



HAL
open science

Devenir et impacts écotoxicologiques du nonylphénol contenu dans les boues de stations d'épuration valorisées en agriculture

Christian Mougin, Jean Pierre J. P. Cravedi

► To cite this version:

Christian Mougin, Jean Pierre J. P. Cravedi. Devenir et impacts écotoxicologiques du nonylphénol contenu dans les boues de stations d'épuration valorisées en agriculture. Dossiers de l'Environnement de l'INRA, 2003, Agriculture et épandage de déchets urbains et industriels (25), pp.85-90. hal-01600151

HAL Id: hal-01600151

<https://hal.science/hal-01600151>

Submitted on 31 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Devenir et impacts écotoxicologiques du nonylphénol contenu dans les boues de station d'épuration valorisées en agriculture

Christian Mougin^a, Jean-Pierre Cravedi^b

^a Unité de Phytopharmacie et Médiateurs chimiques, INRA, route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex
mougin@versailles.inra.fr

^b Unité des Xénobiotiques, INRA, BP 3, 31931 Toulouse cedex
jcravedi@toulouse.inra.fr

Introduction et contexte

Actuellement, les 13 000 stations d'épuration françaises (STEP) produisent chaque année 850 000 t de boues de matière sèche (MS), et ces tonnages ne feront que croître du fait de l'augmentation du nombre de stations d'épuration, pour atteindre 1 300 000 t de MS en 2005 (Bomstein, 2000). La mise en décharge des boues a été progressivement réduite pour être totalement interdite depuis le 1^{er} juillet 2002. L'épandage agricole constitue actuellement la voie majeure d'élimination des boues en France.

En effet, la valeur fertilisante des boues d'épuration est reconnue et justifie pleinement leur valorisation agricole (colloque interministériel du 5 juillet 2000 à l'Assemblée nationale), mais les risques inhérents aux polluants potentiellement présents dans les boues nécessitent une meilleure évaluation. En France, le décret 97-1133 du 8 décembre 1999 impose une surveillance de la qualité des boues et de leur épandage afin de minimiser les impacts sur le sol, les plantes, les animaux et l'homme. Ainsi sont analysées les teneurs des boues en éléments fertilisants, en éléments traces métalliques et certains composés traces organiques.

L'utilisation massive des lessives, au niveau domestique et industriel, engendre la présence de quantités importantes en détergents anioniques (alkylbenzènesulfonates linéaires), cationiques (sels d'ammonium quaternaire alkylés ou arylés) et non-ioniques (alkylphénols polyéthoxylés) au sein des rivières, mais aussi au niveau des stations d'épuration. Si la toxicité des alkylbenzènesulfonates est faible, celle des alkylphénols polyéthoxylés et de leurs dérivés, les alkylphénols issus de leur dégradation biologique, mais également celle des alkylbenzènesulfonates, sont reconnues.

Parmi les alkylphénols polyéthoxylés, 80% du volume total mondial produit sont des nonylphénols polyéthoxylés utilisés comme détergent, émulsifiant, agent séchant et dispersant et intervenant dans les formulations d'herbicides, de spermicides et de produits cosmétiques (Naylor, 1995). Le devenir de ces dérivés au sein d'une station d'épuration est bien établi (Ahel *et al.*, 1994) : les boues activées sont en effet le siège d'une biodégradation rapide qui consiste en un raccourcissement de la chaîne éthoxyle et en la production des nonylphénols (NP), des nonylphénols mono et di-éthoxylés (NP1EO, NP2EO) et des acides nonylphénoxyacétique (NP1EC) et nonylphénoxyéthoxyacétique (NP2EC). Les NP sont retrouvés à la fois au niveau de l'effluent et au niveau des boues dans des gammes de concentrations de l'ordre respectivement du microgramme par litre et du gramme par kilogramme. Actuellement, ces composés ne sont pas pris en compte par la réglementation.

Qu'en est-il du devenir et de l'impact des NP au sein des écosystèmes receveurs ? Si ces aspects ont été abondamment étudiés au niveau des écosystèmes aquatiques (Nilsson, 2000 ; Sumpter, 1998 ; Vos

et al., 2000), peu de données étaient publiées en 1998 concernant les écosystèmes terrestres et aucunes ne concernaient la situation française. Ahel *et al.* (1996) ont montré qu'au cours de l'infiltration des eaux de rivière vers les nappes, les NP1EO, les NP2EO et les NP étaient dégradés biologiquement, la dégradation des NP étant ralentie au cours de l'hiver lors de la chute de la température. Marcomini *et al.* (1989) ont montré que 80% des NP1EO, des NP2EO et des NP étaient dégradés dans les premiers mois après épandage de boues sur sol. Encore moins de données existent sur les transferts vers les plantes (adsorption, distribution, formation de résidus...) et les animaux. Par contre, l'appartenance reconnue des NP, NPEC, NPEO au groupe des perturbateurs endocriniens en font des molécules de grand intérêt environnemental depuis une dizaine d'années. À forte concentration, les NP sont aussi connus pour exercer des effets indésirables sur des champignons (Karley *et al.*, 1997).

Les NP sont donc présents dans l'environnement sous la forme d'un mélange de plusieurs isomères différant par le degré de ramification du groupe nonyl, incluant le 4-*n*-nonylphénol, la forme linéaire la plus souvent étudiée. Par souci de clarté, nous utiliserons dans ce document le terme générique de nonylphénol (NP) pour désigner ce mélange.

Objectifs de l'étude

Le projet initial présenté dans le cadre du programme AGREDE avait pour objectif principal l'étude du transfert du NP vers la plante et l'animal, en se focalisant sur l'étude de sa biodisponibilité et de sa biotransformation dans les sols. Du NP radio-marqué a été synthétisé pour les besoins de l'étude. Ces travaux préliminaires ont été ensuite étendus à l'étude de l'impact du NP sur les champignons du sol¹. Ce document regroupe les résultats obtenus au cours des deux projets.

Résultats

Les boues d'épuration françaises contiennent de fortes teneurs en nonylphénol

Nous avons utilisé des boues provenant de deux stations d'épuration traitant les eaux usées d'agglomérations urbaines de taille moyenne, Ambarès (Gironde) et Plaisir (Yvelines). Les deux boues ont subi une digestion aérobie suivie d'une stabilisation anaérobie. La boue de la station de Plaisir a également été chaulée. Les boues diffèrent également par leurs propriétés physico-chimiques (taux de matière sèche, teneurs en carbone et azote organiques, pH).

Grâce à une méthode d'analyse du NP que nous avons mise au point, nous avons mesuré des niveaux de contamination de l'ordre de 200 mg/kg de matière sèche de NP pour les boues d'Ambarès et de 506 mg/kg de matière sèche pour celles de Plaisir (Dubroca *et al.*, 2003). Ces valeurs, quoique élevées, sont inférieures à celles publiées par des équipes étrangères.

Une part importante du nonylphénol est disponible pour les micro-organismes et les végétaux dans les sols amendés.

Chacune des 2 boues est apportée au sol (un limon fin argileux de Versailles) dans un rapport qui tient compte des pratiques agricoles et qui reflète la contamination d'un horizon de surface. La

¹ Grâce au soutien de la direction générale de l'INRA, dans le cadre de la jeune équipe Xénobiotiques et Environnement de l'INRA Versailles-Grignon.

concentration finale de NP dans ce mélange est de 40 mg/kg. Dans ces conditions, les quantités de NP présentes dans la solution du sol, disponibles pour les micro-organismes et les végétaux, donc susceptibles d'être dégradées, transférées et d'exercer un impact sur organismes vivants, sont mesurées (Kollmann *et al.*, 2003).

Dans la phase aqueuse du sol non amendé par une boue, mais traité par le NP, la concentration en polluant est proche de 2 mg/l (environ $9 \cdot 10^{-6}$ M). Elle est légèrement diminuée lorsque le NP est apporté par la boue d'Ambarès, et divisée par 23 lorsque le NP est apporté par la boue de Plaisir (environ $4 \cdot 10^{-7}$ M). Ces deux valeurs confirment que la nature et les propriétés physico-chimiques des boues conditionnent le transfert des composés traces organiques vers le sol. Elles constituent des valeurs limites qui encadrent une « gamme de concentration utilisable » (GCU) pour les études de toxicité sur les organismes menées en milieu liquide.

Des études d'adsorption du NP ont été également réalisées avec les mélanges sol/boues. Le composé est faiblement adsorbé sur le sol non amendé : le tracé de l'isotherme d'adsorption, en accord avec l'équation de Freundlich, permet de déterminer un coefficient de partage K_d de 45 (Pojer *et al.*, 1999). L'adsorption du NP par des mélanges sol/boues varie d'une boue à l'autre. Le coefficient de partage K_d mesuré est de 1 084 sur la boue prélevée à Plaisir et de 59 sur la boue prélevée à Ambarès. Ces résultats montrent que le NP est très fortement adsorbé lorsqu'il est apporté par la boue de Plaisir, ce qui explique la plus faible biodisponibilité mesurée plus haut.

L'apport de boues modifie la cinétique et les schémas de transformation du nonylphénol dans les sols

La dégradation du NP dans le sol de Versailles non amendé sous conditions aérobies de laboratoire est rapide. Le NP est en partie minéralisé, c'est-à-dire dégradé en dioxyde de carbone, et stabilisé dans les sols, c'est-à-dire incorporé dans la matière organique (Dubroca *et al.*, 2003). Enfin, le NP résiduel et quelques métabolites libres demeurent extractibles par les solvants organiques. Le temps de demi-vie du NP est de 4 jours environ dans le sol non amendé, traduisant la transformation rapide d'une fraction du polluant. Cependant, le sol pourrait constituer le lieu de stockage d'une fraction non négligeable du NP ou de certains produits issus de sa transformation.

L'apport de boues modifie la balance minéralisation/stabilisation. Les effets les plus importants se font sentir sur l'allongement du temps de demi-vie du NP dans le sol qui passe à 16 jours (en présence de la boue d'Ambarès) ou est supérieure à 16 jours (en présence de la boue de Plaisir). Dans ce dernier cas, une phase de latence de 8 jours est observée pendant laquelle aucune dégradation ne se produit. Plusieurs explications sont possibles : une toxicité des boues, à cause de leurs fortes teneurs en composés métalliques et organiques ou de leur pH, une demande biologique en oxygène accrue en raison de la forte teneur des boues en matière organique, une diminution de la biodisponibilité du NP en raison d'une adsorption élevée.

Les champignons filamenteux, la plus forte biomasse des sols, sont capables de transformer le nonylphénol

Nous avons étudié la biotransformation du NP par 10 souches de champignons filamenteux disponibles dans nos collections ou isolées du sol, appartenant aux principaux groupes taxonomiques fongiques (deutéromycètes, zygomycètes, ascomycètes et basidiomycètes) (Dubroca *et al.*, 2003). Toutes se sont montrées capables de dégrader le NP en milieu liquide, mais avec des cinétiques différentes. Les souches de *Fusarium* ont été les moins performantes (temps de demi-vie du NP proche

de 8 jours), alors que le basidiomycète *Trametes versicolor* était le plus efficace (temps de demi-vie d'1 jour).

La transformation du NP par cette dernière souche a été étudiée plus en détail. Le champignon convertit une faible fraction du NP en dioxyde de carbone, mais catalyse surtout grâce à ses phénoloxidasés exocellulaires, les laccases, la polymérisation du NP en composés de haut poids moléculaire. Ce même mécanisme enzymatique serait également responsable de la fixation du NP aux matières organiques du sol, conduisant ainsi à sa stabilisation.

La minéralisation du NP dans les sols serait alors principalement due au métabolisme microbien alors que la stabilisation du NP serait essentiellement l'œuvre des champignons.

Le nonylphénol est en partie transféré du sol vers la plante

La carotte a été choisie comme plante modèle en raison de la forte exposition de la partie consommable de la plante, la racine, aux polluants contenus dans les sols. Dans des conditions d'exposition contrôlées et stériles, les résultats montrent un faible transfert du NP de la solution nutritive vers la plante cultivée en condition hydroponique, principalement au niveau du chevelu racinaire et, pour une très faible part, dans la racine principale et le feuillage (Chatard, 1999). L'analyse chimique des extraits tissulaires montre que le NP n'est pratiquement pas métabolisé. Cette absence de dégradation dans la plante pourrait être attribuée à la faible pénétration du NP dans les cellules de la plante.

Lorsque les carottes sont cultivées sur du sol amendé par la boue de Plaisir contenant le NP, une fraction plus importante du NP se retrouve dans les plantes après deux semaines, et se répartit entre le chevelu racinaire, la racine principale et les feuilles. Néanmoins, les teneurs résiduelles dans ces tissus sont trop faibles pour permettre d'identifier la nature des produits transférés du sol vers la plante. Il est probable qu'ils comprennent à la fois le NP et des produits issus de sa transformation microbienne.

Il a, par ailleurs, été réalisé des études de biotransformations à partir de feuilles excisées et de cultures cellulaires de carotte. Ces travaux indiquent que ces systèmes sont parfaitement capables de métaboliser le NP en composés polaires conjugués au glucose.

Compte tenu du délai d'attente imposé par la réglementation entre l'épandage des boues et l'implantation des cultures, le risque de transfert du NP de la plante à l'animal reste faible. Cependant, il faudrait l'évaluer de façon plus précise dans les cas où la biotransformation est fortement inhibée ou lorsque les sols contiennent de très fortes quantités de NP (épandages successifs de boues fortement contaminées).

Le nonylphénol exerce des effets non-intentionnels sur les champignons du sol

La toxicité aiguë du NP a été évaluée sur les souches fongiques cultivées en milieu liquide (Kollmann *et al.*, 2003). Le NP est apporté dans une large gamme de concentration et les concentrations inhibant 50% de la germination des spores ou 50% de la croissance ont été calculées. La germination des spores fongiques est diversement inhibée par le NP et, en général, les concentrations sont supérieures ou égales à la valeur supérieure de la GCU fixant la biodisponibilité du NP. Lorsque les filaments mycéliens se développent en présence de NP, leur croissance est inhibée lors d'incubations de courte durée (2 à 4 jours). Par la suite, le retard de croissance s'estompe et les biomasses obtenues sont comparables à celles des témoins non traités après 8 jours de culture. Chez les souches de *Fusarium*, les filaments exposés au NP produisent une proportion importante de spores de petite taille, immatures, qui présentent un retard de germination par rapport aux spores normales.

Pour des concentrations supérieures à la GCU, nous avons également observé des anomalies morphologiques : gonflement des filaments, modification de leur degré de ramification.

La toxicité chronique du NP a été aussi évaluée à l'égard des champignons filamenteux pendant 5 cycles biologiques sur une durée totale de 50 jours (Kollmann *et al.*, 2003). Chaque cycle comprend l'inoculation des spores fongiques dans un milieu sans ou avec NP, la détermination de la biomasse mycélienne formée et de la sporulation après 10 jours de culture, puis la récupération des spores issues des filaments pour une nouvelle inoculation.

Le NP apporté à concentration constante ($5 \cdot 10^{-6}$ M) ou décroissante (diminution de moitié tous les 10 jours) est sans effet sur la croissance de *Phanerochaete chrysosporium* et de *M. racemosus*, alors qu'il stimule celles de *Fusarium solani* et de *F. oxysporum*. Si on considère la sporulation, celle-ci décroît naturellement au cours du temps pour les 4 souches considérées dans les cultures non traitées. Les effets du NP sur la sporulation sont variables : inhibiteurs chez *M. racemosus* et *F. solani*, fortement stimulateurs chez *F. oxysporum* ou nuls chez *P. chrysosporium*. L'effet du NP ne dépend pas de la dose appliquée.

L'ensemble de ces résultats obtenus en cultures liquides riches en carbone et azote montre que le NP peut influencer la fonction de reproduction des champignons (en modifiant germination des spores et sporulation) sans toutefois induire d'effets notables sur la biomasse produite. Ces résultats peuvent être différents dans des environnements pauvres sur le plan nutritif comme le sont certains sols.

Nous avons également évalué l'impact du NP sur la production d'exoenzymes fongiques. L'effet inducteur le plus fort est obtenu sur les laccases de *Trametes versicolor*. Dans des cultures additionnées de NP à des concentrations comprises dans la GCU, la production de laccases est stimulée de 3 à 4 fois après 3 jours de contact. Pour des concentrations supérieures, l'effet inducteur est porté à 7. Cet effet inducteur du NP sur des enzymes intervenant dans sa propre transformation conduit à une diminution rapide de la biodisponibilité du composé qui se stabilise dans les sols. Il explique que le temps de demi-vie du NP soit faible dans les cultures de *T. versicolor*.

Le nonylphénol n'est pas toxique pour les plantes

L'exposition de la carotte cultivée en conditions hydroponiques à 1 mg/l ($5 \cdot 10^{-6}$ M) de nonylphénol n'a pas permis de mettre en évidence d'effet phytotoxique (Chatard, 1999).

Conclusions et perspectives

Certaines boues françaises contiennent de fortes teneurs en NP, dont une fraction non négligeable est disponible pour les organismes des sols (micro-organismes et végétaux) après amendement du sol par ces boues. Le NP est rapidement transformé dans les sols en conditions aérobies. Une fraction du composé est minéralisée, l'autre est stabilisée dans le sol qui peut apparaître comme un lieu de stockage du polluant. Le temps de demi-vie du NP dans les sols est augmenté lors de l'apport de boues qui peuvent être toxiques pour les micro-organismes dégradants. Les champignons filamenteux du sol sont capables de transformer le NP, mais aussi de conduire à sa polymérisation et à sa stabilisation. Le NP lui-même ou certains produits issus de son métabolisme par les microorganismes du sol sont transférés en quantité limitée vers la plante mais restent essentiellement localisés au niveau racinaire (tout au moins chez la carotte). Les tissus végétaux sont potentiellement capables de métaboliser ce composé. Aux doses susceptibles d'être présentes dans les sols amendés, le NP n'est pas toxique pour les végétaux. Cependant, des effets indésirables ont été observés sur la reproduction des champignons.

Des recherches complémentaires doivent être poursuivies pour fournir aux gestionnaires du risque des éléments concernant une meilleure connaissance de la composition chimique des boues et une définition des standards de qualité et de l'impact écotoxicologique et sanitaire de l'épandage agricole des boues, notamment concernant le problème des composés traces organiques.

Pour aborder ces aspects, une convention de recherche vient d'être signée entre l'INRA et l'ADEME qui financera un programme transversal monopolisant 6 équipes de recherche. Les molécules retenues sont le nonylphénol et des pesticides utilisés en milieu urbain ■

Références bibliographiques

- AHEL M., GIGER W., KOCH M., 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research*, 28, 1131-1142.
- AHEL M., SCHAFFNER C., GIGER W., 1996. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Research*, 30, 37-46.
- BOMSTEIN D., 2000. Valorisation agricole des boues : la fin des tabous. *Environnement Magazine*, 1591, 24-28.
- CHATARD J., 1999. *Distribution et métabolisation du 4-n-nonylphénol chez la carotte (Daucus carota L.)*. DEA National de toxicologie, université Paris 7 Denis-Diderot, 25 p.
- DUBROCA J., BRAULT A., KOLLMANN A., TOUTON I., JOLIVALT C., KERHOAS L., MOUGIN C., 2003. Biotransformation of nonylphenol surfactants in soils amended with contaminated sewage sludges. In E. LICHTFOUSE, S. DUDD & D. ROBERT : *Environmental Chemistry*. Springer (sous presse).
- KARLEY A.J., POWELL S.I., DAVIES J.M., 1997. Effect of nonylphenol on growth of *Neurospora crassa* and *Candida albicans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1312-1317.
- KOLLMANN A., BRAULT A., TOUTON I., DUBROCA J., CHAPLAIN V., MOUGIN C., 2003. Impact of nonylphenol surfactants on fungi following the application of sewage sludge on agricultural soils. *Journal of Environmental Quality*, 32(4), 1269-1276.
- MARCOMINI A., CAPEL P.D., LICHTENSTEIGER T., BRUNNER P.H., GIGER W., 1989. Behavior of aromatic surfactants and PCBs in sludge-treated soil and landfills. *Journal of Environmental Quality*, 18, 523-528.
- NAYLOR C.G., 1995. Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *Textile Chemist and Colorist*, 27, 29-33.
- NILSSON R., 2000. Endocrine modulators in the food chain and environment. *Toxicologic Pathology*, 28, 420-431.
- POJER K., DAVOINE P., DUBROCA J., DUR J.C., MOUGIN C., JOLIVALT C., CRAVEDI J.P., CHAPLAIN V., 1999. Behaviour and fate of nonylphenol in soils containing contaminated sewage sludge. *Biodepoll'99 : Biotechnology in Environmental Protection Meeting*, Rennes, France.
- SUMPTER J.P., 1998. Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. *Toxicology Letters*, 102, 337-342.
- VOS J.G., DYBING E., GREIM H.A., LADEFOGED O., LAMBRE C., TARAZONA J.V., BRANDT I., VETHAAK A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology*, 30, 71-133.