

Apports de la haute résolution pour l'analyse des eaux résiduaires

6 janvier 2022

Nina Huynh, Julien Le Roux, Régis Moilleron

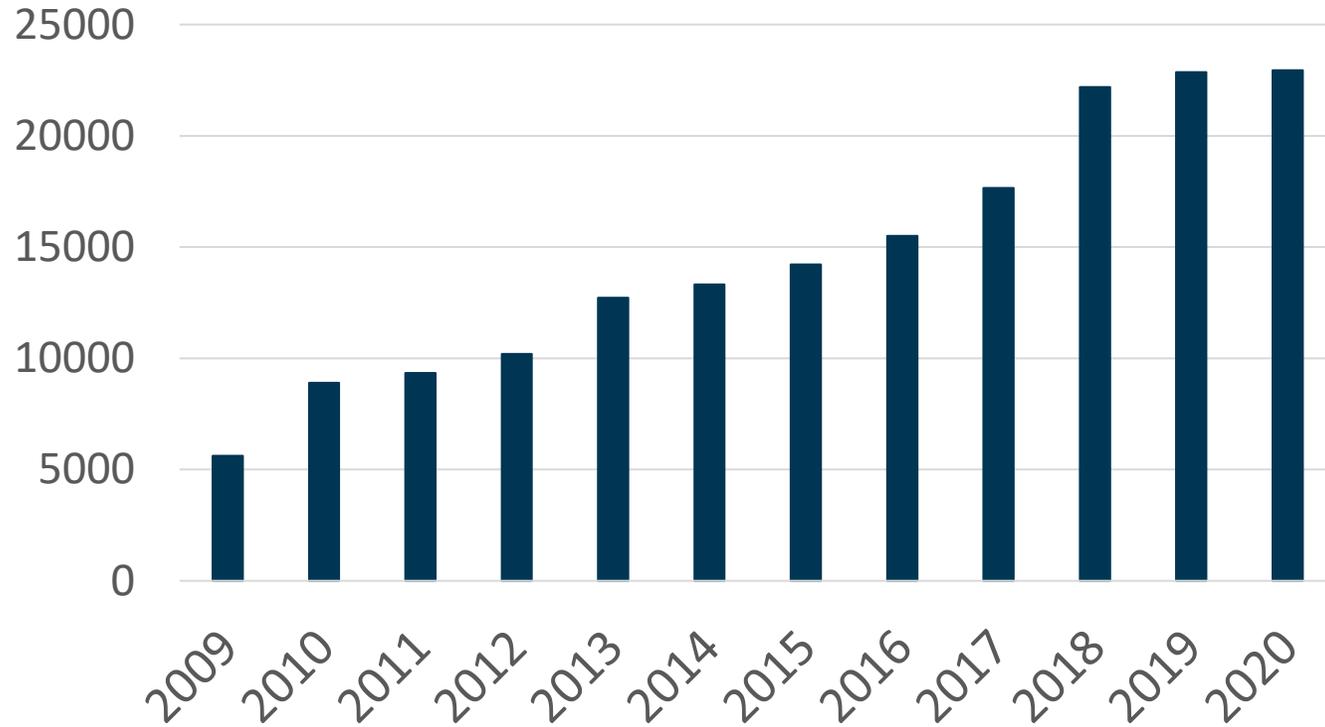


laboratoire eau environnement systemes urbains



Micropolluants organiques dans les eaux urbaines

Nombre de substances enregistrées
(ECHA on 2020/04/07)

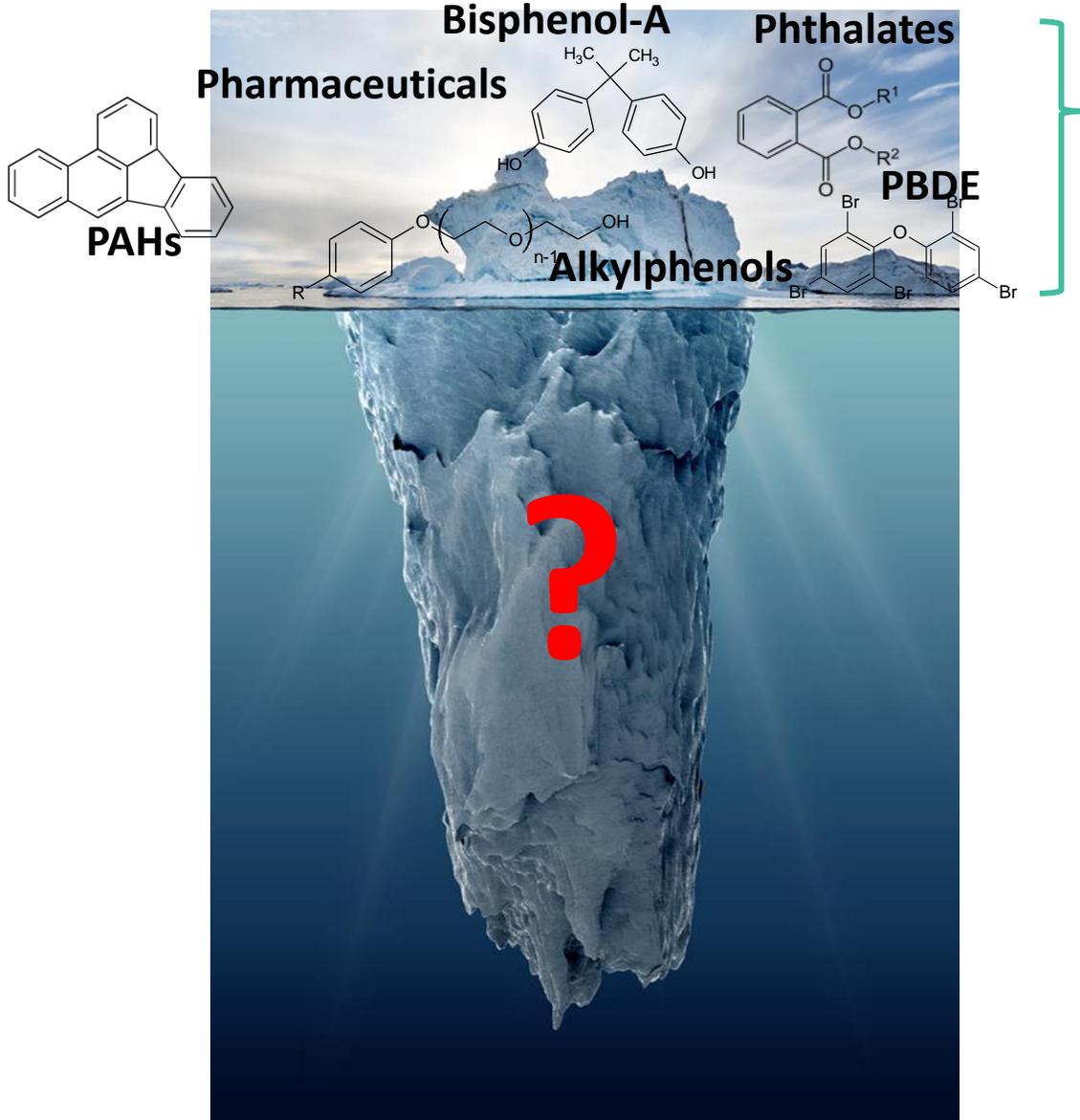


Augmentation du nombre de **substances** disponibles + **changement de consommation** (en particulier pour les pharmaceutiques et biocides)

Nécessité de développer des **méthodes robustes et exhaustives** pour l'analyse de **micropolluants organiques**



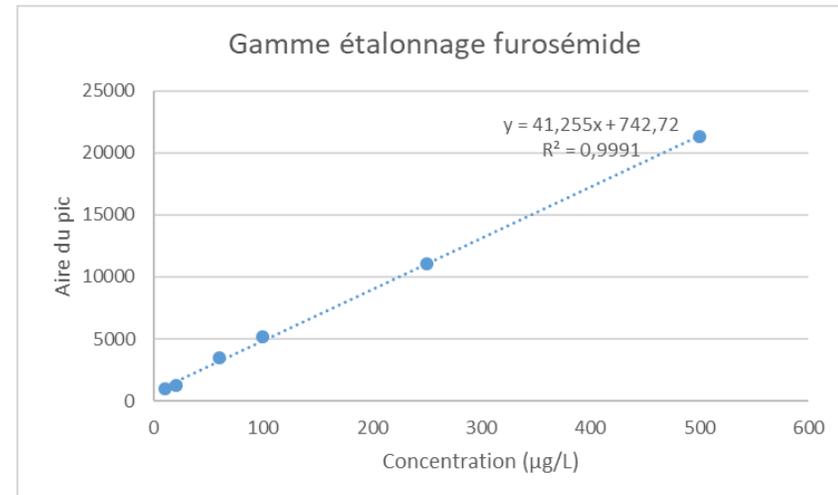
Différents types d'analyse



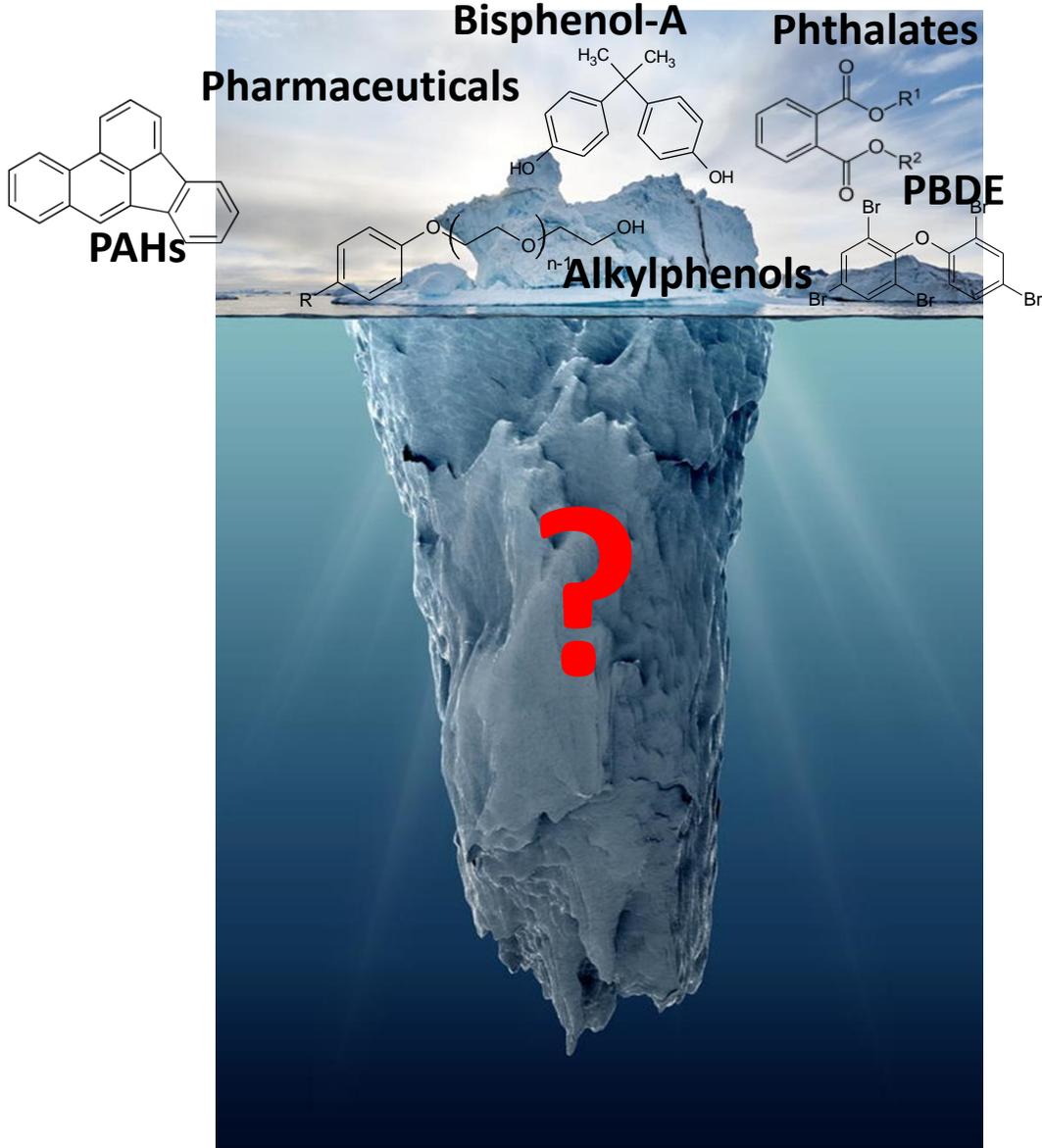
Analyse ciblée

- On sait ce qu'on cherche et comment le trouver
- Développement et optimisation de méthode à partir d'étalons

QUANTIFICATION



Différents types d'analyse



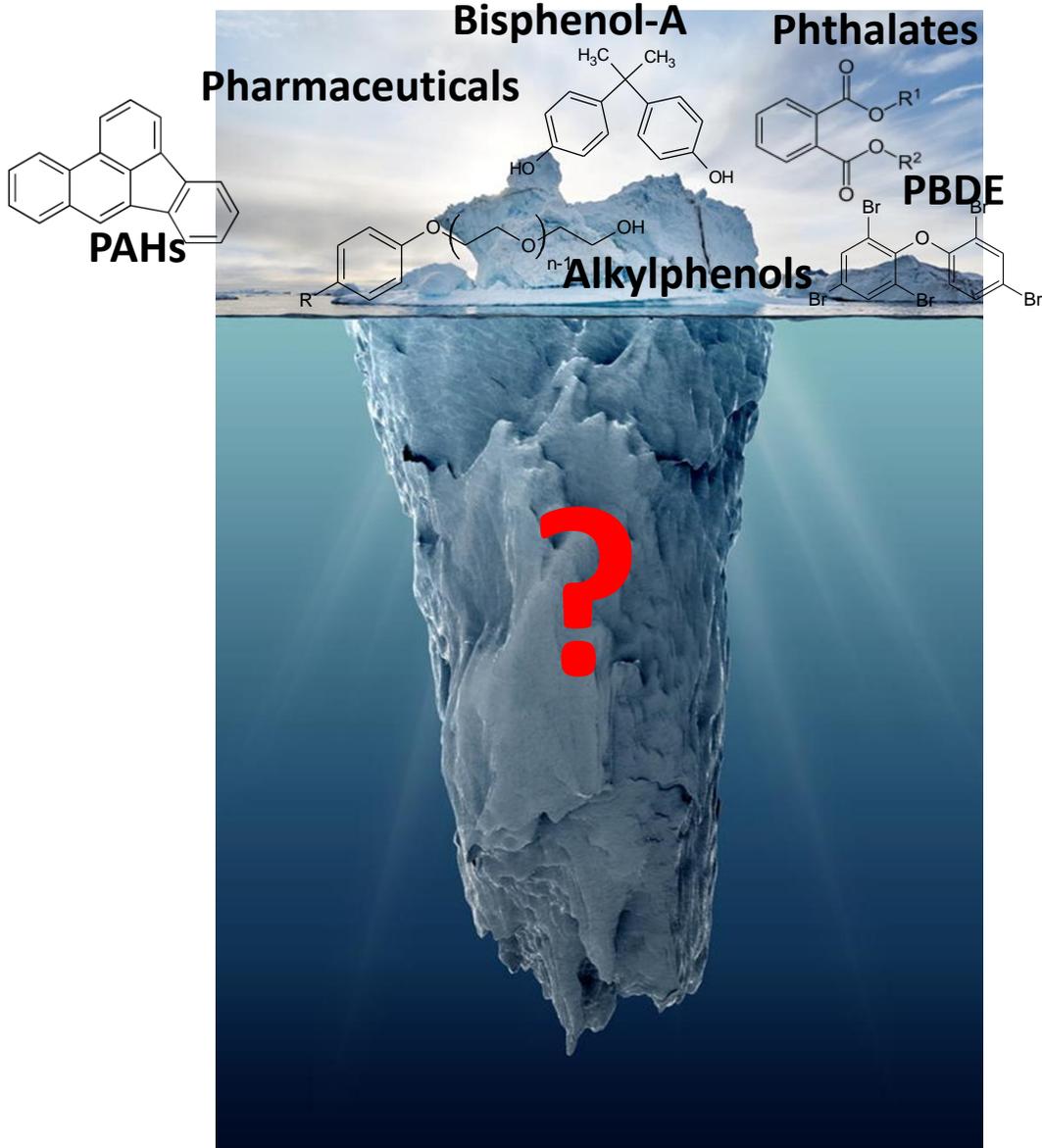
Analyse en suspect

- On sait ce qu'on cherche
- Méthodes pas nécessairement optimisées sur les composés recherchés et étalons pas forcément disponibles
- Différents niveaux de confiance

DÉTECTION
(absence / présence)

Molécule	Sc1	Sc1d	Sc2	Sc2d	V01	V01c	V02	V02c
4-Aminoantipyrine	N	N	N	N	O	O	O	N
Acétaminophen	O	O	O	O	O	O	O	O
Aciclovir	O	O	O	O	O	O	O	N
Aténolol	N	N	N	N	N	N	N	O
Atorvastatin	O	O	O	O	N	N	N	N
Bezafibrate	N	O	N	N	O	N	O	N
Canrenone	N	O	N	O	O	O	O	O
Clopidogrel	N	N	N	N	O	O	O	N
Codeine	O	O	O	O	O	N	O	O
Dicyclanil	O	O	O	N	O	O	O	O
Doxépin	N	N	N	N	O	O	O	O
Enrofloxacin	O	O	O	N	N	N	N	O

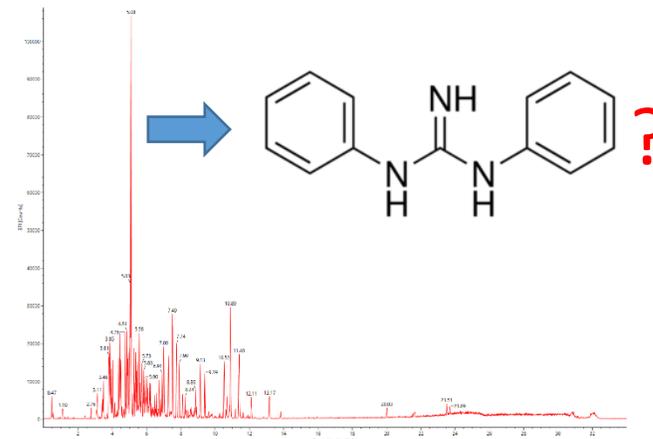
Différents types d'analyse



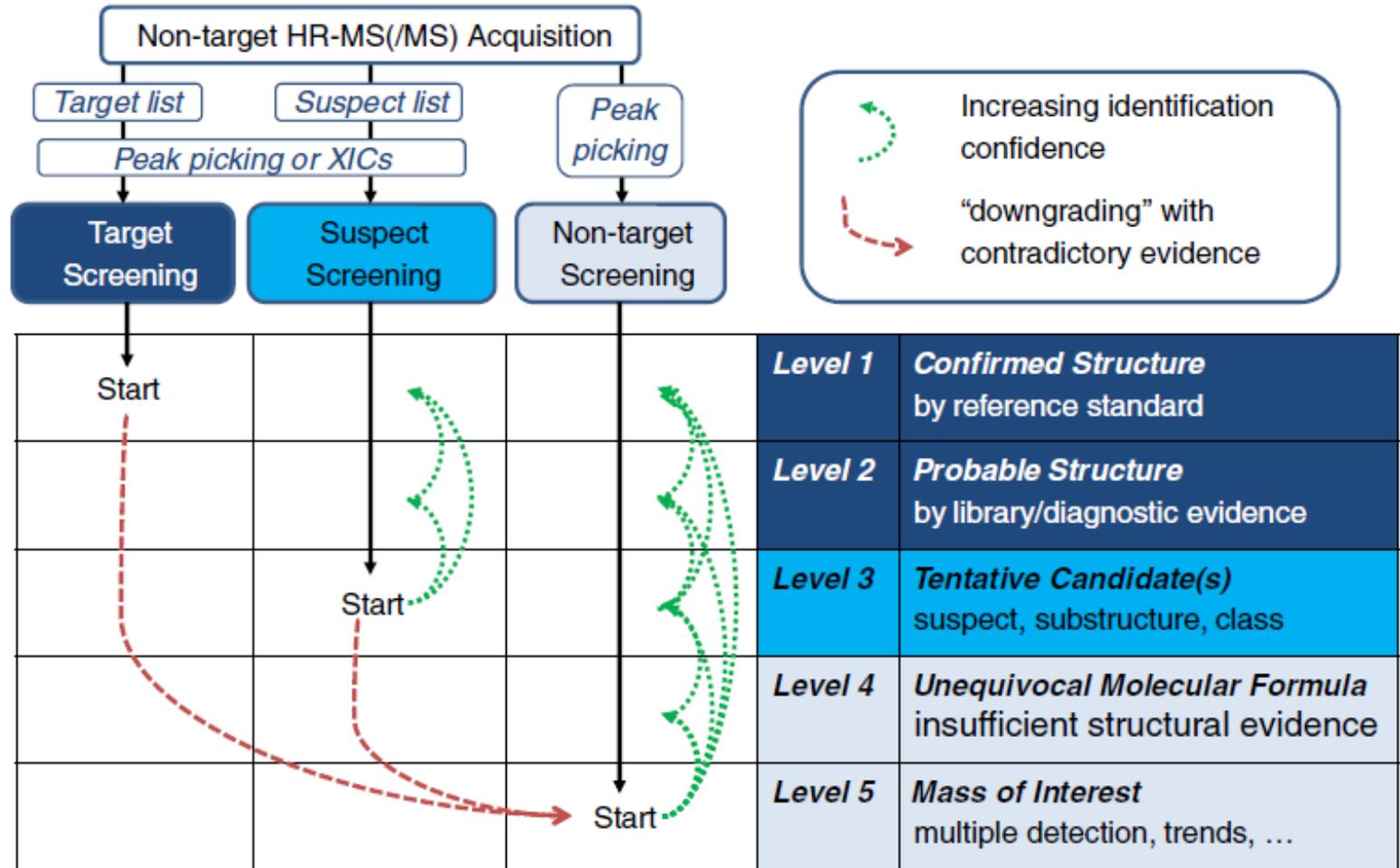
Analyse non-ciblée

- On ne cherche rien *a priori*
- On essaie d'attribuer une identité à ce qu'on détecte
- Différents niveaux de confiance

IDENTIFICATION



Niveaux de confiance

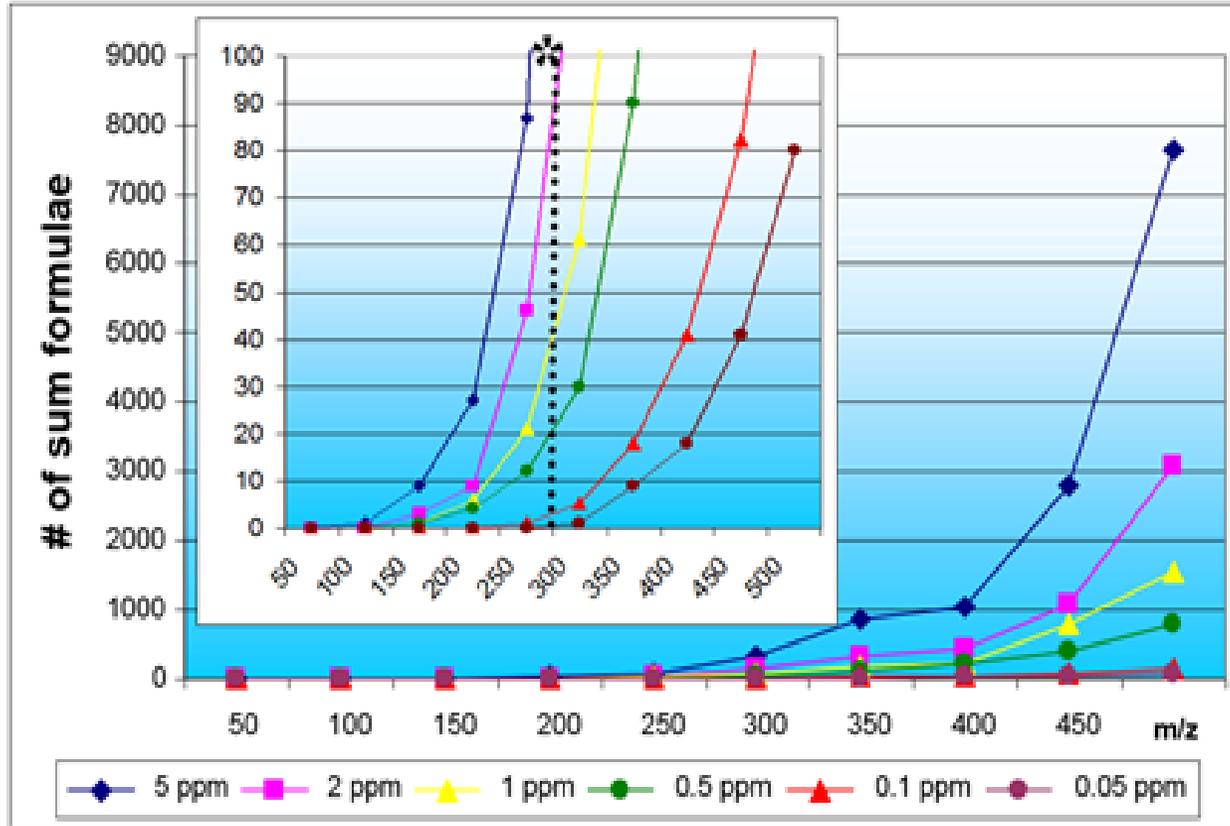


Calcul de **formule brute** grâce au **massif isotopique**

Schymanski et al, Environmental Science and Technology, 2014

Niveaux de confiance : Attribution d'une formule brute

Ex : A m/z 300,0000 ($\pm 0,0006$ m/z, soit une précision de 2 ppm)

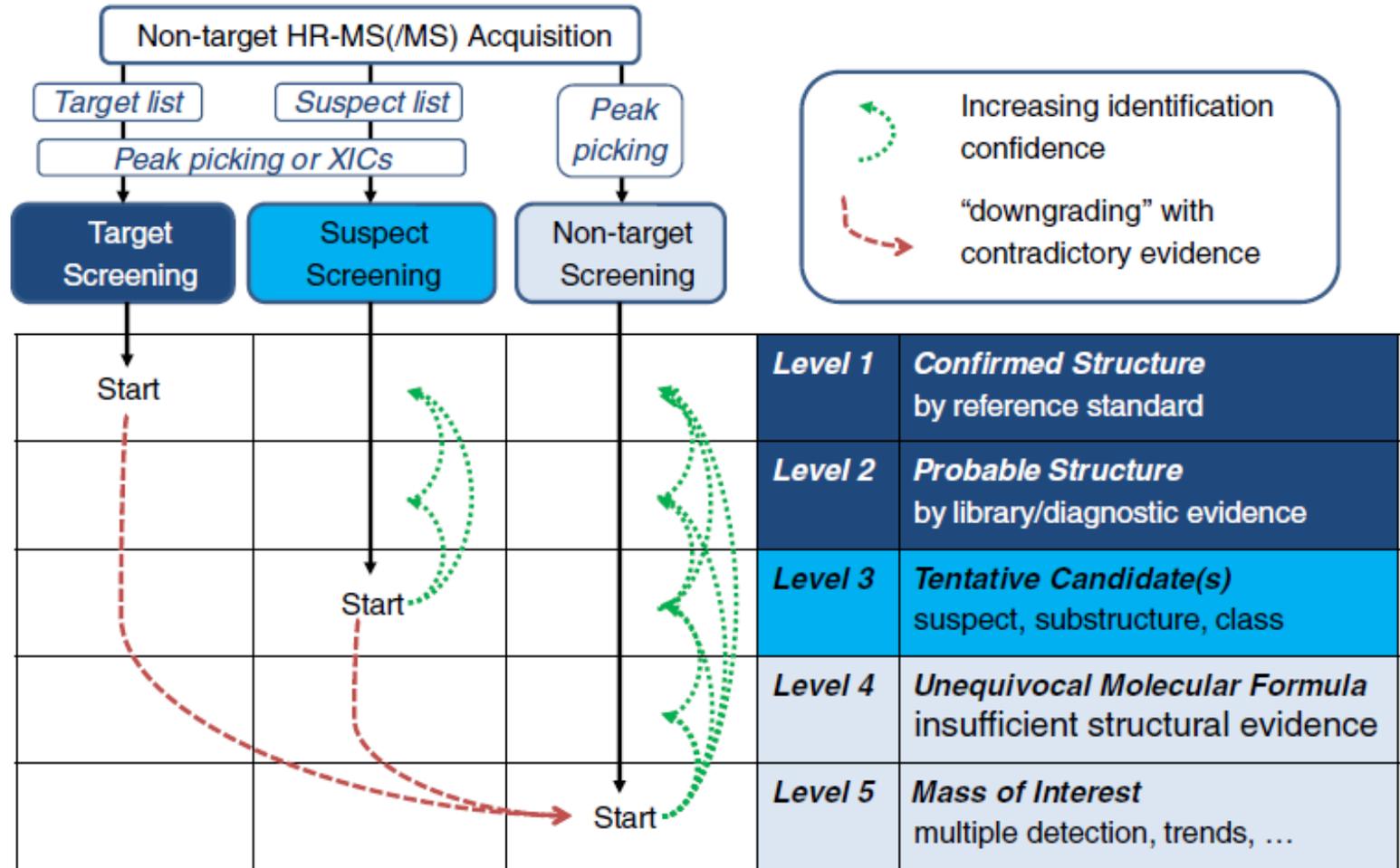


100 formules brutes possibles !

Comment réduire ce nombre ?

- Règles de valence
- Réduire le nombre d'hétéroatomes
- Restreindre le nombre maximal de chaque atome
- ...

Niveaux de confiance



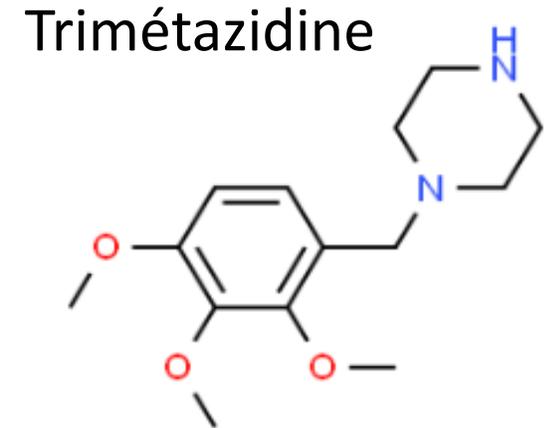
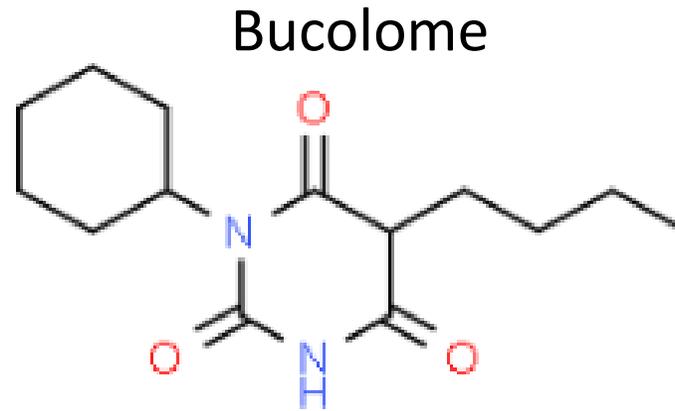
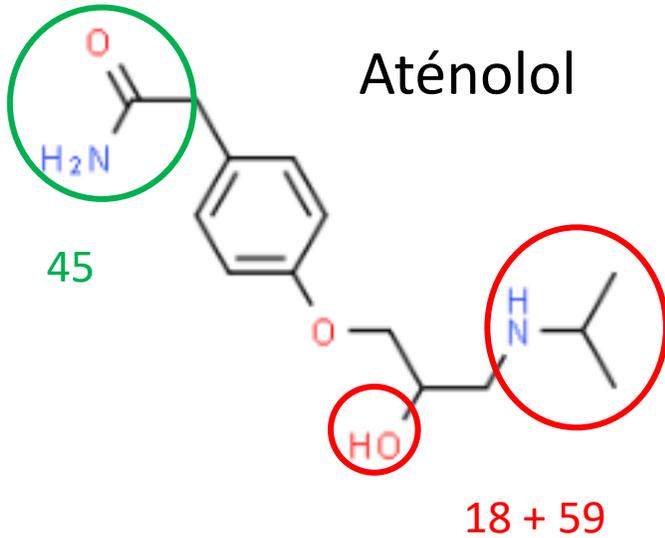
Déduction de **structure** grâce aux **fragments**

Calcul de **formule brute** grâce au **massif isotopique**

Schymanski et al, Environmental Science and Technology, 2014

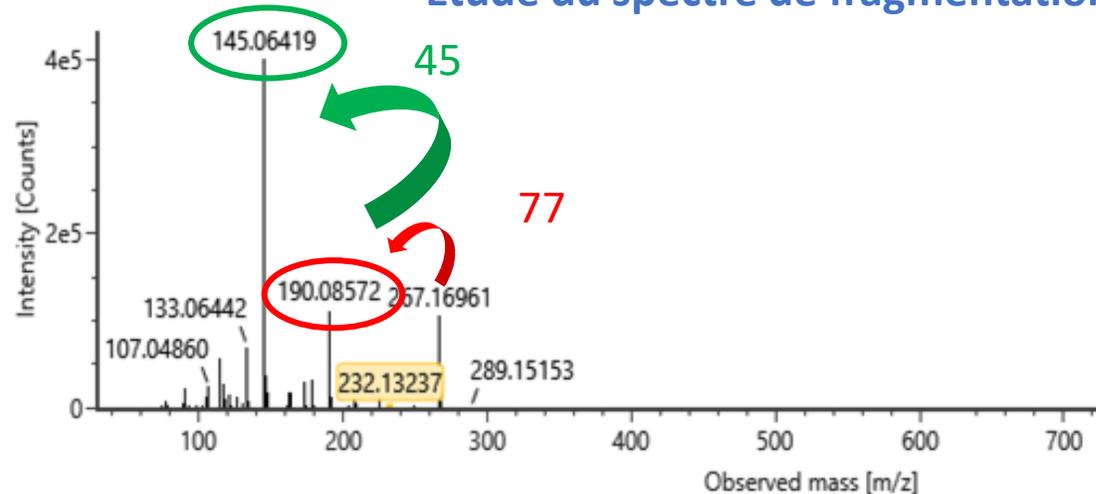
Niveaux de confiance : Attribution d'une structure

Ex : $C_{14}H_{22}N_2O_3$ ($m/z = 267,16961$)

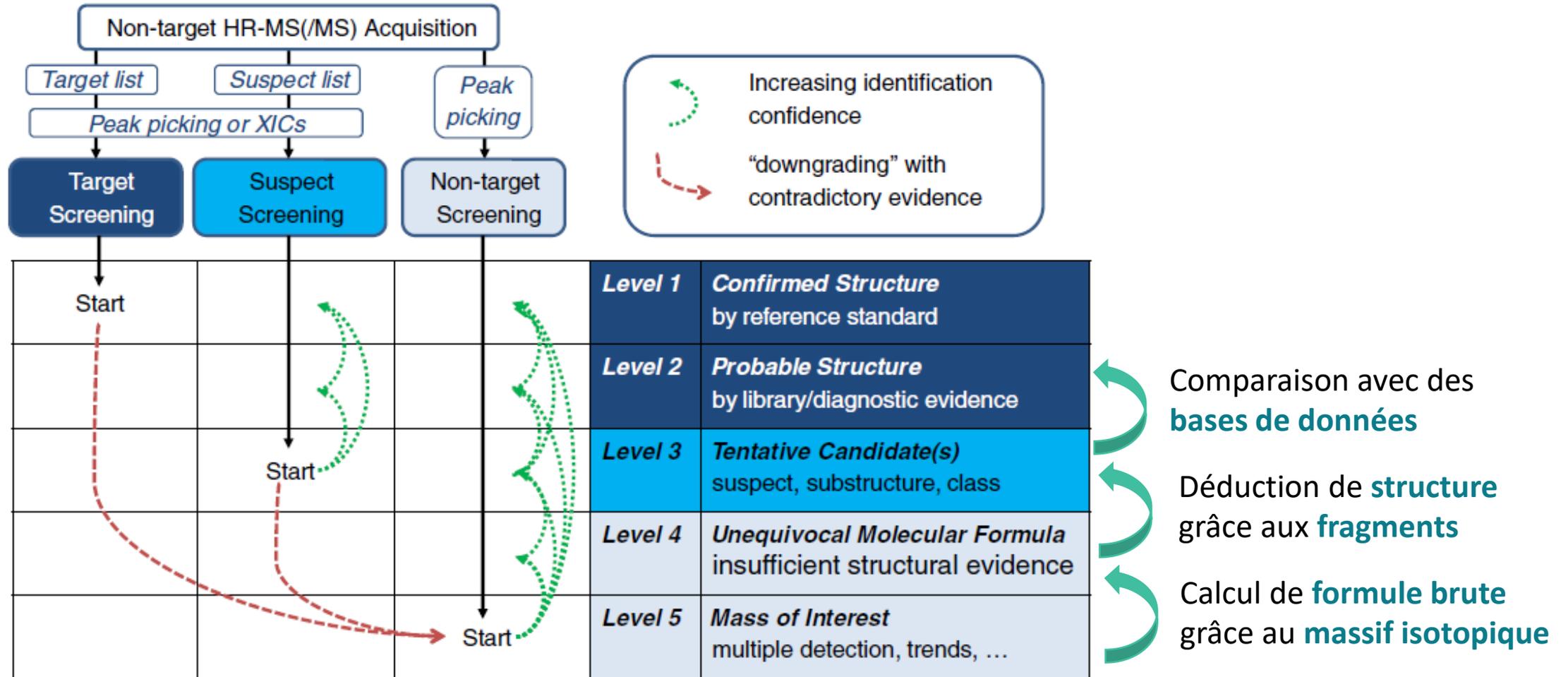


Item description:

Etude du spectre de fragmentation



Niveaux de confiance



Schymanski et al, Environmental Science and Technology, 2014

Niveaux de confiance : interrogation de bases de données externes

 **MassBank**
High Quality Mass Spectral Database

> 85 k spectres uniques

Pub**Chem**

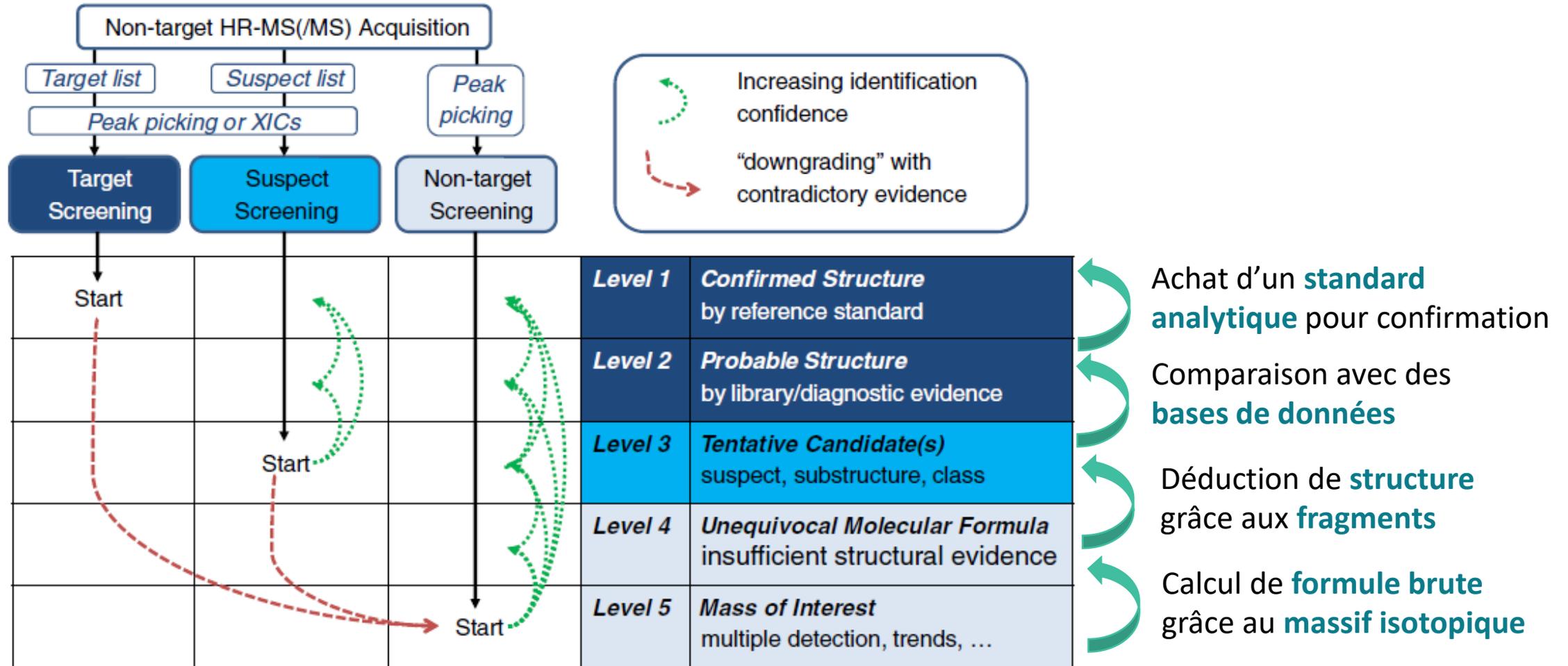
> 11 M de composés

 **norman**

> 100 k composés

- Bases de données en ligne, alimentées par la communauté
- Différents types d'information (peut dépendre des librairies, ou des molécules dans une même librairie)
- Nécessaire de vérifier les conditions dans lesquelles les données entrées dans la librairie ont été obtenues

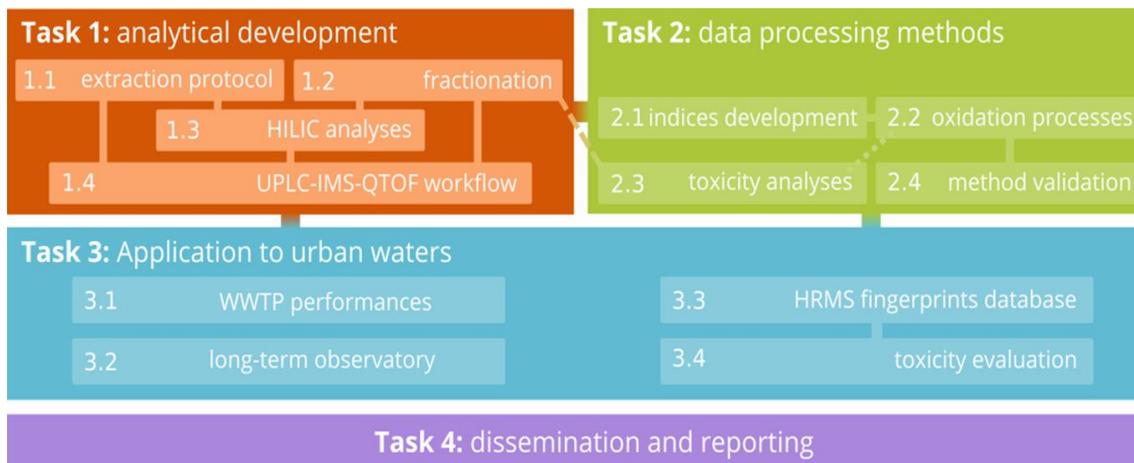
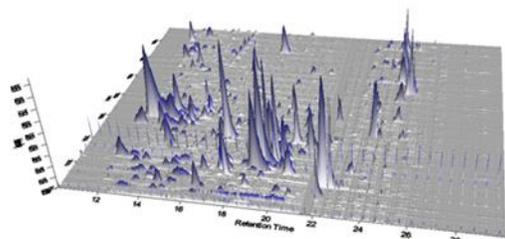
Niveaux de confiance



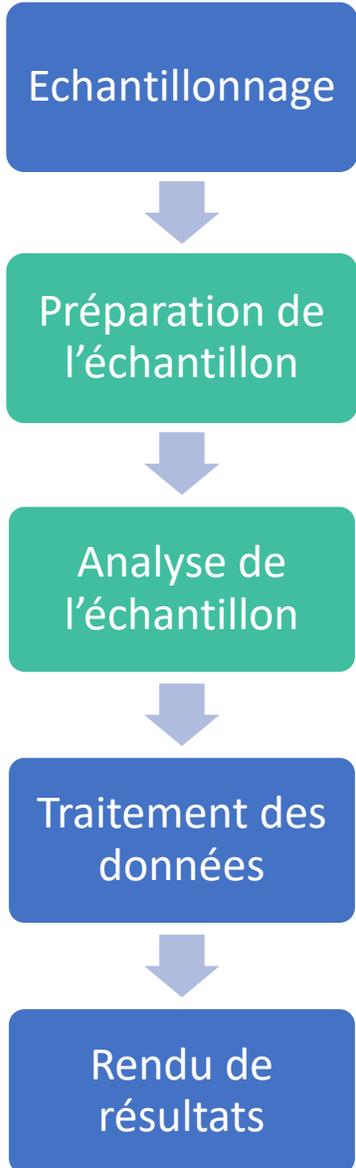
Schymanski et al, Environmental Science and Technology, 2014

Projet ANR JCJC WaterOmics + thèse 2018-2022

- Méthodes non-ciblées (**analyses HRMS**) complexes et longues
- **Composés les plus polaires** : pas bien caractérisés
- **Traitement des micropolluants** dans les stations d'épuration en développement, mais besoin de **méthodes de caractérisation chimique** (ex. métabolites, produits de transformation) et **écotoxicologique**
- Développement de méthodes pour faciliter la **comparaison d'empreintes**
- Comparaison de méthodes d'analyse pour la **caractérisation de diverses fractions**
- Application des méthodes à différentes **eaux urbaines**, dont des rejets de station d'épuration soumis à différents **procédés d'oxydation**



Développement de méthodes analytiques

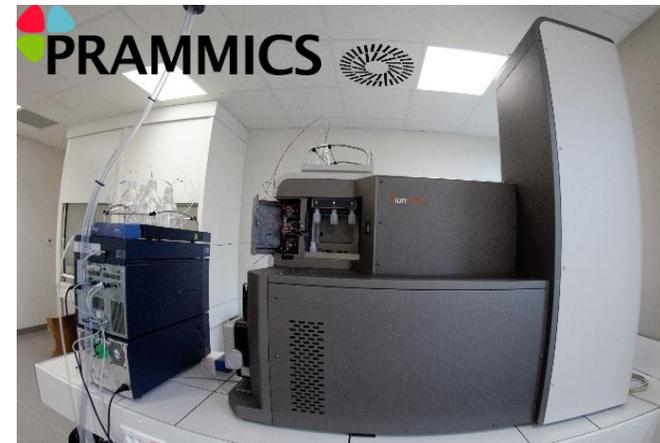


Préparation et analyse de l'échantillon avec utilisation de **supports** « universels »



Test de différentes méthodes (x3) et supports d'extraction (x8)

But : diviser l'échantillon en plusieurs fractions ayant des propriétés différentes

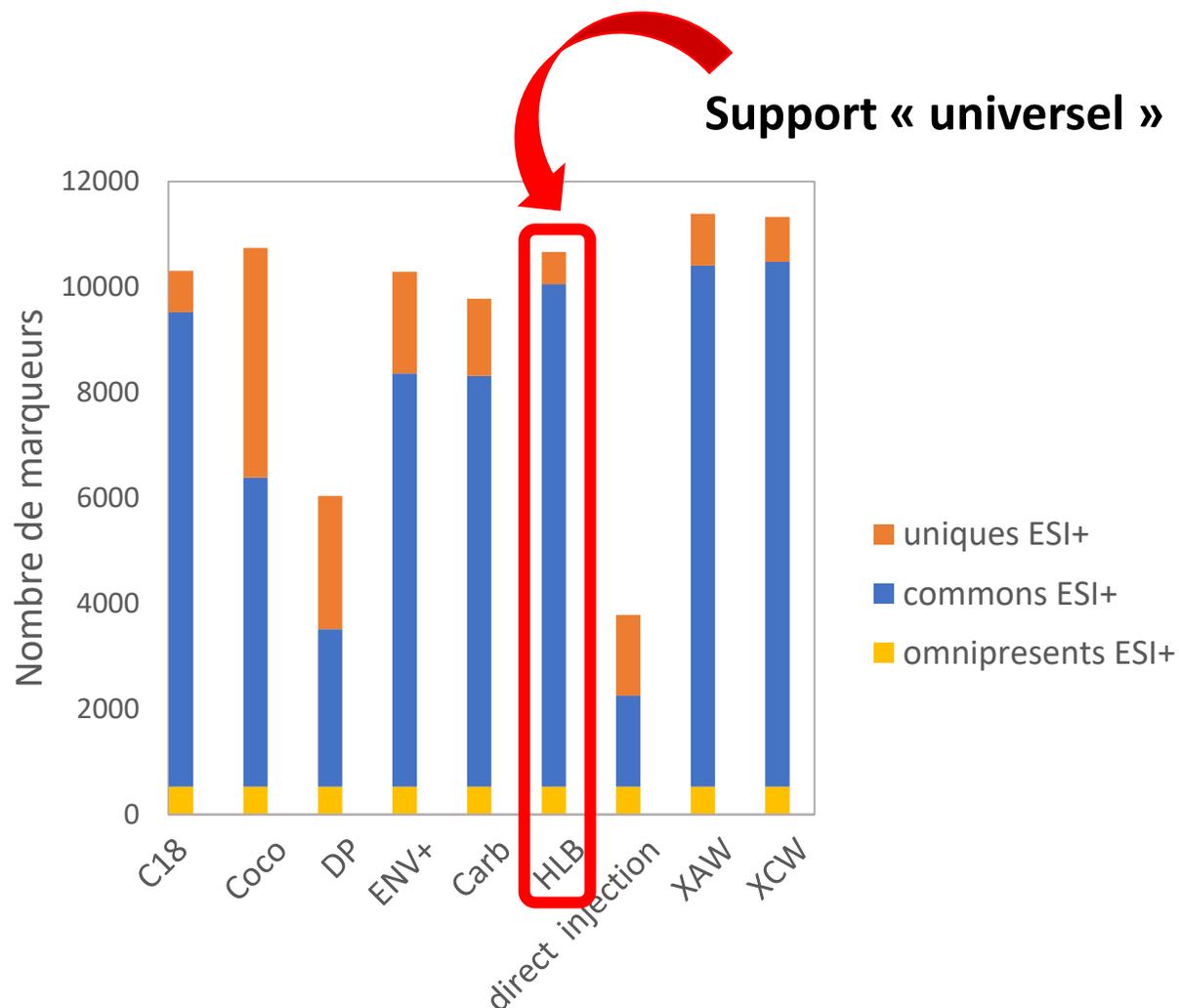


Test de différentes colonnes de séparation (x3) et analyseurs de masse (x2)

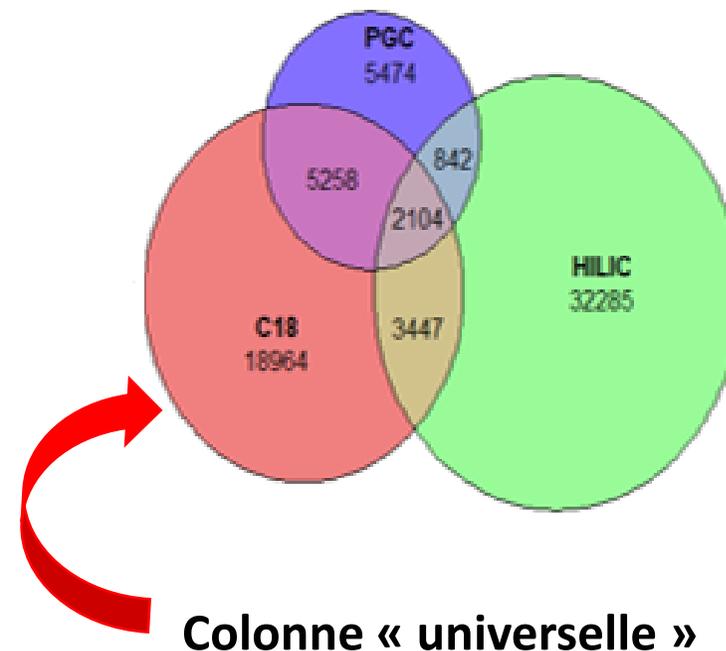
But : récupérer un maximum d'information sur l'extrait analysé pour le caractériser

Quelques résultats

Comparaison de méthodes de préparation



Comparaison de colonnes de séparation



Impossible de tout voir en routine
Important de savoir ce qui est potentiellement
analysable ou non par les méthodes choisies

Développement de méthodes pour le traitement de données

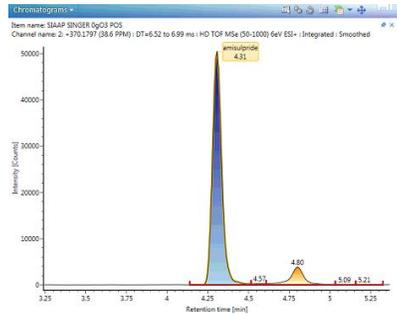
Echantillonnage

Préparation de l'échantillon

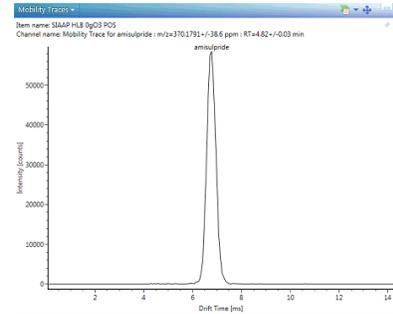
Analyse de l'échantillon

Traitement des données

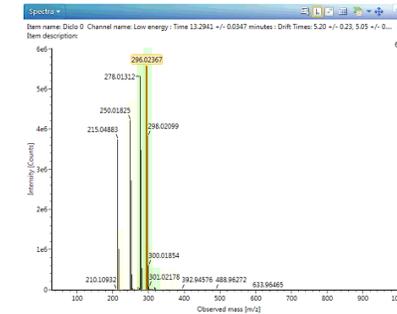
Rendu de résultats



Temps de rétention (min)
Séparation en fonction de l'affinité chimique



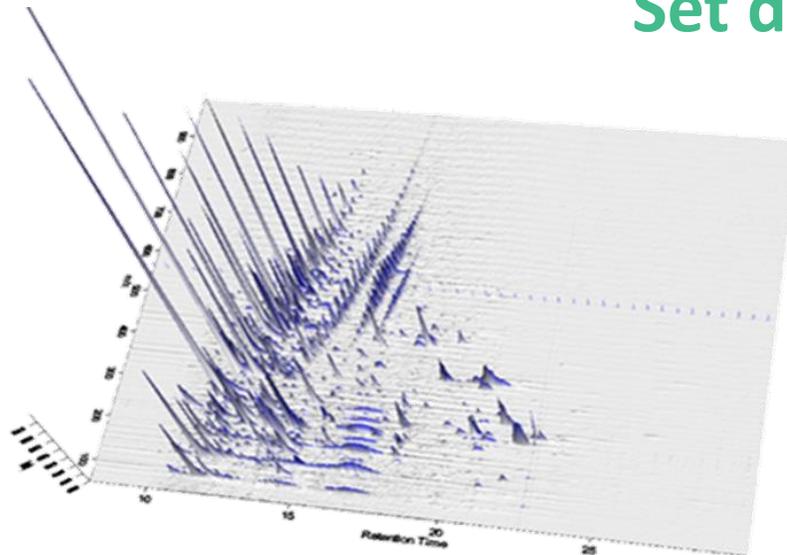
Temps de dérive (ms)
Séparation en fonction de la taille et la forme



Spectres de masse (m/z)
Séparation en fonction de la masse

Intensité du signal

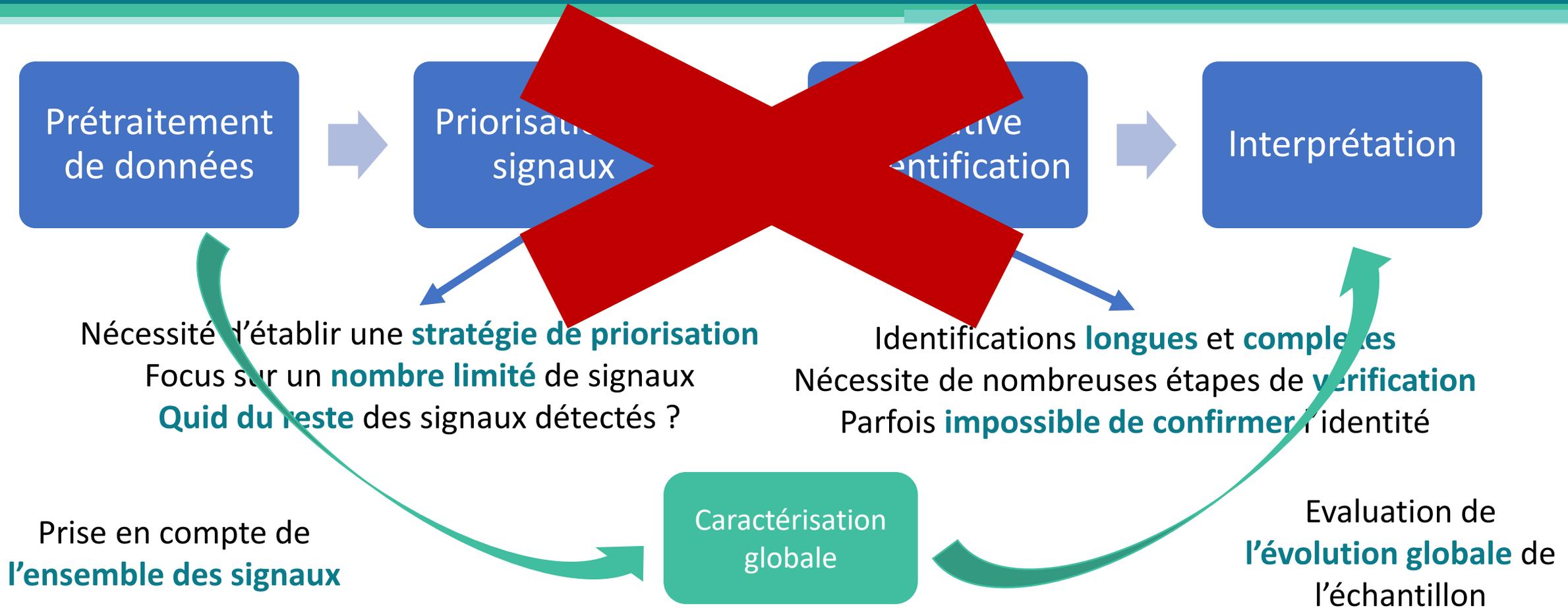
Set de données en 4D !



~ 20 000 pics / injection, soit **3-4 Go par injection**
Chaque **échantillon injecté en triplicat**

=> Nécessité de prévoir un espace et une stratégie pour le **stockage des données**

Développement de méthodes pour le traitement de données



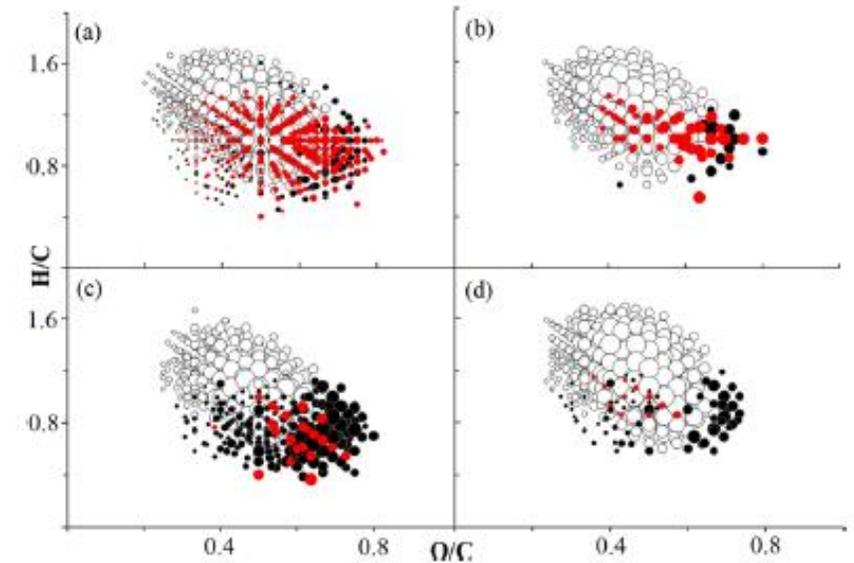
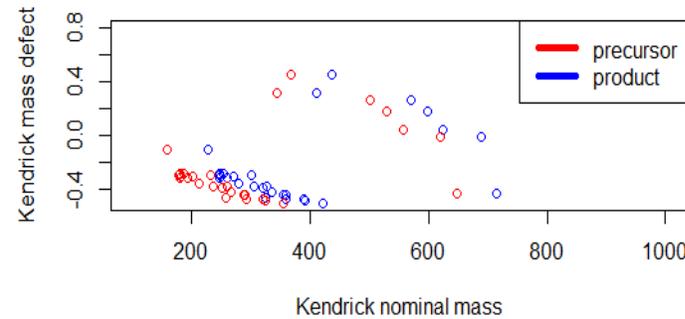
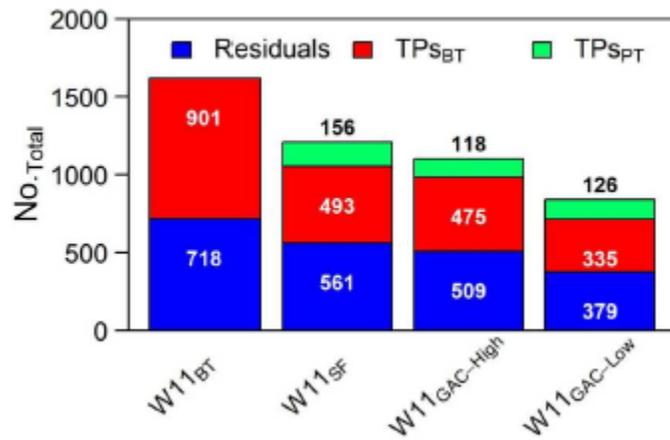
Développement de méthodes pour le traitement de données

Caractérisation globale

Présence de marqueurs*

Masses exactes
Kendrick plot**

Formules brutes
Van Krevelen plot***



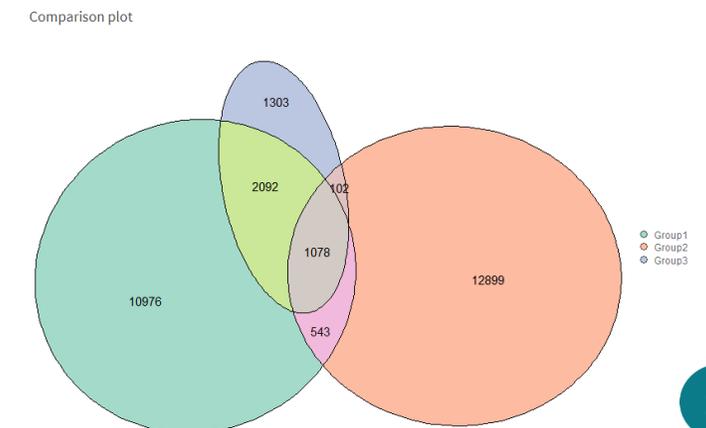
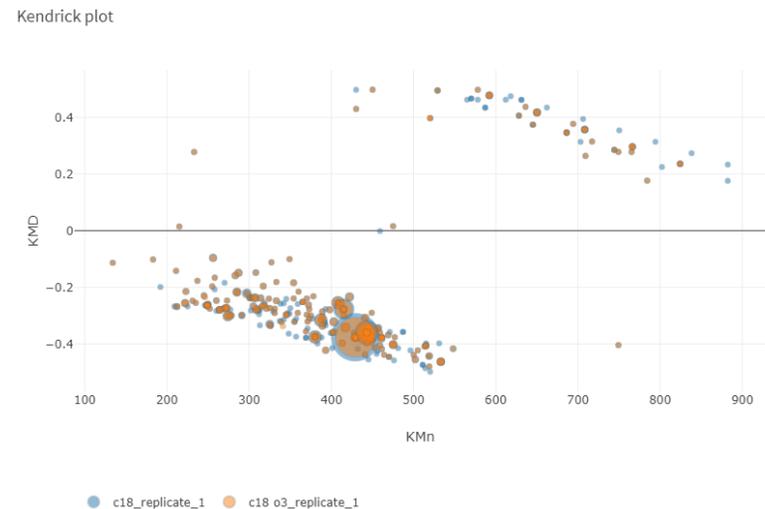
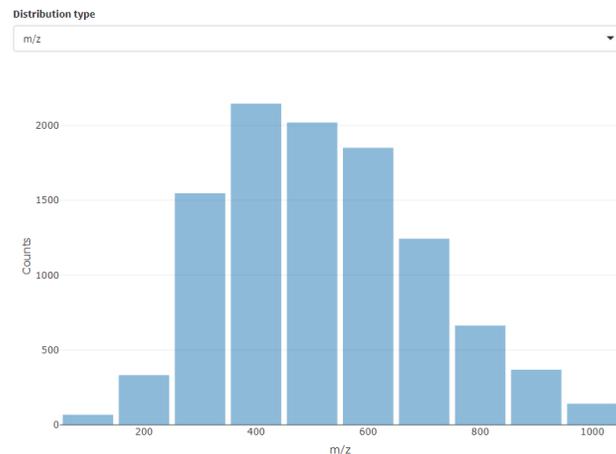
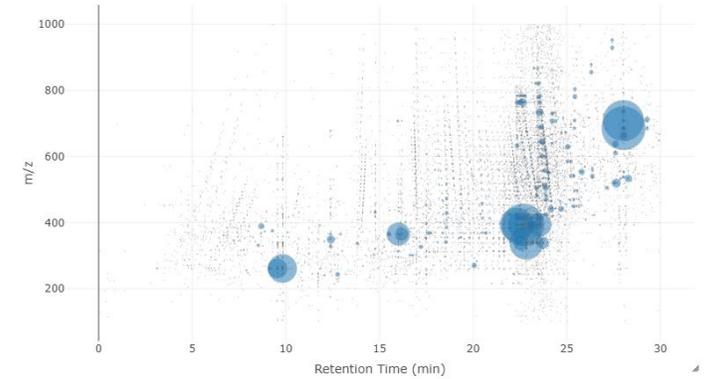
* Nürenberg et al., Water Research (2019)

** Sanchís et al., Water Research (2018)

*** Lavonen et al., Environmental Science & Technology (2013)

Quelques résultats

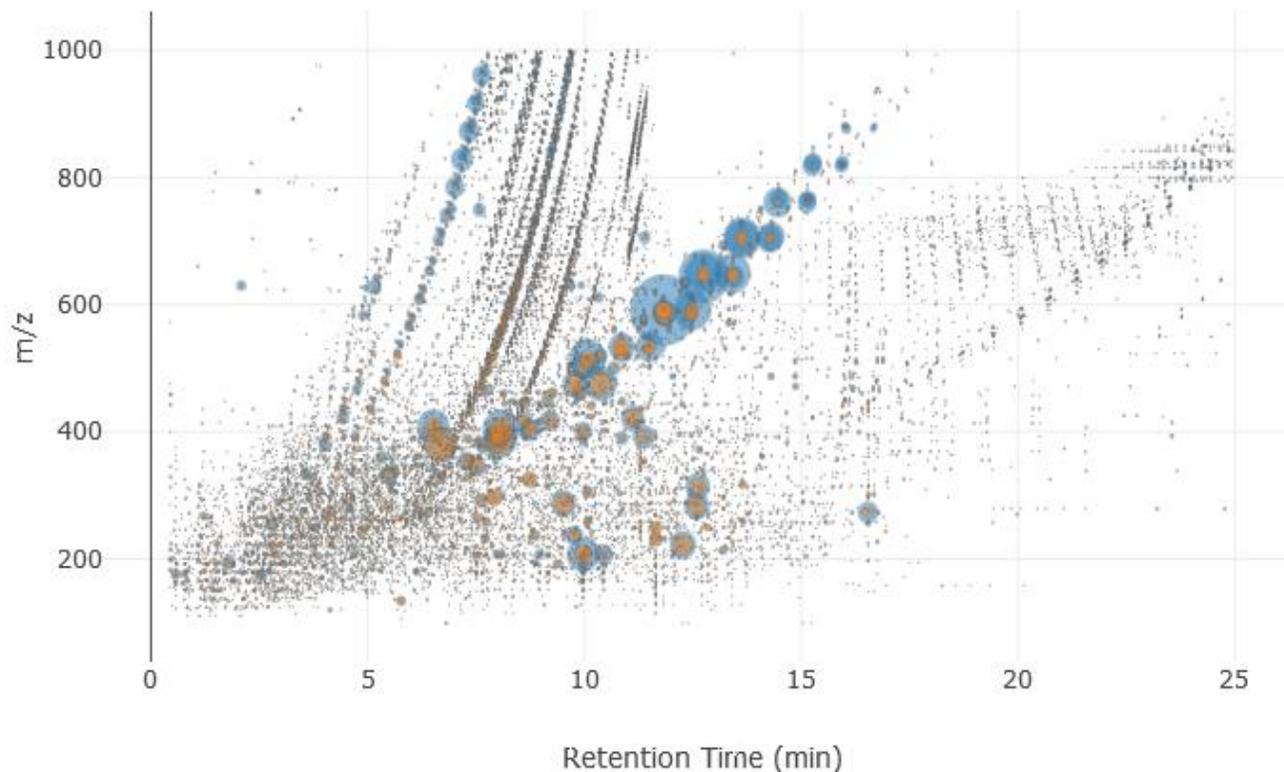
- Comparaison de différents logiciels et algorithmes
- Etablissement d'une méthode rapide et adaptée
- Mise en place d'une application pour automatiser les étapes de traitement



Applications et perspectives

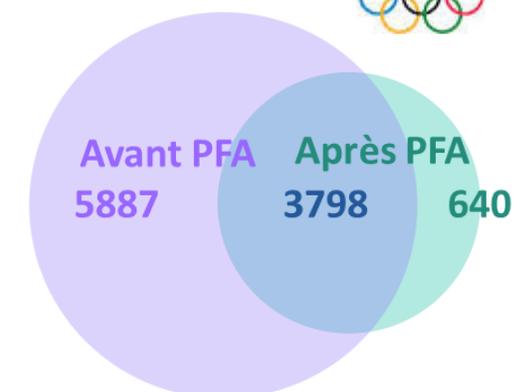
Exemple d'identification de molécules

Eaux usées traitées **avant/après** désinfection (acide performique)



- V0.1-S_replicate_3
- V0.1-d-S_replicate_3

Ouvrage IWA – désinfection des eaux usées (SIAAP) – chapitre 4



Nombre de marqueurs détectés

Effectiveness of Disinfecting Wastewater Treatment Plant Discharges

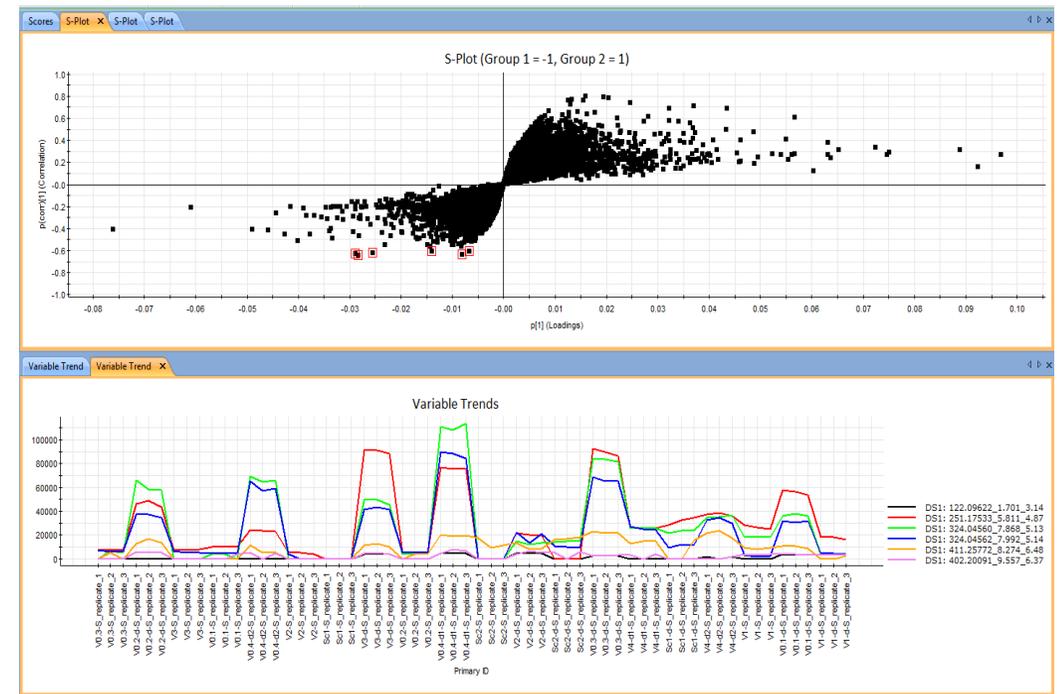
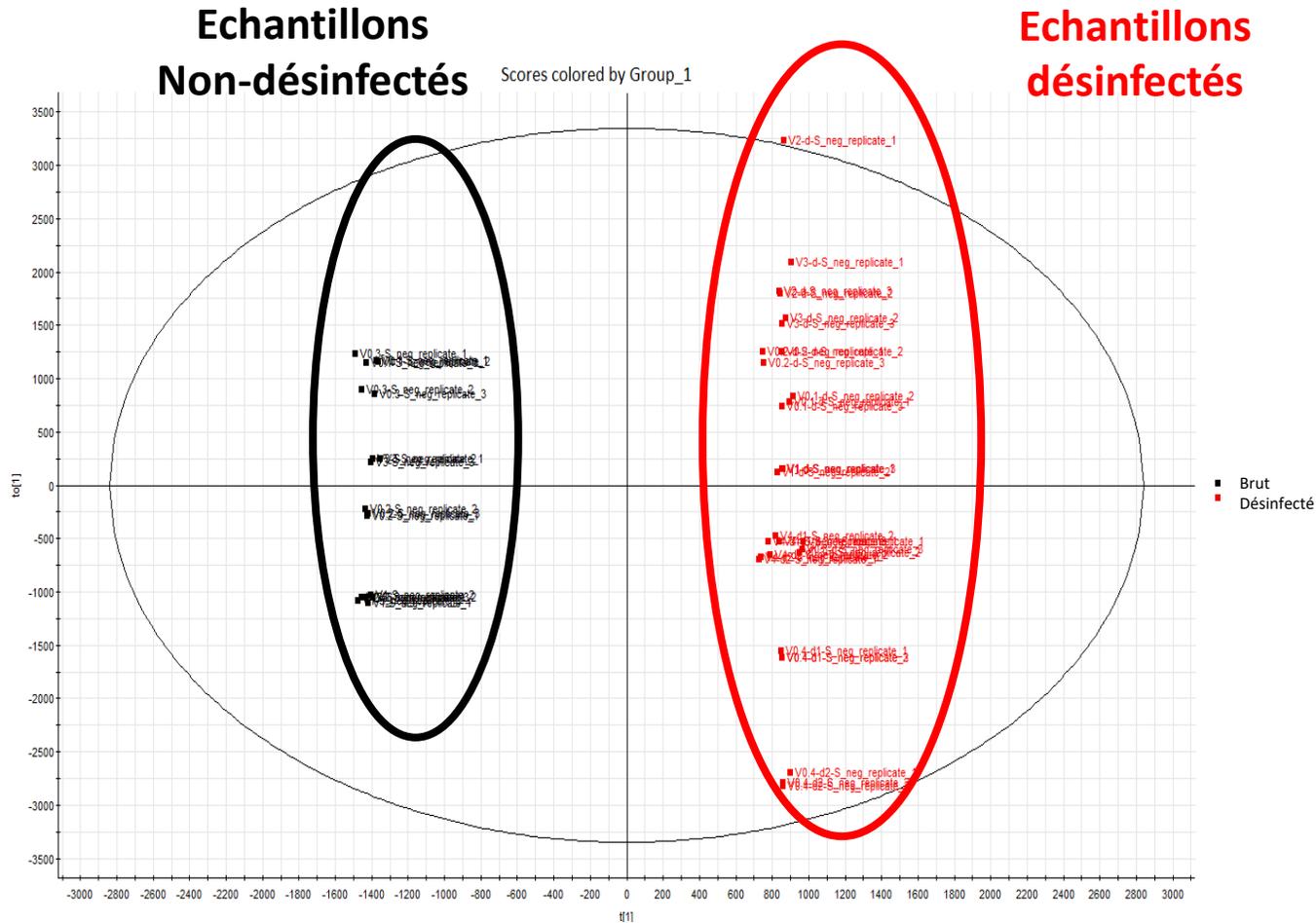
Case of chemical disinfection using performic acid

Edited by Vincent Rocher and Sam Azimi



Exemple d'identification de molécules

OPLS-DA & s-plot : discrimination d'échantillons



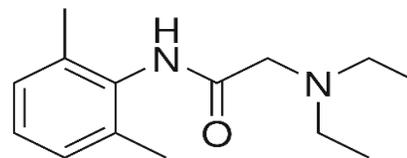
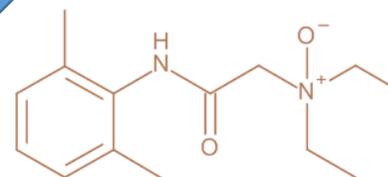
Exemple d'identification de molécules

Disinfected markers	m/z	Retention time (min)	Drift time (ms)	p[1]	p[corr][1]	Formule brute	iFit (%)
122.09622_1.701_3.14	122.09622	1.701	3.137	-0.0067	-0.609733	C ₈ H ₁₁ N C ₅ H ₁₂ FNO	60.22 39.78
251.17533_5.811_4.87	251.17533	5.811	4.867	-0.0282	-0.643974	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₂	87.46
324.04560_7.868_5.13	324.04560	7.868	5.127	-0.0289	-0.630778	C ₁₃ H ₁₆ ClF ₂ NS 2	59.34
324.04562_7.992_5.14	324.04562	7.992	5.144	-0.0255	-0.623155		
411.25772_8.274_6.48	411.25772	8.274	6.477	-0.0139	-0.609606		
402.20091_9.557_7.37	402.20091	9.557	6.373	-0.0081	-0.63989		

N-oxydes observées par ozonation (Merel et al. 2017)

Identification inédite en désinfection par PFA

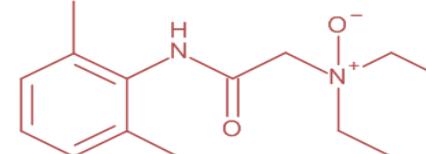
Lidocaine-N-oxide



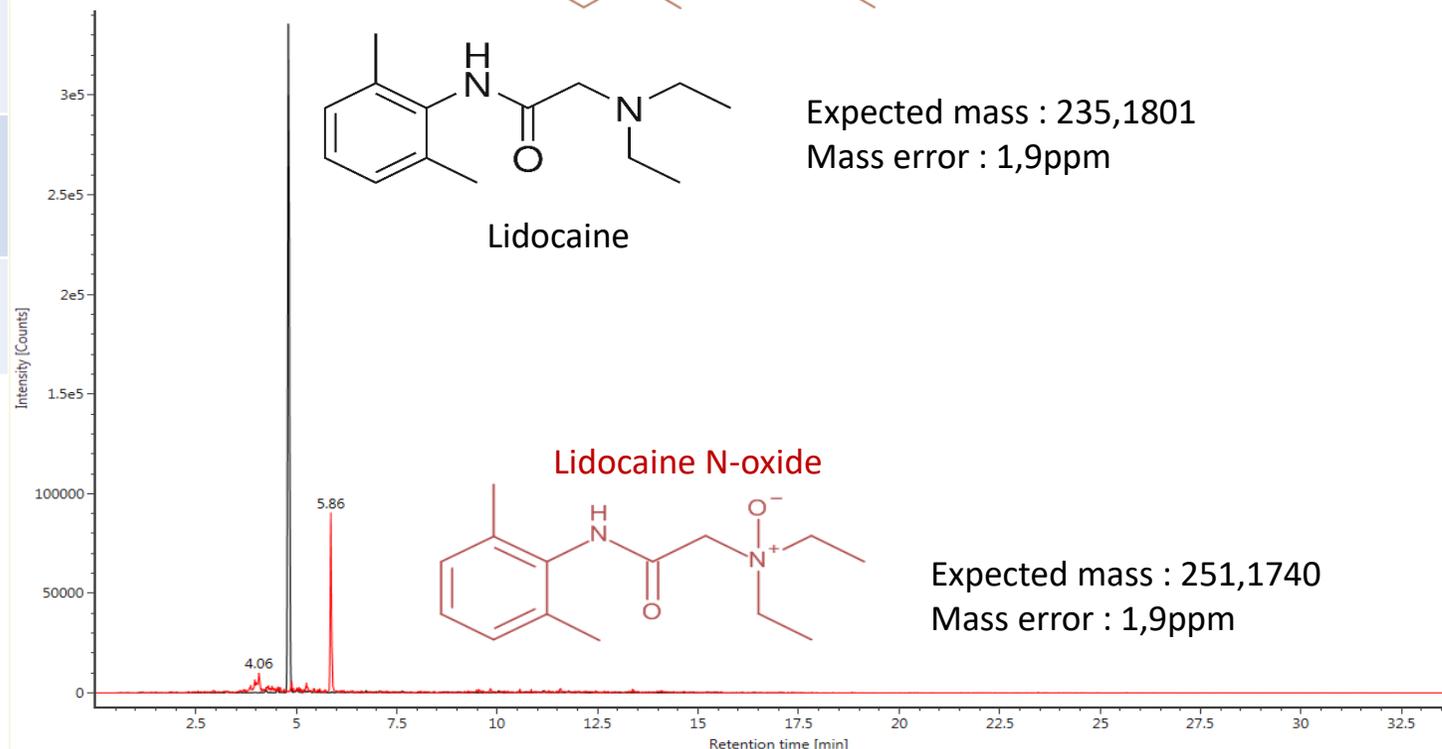
Lidocaine

Expected mass : 235,1801
Mass error : 1,9ppm

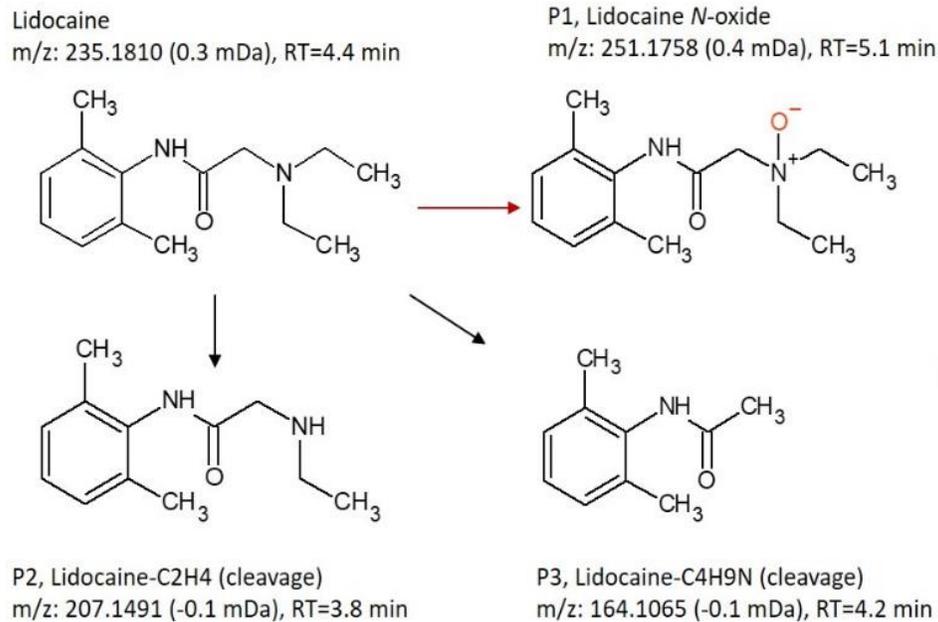
Lidocaine N-oxide



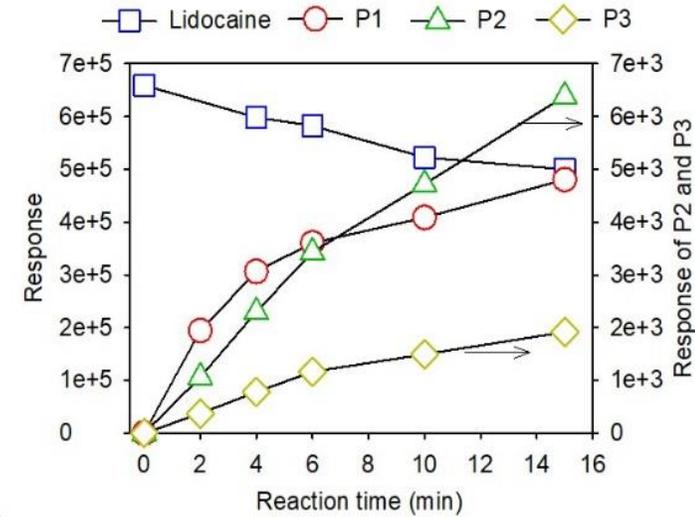
Expected mass : 251,1740
Mass error : 1,9ppm



Identification de mécanismes de dégradation



Semi-quantification



Lidocaine = 5 μ M, pH7, phosphate buffer, PFA = 5 mg/L

Maolida Nihemaiti,
post-doc 2018-2019



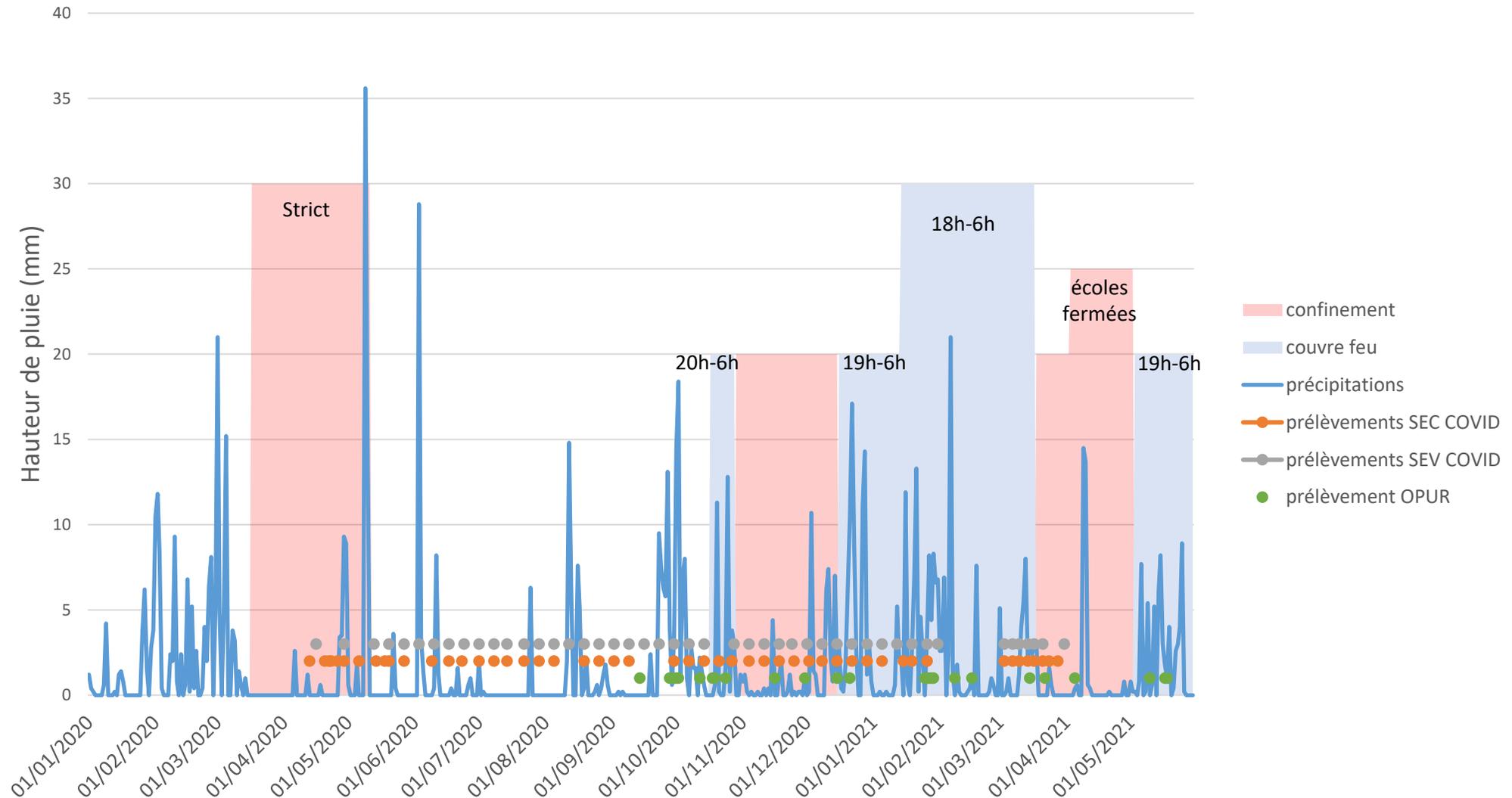
11th Micropol
& Ecohazard
conference

Oct. 2019



Suivi de long terme des eaux usées

150 prélèvements sur 1 an de suivi



Suivi de long terme des eaux usées – Analyses réalisées



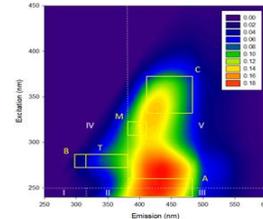
Analyse des paramètres globaux :

- pH
- Conductivité
- Turbidité
- MES
- COD
- DBO
- DCO
- Ammonium
- Nitrites
- Nitrates
- Azote Kjedahl
- Phosphore
- Orthophosphates

Ecotoxicologie



Spectroscopie fluorescence 3D



Micropolluants organiques

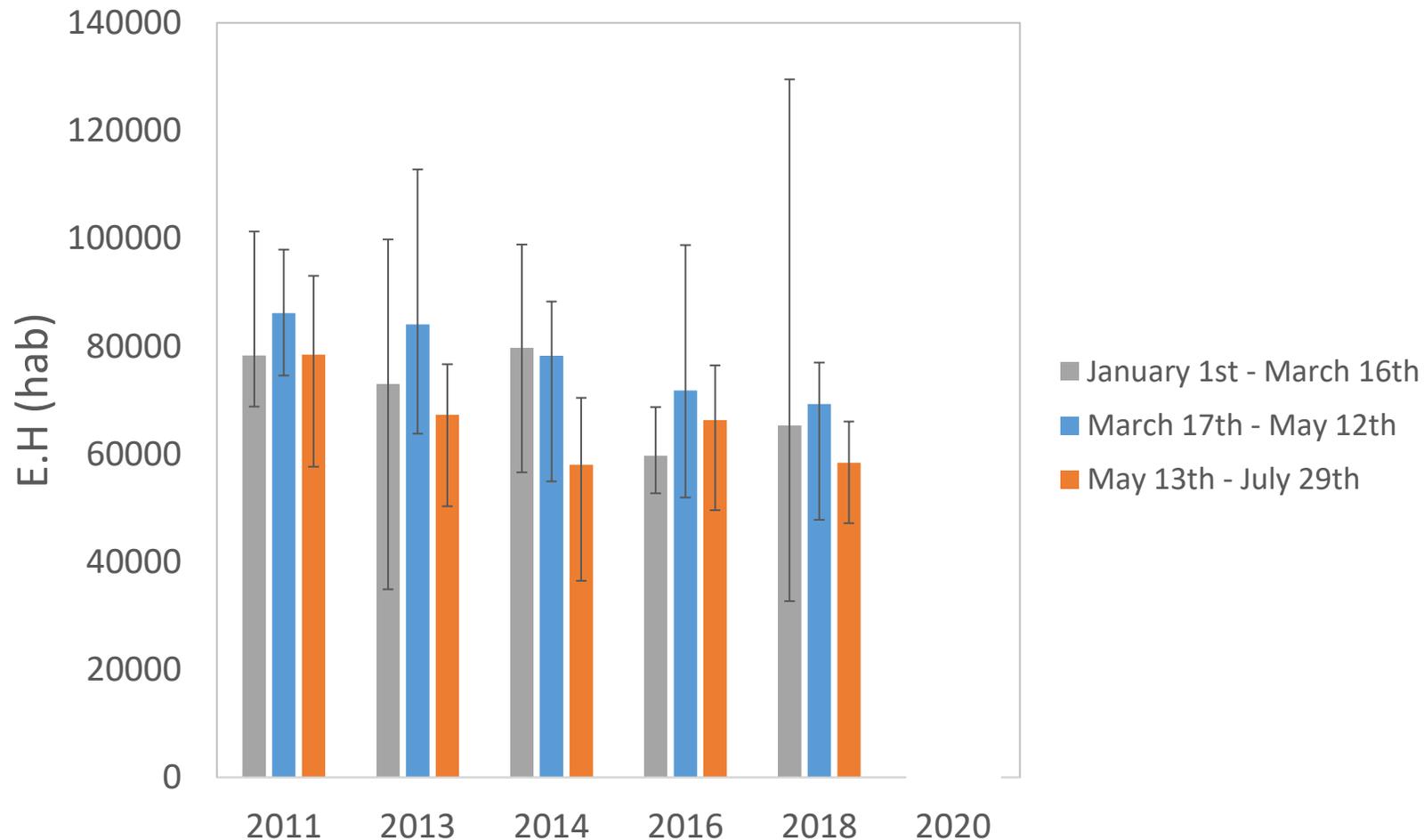
Ciblé
Biocides

Non-ciblé

Suspect
Biocides, Pharmaceutiques



Résultats préliminaires du suivi : paramètres globaux



Mars-Mai 2020 : confinement strict

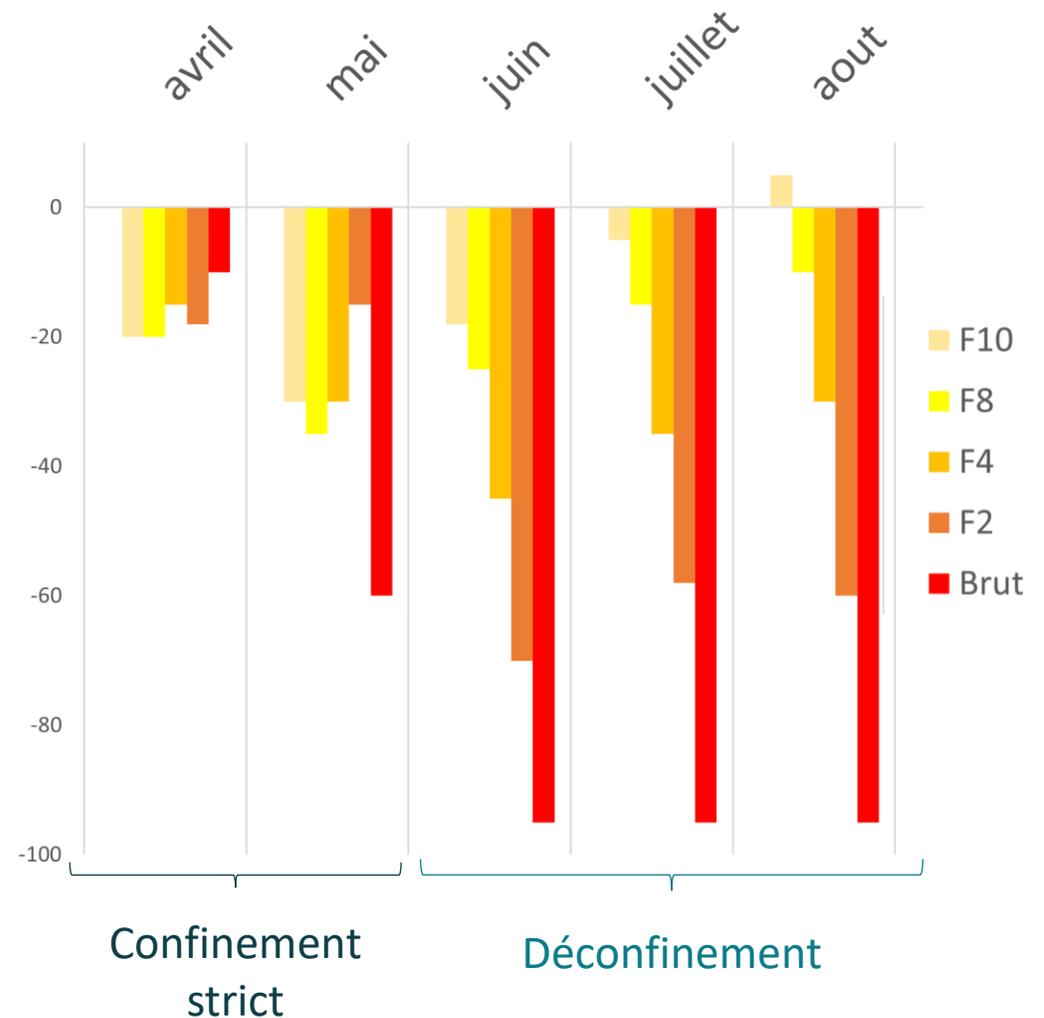
20 % des parisiens intra-muros ont quitté la région pour se confiner (INSEE)

Résultats préliminaires du suivi : écotoxicologie

Evaluation de la toxicité des échantillons

- Réalisée sur des larves de poissons zèbres soumises à un stress
- Distance parcourue relevée et comparée à un témoin
- Comparaison pour différents facteurs de dilution

Résultats préliminaires à confirmer
et à mettre en lien avec d'autres
paramètres



Apports de l'HRMS : observatoire des eaux résiduaires

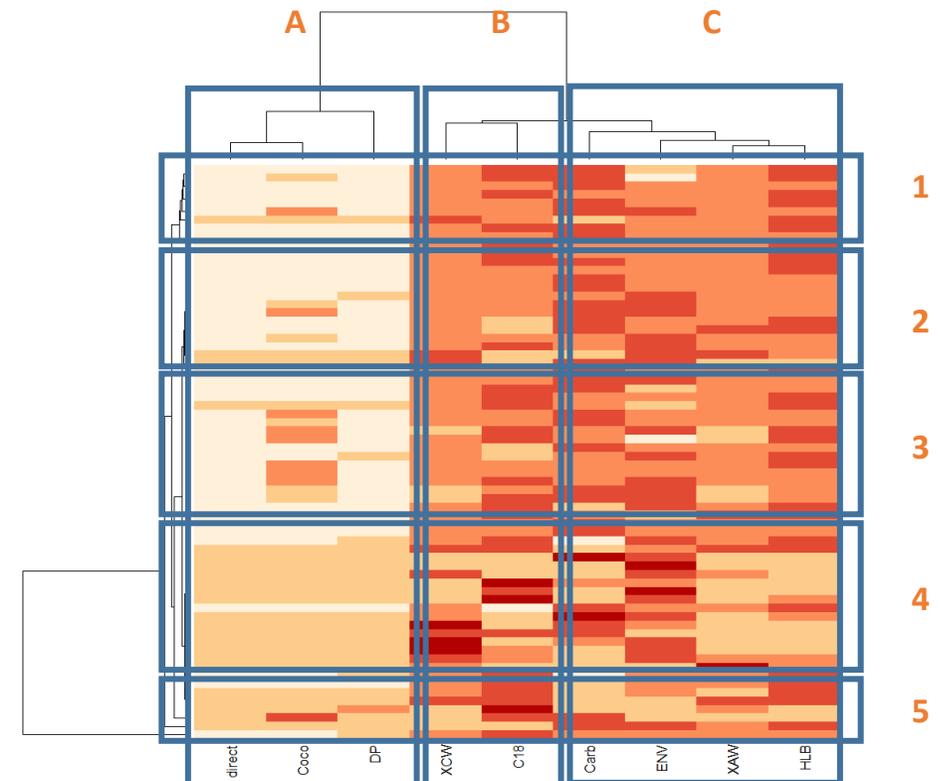
Analyse de **suspects** (375 molécules)

- Drogues
- Biocides
- Polluants majeurs des eaux urbaines
- Produits de transformation

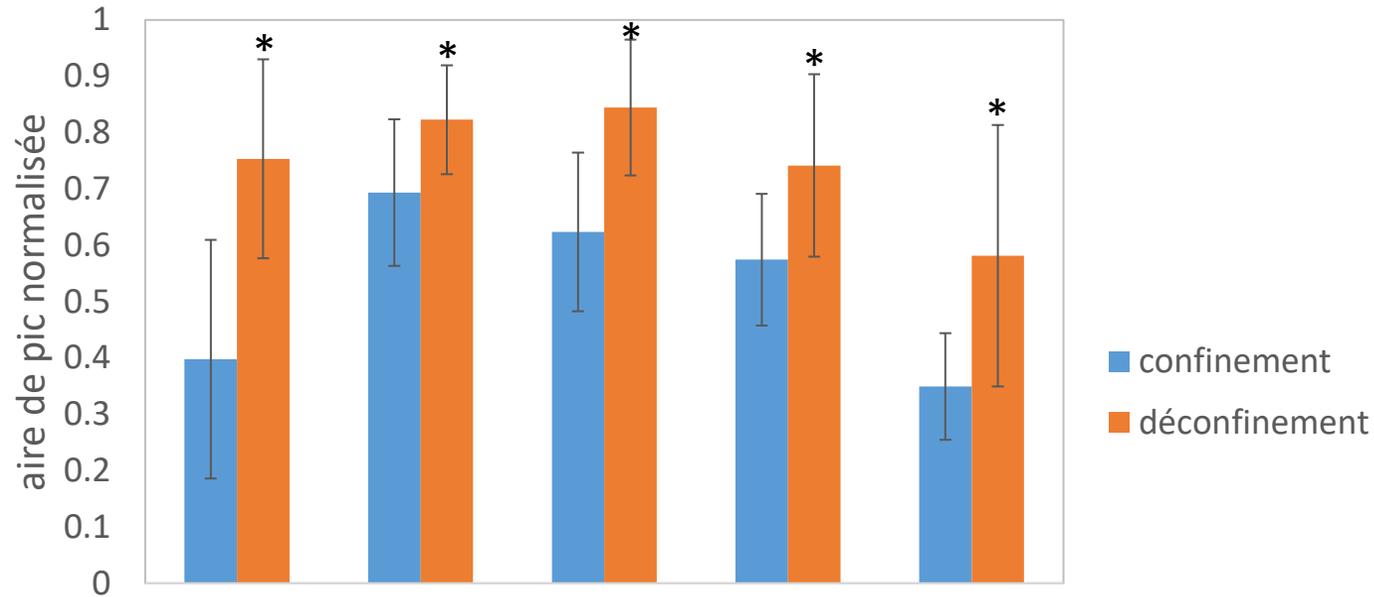
Présence ou absence dans les séries d'échantillons

Complémentaire des analyses ciblées
(produits difficiles à acquérir/chers – ex. drogues, produits de transformation...)

Possibilité **d'études rétrospectives**



Résultats préliminaires du suivi : analyse en suspect



???

Mise en place du télétravail généralisé ?

Restrictions des activités pendant le confinement ?

Retour des personnes qui se sont confinées dans des résidences secondaires ?

Hypothèses à confirmer par d'autres données

Résultats préliminaires du suivi : analyse non-ciblée

● Évolution des habitudes en fonction des périodes ?

- Comparaison des paramètres généraux des marqueurs détectés (nombre de signaux, m/z moyen, temps de rétention moyen...)
- Analyse de séries temporelles (variation d'intensité des signaux corrélée avec les restrictions / les concentrations en Sars-Cov2 ?)

● Polluants caractéristiques de chaque période?

- Recherche et étude de marqueurs discriminants
- Tentative d'identification (quelles familles de molécules ? Quelles propriétés ?)

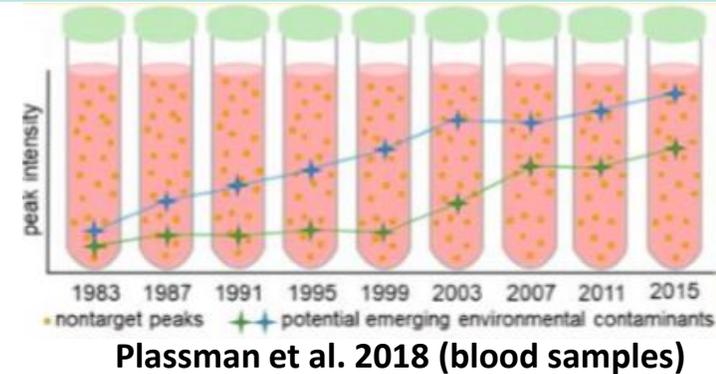
Travail en cours...

Applications : perspectives

Base de données de spectres HRMS

- Analyses temporelles pour la détection de contaminants émergents
- Études rétrospectives sur ces « nouveaux » contaminants
- Épidémiologie sur eaux usées
- Évolution des habitudes de consommation
- Enrichissement des bases de données interne pour faciliter les identification futures

projet ANR EGOUT – 2022-2025

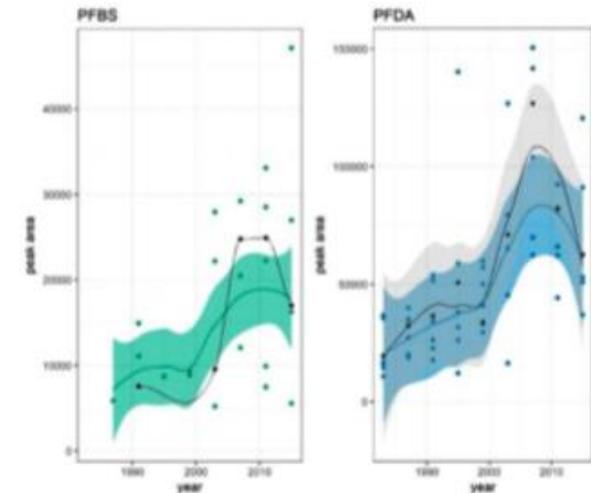


Objectif : pérenniser le suivi de long terme avec l'Observatoire de long terme sur les eaux usées

- Accès eaux usées brutes facilité (SIAAP)
- Observatoire SIAAP (bancairisation d'échantillons)
- Stockage de données (serveur – 10 ans)



Observatoire des
Polluants
URbains





leesu

laboratoire eau environnement systemes urbains

Merci pour votre attention

