Vivien (Graie)
3	Intégrer l'étude préalable de l'Arve dans la base de métadonnées de la ZABR et assurer un stockage des données produites	Graie

Cafés MEAU-RIS

Le Graie a proposé le principe de réunions ZOOM mensuelles de 13h15 à 14h00 (Café MEAU-RIS) afin de garantir plus de lien et de continuité dans RISMEAU. Les dates retenues sont les suivantes : **mardi 15 décembre**, mardi 19 janvier, mardi 23 février, mardi 16 mars et mardi 27 avril.

Cette réunion a mis en lumière **plusieurs thèmes** qui pourraient être l'objet des prochains « cafés » : la base de données, le protocole analytique en écotoxicologie, la validation des molécules suivies et recherchées et le pilote sur colonne de l'INSA.

Prochaine réunion plénière

A programmer au printemps 2021

Projet initié à partir des résultats de l'observatoire Sipibel



Objectifs

- **Caractériser et comparer** les différents types d'**intrants agricoles et urbains** épandus sur le bassin versant d'étude, en termes de concentrations en résidus de médicaments et présence de bactéries résistantes
- **Evaluer les impacts environnementaux** en prenant en compte l'effet des substances en mélange en utilisant la batterie de bioessais et l'expertise développées dans le cadre de l'observatoire SIPIBEL (effluents et boues de STEP), avec un axe de recherche spécifique sur la bioaccumulation (vers de terre et cultures)



Structure

RISMEAU s'articule en **3 projets**, menés en synergie sur **42 mois**

- **Diagnostic de la présence dans les eaux du BV de l'Arve**
- **Télesphère** – Etude des transferts liés aux épandages
- **Perséphone** – Impacts à court et long termes sur des organismes terrestres



Réunion 3 – 24 novembre 2020



RISMEAU



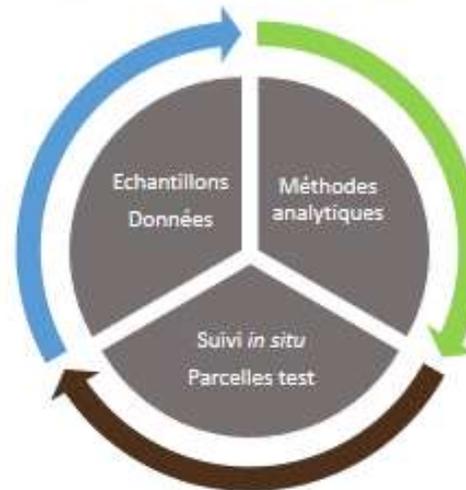
RISques liés aux résidus de Médicaments, biocides et antibiorésistance d'origine humaine et vétérinaire sur les ressources en EAU du bassin versant de l'Arve

Téléspore

**ÉVALUER
LES TRANSFERTS DE
RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS
ET BIOCIDES
LIÉS À L'ÉPANDAGE**

- Caractériser
Différents types de boues urbaines et intrants agricoles
- Quantifier les apports
Urbains – Hospitaliers – Agricoles
- Évaluer les transferts des molécules
Persistence – Dissipation – Mobilité – Biodisponibilité
Suivi pluriannuel en plein champ

INSA DEEP – INRA LBE – ISA CNRS
Chambre d'Agriculture Savoie Mont Blanc – SRB



Mutualisation

Analyse croisée et interprétation des données obtenues sur l'ensemble des projets

Diagnostic BV Arve

- Evaluer la présence de médicaments d'origine humaine et vétérinaire dans les eaux de surface
- Sélectionner un nombre limité de molécules
- Mobiliser les acteurs locaux, sensibiliser
- Identifier les pressions et enjeux

INSA DEEP – ISA – SM3A



2018 - 2019

Perséphone

**ÉVALUER LES IMPACTS
ENVIRONNEMENTAUX LIÉS À
L'ÉPANDAGE**

- Batterie de bioessais
Sur vers de terre et microorganismes terrestres
Effet des substances en mélange
- Étudier la bioaccumulation
Essais en laboratoire – Bioessais in situ
Suivi pluriannuel en plein champ
- Évaluer la dissémination de l'antibiorésistance
Suivi pluriannuel en plein champ

ENTPE LEHNA – ISA CNRS
INRA UMR 1402 Ecosys – UNILIM UMR INSERM 1092

AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ
ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT

2019 - 2022



Avancement

ACTION	Parties	TACHES	Objet	janv-19	juil-19	janv-20	juil-20	janv-21	juil-21	janv-22									
				M1-3	M4-6	M7-9	M10-12	M13-15	M16-18	M19-21	M22-24	M25-27	M28-30	M31-33	M34-36	M37-39	M40-42		
1	Partie 1 Molécules et méthodes analytiques ISA	T1.1	Recherche d'informations																
		T1.2	Sélection des molécules																
		P1	Développement de méthodes analytiques	X	X	X	X												
2	Partie 2 Caractérisation des intrants agricoles DEEP INSA Lyon - INRA Narbonne	T2.1	Inventaire des intrants agricoles																
		T2.2	Sélection des intrants							X									
		T2.3	Campagnes d'échantillonnage							X									
		T2.4	Caractérisation des intrants																
		P2	Caractérisation écotoxicologique des intrants et de leurs éluats				Choix sol+ Mafor N1	Caractérisation encours											
		T2.5	Analyse comparative avec la littérature																
3	Partie 3 Recherche de la dissémination de l'antibiorésistance UMR INSERM 1092	P3.1	Sélection des gènes de résistance																
		P3.2	Validation des méthodes d'extraction et de caractérisation du résistome																
		P3.3	Caractérisation des résistomes et quantification des intégrons																
		P3.4	Analyse comparative avec les connaissances actuelles																
		P3.5	Suivi expérimental, cf T5.8																
4	Partie 4 - Mise en évidence des éventuels phénomènes de bioaccumulation ENTPE LEHNA INRA Versailles	P4.1	Choix argumenté d'une dose d'intrant réaliste pour l'exposition des organismes																
		P4.2	Réalisation d'un sol agricole non amendé pour servir de référence																
		P4.3	Bioessais reproduction bioaccumulation au laboratoire sur <i>E. Fetida</i>																
		P4.4	Bioessais reproduction bioaccumulation au laboratoire sur <i>A. Caliginosa</i>																
5	Partie 5 Suivi expérimental INSA Lyon, INRA Narbonne ENTPE LEHNA - PROVADEMSE - INRA Ensemble des équipes	T5.1	Choix de l'emplacement des parcelles				X												
		T5.2	Construction des parcelles tests : P0, P1 et P2							X									
		T5.3	Carottages initiaux de référence																
		T5.4	Echantillonnage initiaux de surface avant épandage																
		T5.5	Analyse des carottes et échantillons																
		T5.6	Apport d'intrants sur P1 et P2																
		T5.7	Collecte des eaux de ruissellement et d'infiltration																
		T5.8	Analyses physicochimiques et caractérisation de l'antibiorésistance																
		T5.9	Carottages trimestriel et analyses à différentes profondeurs																
		P5	Suivi <i>in situ</i> des phénomènes de bioaccumulation par des organismes terrestres																
		T5.10	Bancarisation, qualification et interprétation trimestriel des données obtenues																
T5.11	Analyse croisée et interprétation des données sur l'ensemble du projet																		
6	Partie 6 Coordination et valorisation du projet GRAIE	T6.1 - P6.1	Coordination du projet Réunion semestrielle des partenaires et contributeurs																
			Newsletters semestrielles																
			Séminaire annuel																
			Rapport annuel d'activité																
			Rapport final et relevé des dépenses																
		T6.2 - P6.2	Valorisation du projet																
			Page Web dédiée sur le site de SIPIBEL																
			Document de présentation du projet																
			Coordination publication technique																
			Participation colloques et congrès																
			Rapport et synthèse publique																
			Conférence																

Perséphone : tâches P1 à P6
Télesphore : tâches T1 à T6
Tâches mutualisées

➔ Besoin et demande de prolongation ?

POINT ADMINISTRATIF ET FINANCIER

BUDGET RISMEAU

BUDGETS DE FONCTIONNEMENT	TELESPHORE	PERSEPHONE	BV SM3A	TOTAL
	TOTAL AERMC	TOTAL AFB	TOTAL SM3A	TOTAL
CHARGES DE FONCTIONNEMENT				
PERSONNELS				
Permanent	389 904 €	314 137 €	9 500 €	676 546 €
Non permanent	181 000 €	37 460 €	- €	218 460 €
sous total Personnel	570 904 €	351 597 €	9 500 €	895 006 €
sous total Dépenses directes	108 500 €	158 270 €	10 490 €	258 160 €
sous total frais de bureau et frais	100 550 €	64 135 €	- €	153 587 €
Total dépenses	779 953 €	574 002 €	19 990 €	1 306 753 €
Total autofinancement	370 781 €	330 406 €	- €	686 928 €
Besoin de financement	409 173 €	243 596 €	19 990 €	619 825 €
Autres financements sollicités	5 070 €	- €	19 990 €	25 060 €
Financement Agence de l'eau	377 550 €	33 596 €	- €	377 550 €
Financement AFB	19 337 €	210 000 €	- €	210 000 €

- BV SM3A : autofinancement 3^e campagne + 3300 € INSA ISA Graie
- Etude Chambre d'agriculture : financement SRB + 5070 €
- Investissement Telesphore : autofinancement + 8 150 €
INSA ENTPE ISA SRB
- Budget supplémentaire H2O'Lyon – ½ bourse de thèse Telesphore



Moyens humains déployés

- Noémie Pernin, doctorante INSA Lyon à partir de juillet 2020
- Tiphaine Lellain, stagiaire INRAE Versailles-Grignon de janvier à juin 2020
- Olivier Roques, doctorant ENTPE à partir d'octobre 2019
- Alexandre Guironnet, doctorant ISA (50 % Perséphone) à partir de septembre 2018
- Deux étudiants en PIRD au sein de l'INSA Lyon – mi-temps de septembre 2020 à janvier 2021



Valorisation RISMEAU et SIPIBEL

- Graie : Lyon III (janvier), ASTEE (septembre), séminaire DIADeM (octobre)
- Yves Lévi (Univ. Paris Sud) : réseau santé environnement Ile de France aujourd'hui



- « Data paper » / accessibilité données SIPIBEL sur Norman
- Site internet SIPIBEL



Les actualités locales





Actualités autour du projet

- Evolution de la réglementation sur l'épandage des boues
- Protocole et campagne PhagesBoue
- Actualités de l'Agence de l'Eau RMC et de l'OFB

➔ **Autres actualités à partager ?**



Metadata for all projects

Update Last updated 17/07/2018 10:40:16 ; update lasted 16,9 seconds

Total number of...	Records	Correct data	Uncertain data	Incorrect data	Campaigns	Samples	Sampling points
	55 655	25 151	27 713	2 791	236	1 007	53
		45%	50%	5%			

Sheet organisation :

-/ All metadata

I/ Physico-chemical data

II/ Bioassays

III/ Microbiological data

IV/ Hydrobiological data

V/ Blank data



Beakdown of number of records by data type



Physico-chemical data : Ev



Currently displaying data for :

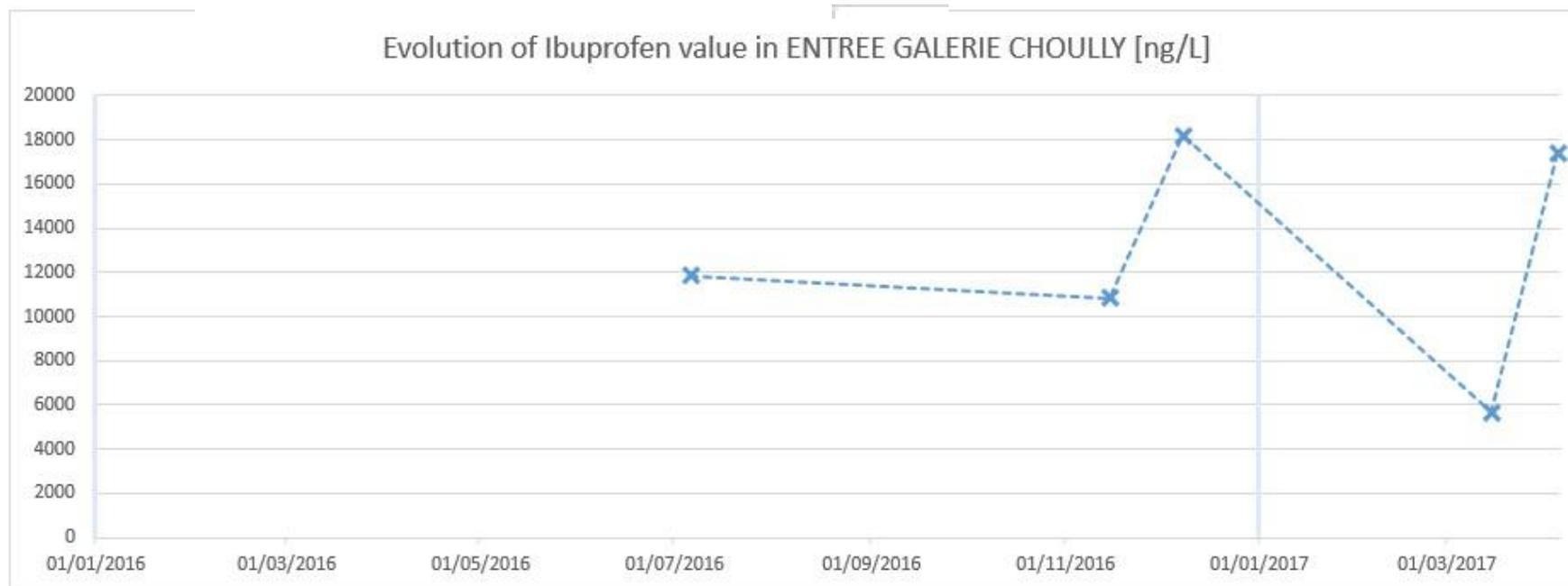
Ibuprofen (PC_0103)

ENTREE GALERIE CHOULLY (SP_0044)

in fraction : 1 - Dissolved fraction

Correct, uncertain and incorrect data

Change



L'outil Base de données DOMINEAU



- Outil utilisé par les projets COSMETEAU et LUMIEAU... et par SIPIBEL
- La base de données SIPIBEL compile 55 000 données physico-chimiques et biologiques issues de :
 - Observatoire SIPIBEL (autosurveillance STEP + analyses spécifiques SIPIBEL) sur effluents, boues et rivière Arve
 - Projets en appui : IRMISE Arve aval, RILACT...
- Principe pour RISMEAU : utiliser également l'outil DOMINEAU, en repartant d'une base de données vierge (avec quelques adaptations ?)



Base de données RISMEAU

	Physico-chimie	Bioessais	Microbio/ADN
TELESPHORE	Eau, sol et MAFOR (ISA et LAEPS) + capteurs (INSA)	X	X
PERSEPHONE	Vers de terre, sol et MAFOR (ISA, INRAE, ENTPE)	Toxicité VDT et activité enzymatique (ENTPE, INRAE)	Eau, sol et MAFOR (UNILIM)
ANALYSES COVID	Boues (Labo. Dépt + ISA)	X	Boues (UNILIM + labo dtp)
ETUDE ARVE	Ech. Intégratifs et eau (ISA)	X	X



Base de données RISMEAU

- Points de discussion :
 1. Dans quelle(s) base(s) souhaite-t-on bancariser chacune des catégories de données ?
 2. Quelle répartition des tâches de bancarisation des données ?
 - a) Descriptif paramètres et méthodes chimie ISA (eau, sol, intrants, vers de terre) : **ISA**
 - b) Descriptif méthodes chimie LAEPS : **INSA**
 - c) Saisie données chimie eau, sol, intrants : **INSA**
 - d) Saisie données chimie vers de terre : **ENTPE**
 - e) Descriptif méthodes bioessais : **ENTPE**
 - f) Saisie données bioessais : **ENTPE**
 - g) Descriptif méthode et saisie données microbio : **UNILIM**



Base de données RISMEAU

- Points de discussion :
 1. Dans quelle(s) base(s) souhaite-t-on bancariser chacune des catégories de données ?
 2. Quelle répartition des tâches de bancarisation des données ?
 3. Modifications/simplifications proposées par Noémie Pernin :
 - Sites et points de prélèvements
 - Campagnes
 - Identification des échantillons
 4. Mode de fonctionnement pour la gestion de la base au cours du projet :
 - Droits d'écriture/de lecture
 - Accès à la base
 - Extractions pour Matlab/R



Telesphore

Dispositif expérimental et avancées

Noemie Pernin

24 novembre 2020

Planning prévisionnel [13 Fev. 20 - Réunion plénière Rismeau]

- Mars : Construction du dispositif expérimental in situ
- Mars à Juin : Finalisation du système de suivi
- Juin : Epandage 1 et début du suivi
- Novembre : Epandage 2

Caractérisation des intrants agricoles

T2.3 Campagnes d'échantillonnage des 5 intrants sélectionnés.

T2.4 Caractérisation des échantillons collectés .[ISA]

T2.5 Analyse comparative de la caractérisation des différents intrants échantillonnés, entre eux et avec la littérature scientifique. T2.6 Sélection finale des médicaments et biocides à suivre dans la partie 4.

Suivi expérimental

T5.2 Construction des parcelles expérimentales.

T5.3-T5.5 Caractérisation initiale du sol des parcelles. [ENTPE LEHNA]

T5.6 Apport des intrants sur les parcelles.

T5.7 Collecte des eaux infiltrées.

Planning 2020 réalisé :

- Mars : Prélèvements et analyses d'intrants agricoles
- Printemps : Conception système de suivi par capteur
- Juin : Chantier de mise en place du dispositif
- Ete : Finalisation du système de suivi
- Octobre : Protocole suite à l'arrêté du 30 avril 2020
[Interdiction d'épandage des boues non hygiénisées suite Covid]
- Novembre : Mesures d'infiltration sur les casiers [L. Lassabatère]
et épandage
- Juin 2021 : 2ème épandage ?

Dispositif expérimental : Conception

Objectifs : Reproduire des conditions d'épandage locales pour identifier et quantifier les transferts et processus associés liés aux résidus pharmaceutiques et aux biocides

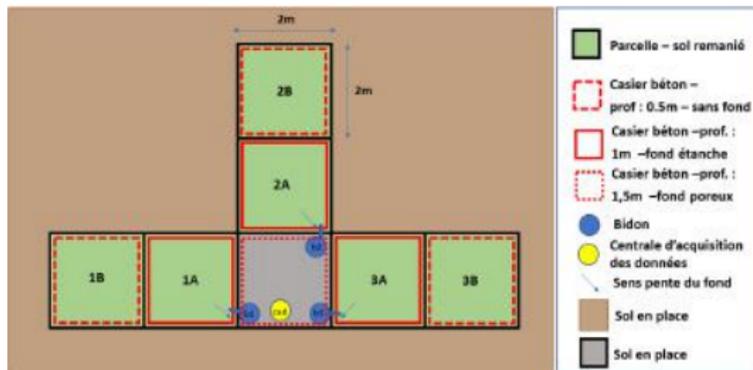
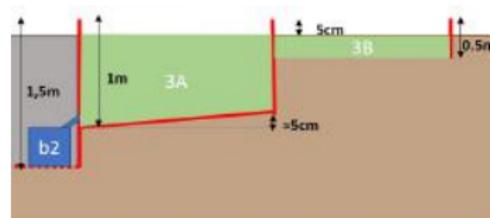


Schéma de conception du dispositif - Vue de dessus



Vue de détail en coupe

- 3 casiers étanches avec récupération de l'eau infiltrée & suivi par capteurs
- 3 casiers sans fond pour les carottes de sol
- Deux types d'intrant : agricole, boues de la STEP de Bellecombe

Dispositif expérimental : Mise en place

- Sol reconstitué couche par couche
- Mise en place du sol :
Piétinement + Tractopelle



Lysimètres in situ - juin 2020



Lysimètres in situ - septembre 2020

- Couverture végétale à l'identique
- Sept. 20 : Suppression manuelle (serfouette) des macropores visibles uniquement sur la zone des travaux
- = Reproduction du terrain d'origine

Dispositif expérimental : Caractérisation

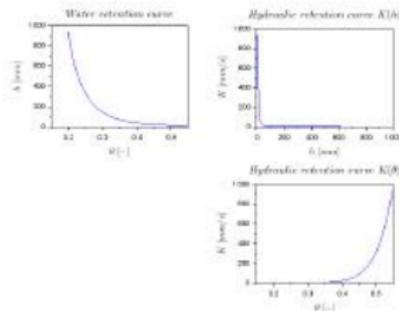
Caractérisation hydraulique du sol :

Essais à l'infiltromètre à simple anneau [partenariat : L. Lassabatère]

→ Mesures automatisées de la hauteur d'eau sur la durée de l'essai



Essai d'infiltration



Résultats après tri des données et algorithme BEST

Algorithme BEST : Estimation des fonctions de rétention en eau du sol et de la conductivité hydraulique à partir de l'infiltration cumulée mesurée lors des essais in situ, et de quelques mesures en laboratoire (granulométrie, densité, teneurs en eau)

→ Données en cours de traitement

Sol

Prélèvement Nov. 2019 [O. Roques] : Analyses HAP, pharmaceutiques [INRAe], métaux [ENTPE]

Caractérisation du sol : Valeurs agronomiques, granulométrie

Eau infiltrée

Essai de saturation du sol → Analyse de l'eau infiltrée récupérée (MES, DCO, COD, COT, P total, orthophosphates, nitrates, nitrites, Azote Ammoniacal, Azote Kjeldahl) [Etat 0]

Intrant

Prélèvement de 4 lisiers et 1 fumier : Analyse pharmaceutiques et biocides [ISA]

→ Choix d'un lisier

Lisier épandu : Analyse pharmaceutique et biocides [ISA] et valeur agronomique (MS,C/N,NTK, ETM) [LAEPS]

→ En cours

Boue STEP (lot épandu) : Analyse pharmaceutique et biocides [ISA] et Analyse des paramètres d'hygiénisation des boues [LAEPS]

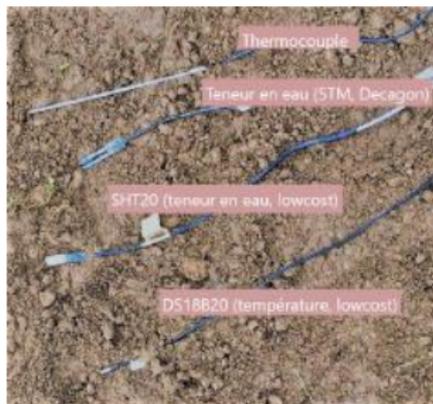
→ En cours

Dispositif expérimental : Suivi par capteurs

Objectif : Évaluation des flux d'eau

→ Suivi en temps réel et à distance de la température et de la teneur en eau du sol, les précipitations, la hauteur d'eau infiltrée, la température et l'humidité relative de l'air.

→ Données Météo France [Station de Bonneville]



Sondes de suivi de température et teneur en eau du sol [photo : jlbk]



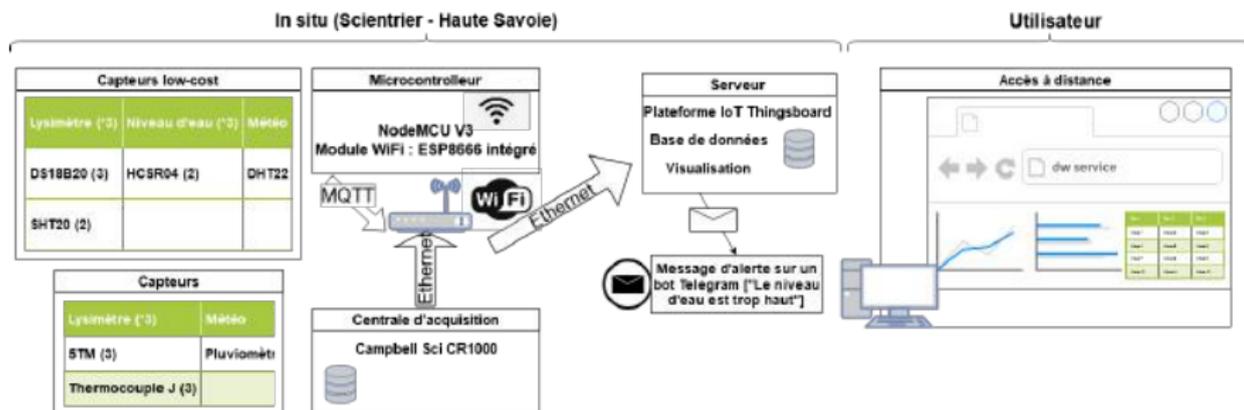
Pluviomètre



Hauteur d'eau :
capteur ultra-son low-cost

Dispositif expérimental : Acquisition des données

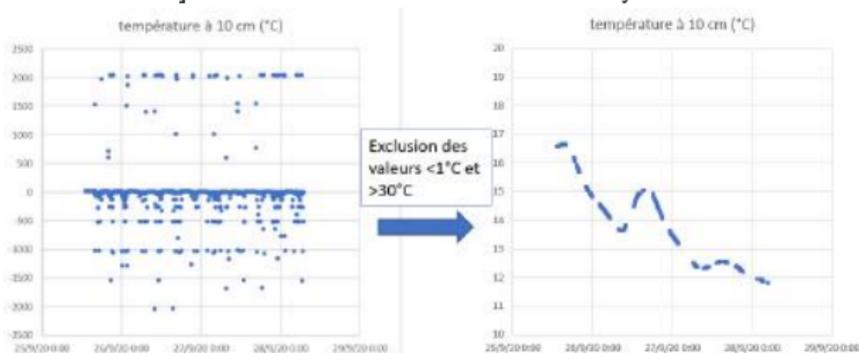
Acquisition des données en temps réel, accès à distance des données en direct ou de l'historique enregistré sur le serveur



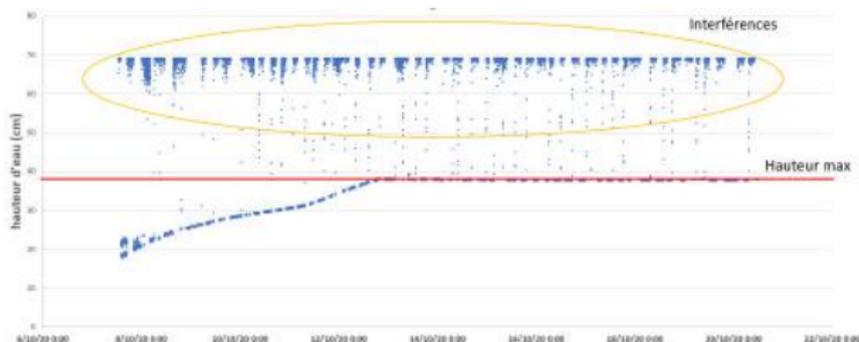
Principe de l'acquisition de données et de l'accès à distance en temps réel

Dispositif expérimental : Capteurs low-cost

[En cours d'amélioration] Problème d'interférence sur le système low-cost



Données brutes et filtrées des températures du sol à 10 cm de profondeur



Hauteurs d'eau évaluées à partir des mesures par capteur ultra-son

Protocole Boues : Hygiénisation & Covid

Mise en place du protocole de suivi des boues de la STEP de Bellecombe suite à l'interdiction d'épandre les boues non hygiénisées [Arrêté du 30 avril 2020]



Prélèvement à la STEP de Bellecombe
[Photo : jlbk]

- 3 lots de boue
→ Temps de séchage : 5, 12, 20 jours
(+ à venir : 43 jours)
- Analyses Hygiénisation (Arrêté 8 janvier 98)
- Analyses spécifiques Sars-CoV2 (Univ. Limoges)
- Analyses micro-polluants (CNRS ISA)

Résultats des analyses des paramètres d'hygiénisation des boues

Lot	tps serre moy.	MS	Entérovirus /10g MS	Œufs d'helminthes g/MS	coliformes thermotolérants /g MS	salmonelles NPP/10g MS	Critères d'hygiénisation			
							Salmonelles <8NPP /10gMS	entérovirus <3 NPPUC /10g MS	Œufs d'helminthes <30/g MS	Coliformes thermotolérants <100/gMS
37-38	20,5	68,7	Absence	< 3	1640	1100	non	oui	oui	non
39	12,5	39,1	Absence	53	792390	240	non	oui	non	non
39	43,5	Analyses en cours [LAEPS]								
40	5,5	40	Absence	18	497510	23	non	oui	oui	non

Résultat à confirmer



Lisier

- Lisier 5 choisi à partir des résultats des analyses médicaments/biocides
- 10 kg par casier
- Basé sur les informations de l'éleveur [20 à 25 $m^3.ha^{-1}$]

→ Analyses en cours

Boues de Bellecombe

- Lot choisi : permet une analyse en plus pour le protocole covid
- 1,6 kg par casier
- siccité : 68.8%
- Recommandation du Cabinet Birraux [2.9 $T.ha^{-1}$]

- Prélèvement de l'eau infiltrée : 1 fois/semaine si volume suffisant
→ **Calendrier de prélèvement**
- Prélèvement sol : semestriel (selon date épandage)
- Réutilisation des documents de campagne de prélèvements de Sipibel
→ **A relire et compléter**
- Mise en place d'une base de données partagées

Tâches Telesphore :

Caractérisation des intrants

T2.5 Analyse comparative de la caractérisation des différents intrants échantillonnés, entre eux et avec la littérature scientifique.

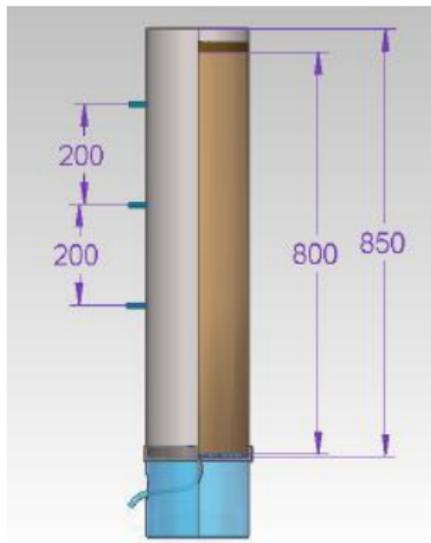
T2.6 Sélection finale des médicaments et biocides à suivre dans la partie 4.

Suivi expérimental

T5.7 Collecte des eaux infiltrées

Pilote en colonne

Suite à l'obtention de la bourse H2O



Conception de la colonne [M. Plissonnier & V. Fagoo]

- Etudiants PIRD INSA
- Construction prototype en cours

Partenariat avec Fabienne Favre boivin [HEIA, Fribourg (CH)]

- Appui au projet Telesphore
- Présentation du site [5/10/2020]
- Présence au laboratoire DEEP Mars-Juin 2021

Partenariat avec Simone et Jens Traenckner [Uni. Rostock, (DE)]

- Appui à la modélisation
- Réunion de présentation Telesphore 8/12/20
- Demande de Bourse DAAD : Séjour d'un mois sur place

Méthodologie des analyses en screening sur les intrants et résultats préliminaires

Réunion RISMEAU du 24 novembre 2020
Alexandre Guironnet, Institut des Sciences Analytiques

Sommaire

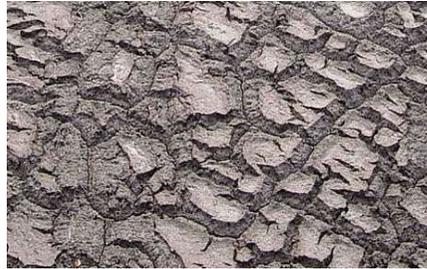
- **Matrices étudiées**
- **Méthodes d'extractions utilisées**
- **Méthode d'analyse**
- **Etablissement liste de molécules suspectes**
- **Sélection de l'intrant à épandre + Etat 0 du sol par infiltration Eau**
- **Confirmation**

Matrices étudiées

4 matrices différentes :



Sol



Boues de STEP



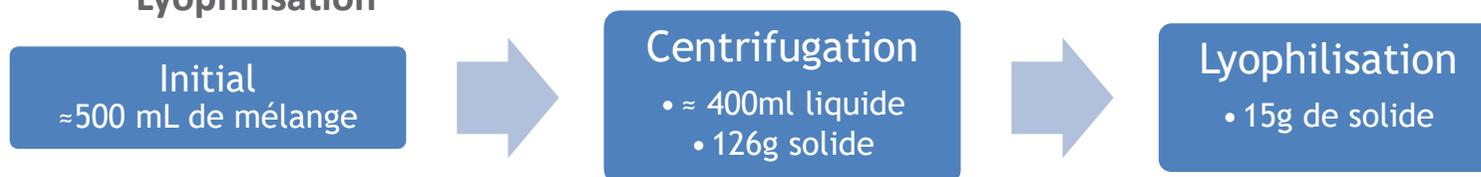
Lisier/Fumier bovin

Sol, boues et fumier relativement secs

Lisier majoritairement liquide

Matrices étudiées - Prétraitement

- **Sol et boues :**
 - Lyophilisation
 - Broyage pilon/mortier pour homogénéiser (<250 μ m pour sol, <2mm pour boues)
- **Fumier**
 - Lyophilisation
- **Lisier (4 Lisiers)**
 - Séparation Solide/Liquide par centrifugation
 - Lyophilisation



Répartition 3/97 Solide/Liquide

Méthodes d'extraction

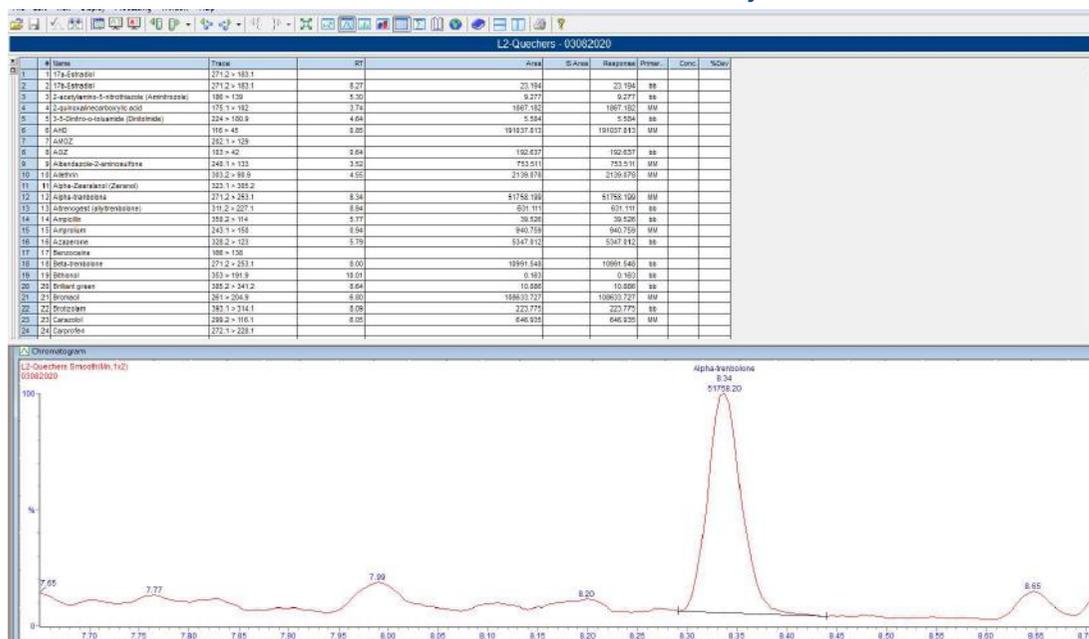
2 méthodes précédemment développées au sein de l'équipe

- Extraction ultrason Eau/Méthanol (100mg)
- Extraction QuEChERS : Eau/Acétonitrile assistée par des sels (2g)

Permet de cribler des molécules sur une large gamme de polarité et de masse molaire

Méthode d'analyse

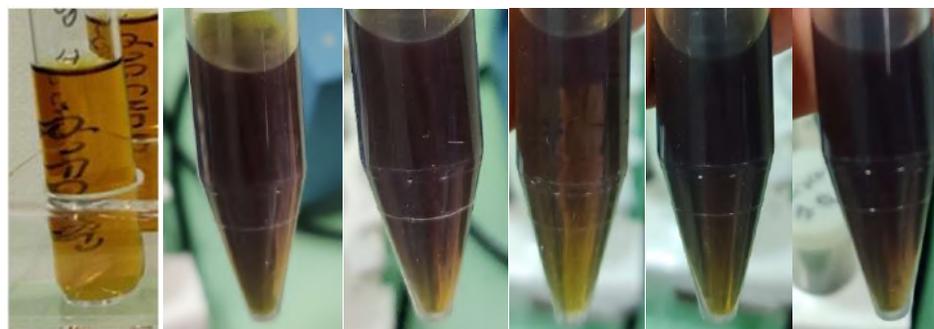
Analyse LC-MSMS (QqQ) avec base de données Quanpédia (Waters)
 160 médicaments vétérinaires , une seule transition MRM par molécule



Nécessaire d'avoir le standard analytique pour confirmer la présence

Résultats préliminaires – Molécules à confirmer

Matrice	Molécules Ultrasons	Molécules QuEChERS
Boues	20	20
Lisier 1	20	20
Lisier 2	20	20
Lisier 3	19	20
Lisier 4	20	20
Fumier	15	17



Etablissement de la liste à confirmer

3 critères de sélections :

- **Composé retrouvé dans la boue et un des intrants agricoles**
- **Présence dans les deux méthodes d'extractions de la même matrice**
- **Intensité élevée du pic chromatographique**

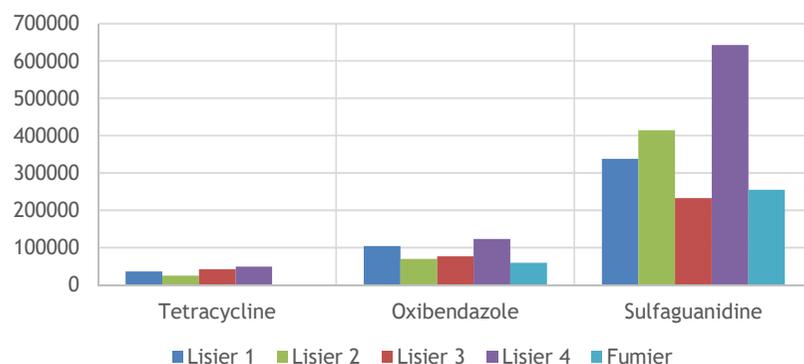


Liste de 32 composés à confirmer :
Antibiotiques et biocides vétérinaires

Sélection Intrans Agricole à épandre

Intrans	Nbre mol détectées	Commun boues
Lisier 1	22	15
Lisier 2	22	15
Lisier 3	22	14
Lisier 4	22	15
Fumier	18	14

Aires pic chromato



Les lisiers contiennent des quantités un peu plus importantes de composés que le fumier

Sélection du lisier 4 : Aires un peu plus intense , plus de facilités de traitement

Etat T0 des casiers

Etat initial des casiers réalisé par saturation d'eau et récupération des eaux d'infiltrations (fin septembre par Noémie) + Eau utilisée pour percolation

Filtration puis traitement par SPE

Echantillon	Nbre molécules Quapédia (ds liste)
Eau Avant saturation	0
Casier 1	14 (9)
Casier 2	14 (9)
Casier 3	14 (9)

Confirmation en cours

26 molécules sur 32

- **Boues :**
 - Ciprofloxacin/ ofloxacin
 - Tetracycline
 - Levamisole (antiparasitaire)
 - Thiabendazole , chlorhexidine (biocides)
- **Lisier :**
 - Tetracycline
 - Oxibendazole , flubendazole

Impacts écotoxicologiques des boues d'épuration – Traitement 2^{ème} MAFOR

Olivier Roques (*doctorant en écologie*)

INSA | INSTITUT NATIONAL
DES SCIENCES
APPLIQUÉES
LYON

ENTPE
L'école de l'aménagement durable des territoires

deep



INRAE

IS INSTITUT DES
SCIENCES
ANALYTIQUES

SIPIBEL
Site Pilote de Bellecombe



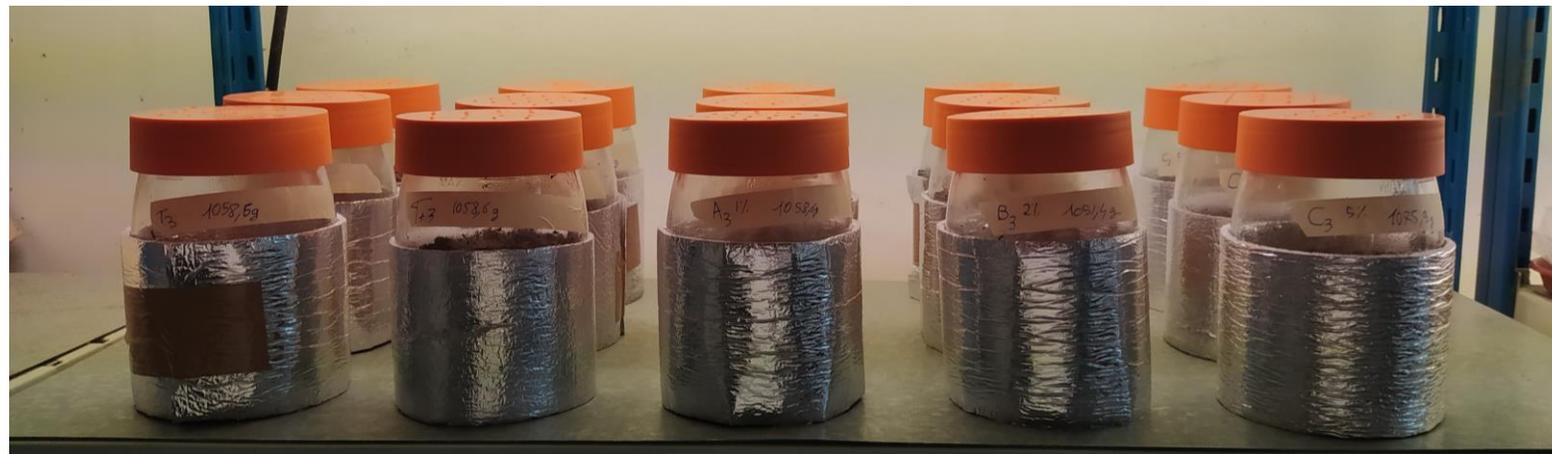


E. Fetida (Savigny, 1826)



Condition expérimentale des tests de létalité/reproduction

- Masse initiale vers de terre = 0,30 à 0,45 g
- 10 vers de terre par réplicats
- 3 réplicats par conditions
- Conditions = Sol de Bellecombe + Boue STEU
- Volume matrice = 0,45 L = 7 cm d'épaisseur (400 à 550 g de MS)

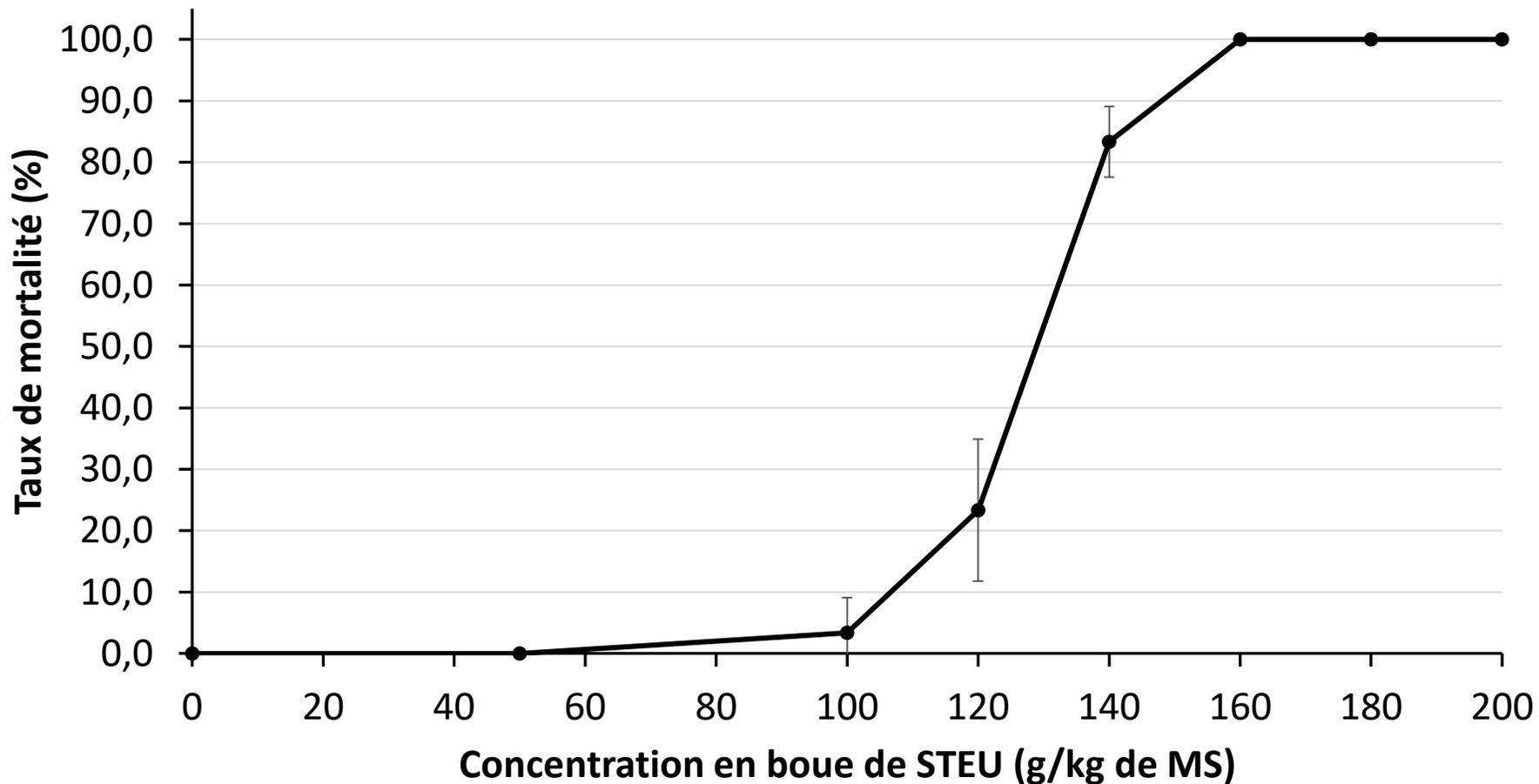


STEU = Station de traitement
des eaux usées

MS = Matières sèches

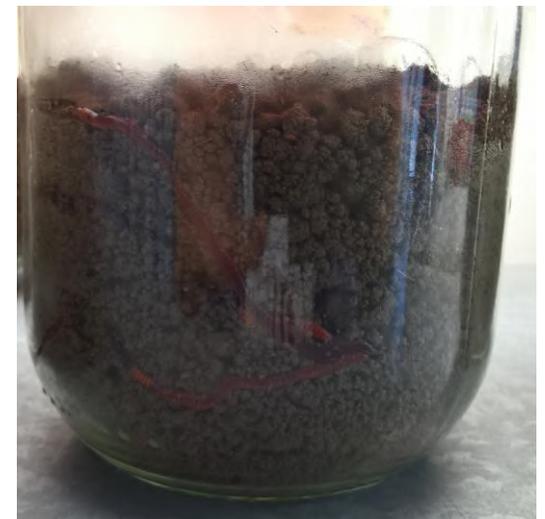
Système expérimental lors des tests de reproduction (et de létalité sans cache)

Test de Létalité



$DL_{50} = 127,06$ g/kg de MS

13 x supérieur à la dose d'épandage (10g/kg de MS)



Taux de mortalité de *E. fetida* après 14 jours d'exposition à différentes concentrations en boue de STEU

Test de Reproduction

But :

- Evaluer la toxicité chronique de la boue de la STEU de Bellecombe à l'aide du test de reproduction sur *E. fetida*

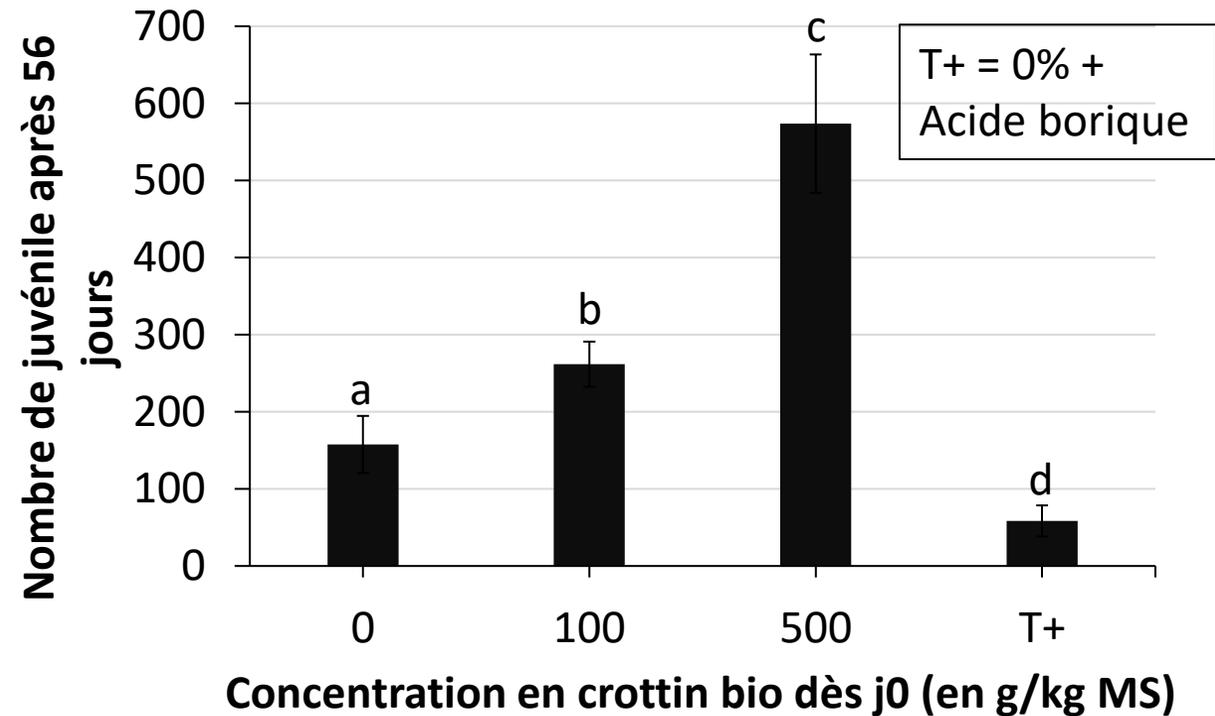
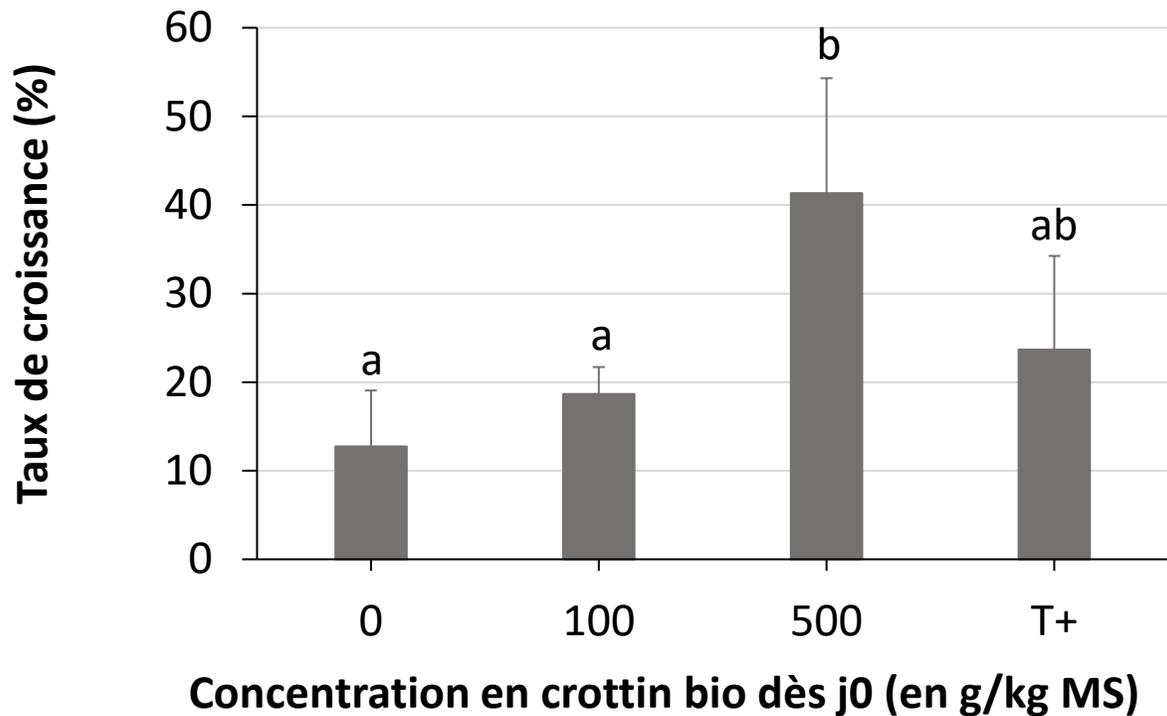
Durée du test : 56 jours

à J+28, les adultes sont retirés (survie et croissance)

à J+56, les juvéniles sont dénombrés (reproduction)

Pré-Test de Reproduction

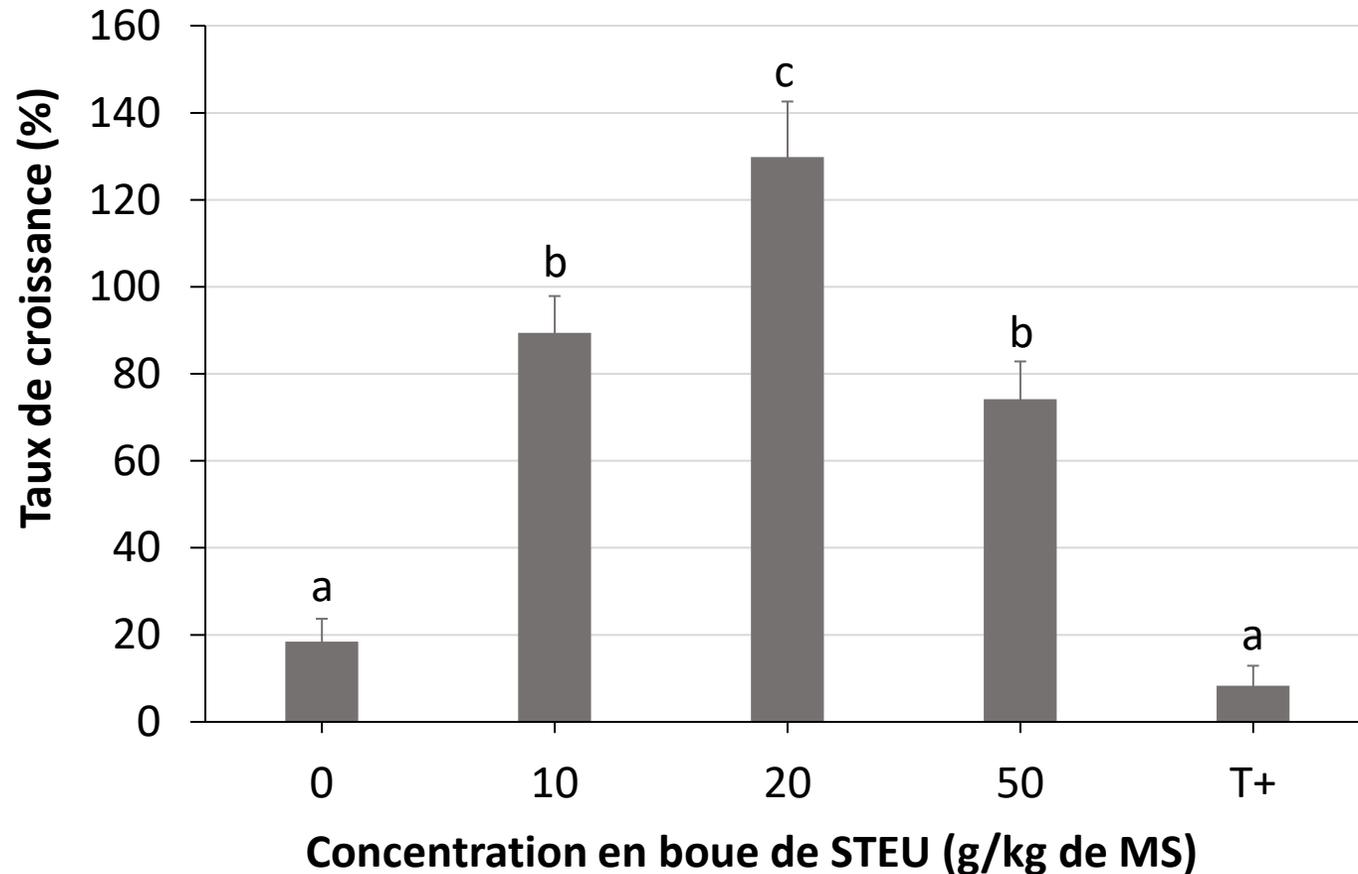
→ Déterminer si l'effet « nourriture » est limitant ou pas sur un test de reproduction



Effet sur le nombre de juvéniles et sur le taux de croissance

Quantité en nourriture ($C_{organique}$) identique dans chaque condition

Test de Reproduction – Croissance et survie



$C_{\text{organique}} = 8,51$ g dans chaque condition

5 % : $36,7 \pm 28,87$ % de mortalité

Taux de croissance > Témoin

Effet Qualité de nourriture

Taux de croissance de *E. fetida* après 28 jours d'exposition à différentes concentrations en boue de STEU

Expérience à venir

MAFORs Boue

- Fin du test de reproduction, comptage du nombre de juvénile **EN COURS**
- Test d'évitement
- Analyses bioaccumulation résidus de médicaments adulte/juvénile

MAFORs Fumier

- Test de létalité **EN COURS**
- Test d'évitement
- Test de reproduction + bioaccumulation

I. Test de toxicité - Boue STEU

II. Traitement - Fumier



Broyage

5x



Homogénéisation

-20°C
-80°C



Merci pour votre attention

UMR ECOSYS

Écologie fonctionnelle et écotoxicologie des agroécosystèmes

➤ Impact d'une boue de STEP sur les vers de terre et les microorganismes du sol

S. Néliu, T. Lellain, V. Etievant, I. Lamy

➤ Introduction

➤ Notre rôle dans le projet

- Caractérisation de l'impact de MAFORs sur des vers de terre *Apporectodea caliginosa* et les microorganismes du sol
- Estimation de la bioaccumulation de métaux liés aux MAFOR, fourniture d'échantillons (issus d'exposition) pour les produits pharmaceutiques et l'antibiorésistance

➤ Notre planning

- Année 2020 : tests sur boue de STEP
- Année 2021 : comparaison de l'impact de la boue de STEP avec le fumier

➤ Nos actions en 2020

- Diverses caractérisations
- Les tests avec la boue de STEP



➤ Contexte & objectifs

- Risques liés à l'épandage de MAFOR pour les organismes du sol
- Différents bioessais existent pour évaluer l'écotoxicité
- Leurs différences : sensibilité variée, représentativité vs terrain et pratiques

→ Objectifs :

- Déterminer parmi différents bio-essais quel(s) est (sont) le(s) meilleur(s) indicateur(s) pour évaluer l'écotoxicité d'une MAFOR dans le sol
- Evaluer les stress potentiels, en situation de labo mais réaliste vs les pratiques



➤ Caractéristiques de la boue de STEP utilisée

- **Reçue** début janvier 2020 – tamisée humide à 2 mm et congelée jusqu'à usage

- **Caractéristiques générales** (évaluations ENTPE et Ecosys)
 - pH 7.45
 - Capacité de Rétention d'eau (CRE) : 135,4 mL/100 g (conservée à 51.72 mL/100 g)
 - Carbone 37.47 % ; Azote 6.60%

- **Contaminants** (évaluations Ecosys)
 - Produits pharmaceutiques :
 - Antibiotiques ($\mu\text{g}/\text{kg MS}$) : fortes teneurs en fluoroquinolones (ofloxacine 3065, ciprofloxacine 2130, norfloxacine 713) et tétracyclines (doxycycline 795, tétracycline 645)
 - Autres ($\mu\text{g}/\text{kg MS}$): lévamisole 15,8 ; fluoxétine 73,3; cabamazépine 40,3
 - HAP : > 15 $\mu\text{g}/\text{kg MS}$ en : fluorène (19,5), phénanthrène (74,1), fluoranthène (25,5), pyrène (42,2), chrysène (20,2), benzo[b]fluoranthène (17,6)
 - Métaux lourds : Cu 349 mg/kg, Zn 711 mg/kg (Pb < LOQ, Cd < LOD)

➤ Matériels et méthode (1/3)

➤ Organismes testés

- *Apporectodea caliginosa* : vdt endogé, courant dans les sols (élevage en place à Ecosys)
- Microorganismes

➤ Modalités

- Clx = Sol d'élevage (limono-argileux; pH 6,68 ;1,12% C) – séché /broyé / tamisé 2 mm
 - BC = Sol de la zone expérimentale (limoneux; pH 6,75; 0,90% C) – séché / tamisé 2 mm
 - BC + 1% = sol BC + 1% de boue de STEP
 - BC + 2% = sol BC + 2% de boue de STEP
- Pour minimiser le **facteur confondant « nourriture »** : compensation en C par du crottin
→ Tous avec apport de 1.05% en C (= situation d'élevage , selon l'apport usuel de crottin/Vdt et /mois)

➤ M & M (2/3) : Bio-essais

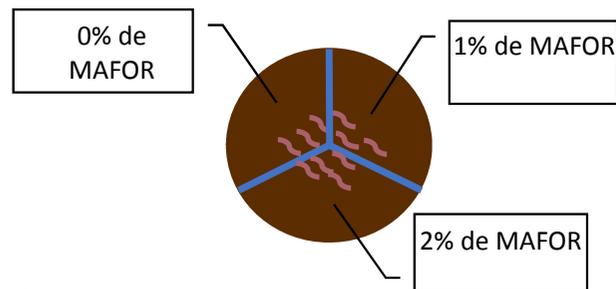
- **Test de reproduction** (expo 3 mois) : 5 Vdt et 400 g MS /cosme, 70% CRE (6 réplicas)
 - Comptage des cocons à 28, 56 et 72 jours
 - suivi des naissances
 - à 72 j : Vdt sacrifiés → réserves énergétiques, contamination (métaux, pharmas, ABR)



- **Test de toxicité aiguë** (expo 14 jours) : 0 ou 5 Vdt et 400 g MS/cosme, 70% CRE (6 réplicas)
 - sol : contamination
 - activités enzymatiques : cycles de C, N et P
 - Vdt : réserves énergétiques, contamination



- **Test d'évitement** (expo 48 h) : 10 Vdt, 5 réplicas



➤ M & M (3/3) : méthodes biochimiques et chimiques

➤ **Réserves énergétiques** des vers de terre

Glycogène : extraction alcaline, transformation en glucose, phosphorylation, colorimétrie sur le NADH formé par réduction du glucose phosphorylé/oxydation de NAD (Holmstrup et al. 2007; Knigge et al. 2000)

Protéines : méthode BCA (bicinchoninic acid assay, Smith et al. 1985) : réduction par les protéines de Cu^{2+} , complexation du Cu^+ formé et colorimétrie

Lipides : extraction puis purification du broyat par ELL, hydrolyse / dérivation par phosphovanilline et colorimétrie

➤ **Activités enzymatiques** du sol (14 jours) : norme ISO 20130:2018

Cycle C : β -glucosidase

Cycle N : arylamidase

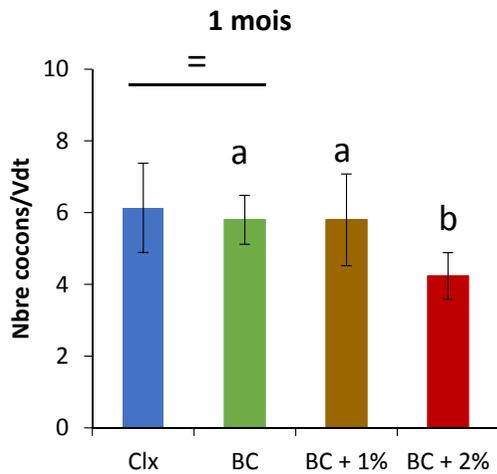
Cycle P : phosphatase et phosphatase alcaline

➤ **Contamination par les métaux** (exposition 14 jours) : sur sol et Vdt ayant jeuné 48 h avant congélation

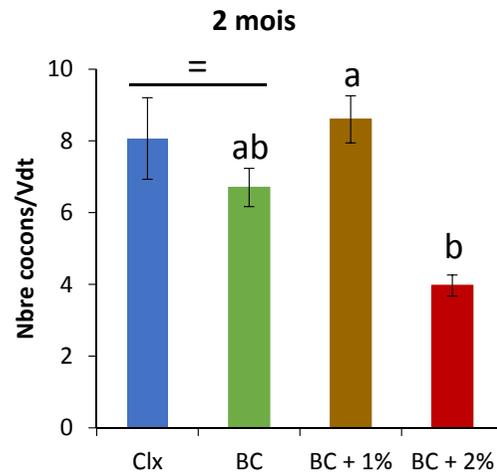
Extraction via minéralisation HF sous micro-ondes

Analyse par spectrométrie d'émission atomique

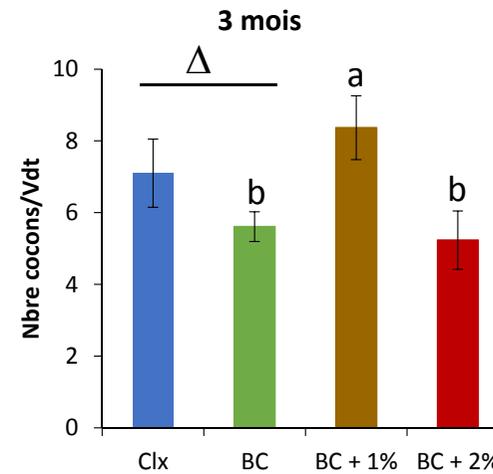
➤ Reproduction : nombre de cocons produits



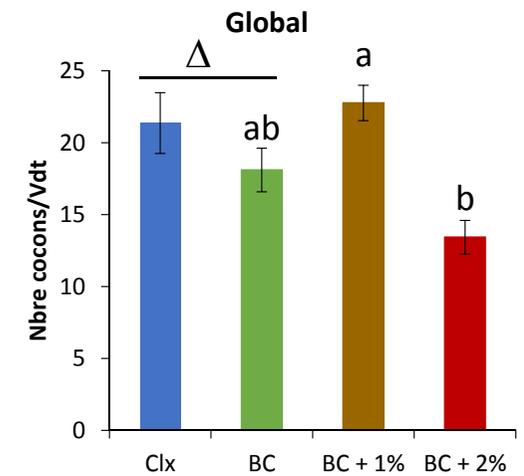
moins de cocons avec 2%



- plus de cocons avec 1%
- moins de cocons avec 2%

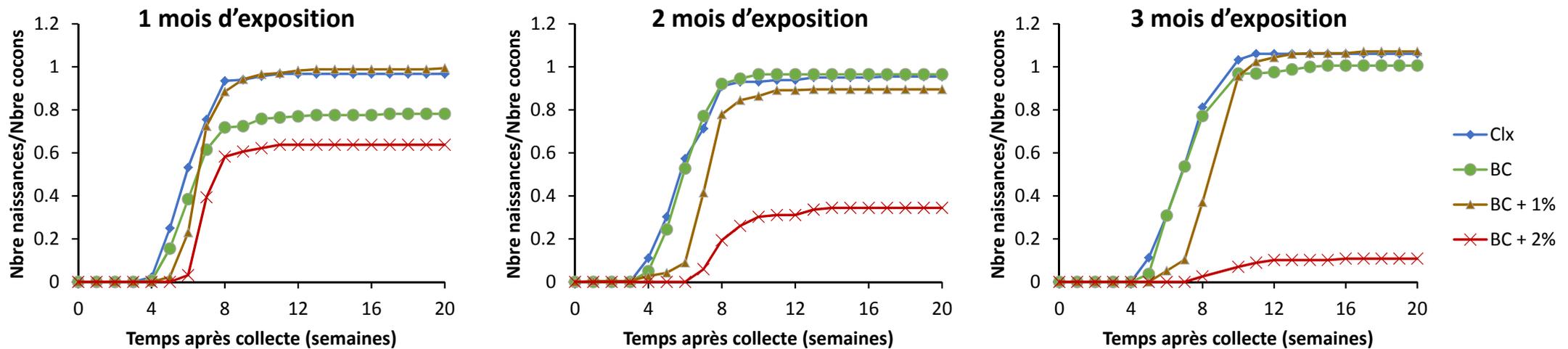


plus de cocons avec 1%



- Légère influence du sol du site vs d'élevage
- Légère augmentation du nombre de cocons à 1% et diminution à 2% de boue

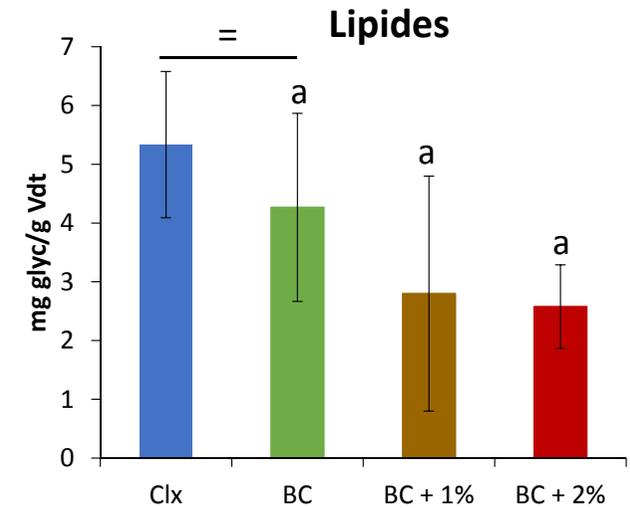
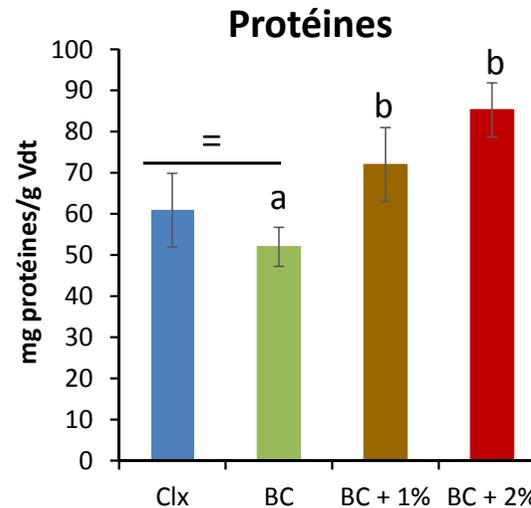
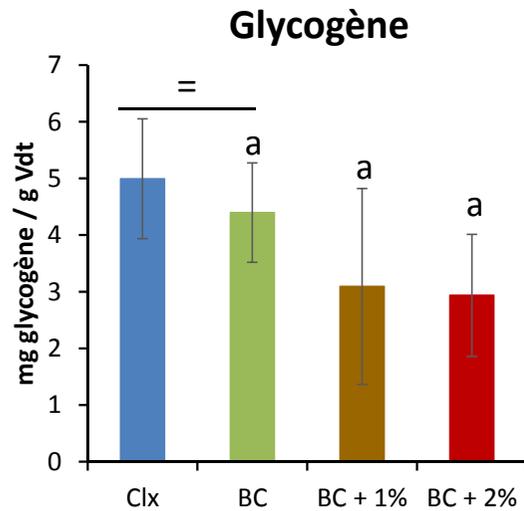
➤ Reproduction : éclosion des cocons



- Les cocons éclosent globalement tous sauf ceux du milieu à 2% de boue
- A 2% de boue, éclosions 1 mois > 2 mois > 3 mois
- Le délai des 1ères naissances est d'autant plus long quand les vers de terre reproducteurs sont exposés à des quantités de boue plus élevées

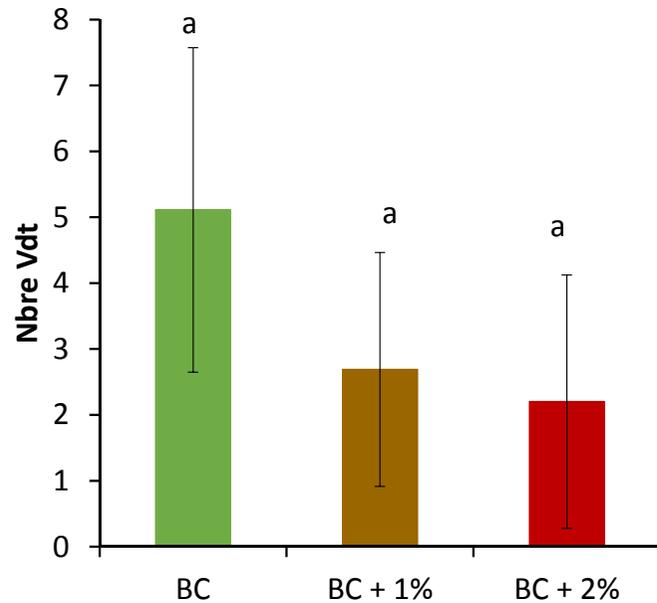


➤ Reproduction : réserves énergétiques



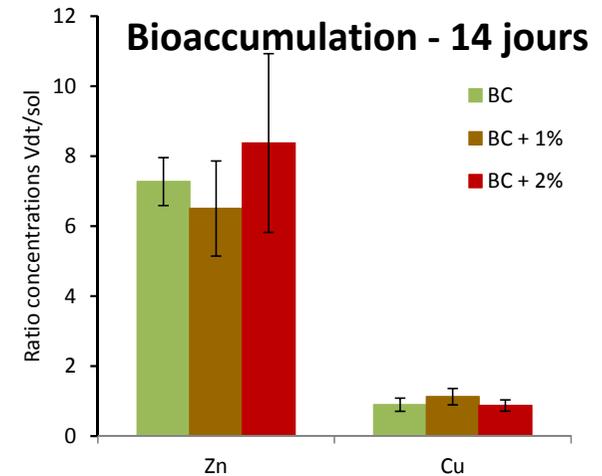
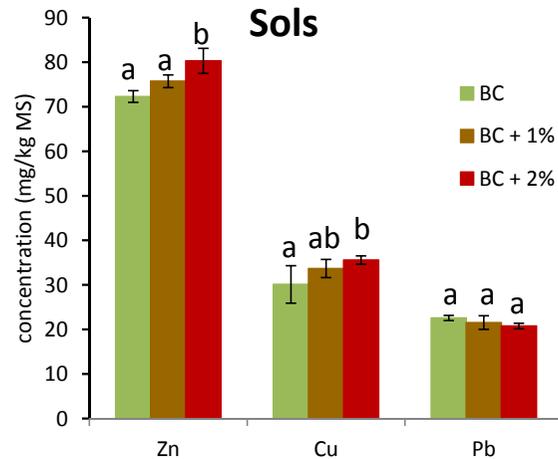
- Avec l'apport de boue de STEP dans le sol :
 - Diminution mais non significative des réserves glucidiques et lipidiques
 - Augmentation significative des réserves protéiques
- Pas net pour trancher sur l'effet de la boue

➤ Evitement



- Pas de différence significative de la répartition des vers de terre entre les différents compartiments selon la concentration de boue
- Mais tout de même une tendance des vers de terre à moins se diriger vers les zones avec de la boue

➤ Contamination du sol et des Vdts lors du bio-essai 14 jours



➤ **Sols** : légers enrichissements en Zn et Cu par l'apport de la boue

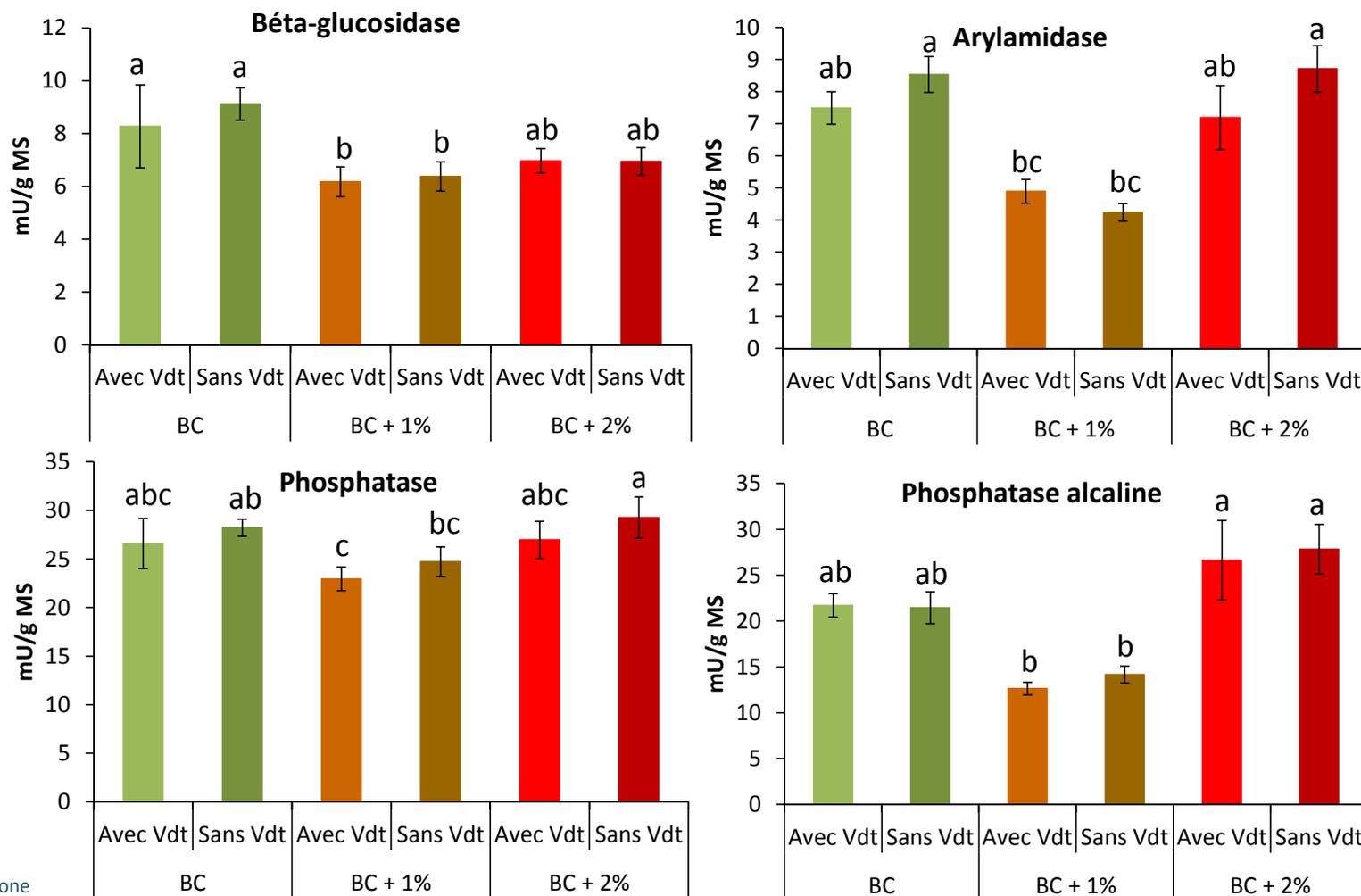
➤ **Vers de terre** :

Pas d'effet des conditions testées : dû à faible contraste entre conditions, à biodisponibilité ou à régulation

➤ Microorganismes du sol : activités enzymatiques (14 jours)

Global :
 ↘ à 1% et = ou ↗ à 2%

Pas/faible boost par la boue



INRAE

Réunion annuelle RISMEAU-Perséphone
 24/11/2020 – Néliu et al.

➤ Conclusion

- Effet sur la reproduction de *A. caliginosa* (3 mois)
 - 2% de boue : moins de cocons (Zaltauskaite et al. 2017), délai des naissances, faible taux de naissances (Kinney et al. 2012)
 - 1% de boue : globalement pas d'effet (tendance à plus de cocons, pas d'effet sur leur éclosion)
 - En parallèle , après 3 mois : l'apport de boue provoque une tendance à ↗ des protéines et ↘ des lipides et du glycogène : le stress de l'amendement change peu la physiologie du Vdt (plus d'énergie allouée à la production de cocons à 1% ?).

- Tests plus courts sur *A. caliginosa* :
 - Pas d'effet significatifs (léthalité – biomasse – évitement; physiologie en cours).
 - Sur 14 jours, la bioaccumulation de Cu et Zn n'est pas affectée.

- Activités enzymatiques du sol : pas d'effet net (cf élimination du facteur confondant « nourriture »)

➤ Merci pour votre attention

Merci pour leurs contributions à :

- ENTPE : Jean-Philippe Bedell, Olivier Roques

- Ecosys (hors co-auteurs) :
 - Ghislaine Delarue
 - Amélie Trouvé
 - Laetitia Pedroni
 - Jean-Pierre Pétraud
 - Sébastien Breuil
 - Giacomo Grassi
 - Olivier Hullot
 - BioChem-Env : Nathalie Cheviron, Virginie Grondin, Erell Naslain



INRAE

Réunion annuelle RISMEAU-Perséphone
24/11/2020 – Nélieu et al.

HOME GARDEN exp

Où l'art de s'occuper en plein confinement

Liste à la Prévert:

Comment « encager » les vers de terre ? Ne pas qu'ils s'enfuient ?

A quelle profondeur doit-on les mettre dans le sol du système ? Doit-on amender ? Quelle % MO /C doit on apporter?

Combien de temps peut-on espérer les laisser ?

Peuvent-ils se reproduire dans ces systèmes encagés ? Notamment à l'extérieur?

Si ajout de Mafors: survie ? Reproduction?

- Petite colonne; semi-contrôlé (°C); 15 jrs; duplicat

Essai 1: A quelle profondeur ?

Essai 2: quel % MO/C ?

- Grande colonne; extérieur; 8 semaines; triplicat

Essai 3 : avec et sans MAFOR N°1

Home garden N°1



- avec des Tube PVC translucide (carottes sédimentaires)
- découpé à 25 cm de hauteur diamètre 8.5 cm pour un dépôt de 20 cm de hauteur d'un mélange : sol « jardin » avec 10% (m/m) de terreau (Gamm vert « BIO»).
- Identification de différentes hauteurs sur le tube sur le pourtour. Mise de la moustiquaire au fond scotche de façon à éviter toute sortie /fuite potentielle des VDT.
- Remplissage par léger tassement mécanique au fur et à mesure du remplissage (tapotage) puis dépôt de 10 VDT par tube soit à 2.5 cm, 5 cm et 10 cm de la surface,
- Essai gardé à l'intérieur (isolé mais sans chauffage) pendant 15 jrs





J+0

Hauteur de dépôt VDT de la surface		Masse VDT (somme pour 10 VDT en g MF)	Masse système sec (en kg MS)	Masse système humide (en kg MF)
A : à 2.5 cm	A1	3.99	1.420	1.820
	A2	3.89	1.430	1.835
B : à 5 cm	B1	3.49	1.140	1.660
	B2	3.53	1.290	1.780
C : à 10 cm	C1	3.20	1.110	1.730
	C2	3.45	1.320	1.810







J+15

		Nombre de VDT/Tranche				Nombre total (/10 déposé)	Masse fraîche (g)	Observations
		20-15	15-10	10-5	5-0			
A : 2.5 cm	A1	2	2	0	6	10	3.70	Cocons visibles
	A2	1	2	1	6	10	3.77	
B : 5 cm	B1	1	1	4	4	10	3.65	
	B2	1	1	3	5	10	3.47	Cocons visibles
C : 10cm	C1	1	2	2	5	10	3.22	Cocons visibles
	C2	1	2	3	4	10	3.48	

Conclusions :

Supporte le système (**ne meurt pas**) voire **se reproduise** (cocons vus dans les 3 hauteurs)

Pas de perte ou gain de poids significatif sur 15 jrs

Se répartissent/**prospectent sur l'ensemble du système** ; avec semble-t-il une meilleure répartition quand **déposé à mi-hauteur du dépôt total** (à 10 cm pour 20 cm du système)

HOME GARDEN N°2

J+0

- Tube PVC translucide (carottes sédimentaires) découpé à 25 cm de hauteur diamètre 8.5 cm
- pour un dépôt de 15 cm de hauteur d'un sol « jardin » seul ou mélangé avec 1%, 5%, 10% (m/m) de terreau (Gamm vert « BIO »).
- Mise de la moustiquaire au fond scotche de façon à éviter toute sortie /fuite potentielle des VDT.
- Remplissage par léger tassement mécanique au fur et à mesure du remplissage (tapotage) puis dépôt de 15 VDT par tube à 7.5 cm de la surface,
- Stocké à l'intérieur (isolé sans chauffage) pendant 15 jrs



		Masse VDT (somme pour 15 VDT en g MF)	Masse système sec (en kg MS)
A : sol seul (0%)	A1	3.65	1.240
	A2	3.46	1.120
B : + 1%	B1	4.19	1.100
	B2	3.78	1.080
C : + 5%	C1	3.41	1.100
	C2	3.67	1.120
D : + 10%	D1	3.92	1.080
	D2	3.82	1.110

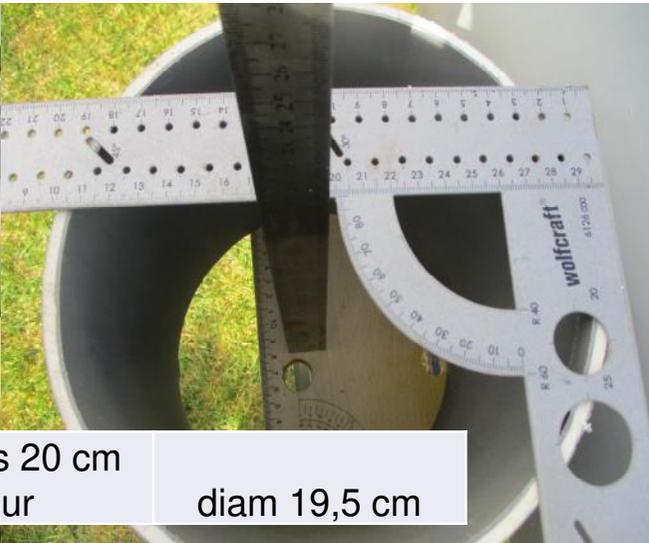


J+15

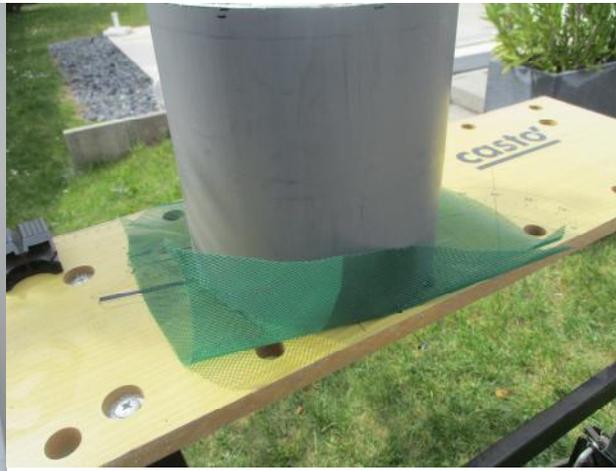
Conclusion:

Se répartissent **toujours plutôt en surface**
 Ne **sont pas impacter (mortalité et survie)** par le sol seul. Pas de cocon visible.
Légères différences poids plus importants avec **5 et 10%** (à vérifier stat?)

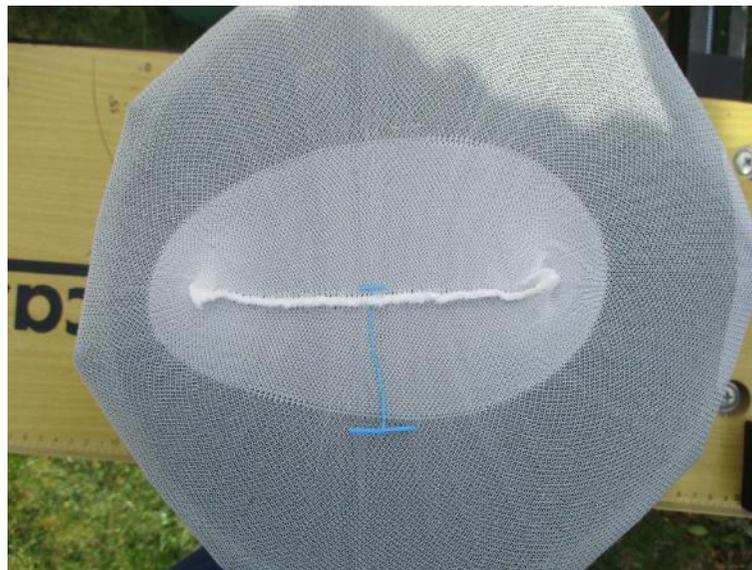
		Nombre de VDT/Tranche			
		15-7.5	7.5-0	Nombre total (/15 déposé)	Masse* fraîche (g)
A 0%	A1	6	9		
	A2	6	9	15	5.77
B :1%	B1	5	10	15	5.65
	B2	5	10	15	5.47
C :5%	C1	6	9	15	6.22
	C2	5	10	15	6.38
D : 10%	D1	6	9	15	6.62
	D2	5	10	15	6.54



Tubes 20 cm
hauteur diam 19,5 cm



HOME GARDEN N°3





sol hauteur 15 cm	20 VDT à 7,5 cm	sol= mélange sol +terreau bio (1/10)			
MAFOR N°1					
< 1cm surface					



Conditions J 0

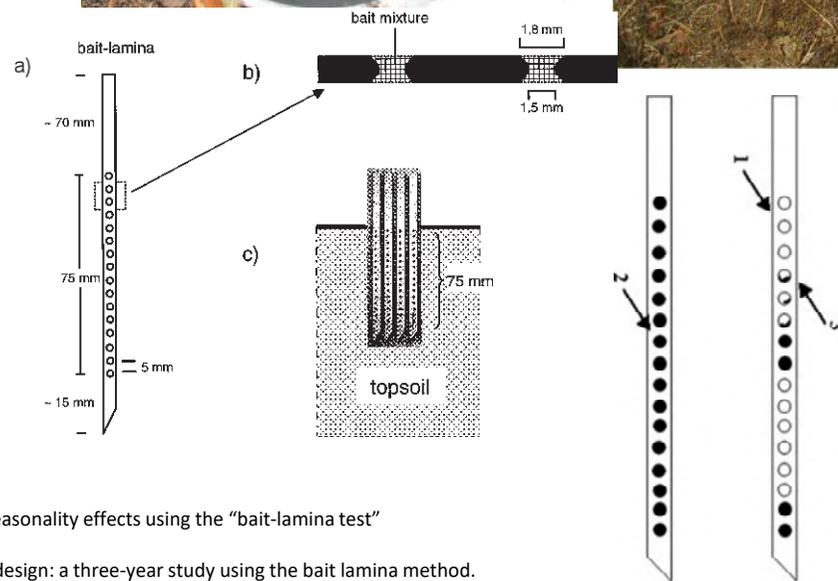
	MF tot sol(g)	MF mafor(g)	MF VDT (g MF)	J 0 : 17/04/2020
A1	3 600	50	8,53	
A2	3720	50	8,13	J +55 : 15/06/2020
A3	3720	50	8,82	
W1	3700	0	8,42	
W2	3520	0	9,73	
W3	3540	0	10,05	

vol eau déminéralisé ajoutée 3/semaine
500 ml

sauf si pluie entre 0 (deux jours
consécutifs)et 300 ml (la veille)

Method of the biological activity in a vineyard soil after landscape redesign: A three-year study

• M. Šturm, G. Eisenbeis
 • Published 2002
 • Environmental Science
 • Višnja, Journ. of Grapevine Research



Ajout de 9 lamina baits/ réplicat

Biological activity in Cerrado soils: evaluation of vegetation, fire and seasonality effects using the "bait-lamina test"
 October 2014. Plant and Soil 383(1-2):49-58
 Recovery of the biological activity in a vineyard soil after landscape redesign: a three-year study using the bait lamina method.
 Environmental science. 2002



J + 55





+
M
A
F
O
R
S

-
M
A
F
O
R
S

J + 55									
Prof colonne	0/7,5 cm			7,5/15 cm			TOTAL		
	Nb Vdt adulte	Vdt juvénile	Cocon	Nb Vdt adulte	Vdt juvénile	Cocon	Masse VDT tot (g MF)	Nb total VDT (juv)	Nbt tot cocon
A1	3	0	25	8	4	40	6,06	15 (4)	65
A2	1	0	30	17	3	65	10,89	21 (3)	95
A3	0	0	20	7	2	80	4,24	9 (2)	100
moyenne A	1,33	0	25	10,67	3	61,67	7,06		
EC A	1,53	0	5	5,51	1	20,21	3,44		
W1	0	1	3	0	1	2	0,15	2 (2)	5
W2	0	0	0	0	2	0	0	2 (2)	0
W3	0	1	0	0	2	1	0,17	3 (3)	1
Moyenne W	0	0,67	1,00	0	1,67	1	0,11		
EC W	0	0,58	1,73	0	0,58	1	0,09		

CONCLUSION: Témoign pas marché!!!
 Mais **Reproduction possible et pas perte de tous les VDT déposés**
 Effet « **physique** » de la MAFOR sur hydrique et teneur en eau et/ou MO?
 Voir si trop long ? Et possibilité sur colonne avec 10 cm sol puisque 80/90% dans les 0/7,5 cm

	Nbre VDT J0	MF totale (g) J0	Ratio MF/VDT J0	Nbre VDT J55	MF totale (g) J55	Ratio MF/VDT J55
A1	20	8,53	0,4265	15	6,06	0,404
A2	20	8,13	0,4065	21	10,89	0,5186
A3	20	8,82	0,441	9	4,24	0,471
W1	20	8,42	0,421	2	0,15	0,075
W2	20	9,73	0,4865	0	0	0
W3	20	10,05	0,5025	3	0,17	0,057

Avec MAFOR

J 0

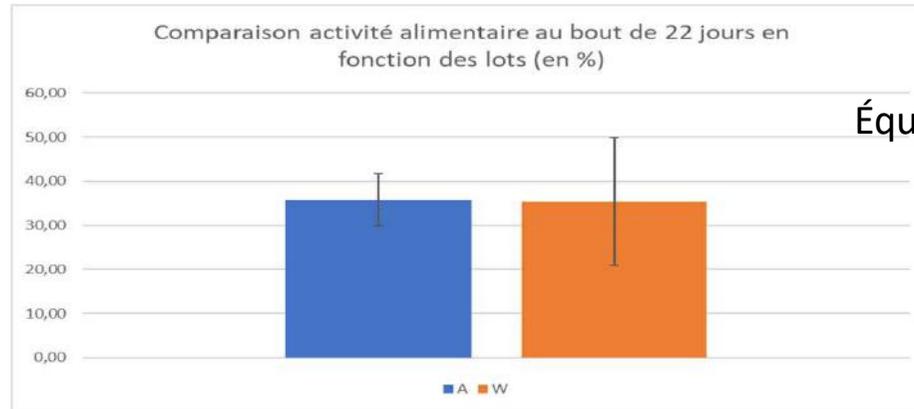
Moyenne MF totale (g) : $8,493 \pm 0,346$ (60 VDT)

Moyenne ratio (g) : $0,425 \pm 0,017$

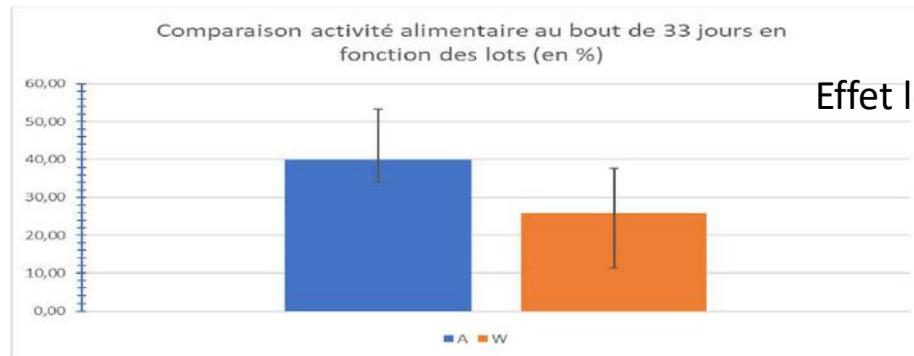
J + 55

Moyenne MF totale (g) : $7,063 \pm 3,436$ (45 VDT)

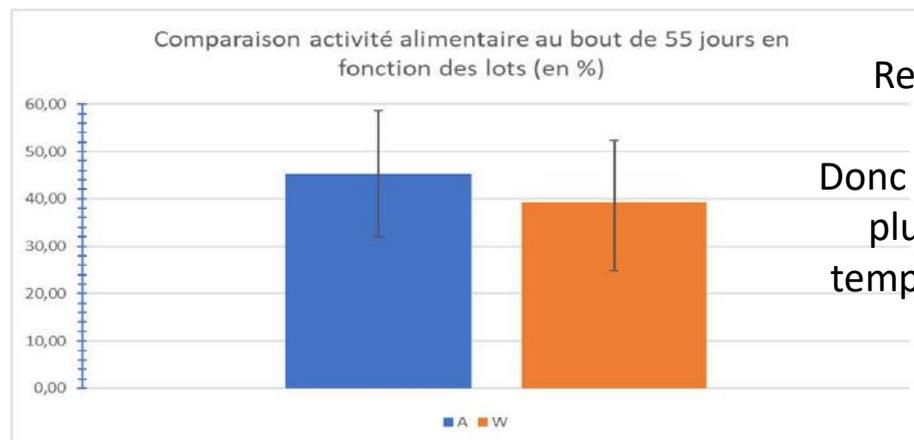
Moyenne ratio (g) : $0,464 \pm 0,057$



Équilibre? identique



Effet le plus « contrasté »



Retour effet moins contrasté

Donc 1 mois d'exposition plutôt ? Explication temps trop long témoin pas marché Mais repro ?

CONCLUSIONS

- Survie et reproduction possible
- Capacité à « garder » les VDT (pré-chaussette efficace)
- Pas déposer VDT trop en profondeur dans système mi-hauteur (Eisenia =épigée)
- Design 10 cm à 15 cm de sol max
- Quid de la MO à disposition (notamment dans sol témoin; facteur limitant ?)
- Encagement à définir sur la durée (1 mois paraît intéressant mais Reproduction?)
- Témoin ??
- Effet positif MAFOR sur hydrique et disponibilité en eau/sécheresse

Merci de votre attention