

M0013/97A

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département de Génie de l'environnement



Présentée par

Samira BOUTRIA

INGENIEUR D'ETAT EN GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

pour obtenir le diplôme de

MAGISTER

EN

GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Sujet:

**ETUDE DE LA BIODEGRADABILITE D'UN
TENSIO-ACTIF ANIONIQUE COMMERCIAL
ALKYLBENZENE SULFONATES DE SODIUM
LINEAIRES (LAS)**

Soutenu publiquement, le

1997 devant le jury composé de:

Mr A. Kettab:	Maître de conférence à l'E.N.P.	Président
Mr R. Kerbachi:	Professeur à l'E.N.P.	Rapporteur
Mme K. Moussaoui:	Maître de conférence à l'E.N.P.	Examinatrice
Mme N. Belhanache:	Maître de conférence à l'E.N.P.	Examinatrice
Mme N. Abdi:	Chargé de cours à l'E.N.P.	Examinatrice

DEDICACES

Je dédie ce travail à:

MA TRES CHERE MERE.

MA TRES CHERE SOEUR.

MES TRES CHERS FRERES.

MA TRES CHERE AMIE, MADAME BENMANSOUR FATIMA.

MADAME K. MOUSSAOUI.

TOUTE MA FAMILLE.

TOUS MES AMIS.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة قابلية التدهور الحيوي لمادة سائلة فعالة سطحيا ألا وهي سلفونات ألكيل البنزن (LAS) ذات السلاسل الكاربونية الخطية وذلك بمختلف الطرق: التنقية بواسطة الأوحال المحفزة، الطلب الكيميائي الحيوي من الأكسجين وطرق تكاثر بكتريا يسودوموناس. وللمقارنة تم كذلك فحص قابلية التدهور الحيوي لألكيل البنزن ذات سلاسل كاربونية خطية وكذا لسادتين سالبتين فعاليتين سطحيا هما: سلفونات ألكيل بنزن أخرى (ABS) ولوريل سولفات الصوديوم (LSS). فالنتائج المحمل عليها تظهر أن LAS هو مركب سام بالنسبة للكائنات المجهرية عند تركيز 50 مغ/ل. كما أن LSS قابل للتلف حيويًا حتى عند النسب العالية، وتظهر الدراسة من جهة أخرى أن التلفية الحيوية لـ ABS يتم تحليلها في حضور التركيز المتزايد لهذه المادة.

Résumé

Le but de ce travail est l'étude de la biodégradabilité d'un tensio-actif anionique commercial à savoir des alkylbenzènesulfonates de sodium linéaires (LAS) par différents tests de biodégradabilité tels que l'épuration biologique par boues activées, la demande biochimique en oxygène (DBO) et la croissance de bactéries, *Pseudomonas*. A titre de comparaison, la biodégradabilité de deux autres tensio-actifs anioniques alkylbenzène sulfonates de sodium (ABS) et alkylsulfate de sodium (le laurylsulfate de sodium (LSS)) ainsi que celle d'alkylbenzènes linéaires (LAB) ont été également étudiées. Les résultats obtenus montrent entre autres que le LAS est toxique pour les microorganismes à une concentration de 50 mg/l. Le laurylsulfate de sodium (LSS) est biodégradable même à des teneurs élevées. L'étude montre par ailleurs que la biodégradabilité du tensio-actif ABS est inhibée en présence de concentrations croissantes de celui-ci.

Abstract

The aim of this work is the investigation of the biodegradability of a commercial anionic surfactant namely linear alkylbenzenesulfonates (LAS) by several tests of biodegradability such as the treatability by laboratory activated sludge, biochemical oxygen demand (BOD) and the growth of *Pseudomonas* bacteria testing procedure. For purpose of comparison, the biodegradability of linear alkylbenzenes (LAB) and that of two others anionic surfactants: alkylbenzenesulfonates of sodium (ABS) and an alkylsulfate of sodium namely laurylsulfate of sodium (LSS) was also investigated. The results obtained show also that the LAS is toxic for the microorganisms at a concentration of 50 mg/l. The LSS is biodegradable even at high concentrations. The study shows on the other hand that the biodegradability is inhibited in presence of increasing concentration of ABS.

Une grande partie de ce travail a été réalisée au laboratoire de L'E.P.E.A.L De Ben Omar. Aussi, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères et ma profonde reconnaissance pour l'accueil chaleureux qui m'a été réservé et l'aide qui m'a été fournie, aux responsables et au personnel de ce laboratoire, particulièrement à:

Monsieur A. NAIT CHERIF, responsable du laboratoire.

Mademoiselle F.BENRAIS, chef de service au laboratoire.

Madame F.SKANDER.

Madame F.CHEGHNANE.

Madame Nassima.

Madame Djamila.

Monsieur A.AMARA.

Monsieur A.AINOUCHE.

Monsieur Rachid.

Monsieur HAMID.

Monsieur AHMED.

J'adresse également mes remerciements les plus chaleureux et exprime ma gratitude à Madame Hafida, responsable de la bibliothèque du département du génie rural de l'Institut National d'Agronomie (I.N.A), pour l'immense service qu'elle m'a rendu en me permettant, si gentille, de consulter toute la documentation disponible au niveau de cette bibliothèque.

Je voudrai également adresser mes vifs remerciements à Monsieur Amara, responsable de la bibliothèque à l'E.N.P. ainsi qu'à tout le personnel de cette bibliothèque pour leur amabilité et leur disponibilité à me fournir toute la documentation nécessaire à mon travail.

Une partie de ce travail a été réalisée, grâce à l'aide de Madame Saoud Zahia du Centre National de Médecine Sportive (CNMS) de Ben Aknoun, de Mademoiselle Djenaoui Mimi et de Mademoiselle Baoûd Najoua de L'U.S.T.H.B. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Je remercie également très chaleureusement Mademoiselle Z.BELHADJ pour toute l'aide qu'elle m'a apportée avec tant de gentillesse et de générosité.

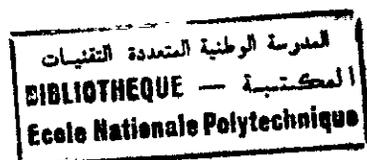
Je ne saurai oublier de remercier sincèrement et chaleureusement mes collègues et amis pour m'avoir aidée et soutenue, particulièrement Madame O. Haouchine, Madame A. Tchoulak, Mesdemoiselles M. Boukharrouba, L. Didaoui, K. Déramchi, S. Aroua, Monsieur T. AHMED-ZAID, Monsieur A. Chergui, Monsieur H. Lounici, Monsieur H.GHRIB et Monsieur M. Faoussi.

Pour leur amabilité, leur gentillesse et leur disponibilité à nous venir en aide, je remercie de tout coeur et avec une immense gratitude les responsables et personnel du centre de calcul de l'E.N.P., en particulier LEILA, HOURIA, KARIMA en la priant de nous pardonner d'avoir si souvent abusé de sa patience, FAIZA et FOUZIA, SALIMA, HACENE, HOCINE, ALI et EL HADI.

De même, je remercie les responsables et personnel du département des Sciences fondamentales.

Tous mes remerciements vont également aux responsables et personnel du département de génie de l'environnement et en particulier à Madame, N. BELHANACHE, Madame D. MAMERI, enseignantes et Mademoiselle LEILA, secrétaire.

SOMMAIRE



Introduction.....	1
CHAPITRE I. Généralités sur les tensio-actifs.....	4
I.1 Définition.....	4
I.2 Propriétés des tensio-actifs.....	5
I.3 Classification des tensio-actifs.....	6
I.3.1 Les tensio-actifs anioniques.....	6
I.3.1.1 Les alkylarylsulfonates ou alkylbenzènesulfonates	6
I.3.1.2 Les alkylsulfates.....	8
I.3.1.3 Les alkylphénols éthoxylés et sulfatés.....	9
I.3.1.4 Les alkylsulfonates ou paraffinesulfonates.....	9
I.3.1.5 Les oléfinesulfonates.....	9
I.3.1.6 Les estersulfonates et les amides sulfonates.....	10
I.3.1.7 Les carboxylates et savons.....	10
I.3.2 Les tensio-actifs non ioniques.....	11
I.3.3 Les tensio-actifs cationiques.....	12
I.3.4 Les tensio-actifs amphotères.....	12
I.3.5 Les tensio-actifs naturels.....	13
I.3.5.1 Les saponines ou tensio-actifs d'origine végétale.....	13
I.3.5.2 Les sulfolipides et les sulfatides.....	14
I.3.5.3 Les lécithines et le tensio-actif du poumon.....	14
I.3.5.4 Les sels biliaires.....	15
I.3.5.5 Les tensio-actifs microbiens.....	15
I.3.6 Les tensio-actifs ou détergents synthétiques.....	16
I.4 Domaines d'application des tensio-actifs.....	18
CHAPITRE II Généralités sur l'épuration biologique et aspects particuliers de la biodégradabilité des tensio-actifs.....	20
II.1. Généralités sur l'épuration biologique.....	20
II.1.1. Notion de biodégradation et de biodégradabilité.....	20
II.1.2. L'épuration biologique.....	21
II.1.2.1. définition	21
II.1.2.2 Conditions de l'épuration biologique.....	21
II.1.2.3. Métabolisme des microorganismes de l'épuration biologique.....	22
II.1.2.4. Procédé d'épuration aérobie à biomasse en suspension ou boues activées.....	24

II.1.2.4.1	Caractérisation des systèmes de boues activées	25
II.1.2.4.1.1	Charge massique.....	25
II.1.2.4.1.2	Charge volumique	25
II.1.2.4.1.3	Age des boues activées.....	26
II.1.2.4.2.	Composition et rôle des boues activées.....	27
II.1.2.4.2.1	Les bactéries.....	27
II.1.2.4.2.2	Les champignons.....	28
II.1.2.4.2.3	Les protozoaires.....	28
II.1.2.4.2.4	Les rotifères et les nématodes.....	32
II.2.	Biodégradabilité des tensio-actifs.....	33
II.2.1.	Notion de biodégradation primaire et de biodégradation ultime.....	33
II.2.2.	Méthodes de détermination de la biodégradabilité des tensio-actifs.....	33
II.2.2.1.	Tests de biodégradabilité.....	33
II.2.2.1.1	Méthodes aérobies.....	35
II.2.2.1.2	Méthodes anaérobies.....	35
II.2.2.2.	Méthodes analytiques d'évaluation de la biodégradabilité des tensio-actifs anioniques.....	35
II.2.2.2.1	Méthodes spécifiques.....	35
II.2.2.2.1.1	Méthode au bleu de méthylène.....	35
II.2.2.2.1.2	Mesure des sulfates et des sulfites.....	36
II.2.2.2.1.3	Méthodes chromatographiques.....	36
II.2.2.2.1.4	Méthodes par spectroscopie ultra-violet et infra-rouge	37
II.2.2.2.1.5	Méthodes radiochimiques.....	37
II.2.2.2.2	Méthodes non spécifiques.....	38
II.2.2.2.2.1	Demande biochimique en oxygène (DBO).....	38
II.2.2.2.2.2	Demande chimique en oxygène (DCO).....	41
II.2.2.2.2.3	Carbone organique total (COT) et carbone organique dissous (COD).....	41
II.2.2.2.2.4	Dioxyde de carbone (CO ₂).....	42
II.2.3.	Généralités sur les microorganismes capables de dégrader les tensio- actifs.....	42
II.2.4.	Mécanismes de biodégradation des tensio-actifs.....	44
II.2.4.1.	Généralités.....	44
II.2.4.2.	Mécanismes de biodégradation des tensio-actifs alkylbenzène sulfonates.....	50
II.2.4.2.1.	Mécanismes de biodégradation de la chaîne hydrocarbonée aliphatique.....	51
II.2.4.2.2.	Mécanismes de biodégradation du noyau aromatique.....	52



II.2.4.3. Mécanismes de biodégradation des tensio-actifs alkylsulfates.....	54
II.2.5. Etude bibliographique sur la biodégradabilité des tensio-actif anioniques alkylbenzènesulfonates et alkylsulfates.....	55
CHAPITRE III Effets des tensio-actifs sur l'environnement.....	64
III.1 Introduction.....	64
III.2 Effets des tensio-actifs sur les bactéries.....	64
III.3 Effets des tensio-actifs sur la faune et la flore.....	67
III.4 Effets des tensio-actifs sur l'homme et les animaux supérieurs.....	66
III.5 Effets des tensio-actifs sur les processus d'épuration biologique.....	69
CHAPITRE IV Tests de biodégradabilité en laboratoire des tensio-actifs anioniques alkylbenzènesulfonates (LAS et ABS), alkylsulfate (LSS) et des alkylbenzènes linéaires (LAB).....	75
IV.1 Evaluation de la biodégradabilité par le procédé des boues activées.....	75
IV.1.1 Dispositif expérimental et description de l'essai de biodégradabilité....	75
IV.1.1.1 Premier essai: Etude de la biodégradabilité du tensio-actif LAS.....	79
IV.1.1.2 Deuxième essai: Etude de la biodégradabilité des tensio-actifs LAS, LSS et du LAB.....	79
IV.1.2 Méthodes analytiques.....	83
IV.1.2.1 Analyses physico-chimiques.....	83
IV.1.2.2 Analyses bactériologiques.....	85
IV.1.3 Résultats et discussions.....	85
IV.1.3.1 Résultats du premier essai.....	85
IV.1.3.1.1 Evolution de la DCO.....	85
IV.1.3.1.2 Evolution de la matière active.....	86
IV.1.3.1.3 Evolution des MVES.....	86
IV.1.3.2 Résultats du deuxième essai.....	95
IV.1.3.2.1 Période A.....	95
IV.1.3.2.1.1 Evolution de la DCO et de la DBO_5	95
IV.1.3.2.1.2 Evolution de la matière active.....	98
a) LAS.....	98
b) LSS.....	98
IV.1.3.2.1.3 Evolution des MVES.....	98
IV.1.3.2.1.4 Analyse bactériologique.....	101
IV.1.3.2.2 Période B.....	101
IV.1.3.2.2.1 Evolution de la DCO et de la DBO_5	101

IV.1.3.2.2.2 Evolution de la matière active.....	104
a) LAS.....	104
b) LSS.....	104
IV.1.3.2.2.3 Evolution des MVES.....	106
IV.1.3.2.2.4 Evolution du pH.....	106
IV.1.3.2.2.5 Analyse bactériologique.....	106
IV.1.3.2.3 Période C.....	109
IV.1.3.2.3.1 Evolution de la DCO et de la DBO ₅	109
a) Effet de l'ajout des tensio-actifs LAS ou LSS.....	109
b) Effet de l'ajout du LAB.....	115
IV.1.3.2.3.2 Evolution de la matière active.....	115
a) LAS.....	115
b) LSS.....	116
IV.1.3.2.3.3 Evolution du LAB.....	128
IV.1.3.2.3.4 Evolution des MVES.....	130
IV.1.3.2.3.5 Evolution du pH.....	130
IV.1.3.2.3.6 Analyse bactériologique.....	133
IV.2 Evaluation de la biodégradabilité des tensio-actifs LAS, ABS et LSS par les tests de demande biochimique en oxygène (DBO).....	134
IV.2.1 Matériels et méthodes.....	134
IV.2.2 Résultats et discussions.....	135
IV.3 Evaluation de la biodégradabilité du LAS par les tests de croissance bactérienne.....	138
IV.3.1 Matériels et méthodes.....	138
IV.3.2 Résultats et discussions.....	140
CONCLUSION GENERALE.....	142
Bibliographie.....	149
Annexes	

INTRODUCTION

Apparus après la deuxième guerre mondiale, afin de pallier à la pénurie des corps gras nécessaires à la fabrication des savons, les détergents synthétiques anioniques de type alkylbenzènesulfonate (ABS) ont été au départ à l'origine de plusieurs nuisances. Dans les milieux récepteurs tels que barrages, fleuves, cours d'eau et stations d'épuration, celles-ci se manifestaient particulièrement par d'énormes quantités de mousses qui perturbaient la pêche, la navigation et les traitements d'épuration biologique. Ces mousses étaient dues essentiellement au principal constituant du détergent synthétique appelé matière active ou agent de surface ou encore tensio-actif. Celui-ci était composé de chaînes hydrocarbonées ramifiées difficilement ou non biodégradables. Par la suite, la fabrication de détergents de type alkylbenzènesulfonate de sodium linéaire (LAS) a permis la réduction ou la suppression des mousses.

Le développement industriel, la croissance démographique et la notion de santé liée à l'hygiène ont engendré une utilisation de plus en plus massive de détergents. Ces derniers constituent une source de pollution non négligeable lors de leur rejet dans les milieux récepteurs du fait de leur utilisation dans tous les domaines aussi bien industriels, sanitaires que domestiques. Tous les rejets urbains, industriels et portuaires du grand Alger aboutissent surtout dans la partie Ouest de la baie d'Alger (fig.1). Le milieu marin reçoit directement (émissaires urbains) ou indirectement (Oued Hamiz et Oued Harrach) les eaux usées domestiques et industrielles ce qui entraîne une dégradation des eaux de la baie d'Alger. L'abondance des espèces exigeant un milieu riche en matières organiques met en évidence, au niveau des petits fonds côtiers (0 à 25 mètres), l'influence de la pollution par les rejets des eaux usées en baie d'Alger [1]. D'autre part des substances de type alkylbenzène à chaînes linéaires ayant une composition en homologues et isomères analogue à celle des détergents anioniques de type alkylbenzène sulfonate linéaire (LAS) ont été trouvées dans des rejets urbains [2] et des sédiments [3]. La quantité de détergents rejetés en Méditerranée est estimée à 60.000 tonnes par an [4].

Une biodégradation facile et complète des substances organiques provenant des rejets industriels et domestiques constitue une des principales conditions pour le maintien de l'équilibre biologique dans l'environnement.

Le tensio-actif LAS, comme tout produit organique synthétique, doit répondre à cette exigence avant tout rejet dans le milieu récepteur. Toutefois, la matière active LAS étant composée, dans un produit commercial, d'un mélange d'homologues et d'isomères résultant du processus de fabrication, le degré de biodégradabilité de celle-ci dépend de la composition de ce mélange [5].

Actuellement, le taux de biodégradabilité des tensio-actifs doit être égal ou supérieur à 80% selon les normes de rejet [6-7] et la teneur de matière active dans les eaux de consommation ne doit pas dépasser 0.5 mg /l selon les normes internationales de l'organisation mondiale de la santé (O.M.S) [6].

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail consacré principalement à l'étude de la biodégradabilité d'un tensio-actif commercial de type LAS utilisé dans la fabrication de certains détergents synthétiques anioniques en Algérie.

La biodégradabilité du tensio-actif sera évaluée par plusieurs méthodes qui sont:

- Les tests de demande biochimique en oxygène (DBO).
- le procédé de traitabilité biologique par boues activées.
- Les tests de croissance, en présence du LAS, de souches pures de bactéries *Pseudomonas*: *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* et *P. chlororaphis*.

L'étude comporte également, à titre de comparaison, l'évaluation de la biodégradabilité:

- d'un autre tensio-actif anionique de type alkylbenzène sulfonate (ABS) par les tests de DBO.
- d'un tensio-actif également anionique de type alkyl sulfate et sans noyau aromatique: le laurylsulfate de sodium (LSS) par le procédé d'épuration par boues activées et les tests de DBO.

- d'alkylbenzènes linéaires (LAB), produits de base utilisés pour la fabrication du LAS étudié; par le procédé des boues activées.

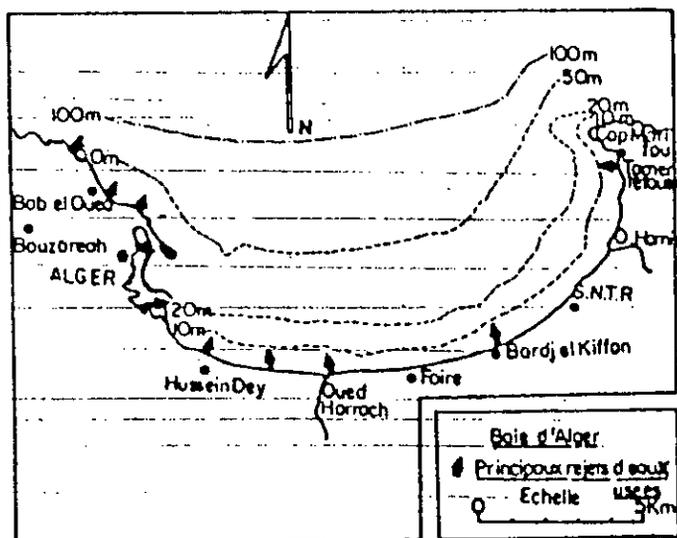


Fig.1: Baie d'Alger [1].

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES TENSIO-ACTIFS

I.1. Définition:

Les tensio-actifs ou agents de surface sont des composés naturels ou synthétiques amphiphiles c'est à dire comportant une partie hydrophile soluble dans l'eau et une partie hydrophobe ou lipophile soluble dans les huiles et graisses. Une représentation schématique d'un tensio-actif est indiquée en fig.2 [8].

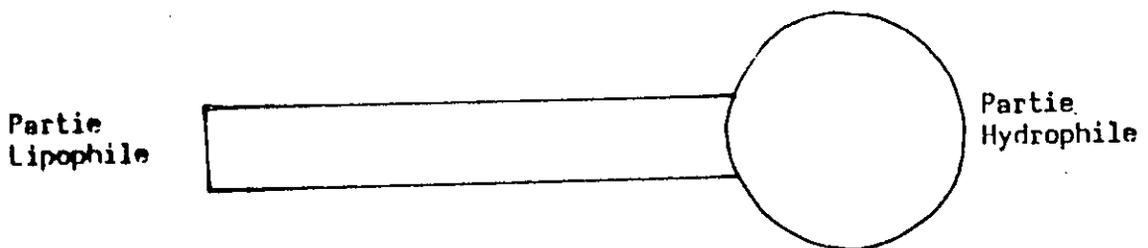


Fig.2: Représentation schématique d'un tensio-actif [8].

1.2. Propriétés des tensio-actifs:

Les tensio-actifs peuvent, comme indiqué en fig.3, s'adsorber aux interfaces liquide-gaz, liquide-liquide, liquide-solide en formant un film superficiel de molécules orientées. Ils diminuent ainsi la tension superficielle des liquides et la tension interfaciale entre les liquides. Les tensio-actifs peuvent favoriser l'étalement d'un liquide à la surface d'un solide (propriétés mouillantes), la dispersion d'un liquide dans un autre non miscible sous forme de fines gouttelettes (propriétés émulsionnantes), provoquer ou empêcher la formation de mousses (propriétés moussantes ou anti-moussantes), solubiliser des substances normalement peu solubles dans un solvant donné, l'eau par exemple, (propriétés solubilisantes) et faciliter l'élimination des souillures et salissures grâce à leurs propriétés mouillantes, solubilisantes et dispersantes appelées également propriétés détergentes [8]. Le mécanisme de la détergence est illustré en fig.4 [6].

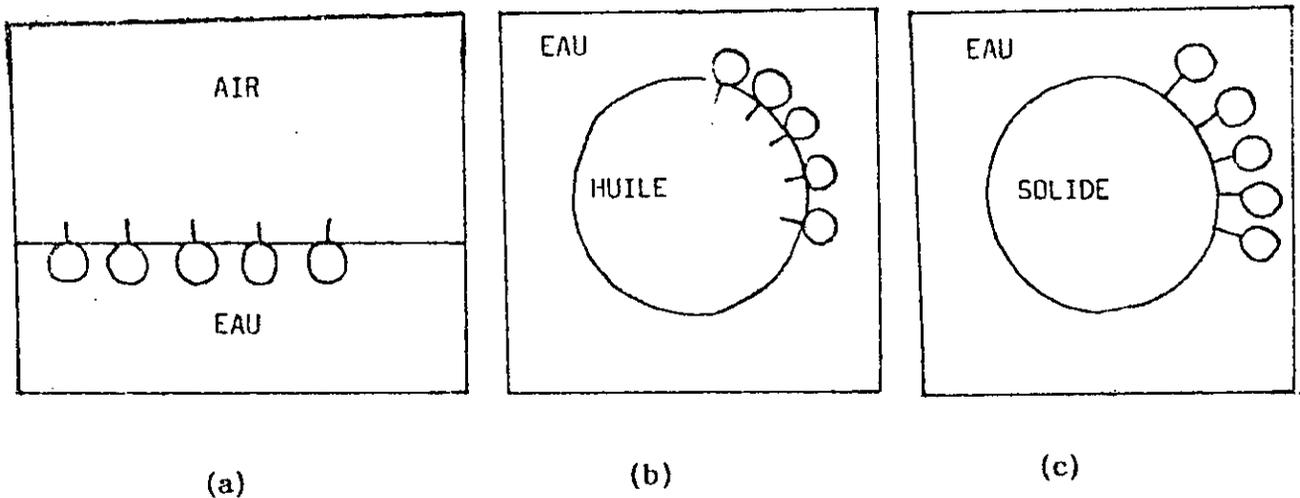


Fig.3: Adsorption d'un tensio-actif [8]:

- a) A une interface liquide-gaz.
- b) A une interface liquide-liquide.
- c) A une interface liquide-solide.

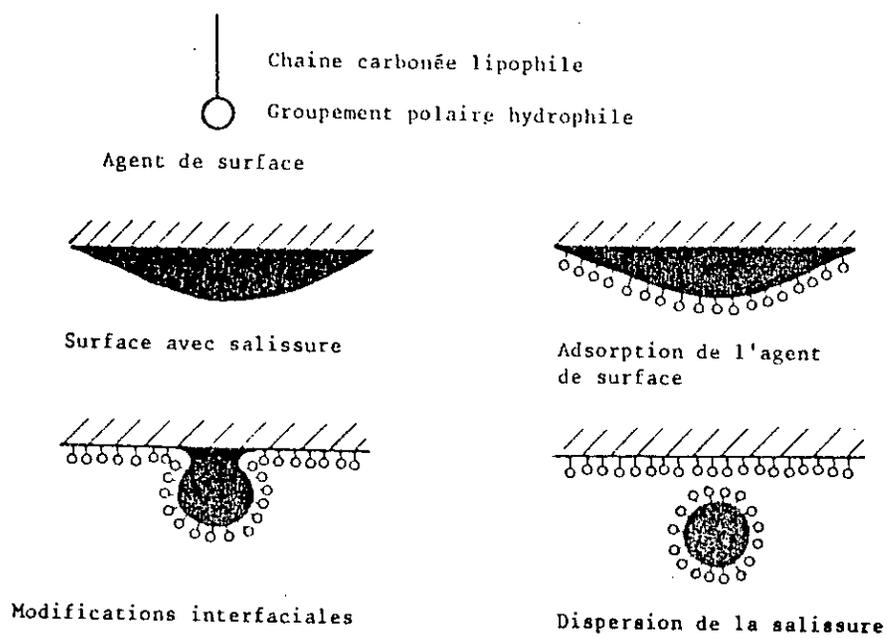


Fig.4: Mécanisme de la détergence [6].

I.3. Classification des tensio-actifs:

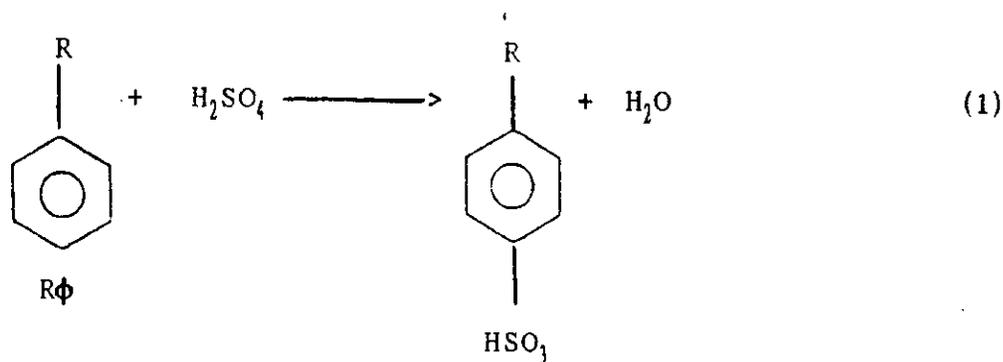
La classification des tensio-actifs est basée sur le caractère ionique de leur groupe hydrophile [7]. On distingue généralement quatre catégories de tensio-actifs.

I.3.1. Les tensio-actifs anioniques:

Ils s'ionisent en solution aqueuse et se dissocient en donnant un gros anion organique tensio-actif et un petit cation tel que Na^+ , K^+ , par exemple. Parmi ces tensio-actifs on trouve divers composés de formule chimique plus ou moins complexe.

I.3.1.1. Les alkylarylsulfonates ou alkylbenzènesulfonates (ABS):

Ils sont les plus largement utilisés à cause de leurs excellentes propriétés détersives et de leur faible coût. Ils sont obtenus par sulfonation d'alkylbenzènes avec de l'acide sulfurique concentré H_2SO_4 ou avec l'oléum (mélange de H_2SO_4 et de SO_3) selon la réaction suivante [9]:



ϕ =Groupement phényl.

acide sulfonique

L'acide sulfonique obtenu est ensuite neutralisé avec une base telle que NaOH [9].

Les alkylbenzènes utilisés pour la fabrication des alkylbenzènesulfonates linéaires (LAS) (fig.5) [7] sont obtenus par alkylation du benzène avec des paraffines normales extraites de fractions de pétrole par adsorption sélective sur tamis moléculaires. Les paraffines obtenues sont chlorées en bout de chaîne [10]. Ainsi le benzène peut être alkylé par le composé $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{Cl}$ [9].

LEENAERTS [10] indique que la fraction intéressante pour l'alkylation du benzène est celle en C_8 - C_{15} car les produits à chaîne plus courte ne possèdent pas de bonnes propriétés détergentes tandis que les dérivés à chaîne plus longue sont peu solubles. C'est dire qu'en matière de détergents biodégradables on continue de parler de dérivés du dodécylbenzène par pure habitude mais qu'en réalité différentes qualités existent suivant la coupe C_i - C_j considérée.

Les alkylbenzènesulfonates ramifiés ou TBS (tétrapropylènebenzène sulfonates) dont la structure est donnée en fig.5 [7] étaient obtenus par alkylation du benzène avec le tétrapropylène ou dodécène [10].

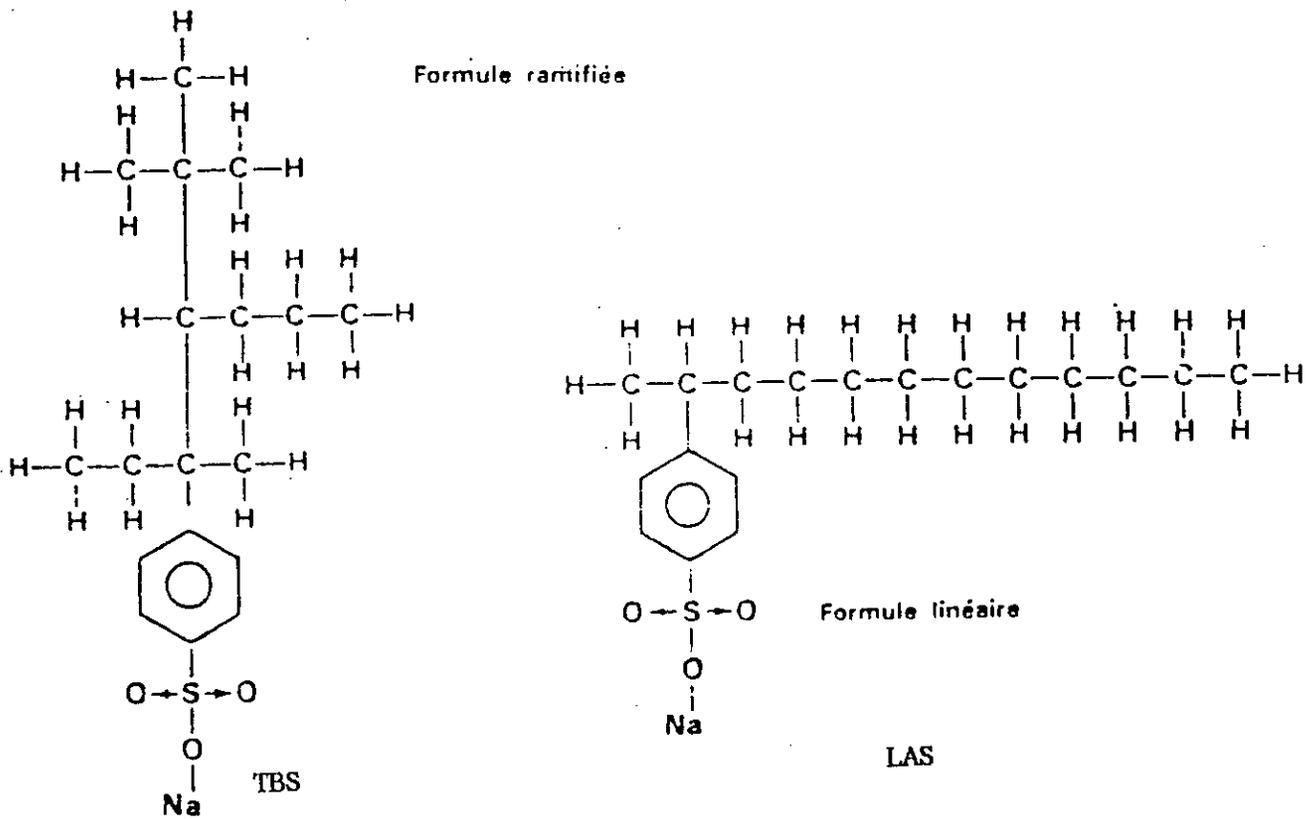


Fig.5: Formule chimique développée du TBS et du LAS [7].

I.3.1.2. Les alkylsulfates:

On distingue parmi ces tensio-actifs :

a) les alkylsulfates primaires:

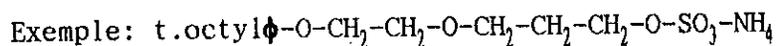
Ils sont obtenus par réaction entre des alcools gras primaires naturels ou synthétiques et l'acide sulfurique, suivie d'une neutralisation de l'acide formé par une base. L'exemple typique de cette classe de tensio-actifs est le laurylsulfate de sodium représenté par la formule générale $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ et qui peut être obtenu selon les réactions précédentes après hydrogénation des acides gras d'huile de palmiste [9].

b) Les alkylsulfates secondaires:

Ils sont obtenus par réaction directe entre une oléfine et l'acide sulfurique. Le groupement sulfate peut être lié à n'importe quel atome de carbone sauf à celui de l'une ou l'autre extrémité [9].

I.3.1.3. Les alkylphénols ethoxylés et sulfatés:

Ils sont obtenus par condensation d'oxyde d'éthylène sur un alkylphénol puis sulfatation de l'éthoxylat obtenu à l'acide sulfamique [11].

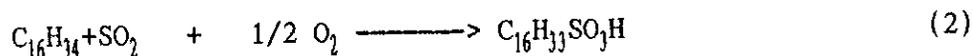


Sel d'ammonium du tertioctylphénoléthoxyéthersulfate

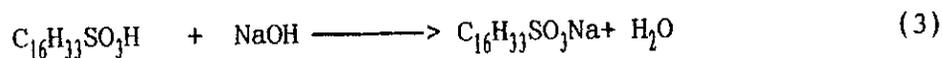
I.3.1.4. Les alkylsulfonates ou paraffinesulfonates:

Ils sont obtenus par réaction catalytique de paraffines en présence de SO₂ et d'oxygène, suivie de neutralisation avec une base [9].

Exemple:



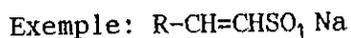
Acide hexadécane sulfonique

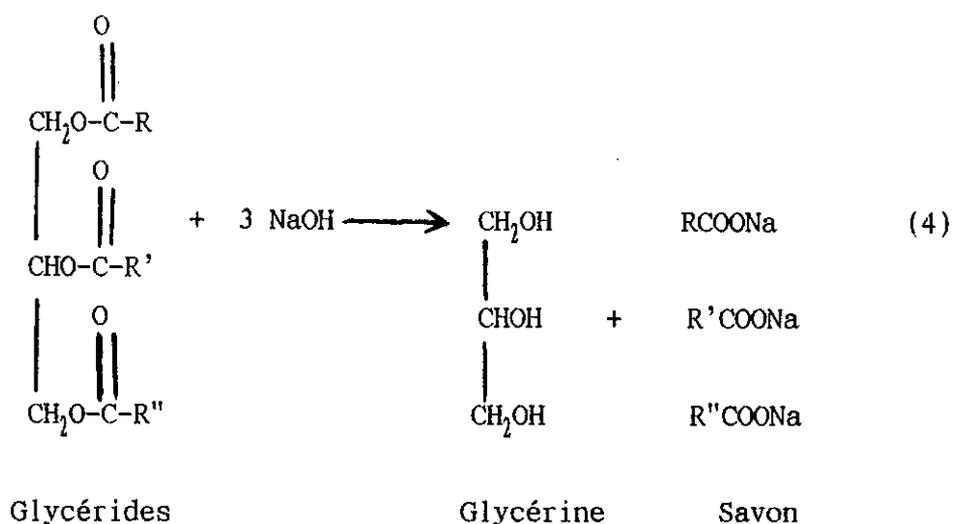


hexadécane sulfonate de sodium

I.3.1.5. Les oléfinesulfonates:

Ils sont obtenus par réaction de SO₃ sur les α -oléfines (alpha-oléfines linéaires, suivie d'une neutralisation [9].



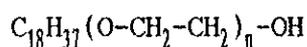
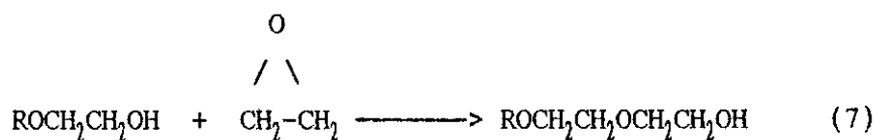


I.3.2. Les tensio-actifs non ioniques:

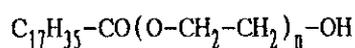
Ces composés ne s'ionisent pas en solution aqueuse. Les deux-tiers de ces tensio-actifs sont obtenus par condensation sur n'importe quel composé contenant un ou plusieurs hydrogènes actifs tels que les alcools gras, les acides gras, les amines grasses polypropylènes glycols etc...[11].

Ces tensio-actifs sont couramment utilisés, notamment en cosmétologie, pour leurs propriétés émulsionnantes et solubilisantes [8].

Exemples:



Alcool stéarique éthoxylé



Acide stéarique éthoxylé

I.3.3. Les tensio-actifs cationiques:

Ces tensio-actifs s'ionisent en solution aqueuse et se dissocient en donnant un gros cation organique et un petit anion. Ce sont des produits azotés qui comportent une longue chaîne hydrocarbonée R et un atome d'azote chargé positivement. Ils sont utilisés comme adoucisseurs de tissus et pour leur pouvoir antiseptique et germicide. Les sels d'ammonium quaternaires constituent, parmi ces tensio-actifs, la majeure partie des produits commerciaux [9]. On peut citer, comme exemples:

- Les alkyltriméthylammonium: $\text{RMe}_3\text{N}^+\text{X}^-$

- Les alkylbenzyl diméthylammonium: $\text{RBZMe}_2\text{N}^+\text{X}^-$

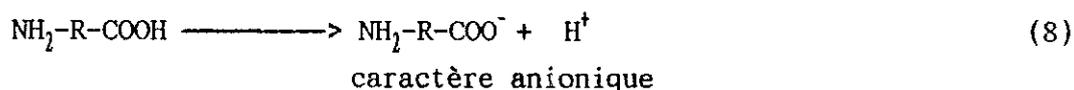
Avec: Me=groupe ment méthyl, BZ=benzyl, X= anion

I.3.4. Les tensio-actifs amphotères:

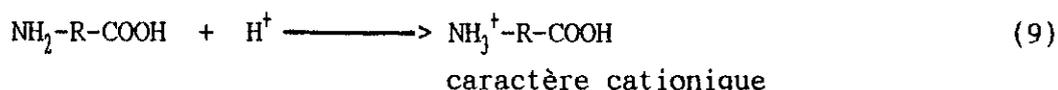
Ils sont composés de groupements acides et de groupements basiques et peuvent être soit anioniques, soit cationiques selon le pH de la solution dans laquelle ils se trouvent [7]. Les tensio-actifs amphotères entrent dans la composition de certains produits cosmétiques tels que les shampoings, les désodorisants, les crèmes etc...[8].

Exemple: $\text{NH}_2\text{-R-COOH}$ acide amine

* En milieu alcalin:



* En milieu acide:



Les tensio-actifs amphotères alkylaminoacides peuvent être obtenus, par exemple, par condensation de l'acide acrylique sur les amines grasses [11]

Exemple: le N-laurylamine propionate de sodium: $C_{12}H_{25}-NH-CH_2-CH_2-COONa$

1.3.5. Les tensio-actifs naturels:

Les tensio-actifs naturels sont des composés indispensables des membranes cellulaires. Ils jouent également un rôle important aussi bien pour les animaux supérieurs que pour certaines espèces bactériennes en tant qu'émulsionnants utiles à la digestion et à l'assimilation de leurs aliments. Toute espèce utilisant le poumon dans le système respiratoire doit synthétiser un tensio-actif approprié à ce poumon. Les saponines, les sulfolipides et les lécithines sont, par exemple, des tensio-actifs naturels [9].

1.3.5.1. Les saponines ou tensio-actifs d'origine végétale:

Ce sont des glycosides très moussants et comprenant un hydrophobe polycyclique et un sucre hydrophile. L'hydrophobe est généralement un dérivé du stéroïde 3-hydroxyspirostan (fig.6) ou du triterpène 3-hydroxy-12-oléanène (fig.7) [9].

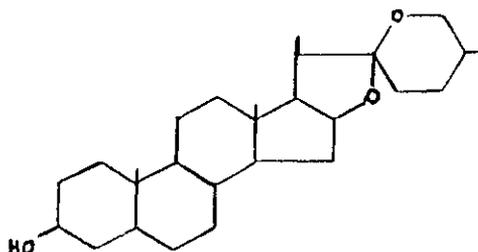


Fig.6: Stéroïde 3-hydroxyspirostan [9].

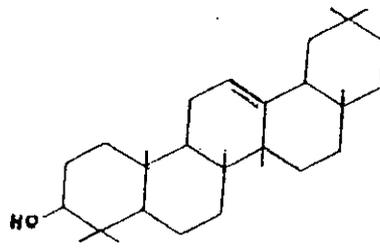
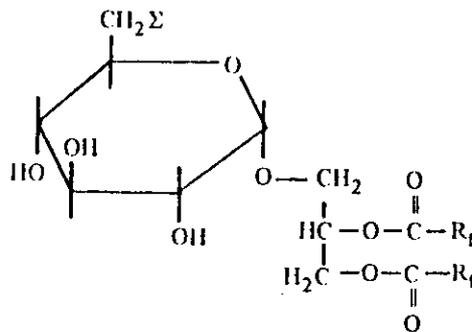


Fig.7: Triterpène 3-hydroxy-12-oléanène [9].

I.3.5.2. Les sulfolipides et les sulfatides:

Ils sont composés d'un hydrophobe lipidique et d'un hydrophile sulfonate ou sulfate. Le <<sulfolipide végétale>> (fig.8) est distribué de façon importante dans les tissus des plantes vertes photosynthétiques [9].



Σ = groupement sulfonate

RfCO = groupement acyl gras

Fig.8: Sulfolipide végétale [9].

I.3.5.3. Les lécithines et le tensio-actif du poumon:

Les lécithines sont des phosphatidylcholines. Ce sont des tensio-actifs amphotères qui sont des composés importants des membranes cellulaires. Le tensio-actif du poumon comprend la lécithine, principalement le

dipalmitoylphosphatidylcholine (fig.9), faiblement lié à une ou des protéines. Il est synthétisé et excrété par les cellules des poumons. Il diminue la tension superficielle à l'interface air-poumon et permet ainsi le gonflement et le dégonflement automatiques de celui-ci [9].

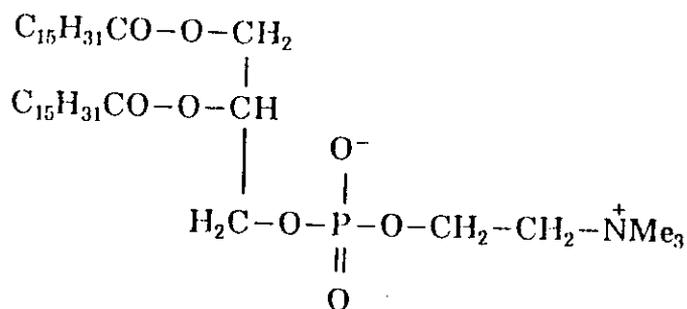


Fig.9:Tensio-actif du poumon [9].

I.3.5.4. Les sels biliaires:

Les sels biliaires sont des composés de la bile qui est une sécrétion tensio-active du foie chez les animaux supérieurs. La bile est indispensable à l'émulsification et à la digestion des aliments dans l'intestin [9].

I.3.5.5. Les tensio-actifs microbiens:

Plusieurs espèces de microbes produisent durant la biodégradation des hydrocarbures des tensio-actifs qui sont dégradés à leur tour ultérieurement dans le process de dégradation. Ces tensio-actifs qui sont de nature protéinique, grasse, carbohydrate, ou de combinaisons variées ont des propriétés émulsionnantes importantes ce qui rend probablement les hydrocarbures accessibles à la biodégradation par les microbes [9].

I.3.6. Les tensio-actifs ou détergents synthétiques:

Les détergents synthétiques sont des produits dont la principale fonction est d'enlever les salissures [7].

Les molécules tensio-actives forment des émulsions avec les produits solubles dans la graisse. En entourant les salissures dans ces émulsions, elles les enferment dans un film soluble dans l'eau. Les particules solides de la salissure sont ainsi dispersées dans l'émulsion (fig.4) [8,12].

La composition d'un détergent synthétique commercial (industriel ou ménager) comporte une ou plusieurs matières tensio-actives et différentes substances utilisées pour renforcer l'action du ou des tensio-actifs, pour permettre la conservation du produit commercial ou pour servir de charge [10].

Les substances utilisées sont [10]:

- Les tripolyphosphates de sodium:

Leur rôle est de séquestrer les ions calcaires de l'eau (calcium et magnésium) et de les empêcher ainsi d'entraîner le redépôt des salissures sur les tissus.

- Les silicates de sodium:

Ils empêchent la corrosion du matériel de fabrication et de certaines pièces de rechange de machines à laver.

- Le perborate de sodium:

Il sert d'agent de blanchiment grâce à ses propriétés oxydantes vis à vis des salissures.

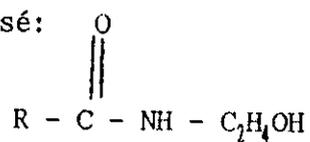
- Le sulfate de magnésium:

Il est utilisé pour stabiliser le perborate.

- Le sulfate de soude:

Il sert de charge soluble.

- Des agents stabilisateurs de mousse dont particulièrement les alkylolamides comme le composé:



- La carboxyméthyl cellulose:

Elle est utilisée pour la dispersion des salissures et pour empêcher celles-ci de se redéposer.

La composition typique d'un détergent en poudre est indiquée dans le tableau N°1.

Tableau N°1: Formulation typique d'un détergent en poudre [10].

Matière tensio-active	20-25 %
Alkylolamides	1-2 %
Tripolyphosphate de sodium	30-40 %
Silicate de sodium	5-10 %
Carboxyméthylcellulose	1-2 %
Sulfate de magnésium	1 %
Perborate de soude	10 %
Sulfate de soude	15-30 %
Parfum	0.1-0.2 %

1.4. Domaines d'application des tensio-actifs:

Les domaines d'application des tensio-actifs sont très variés et englobent aussi bien le secteur industriel (agro-alimentaire, pharmacie, métallurgie ou travaux publics) que le secteur domestique. Dans le secteur industriel, les tensio-actifs sont utilisés comme produits auxiliaires pour faciliter certaines opérations de fabrication: textiles, agents de flottation des minerais, usinage et nettoyage des métaux. Dans le secteur domestique, ils servent de produits de base entrant dans la composition des détergents pour le linge, des shampoings et des produits de nettoyage.

En 1989, le marché mondial des tensio-actifs (hors savons) a été évalué à 5 millions de tonnes dont 1.7 en Europe de l'Ouest [11].

Dans les pays développés, on estime que 40% des tensio-actifs produits sont destinés à un usage industriel; le reste est consommé par les domaines ménager et cosmétique.

Les branches industrielles qui consomment le plus de tensio-actifs sont représentées dans le tableau N°2.

Tableau N°2: Pourcentage d'utilisation des tensio-actifs par industrie [11].

Chimie/polymérisation	19%
Textile	16%
Métallurgie	9%
Phytosanitaire/engrais	7%
Cuir/fourrure	7%
Agro-alimentaire	6%
Bâtiment/travaux publics	5.5%
Mine et pétrole	4%
Peintures/pigments/vernis	3%
Papier	3.0%
Divers	20%

En Algérie la capacité de production des détergents, des produits d'entretien et des cosmétiques est de l'ordre de 288.000, 60.000 et 5000 tonnes par an respectivement. Cette production est réalisée par l'entreprise nationale des détergents et produits d'entretien (E.N.A.D.) regroupant les unités et complexes suivants [13]:

- Unité de détergents de Réghaïa.
- Complexe de détergents de Ain Témouchent.
- Complexe de détergents de Sour El Ghozlane.
- Complexe de détergents de Chelghoum Laid.
- Unité de produits d'entretien de Hussein Dey.
- Unité de produits d'entretien de Lakhdaria.
- Unité de produits d'entretien de Saida.
- Unité d'entretien El Aouinet.
- Unité cosmétiques de Rouiba.

CHAPITRE II

GENERALITES SUR L'EPURATION BIOLOGIQUE ET ASPECTS PARTICULIERS DE LA BIODEGRADABILITE DES TENSIO-ACTIFS.

II.1. GENERALITES SUR L'EPURATION BIOLOGIQUE:

II.1.1. Notion de biodégradation et de biodégradabilité:

La biodégradation est l'ensemble des phénomènes complexes aboutissant à la dégradation moléculaire de la matière organique en milieu généralement aqueux sous l'action d'organismes vivants et la biodégradabilité traduit l'aptitude d'une substance à subir la biodégradation [14].

La biodégradabilité d'un composé chimique dépend de sa structure. En milieu aérobie, la biodégradation d'un composé est freinée d'après les "règles d'ALEXANDER" par [15] :

- La substitution par Cl, SO₃H, NO₂, NH₂.
- La polysubstitution par rapport à la monosubstitution.
- La présence de plusieurs noyaux aromatiques.
- La ramification (effet maximum en présence d'un carbone asymétrique).
- Pour les molécules aromatiques, l'ordre de dégradabilité est para>ortho>méta.
- Pour les dérivés aliphatiques chlorés, l'ordre de dégradabilité est $\omega > \gamma > \beta > \alpha$

II.1.2. L'épuration biologique:

II.1.2.1. définition:

L'épuration biologique est un procédé naturel permettant la diminution de la matière organique des eaux usées par l'intermédiaire des microorganismes qui agissent sur la substance organique grâce à la production d'enzymes. Ces derniers qui sont des corps protéiniques ont un rôle de catalyseurs et leur action dépend de plusieurs facteurs: température, pH, présence ou absence de certains éléments en quantité très faible [16].

II.1.2.2. Conditions de l'épuration biologique :

L'épuration biologique exige les rapports minimums suivants [17]:

- En DCO : $DCO/N/P=150/5/1$
- En DBO : $DBO/N/P=100/5/1$

Pour les eaux usées de caractéristiques mixtes c'est à dire constituées d'un ou de plusieurs composés à biodégradabilité plus ou moins facile mais carencées ou inhibées, H.ROQUES [18] indique qu'un traitement biologique peut être envisagé mais sous certaines conditions:

- Les carences en azote et phosphore doivent être compensées par ajout d'azote par exemple sous forme de NH_4Cl et de phosphore sous forme de phosphate.
- Le rapport $DBO_5/N/P$ doit être de l'ordre de 150/5/1.
- Le rapport $DBO_5/DCO > 0,3$.
- Des souches adaptées doivent être utilisées si $0,3 < DBO_5/DCO < 0,5$.

L'amélioration du traitement des eaux usées pétrochimiques a été ainsi obtenue avec des boues activéesensemencées avec une souche de "corynebacterium nitrophilus" [19]. Toutefois les souches adaptées sont très fragiles et très sensibles aux variations des conditions du milieu telles que diminution du pH , arrivées accidentelles de produits chimiques etc...[18].

- Le rapport DCO/N < 20.
- Le rapport DCO/P < 100.
- Le pH compris entre 6,5 et 8,5 ($6,5 < \text{pH} < 8,5$).
- La concentration limite en éléments toxiques ne doit pas être dépassée.

II.1.2.3. Métabolisme des microorganismes de l'épuration biologique:

La nutrition des microorganismes comporte cinq phases (Fig.10) [15,20]:

- 1-Transport du substrat(en même temps que l'O₂ en aérobie) vers la cellule du microorganisme.
- 2-Adsorption des aliments sur la membrane cellulaire.
- 3-Prédigestion par des enzymes extra-cellulaires (en surface ou en solution) qui transforment la matière organique en composés plus simples.
- 4-Franchissement de la membrane cellulaire (substrat et O₂ en aérobie) ou perméation.
- 5-Métabolisation du substrat: Le métabolisme du substrat se traduit par une succession de réactions d'hydrolyse, d'oxydation, de déshydrogénation, de déamination, de décarboxylation etc...

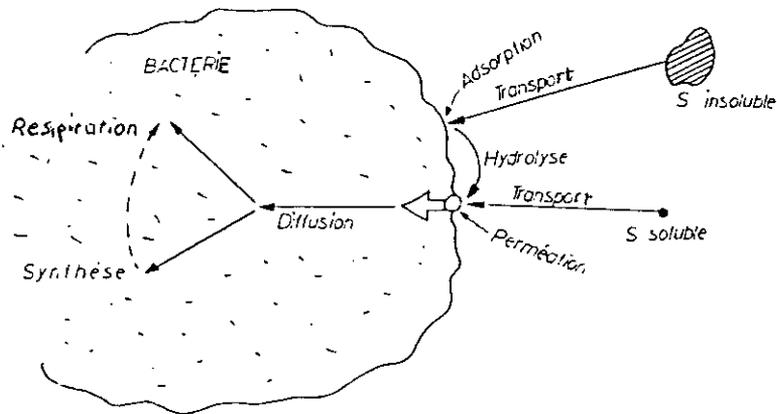
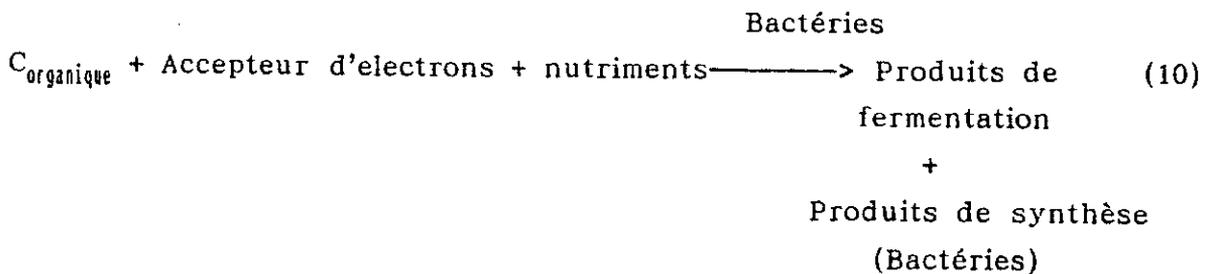


Fig.10: Schéma de principe de la nutrition bactérienne [15].

Lors du métabolisme des hydrates de carbone, des protéines et des graisses, il y a production de métabolites essentiels tels que acide pyruvique, céto-glutarique et oxaloacétique. Selon Vandevenne [20], la bactérie tend à se ramener le plus rapidement possible à un chemin métabolique connu (essais enzymatiques) pour le métabolisme de substrats particuliers (détergents, phénols, produits de synthèse) et c'est sans doute cette recherche qui fait l'objet des périodes d'adaptation.

La métabolisation de la matière organique par les microorganismes peut être décrite selon l'équation générale suivante [20]:



La biodégradation de la matière organique peut être réalisée selon trois process connus [20] :

- La respiration aérobie en présence d'oxygène (réactif pour les enzymes oxygénases) qui est l'accepteur d'électrons et qui est incorporé dans les produits finaux.
- La fermentation qui se produit en absence d'oxygène ou d'air et qui utilise comme accepteurs d'électrons les composés organiques.
- La respiration anaérobie qui se produit également en absence d'oxygène mais qui utilise comme accepteurs d'électrons des produits inorganiques tels que nitrates et sulfates.

Les microorganismes dégradent les matières organiques et les transforment en métabolites intermédiaires n'ayant plus les mêmes propriétés qu'au départ ou en CO_2 , H_2O dans le cas d'une biodégradation complète [7]. Les matières organiques sont transformées par les bactéries en CO_2 et H_2O en milieu aérobie et en CO_2 , H_2O , méthane, ammoniacque, acides gras, acides aminés et produits plus ou moins toxiques (mercaptans, phénols, crésols) en milieu anaérobie [21].

II.1.2.4. Procédés d'épuration aérobie à biomasse en suspension ou boues activées:

Les microorganismes sont mis en contact avec l'eau à épurer soit par agitation et aération, soit tout simplement grâce à l'aération qui provoque également l'agitation du milieu dans lequel ils se trouvent. L'aération vigoureuse des eaux usées urbaines permet aux microorganismes qu'elles contiennent de se multiplier grâce à la présence de substances organiques et d'oxygène. Ces microorganismes forment ce qu'on appelle un floc ou masse floculante composée de ces derniers en suspension, de leurs produits visqueux de sécrétion et de matière organique de nature colloïdale. En sédimentant, cette masse forme des dépôts appelés boues activées. << Ces boues sont en effet activées car si on les met en contact d'eaux usées fraîches fortement aérées, le phénomène de floculation qui avait nécessité précédemment plusieurs semaines va apparaître en l'espace de quelques heures.>> [22].

Le processus d'épuration par boues activées comporte trois étapes [16]:

1. Les matières organiques de l'eau usée sont adsorbées et absorbées par les boues activées.
2. Les matières sont oxydées et dégradées et de nouveaux micro-organismes sont synthétisés.
3. Une partie des boues activées elles-mêmes est oxydée et dégradée ensuite.

La pollution est réellement éliminée après adsorption sur les floccs biologiques par transformation en protoplasme, en produits du métabolisme des microorganismes et auto-oxydation des boues. Cette élimination qui s'effectue en partie dans le bassin de boues activées est d'autant meilleure que le temps de séjour est plus long [16].

II.1.2.4.1. Caractérisation des systèmes de boues activées :

Les systèmes de boues activées sont caractérisés par leur charge massique et leur charge volumique [16].

II.1.2.4.1.1. Charge massique:

La charge massique C_m est le rapport entre la masse de la pollution par jour à éliminer et la masse de boues activées présentes dans le bassin [17]:

$$C_m = \text{DBO}_5 \text{ entrée (kg/jour)} / \text{masse de boues présentes (kg)}$$

II.1.2.4.1.2. Charge volumique :

La charge volumique C_v est le rapport entre la masse de la pollution à éliminer par jour et le volume du bassin [17]:

$$C_v = \text{DBO}_5 \text{ entrée (kg/jour)} / \text{volume du bassin (m}^3\text{)}.$$

Les systèmes de boues activées sont classés, selon la charge appliquée, comme indiqué dans le tableau N° 3:

Tableau N° 3 : Classification des systèmes de boues activées [17].

Système de traitement	Masse de boues (kg/m ³ MVS [*])	Charge massique (kgDBO/kgMVS [*] .j)	Charge volumique (kgDBO/m ³ .j)
Aération prolongée	4	0.1	0.3
Faible charge	3.5-4	0.1-0.2	0.3-0.8
Moyenne charge	3-3.5	0.2-0.5	0.8-1.8
Forte charge	2.5	0.5	1.8

* MVS:matières volatiles sèches (boues activées).

II.1.2.4.1.3. Age des boues activées:

L'âge des boues θ_c ou temps de séjour moyen de la biomasse (microorganismes) dans le bassin aérateur représente le temps au bout duquel celle-ci est totalement renouvelée par les purges effectuées pour la maintenir constante. Il est exprimé par le rapport entre la quantité de boues présente dans le bassin et celle qui est extraite chaque jour [15]:

$$\theta_c = \text{biomasse présente (BV)} / \text{biomasse purgée chaque jour.}$$

ou

$$\theta_c = M / \Delta M / \Delta t$$

avec:

B : concentration des boues (maintenue constante par les purges)

V : volume du système de boues activées.

M : biomasse totale.

ΔM : quantité de biomasse extraite pendant le temps Δt
(purge discontinue)

L'âge des boues est inversement proportionnel à la charge massique [23].

Le temps de séjour θ_c varie de [20]:

- 0.2 à 0.8 jour dans un système à forte charge.
- 4 à 14 jours dans un système à moyenne charge.
- 20 à 300 jours dans un système à faible charge.
- 14 à ∞ jours dans un système en aération prolongée .

II.1.2.4.2. Composition et rôle des boues activées:

Les boues activées sont constituées de différents microorganismes. Ceux-ci comprennent des bactéries hétérotrophes anaérobies facultatives, des levures et moisissures qui existent lorsqu'il y a déficience en azote, des protozoaires, des rotifères et des nématodes.

II.1.2.4.2.1. Les bactéries:

Elles jouent le rôle le plus important dans l'épuration des eaux usées. Les bacilles sont les plus fréquemment rencontrés dans les traitements des eaux usées [24]. Les genres rencontrés sont: Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium, Bacillus, Alcaligènes, Zooglea etc...

On trouve également les bactéries filamenteuses: Sphaerotilus natans, Thiotrix, Beggiata alba etc...responsables de la mauvaise décantation des boues et dans certaines conditions particulières du foisonnement ou bulking de celles-ci [20].

La succession des espèces bactériennes des boues activées observée par ADAMSE [25] durant une période de deux mois est indiquée dans le tableau N° 4:

**Tableau N° 4: Succession des bactéries dans les boues
activées traitant des eaux usées [25].**

Distribution de bactéries (%)			
	9 jours	28 jours	56 jours
Pseudomonodacea	30-50	5-30	5-15
Achronobacteriaceae	39-49	26-60	10-25
Corynebacteriaceae	5-20	5-70	55-85

II.1.2.4.2.2. Les champignons:

Ce sont des organismes eucaryotes multicellulaires (champignons filamenteux ou moisissures) ou unicellulaires (levures) [26]. Ils peuvent être en compétition avec les bactéries pour la matière organique et exister en prédominance en cas de substrat pauvre en azote ou dans les milieux à caractère acide (jusqu'à pH=2) [20].

Bien que les bactéries jouent le rôle principal dans la dégradation des matières organiques, les champignons peuvent également intervenir de façon importante dans la stabilisation de la matière organique dans certaines conditions telles que pH inférieur à 6, azote insuffisant, concentration en O₂ dissous comprise entre 0 et 0.5 mg/l [27].

II.1.2.4.2.3. Les protozoaires:

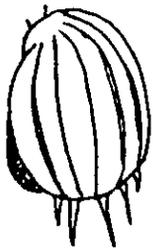
Ce sont des organismes microscopiques monocellulaires (protistes eucaryotes) (fig.11 et 12) [17]. Ils se nourrissent de bactéries isolées et de cadavres de bactéries. Aérobies stricts, ils sont sensibles au manque d'oxygène et à la présence de toxiques. Leur présence en nombre suffisant est indicatrice de l'absence de substances toxiques et d'une teneur normal en oxygène du milieu [6]. Ils font partie pour la plupart du groupe des

flagelés et particulièrement du groupe des ciliés (libres ou fixés au floc microbien). Les protozoaires (bactériophages et/ou prédateurs des protozoaires) jouent un rôle très important dans la clarification de l'effluent [20]. Des effluents de haute qualité sont obtenus avec une grande variété et un grand nombre de protozoaires. Des espèces de vorticella telles que *V.convallaria*, *V.octava*, *V.aequilata* sont signe d'épuration [27].

Le tableau N°5 montre les caractéristiques d'un effluent en présence et en absence de protozoaires ciliés.

Tableau N°5: Caractéristiques d'un effluent en présence et en absence de protozoaires ciliés après épuration des eaux usées domestiques [24].

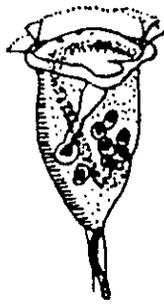
Effluent	Protozoaires ciliés absents	Protozoaires ciliés présents
DCO (mg/l)	198-254	124-142
Azote (mg/l)	14-20	07-10
Solides en suspension (mg/l)	86-118	26-34
Bactéries (millions/ml)	292-492	90-121



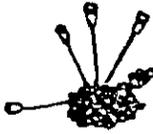
vue de dos



vue de côté
Aspidisca costata



fixée sur un floc



Vorticella convallaria



Opercularia
Coarctata



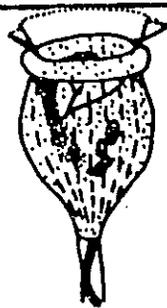
Vorticella microstoma



Trachelophyllum
pusillum



Carchesium polypinum



Vorticella alba



Euplotes moebiusi

Fig.11 :Protozoaires rencontrés dans les boues activées [17].

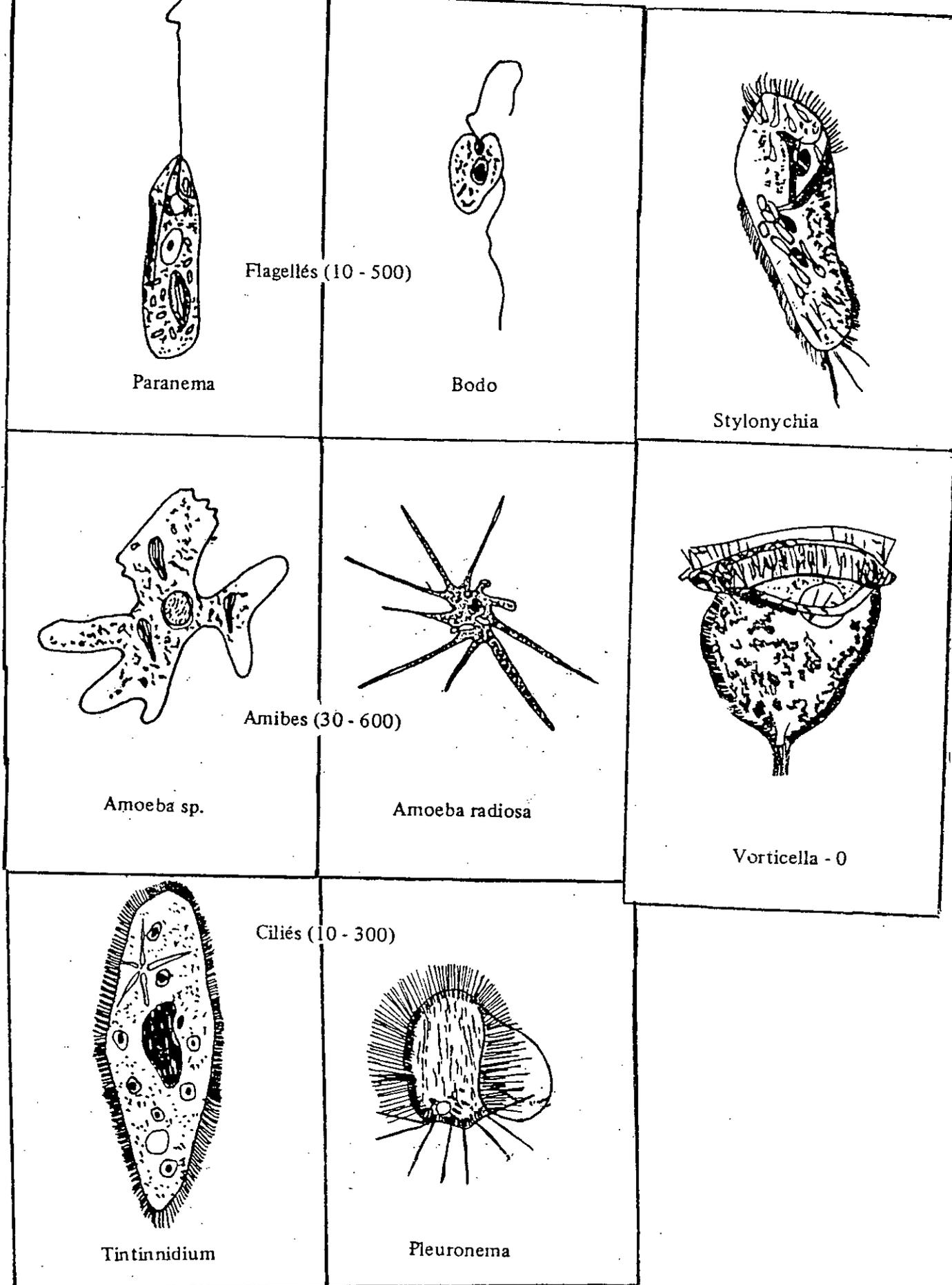
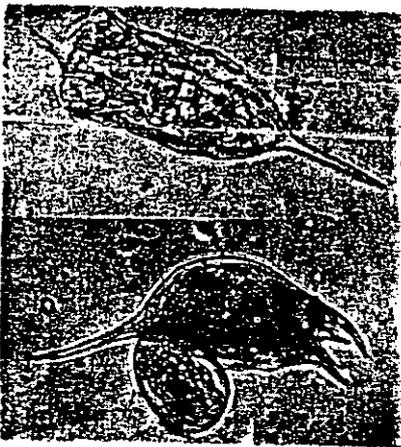


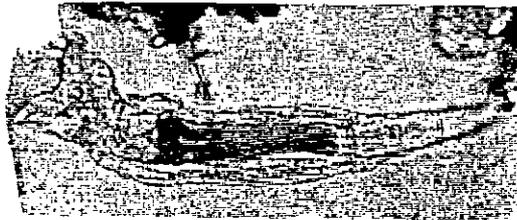
Fig.12 : Microorganismes rencontrés dans les boues activées [17].

II.1.2.4.2.4. Les rotifères et les nématodes:

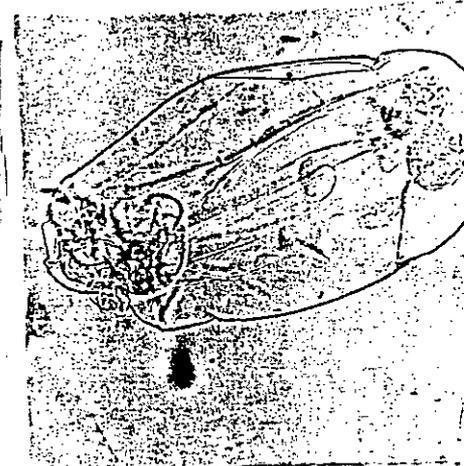
Ce sont des organismes pluricellulaires trouvés occasionnellement (fig.13 et 14 respectivement) [23]. Ils sont caractéristiques des systèmes à faible charge (âge des boues élevé) [20]. La présence des rotifères (fig.13) et des nématodes (fig.14) est signe d'une bonne épuration [6] car c'est une faune détritivore qui se nourrit de débris organiques (cadavres de protozoaires etc...) et qui peut être bactérivore et prédatrice des protozoaires [20].



— *Keratella cochlearis* - x 200.
La photo du haut montre le rotifère vu du dessus.
La photo inférieure représente *Keratella* de profil, avec un œuf.



— *Philodina* - x 150. L'animal étiré à partir de son point d'appui déploie ses deux appareils rotateurs.



— *Asplanchna* - x 80. R. très carnassier. Organes très transparents.

Fig.13 : Rotifères [23].

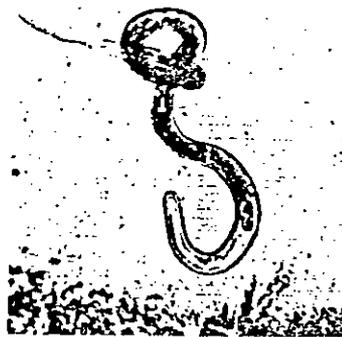
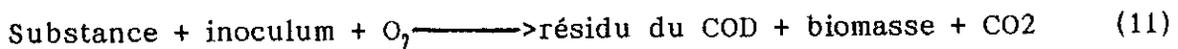


Fig.14 : Nématode x 50 [23].

II.2. BIODEGRADABILITE DES TENSIO-ACTIFS:

II.2.1. Notion de biodégradation primaire et de biodégradation ultime:

Un agent de surface peut subir une biodégradation primaire et une biodégradation ultime. On parle de biodégradation primaire lorsque la molécule du tensio-actif a subi une oxydation ou une altération sous l'action bactérienne et a perdu ses propriétés caractéristiques telles que la formation de mousse par exemple et de ce fait ne répond plus à certaines méthodes analytiques, plus ou moins spécifiques, usuellement utilisées pour sa quantification. On parle de biodégradation ultime ou minéralisation lorsque la molécule tensio-active est complètement transformée en dioxyde de carbone, eau, sels inorganiques et autres produits correspondant au processus métabolique normal de la cellule bactérienne. Le degré de minéralisation de la molécule tensio-active peut être mesuré par la consommation d'oxygène, la production de CO₂ ou la disparition du carbone organique soluble COD selon, par exemple, la réaction suivante [14]:



II.2.2. Méthodes de détermination de la biodégradabilité des tensio-actifs:

II.2.2.1. Tests de biodégradabilité:

Il existe de nombreux tests pour l'étude de la biodégradabilité des tensio-actifs. Ces tests se classent en méthodes aérobies statiques ou dynamiques [6] et en méthodes anaérobies [28].

II.2.2.1.1. Méthodes aérobies:

a) Méthodes statiques:

Ces méthodes simulent la biodégradation dans les eaux naturelles [6]. On distingue, parmi ces méthodes:

- Les méthodes en << fioles ouvertes >> ou <<shake-flask test >>:

Dans ces méthodes, on utilise pour l'étude de la biodégradabilité, un milieu synthétique contenant de l'extrait de levure et des sels minéraux qu'on ensemence avec un inoculum. Celui-ci, prélevé à partir du sol ou des eaux usées, est préalablement acclimaté au tensio-actif avant l'ensemencement du milieu synthétique [28].

- La méthode <<River Die Away Test >>:

Le tensio-actif est dissous dans un certain volume d'eau de rivière contenant des microorganismes et sa biodégradation est suivie par des dosages au cours du temps [29].

b) Méthodes dynamiques:

Ces méthodes sont utilisées pour simuler les conditions existant dans les stations d'épuration utilisant des boues activées ou des lits bactériens [6]. Le tensio-actif à tester est ajouté en continu ou de façon intermittente (semi-continu) à une biomasse alimentée également avec un milieu naturel ou synthétique contenant des matières organiques et des éléments nutritifs [6].

II.2.2.1.2. Méthodes anaérobies:

Divers systèmes tels que les fosses septiques et les digesteurs anaérobies sont employés pour l'étude de la biodégradabilité des tensio-actifs [29].

Une fosse septique est constituée par une cuve fermée cylindrique ou rectangulaire. L'eau usée passe à travers des ouvertures se trouvant dans la partie médiane de cloisons verticales qui divisent la fosse en compartiments. Les particules solides décantables ou boues lourdes se déposent au fond de la fosse et y subissent une digestion anaérobie c'est à dire une transformation des matières organiques en gaz carbonique ou en gaz méthane sous l'action des bactéries anaérobies.

Les fosses septiques utilisées pour l'étude au laboratoire de la biodégradabilité des tensio-actifs ont un volume utile de 3 à 4 litres. Elles peuvent êtreensemencées avec des boues activées ou des boues provenant d'une autre fosse septique. Celles-ci sont ensuite alimentées de façon intermittente (à quelques heures d'intervalle) avec un influent contenant 10 à 30 ppm de tensio-actif [9].

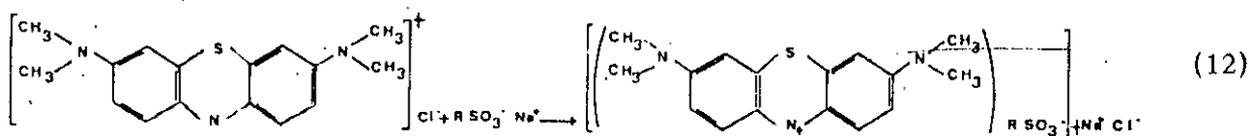
Les digesteurs anaérobies sont des réacteurs biologiques où les matières organiques des boues provenant des stations d'épuration sont minéralisées par les microorganismes à l'abri de l'air et de la lumière. On peut étudier la biodégradabilité du tensio-actif en suivant l'évolution du gaz produit (CH_4 ou CO_2) lors de la digestion anaérobie dans un digesteur alimenté avec des boues et auquel on ajoute le tensio-actif. Un autre digesteur alimenté de la même façon mais sans tensio-actif sert de témoin. La biodégradation du tensio-actif est indiquée par une production de gaz dans le digesteur testé supérieure à celle du témoin [9].

II.2.2.2. Méthodes analytiques d'évaluation de la biodégradabilité des tensio-actifs anioniques:

II.2.2.2.1. Méthodes spécifiques:

II.2.2.2.1.1. Méthode au bleu de méthylène:

Cette méthode couramment utilisée est basée sur la formation d'un complexe coloré: agent de surface anionique-bleu de méthylène selon la réaction suivante [30]:



Le complexe peut être extrait par le chloroforme [30]. Le dosage est effectué par colorimétrie et on mesure dans ce cas l'absorption de la coloration bleue du complexe; c'est la réponse au bleu de méthylène: MBAS ou (méthylène blue active substance). La coloration bleue dont l'intensité dépend de la longueur de la chaîne alkyle diminue en fonction de la biodégradation primaire ou raccourcissement de cette chaîne. Celui-ci entraîne la diminution ou la disparition des propriétés tensio-actives de l'agent de surface. La réponse au bleu de méthylène est très faible pour une chaîne en C₈ et disparaît totalement pour une chaîne en C₆ [6].

II.2.2.2.1.2. Mesure des sulfates et des sulfites:

La formation des sulfates et/ou des sulfites inorganiques dans un milieu contenant des agents de surface sulfonés ou sulfatés indique qu'une quantité correspondante de substance active a été dégradée [9]. La mesure des sulfates peut être effectuée par deux méthodes:

- par turbidimétrie après précipitation des sulfates inorganiques sous forme BaSO₄ [31].
- Par le marquage isotopique du soufre:³⁵S [32] .

Dans certains cas il peut y avoir formation de sulfite inorganique au lieu de sulfate inorganique au cours de la biodégradation [9]. Une méthode colorimétrique a été développée par JOHNSTON [33] pour la mesure des sulfites au cours de son étude sur le mécanisme de biodégradation du groupement aromatique sulfonate.

II.2.2.2.1.3. Méthodes chromatographiques:

Ces méthodes permettent de suivre la biodégradation de chaque isomère et de chaque homologue entrant dans la composition de l'agent de surface. Elles permettent également la détection des produits de biodégradation [9].

Une méthode d'analyse directe du LAS par chromatographie HPLC ou <<High Performance Liquid Chromatography>> et détection fluorométrique

sans préconcentration ni prépuration a été développée par NAKAE et al [34]. Cette méthode permet d'analyser très rapidement et spécifiquement chaque composant de LAS se trouvant par exemple dans une eau de rivière polluée.

La méthode chromatographique DS/GC ou <<desulfonation gas chromatography>> permet la séparation des composés ABS par partition de leurs vapeurs entre un gaz mobile transporteur et la phase stationnaire d'une colonne capillaire. La désulfonation des ABS permet de transformer ces agents de surface anioniques qui sont des sels non volatils en composés volatils. Celle-ci est effectuée par ébullition à 200°C en présence d'acide phosphorique concentré [35]. Les alkylbenzènes correspondants sont alors libérés et peuvent être isolés à partir du distillat.

Des méthodes de microdésulfonation ont été également développées par SETZKORN [36] et SWISHER [37-38]. Ces méthodes permettent d'obtenir des alkylbenzènes qu'on peut identifier et mesurer ce qui permet de suivre la biodégradation des ABS.

II.2.2.2.1.4. Méthodes par spectroscopie ultra-violet et infra-rouge:

a) Méthode par spectroscopie UV:

Le noyau benzénique possède des bandes d'absorption caractéristiques dans l'UV. La disparition de celles-ci indique la dégradation du noyau. SWISHER [39-43] a utilisé cette méthode pour étudier la biodégradabilité du LAS et autres ABS.

b) Méthode par spectroscopie IR:

Les molécules des agents de surface ont des spectres d'absorption caractéristiques dans l'infra-rouge. Ces spectres ont été utilisés par RYCKMAN [44-45] pour démontrer la biodégradation par boues activées du LAS et d'un ABS primaire linéaire.

II.2.2.2.1.5. Méthodes radiochimiques:

Le marquage isotopique a été utilisé dans certaines études effectuées sur le suivi de la biodégradabilité des agents de surface. Ceux-ci peuvent être marqués radiochimiquement sur le soufre ou sur le carbone [9].

On peut obtenir un ABS avec ^{35}S , par exemple, en sulfonant l'alkylbenzène correspondant avec $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ ce qui permet de suivre sa biodégradation [46]. De même, la formation de $^{14}\text{CO}_2$ indique la biodégradation du produit marqué au ^{14}C [9].

II.2.2.2.2. Méthodes non spécifiques:

Ces méthodes se rapportent à la matière organique présente dans l'eau. Elles mesurent soit la consommation d'oxygène, soit la production de CO_2 ou soit enfin la disparition du carbone organique. Les méthodes non spécifiques les plus couramment utilisées sont la demande biochimique en oxygène (DBO), la demande chimique en oxygène (DCO), le carbone organique total (COT), le carbone organique dissous (COD) et le dioxyde de carbone (CO_2). Si, dans un test de biodégradabilité, la substance d'essai est la seule source de carbone organique dans un milieu minéral, la mesure de O_2 , du carbone organique ou du CO_2 permet d'estimer la biodégradabilité ultime (totale) ou minéralisation de la substance testée [14].

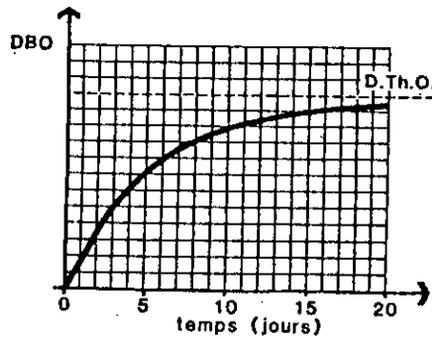
II.2.2.2.2.1 Demande biochimique en oxygène (DBO):

Cet essai permet de mesurer le carbone organique biodégradable. Les microorganismes consomment l'oxygène pour oxyder les matières biodégradables, ce qui leur permet d'assurer leur croissance et leurs besoins énergétiques [20].

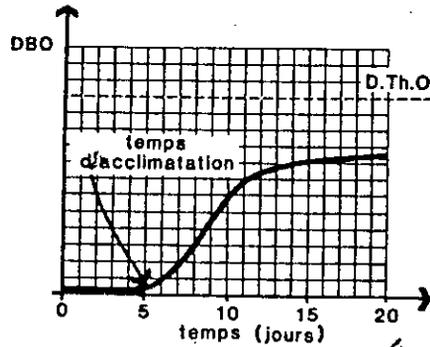
La DBO est la quantité d'oxygène consommée par les microorganismes aérobies pour oxyder biologiquement le substrat organique. La DBO_5 est la quantité d'oxygène (en mg/l) consommé au bout d'un temps conventionnel de 5 jours [47].

L'essai de DBO consiste à mesurer la consommation d'oxygène d'un échantillon d'eauensemencé contenant le substrat à étudier mis en incubation à 20°C dans des flacons à l'obscurité pendant un temps déterminé. Un essai à blanc (sans substrat) est réalisé en parallèle pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à l'autooxydation des microorganismes. La consommation d'oxygène due à l'oxydation biologique du substrat est alors calculée en retranchant celle de l'essai à blanc [20].

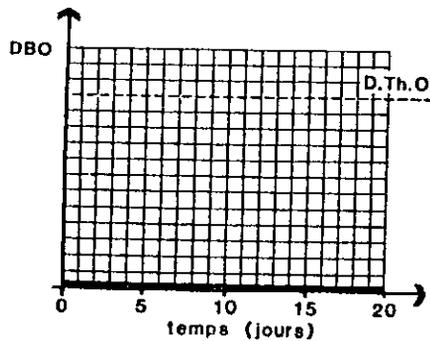
La biodégradabilité d'une substance peut être évaluée en mesurant sa DBO en fonction du temps. Une augmentation de la DBO avec des concentrations croissantes de la substance à tester indique qu'elle est facilement biodégradable tandis qu'une diminution est signe de toxicité ou d'inhibition [18]. Certaines substances peu biodégradables nécessitent des périodes d'adaptation ou d'acclimatation des microorganismes. Selon le degré de biodégradabilité du substrat, on obtient des courbes de différentes allures (fig.15) [48] et (fig.16-17) [18].



1) composé biodégradable
(cas du glucose)



2) composé à acclimatation prolongée
(cas de l'isopropanol)



3) composé non biodégradable
(cas du tertiobutanol)

Fig.15: Relation entre la biodégradabilité et l'allure et la courbe de DBO [48]
(D.Th.O: Demande théorique d'oxygène ou demande totale)

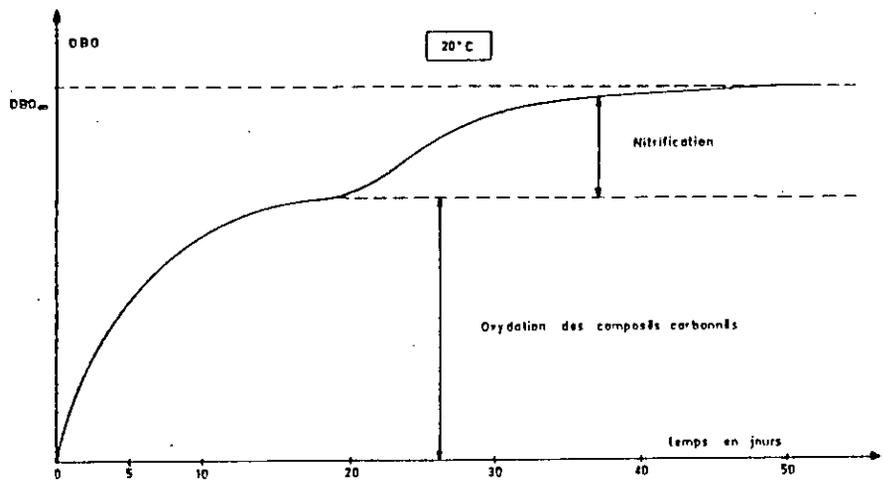


Fig.16: Courbes types d'évolution dans le temps de la Demande Biologique en Oxygène pour une eau résiduaire domestique [18].

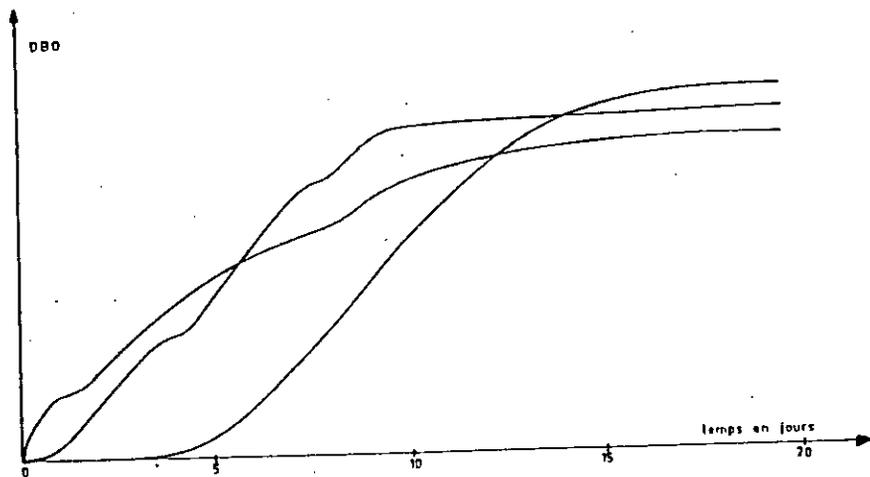


fig.17: Courbes types d'évolution dans le temps de la Demande Biologique en Oxygène pour des eaux industrielles [18].

II.2.2.2.2. Demande chimique en oxygène (DCO):

C'est la quantité d'oxygène (en mg/l) nécessaire pour oxyder par voie chimique et dans les conditions de l'essai les matières organiques oxydables biodégradables ou non contenues dans l'eau [47].

La DCO permet de mesurer toutes les matières organiques (carbone organique total) à l'exception de celles qui résistent à l'oxydation chimique ou ne sont pas complètement oxydées dans les conditions de l'essai.

La biodégradation du tensio-actif peut être indiquée par la mesure de la DCO qui permet d'évaluer la diminution ou la disparition du carbone organique.

L'essai de biodégradabilité consiste à utiliser un milieu minéral contenant des boues activées et le tensio-actif à tester. Un essai témoin c'est à dire sans tensio-actif est réalisé en parallèle. Des mesures de DCO sont effectuées durant la période ou à la fin du test. La différence entre les valeurs de DCO de l'essai avec le tensio-actif et celles du témoin représente la matière organique provenant du tensio-actif [9].

II.2.2.2.3. Carbone organique total (COT) et carbone organique dissous (COD) :

Le COT permet une estimation de la totalité de la matière organique présente dans l'échantillon, y compris celle qui résiste à l'oxydation avec la méthode de la DCO et ceci grâce à une oxydation énergique du substrat.

Celui-ci, oxydé catalytiquement à 950°C, subit une combustion complète qui le transforme en CO₂ et en eau. Le CO₂ formé est dosé dans un appareil à infra-rouge. Il correspond à la totalité du carbone (carbone organique et carbone minéral) présent dans l'échantillon analysé. Le COT est déterminé après élimination du carbone minéral ou inorganique qui correspond au carbone des ions carbonates et bicarbonates. Celui-ci peut être éliminé par acidification de l'échantillon ce qui transforme les ions carbonates et bicarbonates en CO₂. On élimine ensuite ce dernier par strippage après barbotage de l'azote dans l'échantillon [49].

La méthode d'analyse utilisée pour la mesure du carbone organique dissous (COD) est la même que pour le COT mais l'eau à analyser est préalablement filtrée [47].

L'essai de biodégradabilité consiste à soumettre le tensio-actif à l'action des boues activées dans une eau usée synthétique riche en matières organiques. Un essai témoin (sans tensio-actif) est effectué en parallèle.

La différence des mesures de COD entre les effluents du témoin et de l'essai est due au tensio-actif ou aux sous-produits résultant de sa biodégradation [14].

II.2.2.2.4. Dioxyde de carbone (CO₂):

La technique de la mesure de l'évolution du CO₂ a été adaptée par LUDZACK et al [50-52] pour les tests de biodégradation .

Une libération complète du CO₂ théorique à partir du substrat et des cellules bactériennes développées sur le substrat indique une biodégradation complète ou ultime de celui-ci [50,53-54].

II.2.3. Généralités sur les microorganismes impliqués dans la biodégradation des tensio-actifs:

La dégradation du LAS et probablement celle de plusieurs autres tensio-actifs par les microorganismes est effectuée selon les mécanismes utilisés pour la biodégradation des hydrocarbures [9].

Les hydrocarbures contenant entre 8 et 18 carbones sont très facilement attaqués par les microorganismes lorsqu'ils sont à chaînes aliphatiques et difficilement lorsqu'il s'agit de dérivés aromatiques qui offrent une grande résistance [22].

Il existe de nombreuses espèces microbiennes qui peuvent dégrader les hydrocarbures. On trouve, parmi celles-ci, les Mycobactéries, les Pseudomonas, les Nocardia, les Corynebactéries, les Micrococcus. Chez les levures il y a les Candida, Torulopsis, Rhodotorula, Pichia et Debaromyces [22].

NYNS [55] a isolé 21 souches non identifiées provenant du sol sur un milieu de culture contenant du tétrapropylène alkylbenzène (TP-alkyl benzène) et 22 autres sur un autre milieu contenant un mélange d'alkylbenzènes en C₁₃ ; 17 souches isolées sur celui-ci ont pu croître en présence du TP-alkylbenzène. Cependant une seule souche isolée sur le milieu contenant ce dernier a pu pousser en présence de C₁₃ alkylbenzènes.

5 souches seulement de chaque milieu ont pu se développer sur le C₁₃ LAS et aucune souche n'a poussé sur le TBS ce qui indique que l'acclimatation des bactéries aux alkylbenzènes ne confère pas nécessairement l'adaptation aux ABS [9]. De même, 6 souches seulement ont pu pousser en présence de C₁₃ alkylbenzène et une seule souche a pu se développer en présence de TP-alkylbenzène parmi les 22 souches isolées sur un milieu contenant le C₁₃ LAS [55].

Les agents de surface peuvent être biodégradés par divers microorganismes; Ainsi, MC KINNEY [56] a isolé 34 cultures bactériennes pures capables de vivre sur le TBS et dont 15 appartenaient au genre *Pseudomonas*, 10 au genre *Alcaligène* tandis que les cultures restantes étaient partagées parmi 5 autres genres. SCHÖNBORN [57] a également isolé 34 souches en présence de LAS et de TBS; une de ces souches était un champignon, une autre une bactérie Gram⁺ et toutes les autres des bactéries Gram⁻.

ILISESCU [58] a isolé 10 espèces de *Pseudomonas* et des bactéries de type *Aerobacter*, *Alcaligène*, *Achromobacter* et *Escherichia* (une espèce chacune) sur un milieu de culture contenant des agents de surface ABS ou alkylsulfates utilisés comme seule source de carbone et ensemencé avec des boues activées acclimatées aux agents de surface.

HSU [59] a isolé, à partir d'une eau usée, 6 souches de *Pseudomonas*, capable chacune, de dégrader les alkylsulfates. 76 souches de bactéries (avec les *Alcaligènes* et *Pseudomonas* en prédominance) capables d'utiliser plusieurs agents de surface anioniques ont été isolées, à partir de boues activées, par RZECHOWSKA [60]. D'ARCA [61] a isolé, à partir de différents milieux (sols, rejets industriels, eau de rivière, sables, eau de mer), des souches de bactéries qui ont pu dégrader 50% ou plus de LAS 14 jours après leur ensemencement dans un milieu contenant 50 ppm de LAS, 10000 ppm de peptone et 5000 ppm de NaCl. En lit bactérien avec recyclage et en présence de souches pures isolées à partir des eaux usées domestiques, le TBS a été dégradé, à 58% par *Bacterium impériale*, à environ 28% par *Corynebacterium annamensis* et *Flavobacterium diffusum* et à 70% par ces deux dernières espèces utilisées en mélange [62]. PHILLIPS [63] a isolé, à partir de boues acclimatées au LAS utilisé comme seule source de carbone, 4 souches pures: *Serratia marcescens*, *Pseudomonas alcaligènes*, *Ps.Putida* et *Arthrobacter globiformis*. Aucune des quatre espèces de bactéries isolées

testées individuellement ou en diverses combinaisons n'a pu dégrader plus de la moitié du LAS alors que 21 ppm de celui-ci (concentration initiale) ont été dégradés en 20-24 heures par les boues activées. Lorsque les quatre souches furent mélangées et développées de la même façon que pour la boue originale, elles formèrent un floc ayant la même capacité que le floc original pour la dégradation du LAS. On en conclua que la floculation joue un rôle important dans l'augmentation de l'activité de biodégradation en favorisant l'adsorption du LAS au voisinage des bactéries.

Bien que la biodégradation des tensio-actifs soit due en grande partie aux bactéries, il existe cependant d'autres espèces capables de dégrader ces derniers [9]. La dégradation des ABS par des algues a été rapportée par WURTZ-ARLET [64] et KLEIN [65]. Le TBS a été dégradé par des algues en cultures pures à des degrés variant largement d'une espèce à l'autre [66].

KLEIN [67-68] indique également que le TBS peut être intensivement dégradé par les tournesols. Une espèce de champignons *Phialophora Jeanselmei* isolée de terre par COOKE [69] et utilisée dans un traitement des eaux usées a pu dégrader le TBS à un degré significatif. LEE [70] a trouvé 9 souches de champignons de terre capables de croître sur des agents de surface anioniques de type $R(OC_2H_4)_3 SO_4$ utilisés comme seule source de carbone.

II.2.4. Mécanismes de biodégradation des tensio-actifs:

II.2.4.1. Généralités:

La biodégradation d'un tensio-actif comporte les étapes suivantes [9]:

1. Une oxydation initiale ou ω -oxydation à l'extrémité de la chaîne hydrocarbonée.
2. Une β -oxydation des portions aliphatiques du groupement hydrophobe.
3. Une oxydation du noyau aromatique quand la chaîne hydrophobe contient un noyau benzénique.

L'attaque des hydrocarbures paraffiniques par les microorganismes débute par la fixation d'oxygène moléculaire à une extrémité de la chaîne alkyle avec transformations successives de l'alcool et de l'acide qui lui correspond (fig.18). Celui-ci sera soumis à des β -oxydations successives ce qui aboutit à la formation de molécules d'acétyl coenzyme A qui seront dégradées à leur tour dans le cycle tricarboxylique ou cycle de Krebs [22] (fig.19-20 respectivement) [71].

La biodégradation des alkylbenzènes commence généralement par l'attaque au bout de la chaîne alkyle qui est dégradée ensuite par β -oxydation. La dégradation du noyau aromatique peut être effectuée selon l'une des deux voies via le catéchol (fig.21) [9].

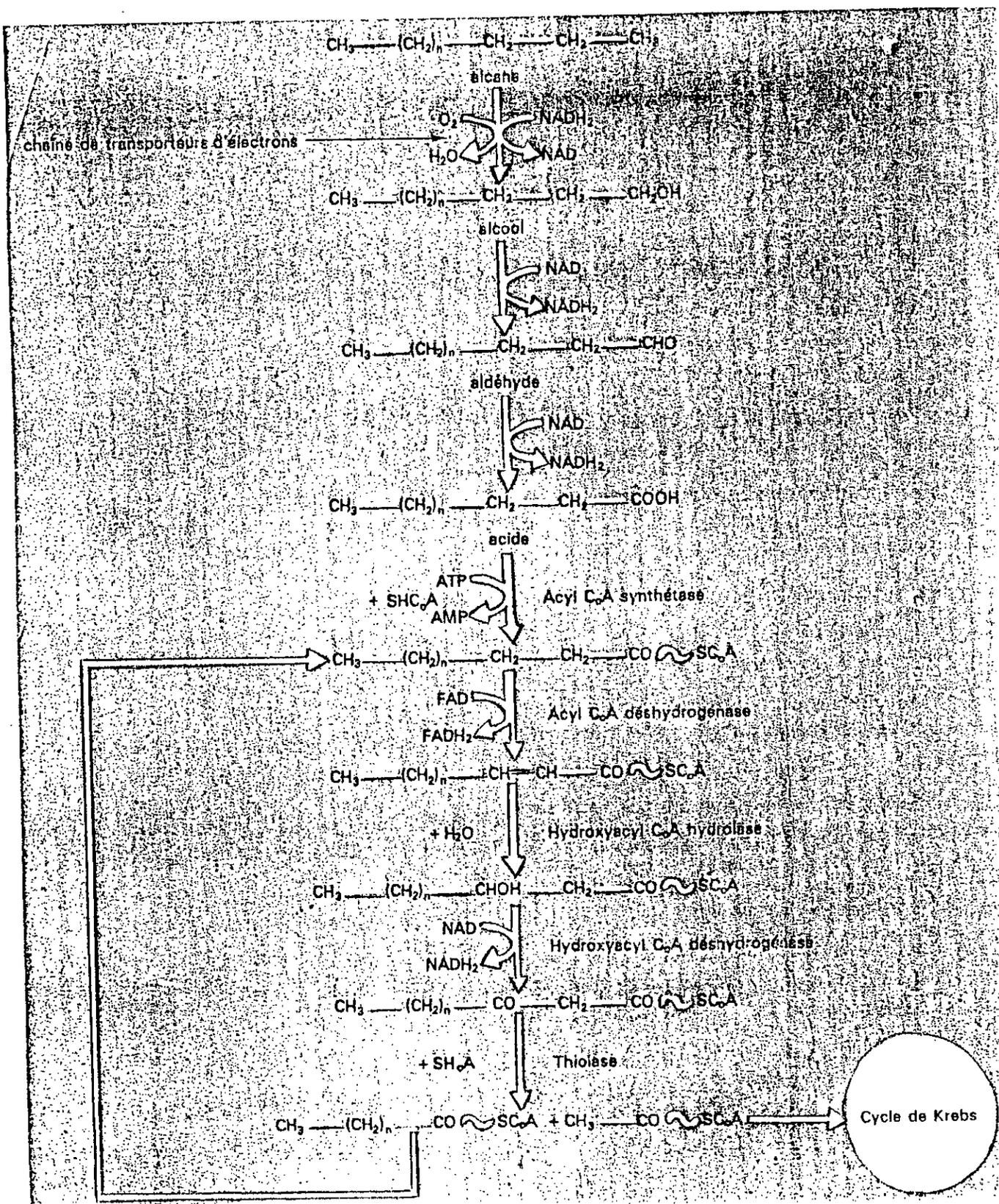


Fig.18: Dégradation des hydrocarbures: Réaction initiale [22].

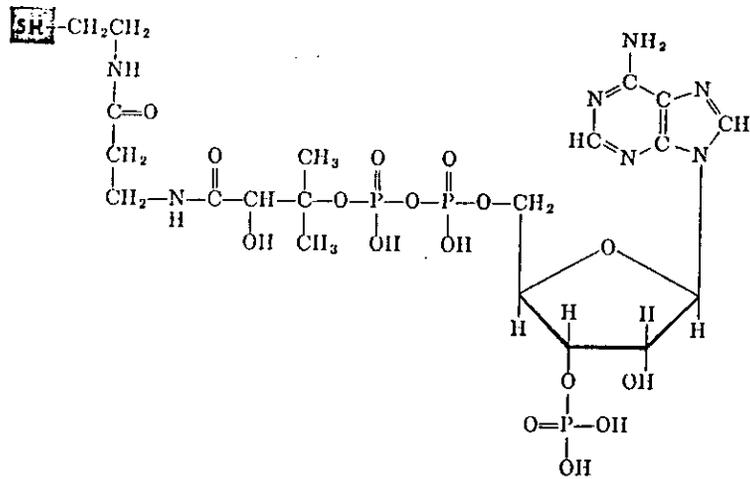
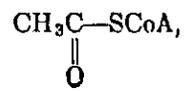
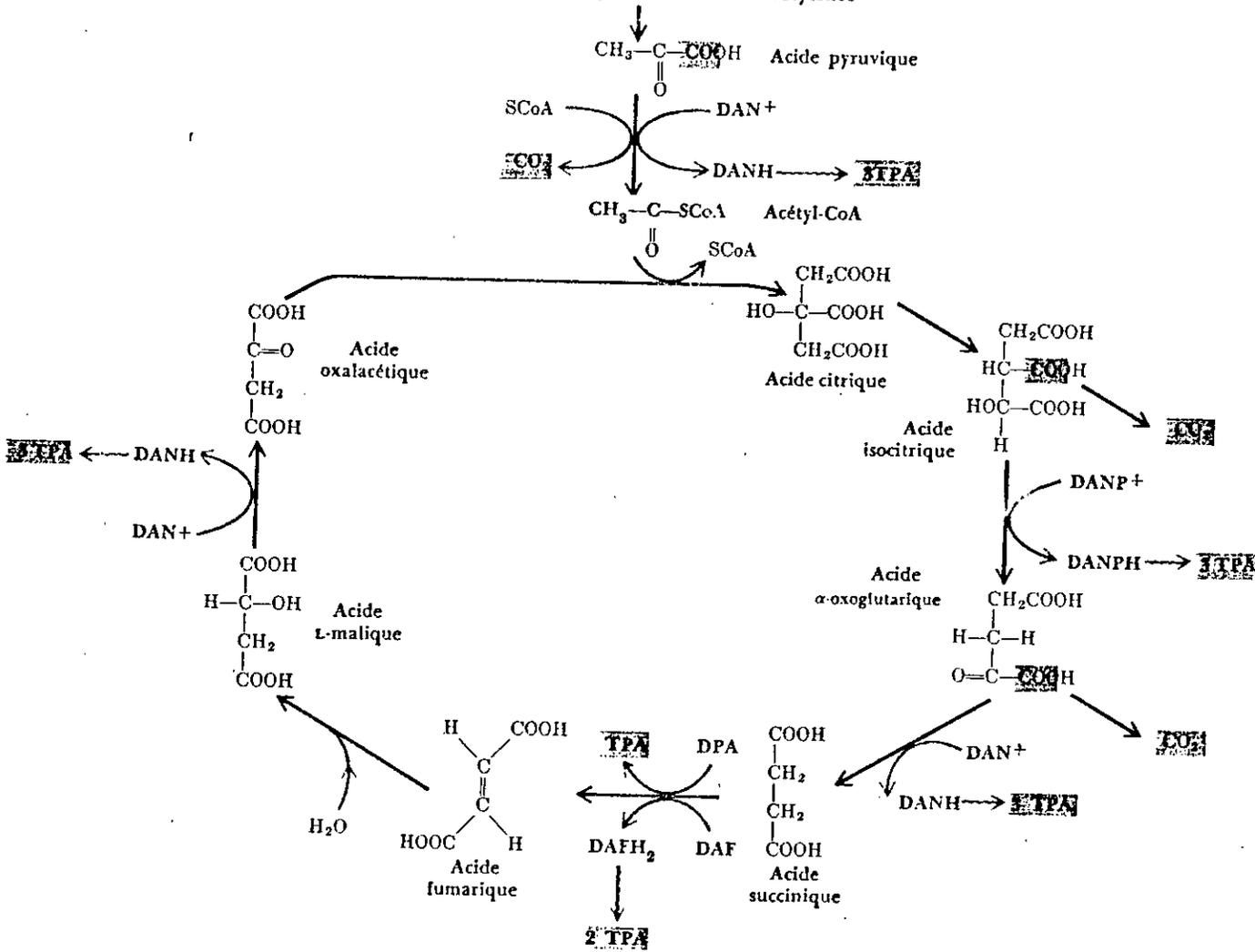


Fig.19: Structure du coenzyme A (CoA ou SCoA) dans l'acétyl coenzyme A [71]

Cours de la glycolyse selon Embden-Meyerhof



DPA: diphosphate d'adénosine.

TPA: triphosphate d'adénosine.

DAN[†]: dinucléotide d'adénine et de nicotinamide.

DANP[†]: dinucléotide d'adénine et de nicotinamide phosphate.

DAF: dinucléotide d'adénine et de flavine.

DAFH₂: forme réduite de DAF.

Fig.20: Cycle de Krebs [71].

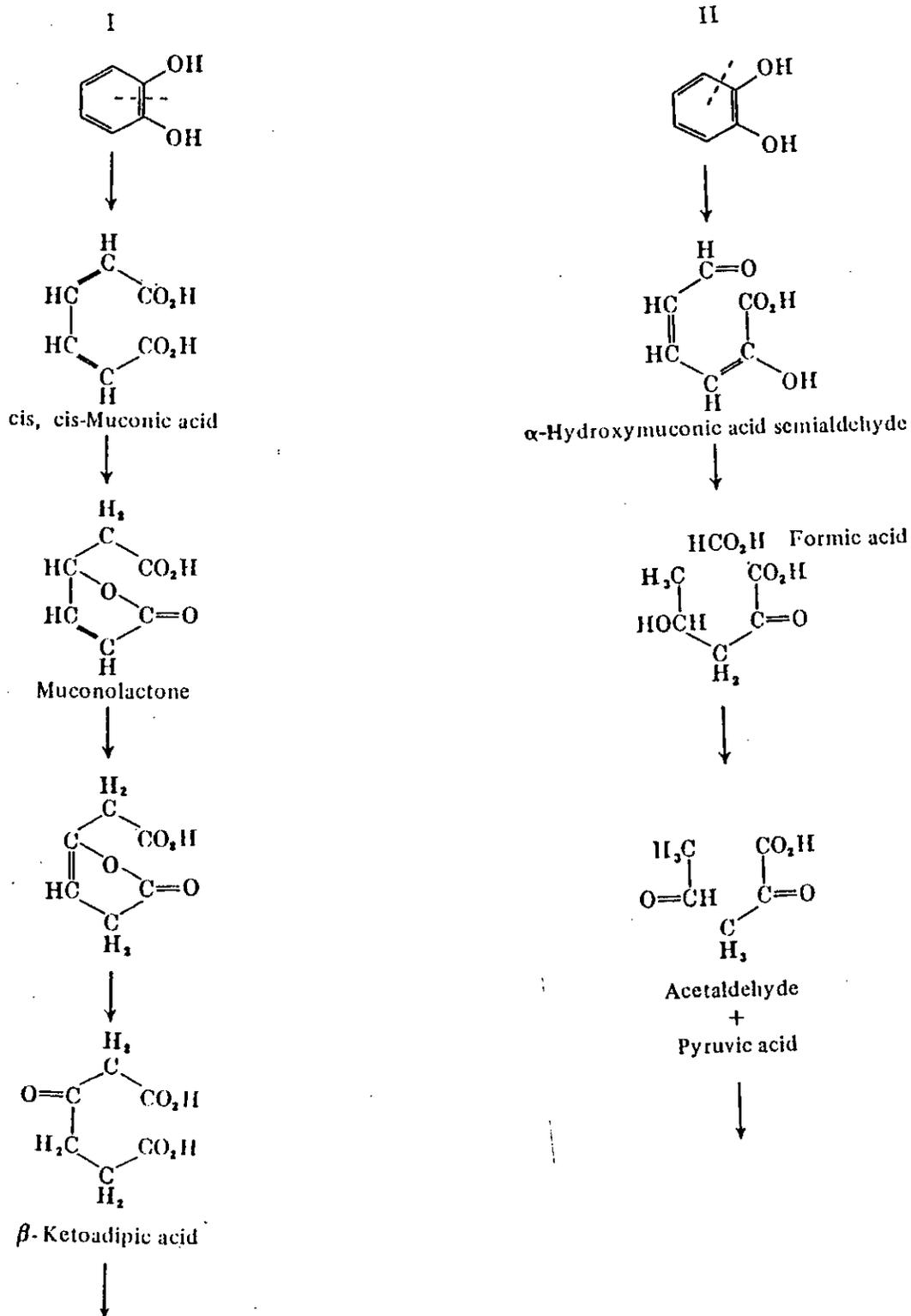


Fig.21: Biodégradation du noyau benzénique via le catéchol:
I. voie ortho; II. voie méta [9].

II.2.4.2. Mécanismes de biodégradation des tensio-actifs alkylbenzène sulfonates:

Les différents travaux concernant l'étude de la biodégradation des LAS concordent avec l'hypothèse émise par RYCKMAN [45] selon laquelle la dégradation d'un LAS commence par l'attaque au bout de la chaîne alkyle (ω -oxydation) par les microorganismes selon les mêmes mécanismes de dégradation des hydrocarbures aliphatiques. Cette attaque avec formation d'un groupement carboxyle est suivie par une β -oxydation rapide de la chaîne et ensuite une oxydation plus lente du noyau aromatique avec conversion simultanée du groupement sulfonate (fig.22) [74]. La rupture de la liaison du groupement sulfonate avec le noyau aromatique par les microorganismes (biodésulfonation) avant et en même temps que celle de ce dernier a été également signalée par CAIN et al [72] ainsi que par OBA [73].

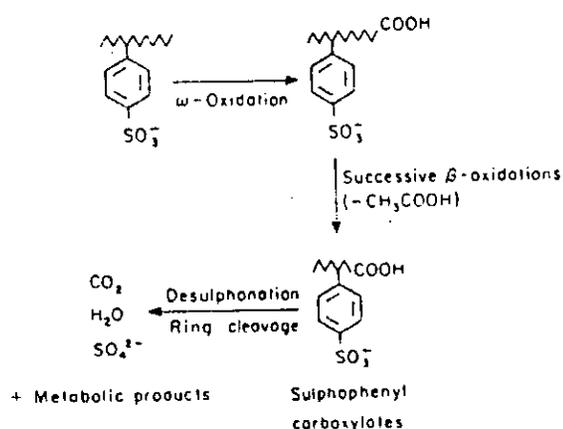


Fig.22: Mécanismes de biodégradation du LAS [74].

II.2.4.2.1. Mécanismes de biodégradation de la chaîne hydrocarbonée aliphatique:

La chaîne hydrocarbonée aliphatique du LAS subit la méthyl-oxydation (ω -oxydation) ou l'attaque par l'oxygène moléculaire (fig.23) ce qui donne un hydroperoxyde primaire qui est transformé ensuite progressivement en alcool puis en aldéhyde et enfin en acide. Un système enzymatique approprié catalyse chaque étape. Après la méthyl-oxydation, intervient le mécanisme de la β -oxydation (fig.24) dans lequel les acides gras sont dégradés. Il en résulte une succession de groupements acétyl (à 2 atomes de carbone) qui constituent une source d'énergie pour les cellules bactériennes ou la matière première pour les réactions de synthèse de celles-ci.

Le principal élément dans le mécanisme de la β -oxydation est le coenzyme A (HSCoA ou SCoA) (fig.19) [71].

La β -oxydation comporte l'estérification d'un acide gras par le coenzyme A (réaction d'activation) sous l'effet d'enzymes, ensuite une déshydrogénation en α , β , suivie par une hydratation puis une oxydation en β -cétone. Celle-ci en réagissant à son tour avec une autre molécule de coenzyme A se coupe en acétyl coenzyme A et en acyl coenzyme A ayant 2 atomes de carbone de moins que la chaîne de départ. Toutes ces réactions se font par l'intermédiaire d'enzymes spécifiques. La réaction de dégradation, en se poursuivant selon le même mécanisme, aboutit à la formation de n molécules d'acide acétique pour un acide à nombre pair d'atomes de carbone ($2n$) au départ et à $(n-1)$ molécules d'acide acétique et une molécule d'acide propionique pour un acide impair à $(2n+1)$ atomes de carbone [29].

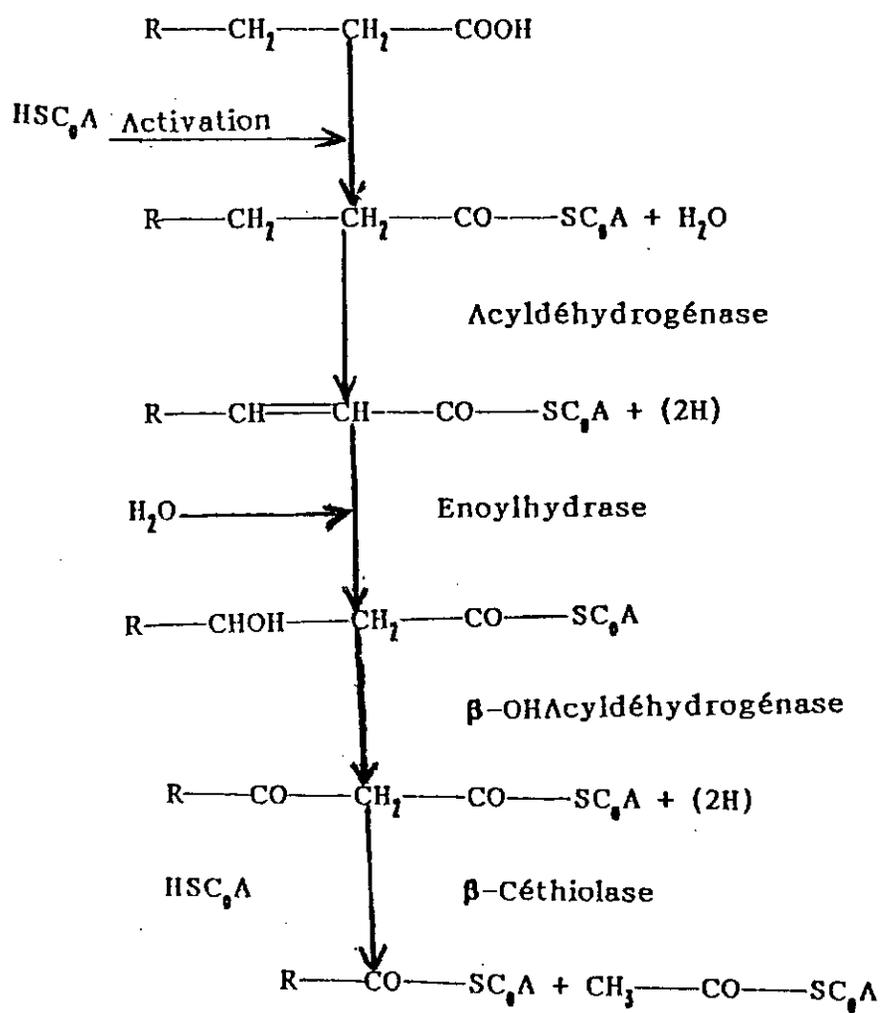


Fig.24: Schéma de la β -oxydation [29].

II.2.4.2.2. Mécanismes de biodégradation du noyau aromatique:

Le noyau aromatique subit une β -oxydation qui le transforme en acide benzoïque (fig.25) [29] qui est transformé à son tour en pyrocatechol par auto-oxydation catalysée par une enzyme. Il y a ensuite formation d'un diacide par ouverture oxydative du cycle. L'hydratation de la lactone issue du réarrangement moléculaire aboutit à la formation de l'acide β -cétoadipique qui peut donner, par β -oxydation, les groupements acétate et succinate. Il y a, là aussi, intervention de diverses enzymes spécifiques [29].

L'acide β -cétoadipique est dégradé par la voie du cycle tricarboxylique [75] (fig.20) [71].

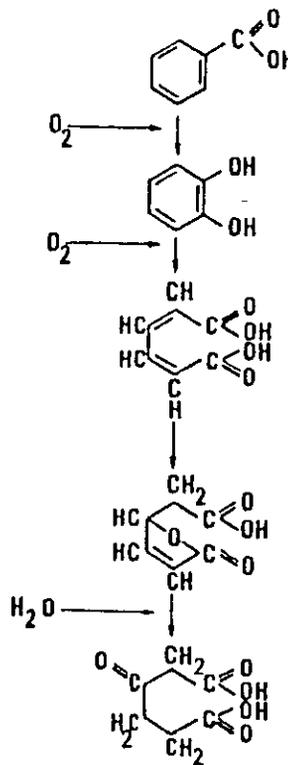


Fig.25: Schéma de la biooxydation du noyau aromatique [29].

II.2.4.3. Mécanismes de biodégradation des tensio-actifs alkylsulfates:

La biodégradation d'un alkylsulfate débute par l'hydrolyse enzymatique du groupement sulfate (fig.24), suivie par l'oxydation de l'alcool formé en acide gras qui est à son tour rapidement et complètement oxydé par β -oxydation [74].

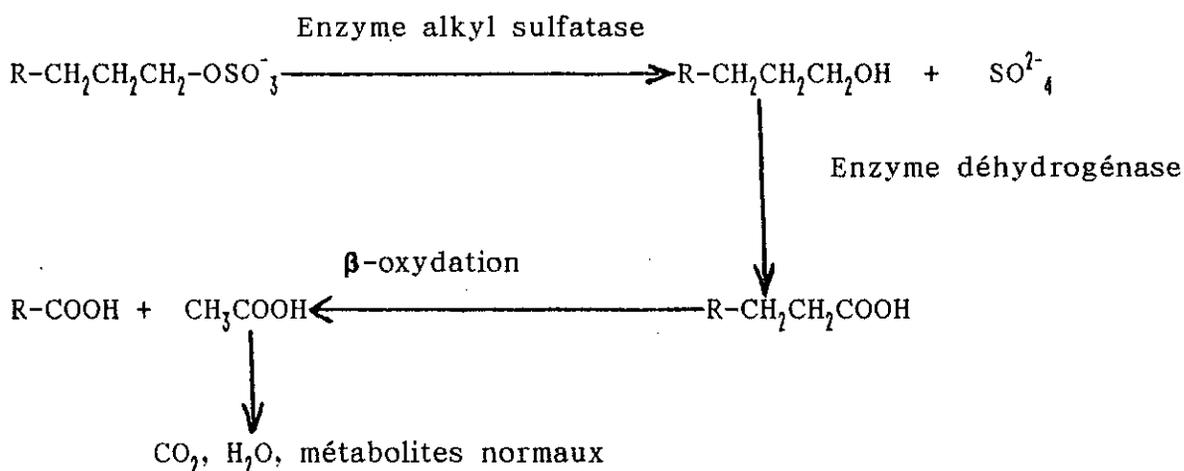


Fig.26: Mécanisme de biodégradation d'un alkylsulfate primaire [74].

II.2.5. Etude bibliographique sur la biodégradabilité des tensio-actifs anioniques alkylbenzènesulfonates et alkylsulfates:

La biodégradabilité des tensio-actifs alkylbenzènesulfonates et alkylsulfates dépend de la structure du groupement hydrophobe (plus la linéarité de la chaîne hydrophobe augmente et plus la biodégradabilité augmente) [9].

La résistance du TBS (fig.5) [7] à la dégradation biologique est due à la ramification de ses groupements alkyles. Le tensio-actif ABS linéaire est rapidement dégradé par les microorganismes. Les alkylsulfates linéaires sont plus rapidement dégradés que les ABS linéaires. Dans un test de

biodégradabilité en eau de rivière, la réponse au bleu de méthylène (MBAS) a disparu en un jour ou moins pour un alkylsulfate linéaire. La disparition de celle-ci a nécessité plusieurs jours pour un ABS linéaire [76-77].

La biodégradation primaire des alkylsulfates linéaires a été reconnue depuis longtemps comme étant très rapide. La facilité de biodégradation des alkylsulfates a été attribuée à la rapidité d'hydrolyse de la liaison ester sulfate [9]. HAMMERTON [78-79] a, cependant, montré que certains alkyl sulfates ramifiés pouvaient offrir une résistance à la biodégradation. Il trouva ainsi, après 21 jours d'exposition en eau de rivière, 4 % seulement de biodégradation d'un alkylsulfate ramifié tandis qu'un tensio-actif ABS linéaire en C₁₀ avait disparu en 4 jours.

Les alkylsulfates linéaires sont minéralisés de façon importante comme l'indique la consommation en O₂, la production du CO₂ et l'élimination du COD [9]. GERIKE [80] a trouvé un taux d'élimination du COD de 104 ± 2%, après une longue exposition aux boues activées d'un alkylsulfate linéaire (comportant 12 à 14 atomes de carbone). Ce taux au dessus de 100 montre que l'alkylsulfate favorise l'oxydation des métabolites normaux des boues activées par rapport au système de contrôle n'ayant pas reçu ce tensio-actif [9].

Les alkylsulfates primaires linéaires dépassent tous les autres tensio-actifs dans la vitesse de la biodégradation primaire et ultime du fait de la large présence des enzymes appropriées dans les espèces bactériennes [9].

La biodégradation des ABS est inhibée lorsque les chaînes alkyles sont ramifiées [77]. Une relation linéaire inverse entre le pourcentage de ramification des chaînes alkyles et le pourcentage de biodégradation a été démontrée par des analyses de chromatographie et de résonance magnétique nucléaire [81]. La résistance du TBS (fig.5) [7] est due à la présence d'un atome de carbone quaternaire dans la chaîne alkyle [57]. NELSON [82] a montré que les ABS avec un carbone quaternaire terminal offraient une grande résistance à la biodégradation. Une étude effectuée sur des chaînes de carbone d'ABS (C₁ à C₁₇) a montré que les chaînes à carbone primaire et secondaire sont complètement dégradées avec libération

de SO_4^{2-} tandis que celles qui sont à carbone tertiaire sont résistantes à la biodégradation avec une oxydation incomplète et sans libération de SO_4^{2-} [45]. Des ABS ramifiés marqués radiochimiquement au ^{35}S ont libéré seulement 12% du soufre ^{35}S sous forme de $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ avec 70% de biodégradation primaire par des boues activées tandis qu'un LAS a subi 98% de celle-ci avec libération de 30 à 50% de son soufre [83]. Le LAS a été éliminé à 95% (MBAS) tandis que des ABS ramifiés n'ont subi que 45-60% de biodégradation dans un système de boues activées [84]. Des études sur terrain ont montré que le remplacement des ABS ramifiés par les LAS a permis d'augmenter l'élimination de la matière active MBAS de 33-52% à 85-94% [85]. La biodégradation des LAS est d'autant plus rapide que la distance entre le groupement sulfonate et l'extrémité de la chaîne alkyle est grande [9].

Le mécanisme suggéré pour expliquer cet effet est la liaison du groupement sulfonate avec l'enzyme oxydative à une certaine distance du lieu où l'oxydation est initiée à l'extrémité de la chaîne alkyle. L'augmentation de la distance entre cette enzyme et le groupement sulfonate faciliterait l'orientation de celle-ci [9]. HUDDLESTON [86] a étudié la biodégradabilité du LAS et a trouvé que les isomères avec le groupement phényle attaché près de l'extrémité de la chaîne alkyle disparaissent plus rapidement que ceux qui ont celui-ci attaché au centre. DIVO [87] a confirmé que la biodégradation est plus lente lorsque le noyau aromatique se trouve dans une position plus interne sur la chaîne alkyle après avoir étudié la concentration maximale de divers isomères à partir de laquelle la biodégradation primaire pourrait être complète au bout de 10 jours dans un milieu minéral ensemencé avec des souches de *Pseudomonas* Micro-C.

La biodégradation du LAS augmente avec la longueur de la chaîne hydrophobe [9]. Plusieurs études effectuées sur différentes chaînes alkyles (homologues purs) ont montré une biodégradation rapide de l'homologue C_{12} tandis que des chaînes alkyles plus courtes ou plus longues que C_{12} rendent la molécule plus résistante à l'attaque bactérienne [5, 88, 89, 90].

La dégradation de différents homologues et isomères d'un LAS commercial dans une station d'épuration des eaux usées a été suivie par chromatographie gazeuse. Les isomères en C_{12} et en C_{13} ont été dégradés à 92-96% excepté pour le 6 sulfo-phényl dodécane qui le fut à 81% seulement.

Le taux d'élimination des isomères en C_{10} et C_{11} a varié entre 52 et 89%. Les isomères 5-sulfophényl décane et 6-sulfophényl undécane furent les plus lentement dégradés (entre 52 et 58 % d'élimination seulement) [91,92].

WICKBOLD [93] a également trouvé que le 5-phényldécane était le principal composant résiduaire dans un test de biodégradation par boues activées. L'étude de la biodégradation d'homologues purs de LAS dans le test de biodégradabilité <<River Water Die Away>> a révélé que la vitesse de biodégradation (diminution de MBAS) augmente avec la longueur de la chaîne alkyle de C_6 à C_{12} puis diminue de C_{13} à C_{14} avant d'augmenter de nouveau entre C_{15} - C_{18} [5,90].

La biodégradation de différents homologues de LAS peut être inhibée au delà d'une concentration limite. Celle-ci diminue d'environ 1/3 lorsque la longueur de la chaîne est augmentée d'un carbone dans la série C_{10} - C_{15} . Elle est également plus faible à une température et à un pH plus faibles [9].

CIATTONI [94] indique que l'inhibition de la biodégradation est due à l'interaction du LAS avec les enzymes bactériennes spécifiques et qu'il y a l'adsorption de celui-ci sur les cellules bactériennes augmente avec la longueur de la chaîne alkyle de C_{10} à C_{15} .

La concentration du tensio-actif joue également un rôle important dans la biodégradabilité de celui-ci, particulièrement dans les systèmes où la concentration des bactéries est faible comme c'est le cas pour l'eau de rivière. Une augmentation de la concentration du LAS de 5 à 20 ppm peut retarder la biodégradation de plusieurs semaines dans le test de biodégradabilité en eau de rivière [9].

Dans le test <<shake flask>>, KRAVETZ [95] a obtenu une biodégradation importante du LAS à 15 ppm après un délai de 2 à 3 semaines mais celui-ci fut à peine biodégradé en un mois lorsque sa concentration a été augmentée à 1000 ppm. Dans les systèmes où les concentrations des bactéries sont plus élevées, comme dans le cas des procédés d'épuration par boues activées, la concentration permise du tensio-actif à l'influent peut être beaucoup plus élevée. Elle peut atteindre plusieurs centaines de ppm pourvu que ce tensio-actif soit biodégradable, qu'il n'atteigne pas le seuil d'inhibition dans la liqueur mixte et que les boues activées soient acclimatées. Cependant, si la concentration de celles-ci diminue, celle du

tensio-actif doit être également diminuée [9]. Le taux de biodégradation du LAS a été de 98% et de 37% avec avec une concentration de 20 ppm et 45 ppm respectivement à l'influent et une concentration de bactéries correspondant à 100 ppm de biomasse dans le système d'épuration [96,97]. SWISHER [9] a trouvé 98% de biodégradation avec une concentration d'au moins 100 ppm de LAS et 4000 ppm de biomasse.

L'acclimatation des microorganismes à un tensio-actif est souvent un facteur clé dans la biodégradation de celui-ci [9]. Ainsi, la disparition du 8-phényl pentadécane LAS dans une eau de rivière non acclimatée a nécessité 5-6 jours mais seulement 1-2 jours après ajout d'une certaine quantité d'eau de rivière acclimatée dans laquelle le tensio-actif testé a déjà été biodégradé [98]. L'acclimatation peut s'avérer nécessaire lorsqu'il y a un changement de conditions opératoires [9]. HUDDLESTON [99] a trouvé qu'une augmentation de concentration de tensio-actif dans un système de boues activées en continu peut requérir une réacclimatation importante de celles-ci. Une à deux semaines ont été nécessaires avant le rétablissement de l'équilibre, après chaque changement de concentration de tensio-actif, dans un système de boues activées correspondant au procédé contact-stabilisation avec 2400-3000 mg/l de matières solides en suspension et dans lequel des tensio-actifs ont été introduits à des concentrations allant jusqu'à 50 ppm [100]. Dans une étude effectuée sur lits bactériens sur la biodégradation du LAS et du TBS, TRUESDALE [101] a trouvé que l'acclimatation des microorganismes alimentés avec une eau usée a nécessité 4-8 semaines en présence de 13 ppm du LAS ou de TBS en plus des 14 semaines requises pour le développement du biofilm.

L'interruption durant 2 semaines de l'ajout de différents tensio-actifs a provoqué la déacclimatation plus ou moins prononcée des lits bactériens selon le tensio-actif testé. Il y eut une nette déacclimatation pour le TBS tandis que la réacclimatation pour le LAS a été regagnée en 3 semaines au lieu des 12-13 semaines requises pour l'acclimatation initiale [102].

La biodégradation des tensio-actifs peut être également affectée par la température. Ces derniers sont plus lentement dégradés aux faibles températures [9]. La biodégradation du C₁₄ LAS a été inhibée à 10°C tandis qu'à 2°C aucune biodégradation n'eut lieu [103]. Le LAS a été biodégradé

plus rapidement à 37°C qu'à température ordinaire [104]. WAYMAN [105] a trouvé que la biodégradation est plus lente à 10°C. Celle-ci a été nettement plus faible à 6°C qu'à 25°C (voir tableau N°6) [106]. Dans les tests de biodégradabilité dieaway, HOLLIS [107] a trouvé que la biodégradation du LAS est maximale à 15-35°C et est nettement retardée à 5 et 45°C. Dans les tests dieaway, une biodégradation plus lente aux faibles températures a été également indiquée par COOK [108] et MICHELSEN [109] pour le LAS et par BRÜSCHWEILER [110] pour le LAS et le TBS.

Tableau N°6: Biodégradation du LAS par boues activées à différentes températures [106].

	Température, °c		
	6°	15°	20°
Pourcentage d'élimination du LAS (MBAS)	25	40-95	96

La biodégradation des ABS exige des conditions aérobies. L'oxydation initiale des chaînes hydrocarbonées nécessite la présence de l'oxygène moléculaire et par conséquent le LAS n'est pas biodégradé dans les conditions strictement anaérobies. Différents résultats expérimentaux ont confirmé le faible taux de biodégradation du LAS dans les systèmes anaérobies. Un faible degré de biodégradabilité dans de tels systèmes indique, cependant, la présence d'une certaine quantité d'oxygène dissous [32]. Contrairement aux ABS, une biodégradation importante des alkyl sulfates primaires linéaires dans les systèmes anaérobies a été signalée par PITTER [111,112], KLEIN [113] et MAURER [114]. Cependant, le travail effectué par OBA [115] sur la biodégradabilité d'un alkylsulfate en systèmes aérobie et anaérobie suggère, d'après SWISHER [9], qu'il pourrait s'agir seulement d'une simple hydrolyse en anaérobie et que:

1- Dans les conditions aérobies, l'alcool libéré par hydrolyse est rapidement oxydé en acide gras qui est dégradé à son tour.

2- Dans les conditions anaérobies, l'alcool libéré n'est pas oxydé.

Différentes études en laboratoire ont montré que la biodégradation des LAS commerciaux varie généralement entre 80 et 90% [28]. RYCKMAN [44-45] indique une dégradation complète du LAS après avoir trouvé 50% de la consommation théorique en oxygène durant 6 heures dans un respiromètre de Warburg en présence des composés LAS:2-sulfophényldécane,-tétradécane et des homologues en C_8 . Les 50% restants ont été utilisés, selon cet auteur, pour la synthèse du protoplasme des bactéries. Il prouva les résultats obtenus par d'autres expériences sur ces mêmes composés en trouvant:

1- Une réponse au bleu de méthylène (MBAS) nulle.

2- Des valeurs de DBO à long terme (10-15jours) indiquant 60-75% de la demande théorique en oxygène.

3- 95-100% de la formation théorique de sulfate inorganique.

4- Des spectres infra-rouge des résidus de biodégradation identiques à ceux des systèmes de contrôle (sans produits LAS testés) et la disparition des bandes d'absorption initiales caractéristiques des chaînes alkyles, des noyaux benzéniques et des groupements sulfonates.

NELSON et al [82] ont étudié la biodégradation de 9 ABS synthétiques dans le système de Warburg en présence d'un inoculum de boues activées acclimatées auparavant, durant plusieurs jours, aux tensio-actifs testés, sur un cycle de 24 heures dans un système de boues activées en semi-continu.

Ils ont trouvé 100 ± 15 % de la demande théorique en oxygène et 85 ± 15 % d'élimination de la DCO avec le 2-phényl C_{12} LAS, ce qui indique l'approche d'une minéralisation complète. Les résultats obtenus avec les tensio-actifs à chaînes ramifiées ont été généralement beaucoup plus faibles, certains ayant même été pratiquement nuls [9]. L'élimination du COD varia entre 80-85 %

pour 3 types de LAS commerciaux et atteigna 87% en moyenne pour la peptone dans un essai de biodégradabilité par boues activées en continu [116]. LARSON [117] a trouvé, dans le procédé par boues activées semi-continu, 92% et 93% d'élimination du COD pour 2 LAS commerciaux. Le COD a été éliminé en 30 jours à 81% pour l'un de ces LAS et à 55% pour l'autre dans le test de biodégradabilité dieway avec un milieu minéral ensemencé.

Le faible taux d'élimination d'un des deux LAS a été attribué à la présence en quantité élevée des homologues C_{13} et C_{14} qui tendent à retarder la biodégradation du LAS. La biodégradation de 3 LAS commerciaux a atteint des taux de 71-91%, 88-98% et 90-97% dans les tests de biodégradabilité en shake flask, en semi-continu et en continu respectivement. Ces mêmes LAS ont subi 86-94% d'élimination (MBAS) dans une station d'épuration par boues activées [118].

Une biodégradation importante du LAS a été également obtenue dans les fossés d'oxydation [28]. SPOHN [119,120] et HUBERT [121] indiquent un taux d'élimination de 80-92 % de MBAS dans ces systèmes.

Le marquage au ^{14}C du noyau aromatique a permis de suivre la biodégradation du LAS par la mesure de l'évolution du $^{14}CO_2$; STEBER [122] indique une dégradation considérable du noyau benzénique avec 97-98 % de dégradation du LAS initial par des boues activées. La moitié environ du noyau aromatique a été complètement minéralisée en $^{14}CO_2$ tandis que le reste a été partagé entre la biomasse et le ^{14}COD de l'effluent, celui-ci incluant un peu de LAS non dégradé (1-2% du LAS initial), des produits intermédiaires de dégradation (sulfophénylalcanoates) et des produits intermédiaires ayant subi une dégradation plus poussée. HUDDLESTON [123] et NIELSEN [124] ont trouvé entre 95-100% de biodégradation du noyau aromatique de différents homologues de LAS testés individuellement ou en mélange dans un système de boues activées semi-continu. Des analyses par U.V ont révélé 85-92 % de biodégradation du noyau benzénique du C_{12} LAS commercial et du 1,3 et 6-phényldodécanesulfonate [39]. L'étude de la biodégradation du noyau aromatique par les méthodes spectroscopiques U.V a montré que les homologues 2-phényl de C_{10} à C_{13} LAS ainsi que 3 et 6-phényl C_{12} LAS sont relativement faciles à dégrader [9]. En utilisant la méthode par U.V fluorescence (U.V.F), LINDER [125] a trouvé plus de 99.5% de biodégradation du noyau benzénique avec le test de biodégradabilité dieaway.

La biodégradabilité ultime du LAS a été cependant remise en cause par certains auteurs; ainsi COMMOMER [126] indique qu'après la biodégradation des chaînes hydrocarbonées du LAS, il se forme du phénol qui risque de ne pas être biodégradé ce qui pourrait entraîner son accumulation dans les eaux de surface. WUHRMANN [127] et LEIDNER [128] mettent aussi en doute la biodégradabilité totale du LAS après avoir trouvé, dans un milieu minéral ensemencé et contenant le LAS comme seule source de carbone, un faible taux d'élimination du COD (15-30%) [127], une quantité persistante de COD ainsi que de sulfophénylalcanoates (produits intermédiaires de biodégradation du LAS) dans les stations d'épuration et dans les eaux de réception [128]. PITTER [129] considère également que la biodégradabilité ultime du LAS est discutable en trouvant un taux d'élimination du COD et de la DCO de l'ordre de 60% seulement avec une concentration initiale de 60 mg/l de LAS (MBAS). Les concentrations résiduelles relativement élevées du COD et de la DCO seraient dues, selon cet auteur, à la formation de sous-produits relativement stables.

En résumé, nous pouvons dire que la biodégradabilité des tensio-actifs dépend de plusieurs facteurs dont:

- La linéarité de la chaîne alkyle. Les tensio-actifs sont d'autant moins biodégradables que la ramification de celle-ci est grande.
- La longueur de la chaîne alkyle linéaire. Plus le nombre de carbone augmente sur celle-ci et plus la biodégradabilité augmente.
- La distance entre le noyau benzénique et le carbone terminal. L'augmentation de celle-ci entraîne plus de biodégradabilité.
- La concentration des microorganismes. La biodégradabilité des tensio-actifs est d'autant plus grande que celle-ci est élevée.
- L'acclimatation des microorganismes aux tensio-actifs. Ces derniers sont d'autant plus facilement et rapidement biodégradés que celle-ci est grande.
- La présence d'oxygène ou conditions d'aération. Les tensio-actifs alkylbenzènesulfonates ne sont pas biodégradés en milieu anaérobie.

- La température. Une baisse de celle-ci entraîne une diminution ou une inhibition de la biodégradabilité.
- Le pH. La biodégradabilité des tensio-actifs diminue lorsque celui-ci est faible.

CHAPITRE III

EFFETS DES TENSIO-ACTIFS SUR L'ENVIRONNEMENT

III.1. Introduction:

Les tensio-actifs exercent de façon directe ou indirecte différents effets sur l'environnement. Ces effets qui peuvent se manifester par différentes nuisances telles que toxicité, formation de mousses, perturbation du transfert d'oxygène et des procédés d'épuration biologique concernent les bactéries, la flore, la faune et les organismes supérieurs (homme et animaux).

III.2. Effets des tensio-actifs sur les bactéries:

Après adsorption et pénétration à l'intérieur des membranes de la cellule bactérienne, la matière active réagit avec les complexes protéiniques, c'est à dire avec les segments hydrophobes des protéines et des lipides d'où il en résulte que les membranes cellulaires ne jouent plus le rôle de barrière perméable. On observe alors l'excrétion de petites molécules de métabolites dans le fluide cellulaire et la décomposition des polymères biologiques [130].

Les bactéries gram-négatif (Gram⁻) sont en général moins sensibles aux agents de surface que les bactéries gram-positif (Gram⁺) [9]. La résistance des bactéries Gram⁻ à l'effet anti-microbial des agents de surface s'explique par la composition de leurs parois cellulaires. En effet, les lipoprotéines, les lipopolysaccharides et les phospholipides constituent plus de 80% en poids sec de la paroi cellulaire chez les bactéries gram⁻. Dans la paroi des bactéries Gram⁺, on note peu de protéines et l'absence de

lipopolysaccharides [130].

La principale action des agents de surface sur les bactéries est la destruction ou la dissolution de la couche de lipopolysaccharides ou lipopolyosides ce qui augmente la perméabilité de la paroi cellulaire. Les bactéries possédant une surface riche en lipides sont plus résistantes à l'action des agents de surface. Des cellules soumises à l'action d'une lipase (enzyme qui dégrade les lipides) ont une résistance plus faible aux agents de surface. La résistance des microorganismes aux substances antibactériennes est fréquemment attribuée à la diminution de la perméabilité de l'enveloppe cellulaire à ces substances ou à la dégradation enzymatique de celles-ci. *Pseudomonas aeruginosa* possède une sensibilité naturellement faible à différents agents anti-microbiens incluant les agents de surface à cause de la faible perméabilité de sa membrane externe. Celle-ci est constituée de phospholipides, de protéines et de lipopolyosides [130]. Les *Pseudomonas* sont des bacilles gram⁻ capables d'utiliser différentes sources de carbone tels que glucides, acides aminés, acides organiques, lipides et corps aromatiques benzéniques, phénoliques, terpéniques etc... [22].

La toxicité des agents de surface cationiques pour les microorganismes augmente avec le pH. Les agents de surface anioniques sont moins bactéricides que les agents de surface cationiques à un pH neutre mais leur toxicité augmente avec la diminution du pH. Les agents de surface non ioniques sont en général peu bactéricides [9].

En général, les bactéries Gram⁻ sont moins sensibles aux agents de surface anioniques que les bactéries Gram⁺ mais les deux types de bactéries sont sensibles aux agents de surface cationiques [9].

Les cations divalents tels que Ca²⁺ favorisent l'effet anti-bactérien du TBS et d'autres agents de surface anioniques probablement en permettant l'adsorption de ceux-ci sur la membrane cellulaire et leur pénétration à travers celle-ci [131].

La présence de protéines ou d'autres matières organiques peut également diminuer considérablement l'activité bactéricide des agents de surface [9].

Le seuil de concentration limite varie largement et dépend du type d'agent de surface, de la présence d'autres substrats, de protéines,

d'espèces bactériennes particulières, de la concentration des bactéries et du degré d'acclimatation ou d'adaptation de celles-ci [9]. Selon Swisher [9], l'effet inhibiteur des agents de surface anioniques devient complètement évident dans l'intervalle de concentration compris entre 100-1000 ppm. Knöpp [132] indique, cependant, un seuil d'inhibition, dans la dégradation bactérienne des protéines, entre 10-20 ppm de TBS, 1-2 ppm de LAS et Meinck [133] une inhibition de la dégradation du glucose, par les espèces *Escherichia*, évidente pour des concentrations de TBS de l'ordre de 60-120 ppm. Certaines bactéries autotrophes, en particulier les espèces intervenant dans la nitrification, peuvent être inhibées par des concentrations d'agent de surface de l'ordre de 10 ppm [6]. La consommation d'oxygène, dans un test de demande biochimique en oxygène (DBO), a été inhibée par 60 ppm d'ABS commercial [134].

La concentration des cellules bactériennes joue un rôle important dans l'effet de l'agent de surface, selon Fisher [135]. Il nota qu'avec 5000 ppm de bactéries *Mycobacterium Phlei*, la respiration fut presque totalement inhibée par 1000 ppm de TBS alors que l'inhibition fut négligeable avec 15000 ppm de bactéries. Harrisson [136] aboutit à la même conclusion concernant l'importance de la concentration des microorganismes. La respiration a été complètement inhibée par 30 ppm de LAS avec une concentration de 250 ppm de cellules bactériennes tandis qu'avec 750-1500 ppm de bactéries, la concentration limite d'inhibition a été autour de 150 ppm LAS. Dans certaines circonstances, la concentration limite de l'agent de surface peut être extrêmement élevée. Ainsi Payne [137] remarque une croissance optimale de *Pseudomonas C₁₂B* en présence de 4000 ppm de lauryl sulfate de sodium (LSS) tandis que Divo [87] indique celle de *Pseudomonas micro-C* avec 1000 ppm de LAS comme seule source de carbone. Anderson [138] obtient également une bonne croissance bactérienne en présence de 5000 ppm TBS.

Le contact des microorganismes avec des agents de surface entraîne non seulement un réarrangement chimique des cellules mais également un changement des propriétés morphologiques et physiologiques.

L'utilisation des agents de surface comme anti-mousse dans un milieu de culture de *Bréviobactérium* s.p. a entraîné une diminution de la taille des cellules. Des agents de surface non ioniques ont entraîné un changement morphologique des colonies et la rupture du processus de formation de spores chez les actinomycètes *streptomyces roseoflavus*. La formation des flagelles des bactéries est affectée par les agents de surface. Des agents de surface anioniques (dodécylsulfate, dodécylbenzène sulfonate et tipol) ont empêché la formation des flagelles latéraux et péritriches mais pas celle des flagelles monotriches chez *vibrio parahaemolyticus*. L'absence des flagelles polaires a également été notée chez des mutants de *P.aeruginosa* résistants aux agents de surface cationiques [130].

Les agents de surface exercent un effet sur les microorganismes qui forment des pigments. Le dodécylsulfate stimule la biosynthèse de la prodigiosine (pigment rouge) par *Serratia marcescens*. Cette stimulation serait due à l'augmentation des segments chargés négativement sur l'enveloppe cellulaire. Ces segments résultent de l'association du dodécylsulfate avec les composants de celle-ci. Un effet inverse a été observé sur une culture de *P. aeruginosa* adaptée aux agents de surface cationiques. Pour ces bactéries, le développement de résistance aux composés ammonium quaternaires (agents de surface cationiques) a été accompagné par la perte de la capacité de celles-ci de synthétiser des pigments c'est à dire que *P.aeruginosa* a perdu une de ses caractéristiques de diagnostic. Cette variabilité complique la détermination des bactéries en contact constant avec les agents de surface. La variabilité morphologique significative des genres *Pseudomonas* et alcaligènes a empêché la détermination quantitative de la composition de leurs espèces dans un traitement d'épuration d'alkylbenzènesulfonates de sodium [130].

III.3. Effets des tensio-actifs sur la faune et la flore:

Les effets toxiques des détergents pour les poissons apparaissent généralement à partir de concentrations de l'ordre de 2-3 ppm [6]. Les détergents anioniques exercent un effet toxique sur le poisson à partir d'une concentration de 6.5 mg/l en moyenne dans les eaux dures. Ils sont

cependant visiblement incommodés dès que la concentration en alkylbenzène sulfonates (ABS) atteint 1-2 ppm et dans le cas de détergents linéaires de type alkylaryl sulfonates linéaires les limites de concentration sont plus faibles [17]. La concentration des détergents supportée par les salmonidés ne dépasse pas 1 mg/l [21]. L'effet toxique des détergents sur le poisson se traduit principalement par la destruction des membranes muqueuses surtout branchiales. Les branchies du poisson prennent un aspect noirâtre et une importante quantité de mucus est produite aussi bien sur celles-ci que sur la surface du corps [139].

Les détergents anioniques sont toxiques pour les protozoaires à partir d'une concentration de 5 mg/l [139].

La croissance des végétaux aquatiques peut être inhibée par des doses élevées de tensio-actifs tandis qu'une dose de 100 ppb suffit à ralentir la croissance des posidonies ou herbier sous-marin et une dose de 250 ppb / jour à décolorer et à flétrir les feuilles [140].

En Méditerranée, les détergents seraient en grande partie responsables de la <<régression quasi générale de l'herbier sous-marin>>. Cet herbier (Posidonie) ou peuplement végétal de l'infra-littoral (jusqu'à 38 mètres de profondeur) <<compense la pauvreté du phytoplancton et sert de frayère à de nombreuses espèces de poissons.>> [141]. Les détergents augmentent la perméabilité des membranes cellulaires du phytoplancton, facilitant ainsi le passage des substances dissoutes et l'échappement des constituants cellulaires ce qui entraîne la mort des cellules [140].

Des concentrations de produits tensio-actifs inférieures au ppm peuvent avoir un impact sur les organismes vivants. Ils peuvent agir sur les larves à des doses très faibles (25 à 50 ppb) en entravant leur développement et sur la physiologie des adultes en perturbant les processus de fertilité et de reproduction [142].

Les détergents augmentent la toxicité du pétrole pour la faune et la flore en facilitant la <<pénétration des fractions toxiques du pétrole dans les cellules vivantes.>> [141].

Les tensio-actifs augmentent la toxicité des pesticides organophosphorés et des hydrocarbures. La déforestation littorale sur la côte méditerranéenne

est due à la projection d'embruns phytotoxiques provenant de la couche superficielle des eaux riches en tensio-actifs et en hydrocarbures [140].

Monnier-Besombes [140] indique que le développement anormal d'animaux ou de végétaux exposés à des produits tensio-actifs peut être lié à des perturbations d'ordre physiologique. D'après cet auteur, les membranes et le système enzymatique sont les plus directement atteints par ces produits.

Les détergents agissent sur la structure lipoïdique et tissulaire. Ils inhibent les processus respiratoires chez le poisson en diminuant l'activité de l'enzyme succindéhydrogénase [139].

III.4. Effets des tensio-actifs sur l'homme et les animaux supérieurs:

L'absorption intestinale de substances étrangères toxiques ou potentiellement cancérigènes (hydrocarbures) serait favorisée par les agents de surface [6].

Il peut y avoir inhibition des enzymes digestives chez le chien avec irritation du tractus intestinal et sécrétion abondante du mucus [140]. L'absorption d'un hydrocarbure aromatique polycyclique (3-4 Benzopyrène) a été facilitée chez la souris lorsque celui-ci fut mélangé avec une solution aqueuse de tensio-actif ce qui a augmenté à long terme le nombre de cancers de l'estomac chez celle-ci [140].

III.5 Effets des tensio-actifs sur les processus d'épuration biologique:

Les tensio-actifs peuvent inhiber les processus d'oxydo-réduction qui interviennent dans la métabolisation des matières organiques dans les milieux naturels [6]. Ils peuvent inhiber l'auto-épuration de l'eau à des concentrations très faibles de l'ordre de 0.05 mg/l [21]. Ils ralentissent ou empêchent le transfert d'oxygène et provoquent des mousses importantes; celles-ci sont stabilisées par les protéines ou les produits de dégradation de celles-ci surtout en présence des ions calcium. Elles diminuent les échanges gazeux aux interfaces c'est à dire la pénétration de l'oxygène dans le milieu et l'échappement du CO₂ (fig.27) [143].

Des concentrations de 0.3 à 0.4 mg/l en alkylbenzènesulfonate peuvent entraîner la formation de quantités importantes de mousses dans certains cours d'eau [6].

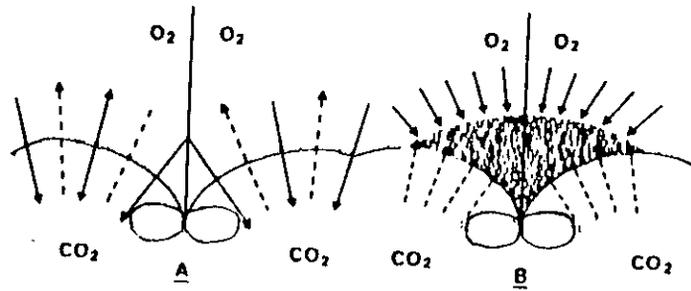


Fig.27: Influence de la présence des mousses superficielles [143].

En A, l'échange gazeux se déroule normalement c'est à dire dans de bonnes conditions, le gaz carbonique peut s'échapper, l'entrée de l'air dans l'effluent est maximale. En B, l'effluent ne peut être atteint par l'oxygène, le gaz carbonique ayant tendance à être retenu par la mousse .

La vitesse de transfert en oxygène peut être exprimée par [49]:

$$N = K_L A \cdot (C_s - C_l) \quad (13)$$

ou

$$N/V = dC_l/dt = K_L A/V \cdot (C_s - C_l) = K_{L_a} \cdot (C_s - C_l) \quad (14)$$

Avec:

$$K_L = -D_l/L$$

N = masse d'oxygène transféré par unité de temps

D_l = coefficient de diffusion de transfert de masse

L = épaisseur du film liquide

C_s = concentration de saturation en oxygène à l'interface liquide/air

C_l = concentration en oxygène dans la masse du liquide

$C_s - C_l$ = déficit en O₂

A = Aire de la surface de transfert (aire interfaciale de transfert)

V = volume du liquide aéré

K_{L_a} = coefficient global de transfert en O₂

La concentration de saturation en oxygène C_s est diminuée en présence de détergents [17].

En tenant compte de l'effet de la pollution, on définit le rapport α [49]:

$$\alpha = K_{l_2}(\text{eau usée}) / K_{l_2}(\text{eau pure})$$

Les tensio-actifs, en se concentrant à l'interface, forment un film de molécules qui empêchent la diffusion de l'oxygène dans l'eau. Il y a d'abord diminution du rapport α en fonction de la concentration en agents de surface jusqu'à saturation de l'interface. L'augmentation de la concentration n'aura plus d'effet ensuite car la diminution de K_l est compensée par l'augmentation du facteur A/V à cause de la diminution de la dimension des bulles d'aération en présence de tensio-actifs [49] (fig.28) [17].

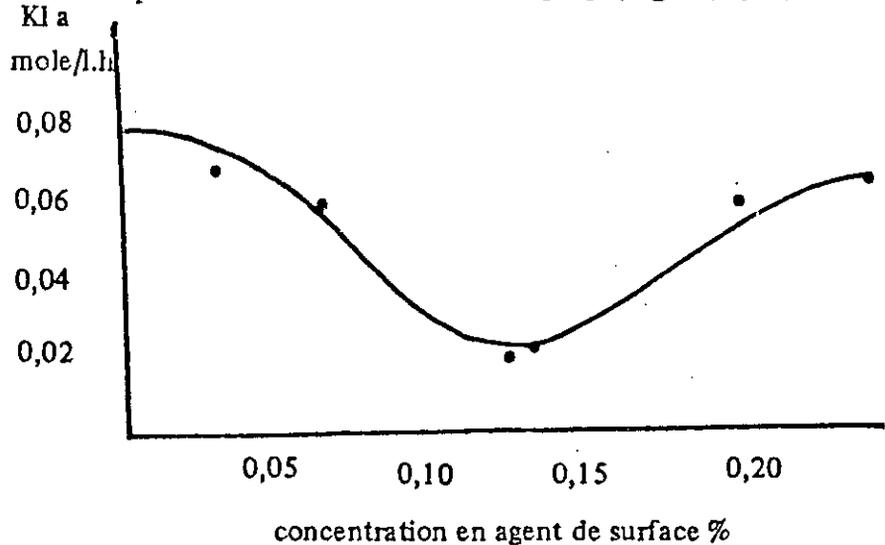


Fig.28: Influence de la présence d'agent de surface sur le coefficient de transfert d'oxygène [17].

La valeur du coefficient α suivant le type d'eau usée utilisée est indiquée dans les tableaux 7 et 8 suivants:

Tableau N° 7: Coefficient α [16]

Polluant	Concentration (mg/l)	α
Peptone	25	0.50
-	1000	0.20
Détergent	50	0.35

Tableau N° 8: Valeur du coefficient α pour divers types d'eau usée [49].

Type d'eau	α
Eau	1.0 (par définition)
Eau usée urbaine	0.8 - 0.95
Eau usée urbaine reconstituée	0.8 - 0.85
Fibre synthétique	0.45 - 0.65
Conserverie	0.80
Industrie de savons et détergents	0.6 (brute) - 0.85 (épurée)
Raffinerie de pétrole	0.5 (brute) - 0.90 (épurée)
Papeterie	0.65 - 0.90

Les agents de surface, à partir d'une concentration de 4 à 5 mg/l, empêchent la floculation en maintenant les matières organiques en suspension. Ils gênent également la décantation primaire et leur présence favorise le dépôt des graisses dans les égoûts [6]. Ils sont aussi responsables de l'augmentation des pertes de charge dans les filtres à sable et sont à

l'origine de la destruction des bactéries de l'épuration (pouvoir antiseptique des détergents cationiques) [17].

L'efficacité d'épuration par boues activées est sérieusement affectée par les détergents et autres composés tensio-actifs car ils réduisent la vitesse de transfert de l'oxygène à l'interface air-eau et la décantation du floc biologique. Ces problèmes sont très répandus dans les stations d'épuration traitant des eaux usées domestiques à cause de l'utilisation ménagères des détergents et ils peuvent également exister dans celles qui traitent certaines eaux usées industrielles notamment les eaux usées de l'industrie textile [144]. LIEBMANN [145] situe un seuil de toxicité pour les boues activées entre 7-9.5 mg/l de tensio-actifs alkylarylsulfonates.

GAID [17] indique un seuil de concentration de 15 à 20 ppm de détergents anioniques pour la détérioration des processus d'épuration par boues activées ou lits bactériens. Cependant, d'après PESSON [6], les lits bactériens ne sont affectés qu'à partir d'une concentration de 30 mg/l en agents de surface. Selon SWISHER [9], certains tensio-actifs peuvent être toxiques ou inhiber les bactéries à des concentrations de l'ordre de 25-50 ppm. Ils peuvent être néanmoins biodégradés à des concentrations beaucoup plus élevées dans les systèmes de boues activées du fait que ces tensio-actifs soient adsorbés par celles-ci et dégradés rapidement ce qui maintient leur concentration dans la liqueur mixte et dans les boues au dessous de la limite critique. Cependant, si une irrégularité intervient dans le processus de dégradation avec l'interruption momentanée de celle-ci, les sites d'adsorption ne sont pas libérés ce qui entraîne l'augmentation de la concentration du tensio-actif dans la phase liquide de la liqueur mixte et par conséquent l'augmentation de l'inhibition des microorganismes. Le même auteur indique que même si le tensio-actif n'est pas toxique pour les bactéries, la même situation peut se produire si le seuil de concentration pour la formation de mousse est atteint. Celle-ci peut faire flotter les boues activées hors de la liqueur mixte ce qui diminue leur concentration et par conséquent entraîne la diminution de la biodégradation. Il ajoute également que cette situation peut être évitée en opérant avec des concentrations au dessous du seuil toxique ou de formation de mousse, par exemple de l'ordre de 5-10 ppm, rencontrées dans les eaux usées.

Enfin , il a été montré que les tensio-actifs inhibent les processus anaérobies dans les digesteurs et les fosses septiques [6]. L'inhibition de la digestion anaérobie des boues par les tensio-actifs a été également rapportée par GILBERT [74].

Les seuils de toxicité pour la digestion anaérobie pour certains types de tensio-actifs sont indiqués dans le tableau 9.

Tableau N° 9: Seuils de toxicité des substances toxiques en épuration biologique d'après LIEBMANN [145].

Substance toxique	exprimée en	Valeur limite digesteur
Alkylarylsulfonate	Substance active	9.5 mg/l
Alkylsulfate	Substance active	>40 mg/l
Détergents cationiques	Substance active	10 mg/l
Détergents non ioniques	Substance active	5 mg/l

CHAPITRE IV

Tests de biodégradabilité en laboratoire des tensio-actifs anioniques alkylbenzènesulfonates (LAS et ABS), alkylsulfates (LSS) et des alkylbenzènes linéaires (LAB)

Cette partie comporte l'étude expérimentale de la biodégradabilité des tensio-actifs LAS, LSS, ABS et des alkylbenzènes linéaires LAB.

IV.1. Evaluation de la biodégradabilité des tensio-actifs LAS, LSS et du LAB par le procédé des boues activées:

IV.1.1. Dispositif expérimental et description des essais de biodégradabilité:

Le dispositif expérimental que nous avons utilisé est schématisé en figure N°29. Il consiste en une série de cellules pouvant contenir chacune 3 litres de liqueur mixte (boues activées et eau usée). Des diffuseurs d'air permettent l'aération et le mélange complet de cette liqueur. Le système fonctionne en semi-continu c'est à dire que les boues activées sont alimentées en une seule fois toutes les 24 heures. Le prélèvement quotidien d'un certain volume de liqueur mixte permet de fixer le temps de séjour θ_c des boues activées.

Les boues activées utilisées dans les essais proviennent d'une station d'épuration des eaux usées urbaines. Leur alimentation est composée d'un milieu synthétique avec ajout des tensio-actifs LAS ou LSS ou de LAB.

- Composition du milieu de culture des boues activées:

* Milieu synthétique de base:

Le milieu synthétique de base utilisé pour l'alimentation des boues activées est une solution composée soit de nutraforce et d'eau de robinet pour l'apport des oligo-éléments (1^{er} essai), soit de labnamine et d'eau de robinet (2^{ème} essai).

Le nutraforce et le labnamine sont des produits alimentaires en poudre contenant des éléments nutritifs pouvant permettre la croissance des microorganismes et ayant respectivement un rapport DBO_5/DCO égal à 0.55 et 0.53. Ces influents sont donc facilement épurables par les traitements biologiques classiques.

La composition du nutraforce et celle du labnamine telles que données par le fournisseur est indiquée dans les tableaux N°10 et N°11 respectivement.

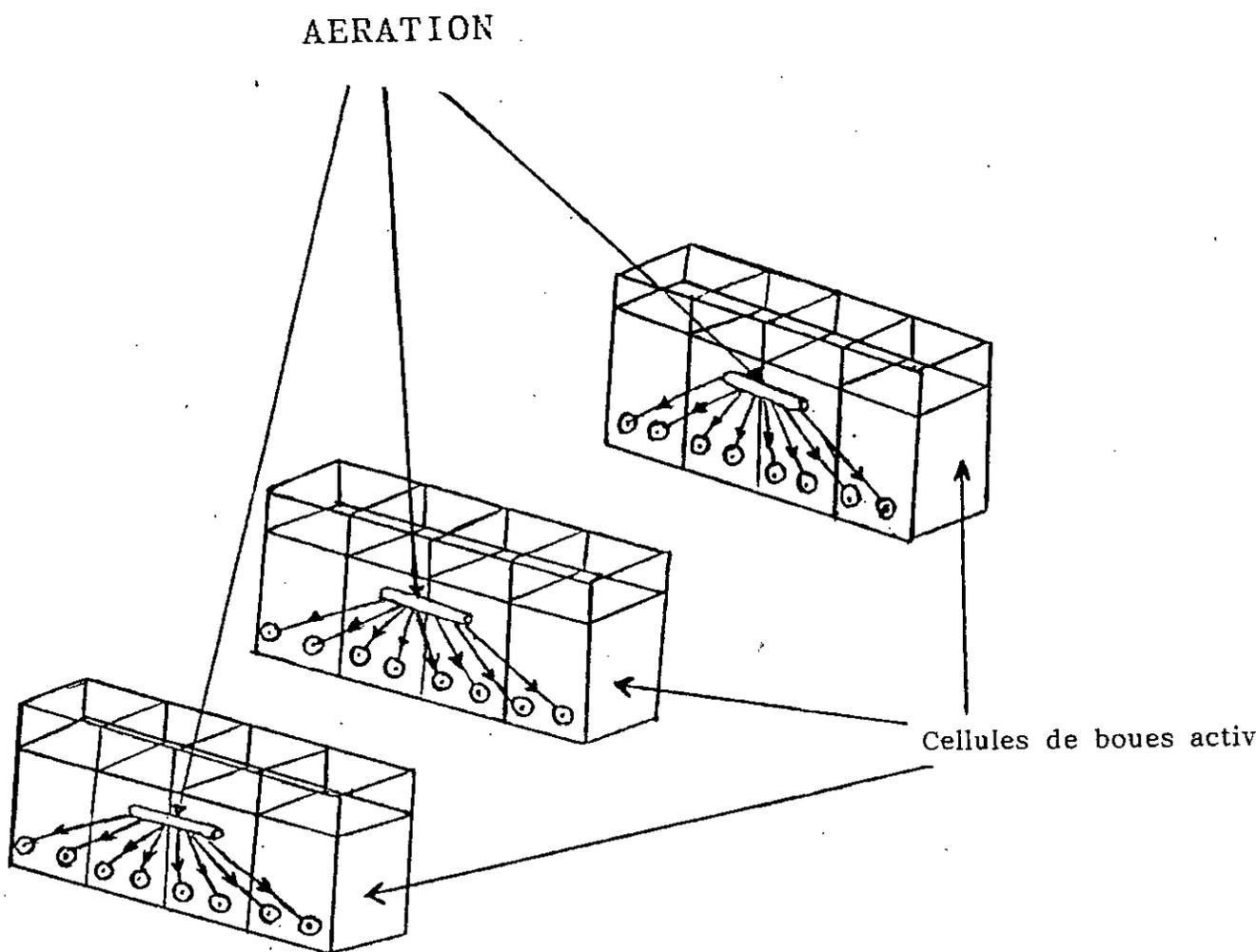


Fig.29: Schéma du montage expérimental.

Tableau N° 10: Composition nutritive du nutraforce.

Eléments	Unité	Concentrations par 100 g de poids sec
Calories	(cal)	376.0
Protéines	(g)	24.5
Lipides	(g)	5.5
Glucides	(g)	58.5
Acide Linoelique	(g)	2.5
Vitamine A	(U.I.)	6000.0
Vitamine D	(U.I.)	310.0
Vitamine E	(U.I.)	25.0
Vitamine C	(mg)	50.0
Thiamine B1	(mg)	1.75
Riboflavine B2	(mg)	1.25
Niacine B3	(mg)	35.75
Vitamine B6	(mg)	3.9
Vitamine B12	(mg)	0.000625
Acide folique	(mg)	0.25
Biotine	(mg)	0.02
D-Pantothénate	(mg)	2.05
Calcium	(mg)	900.0
Phosphore	(mg)	875.0
Fer	(mg)	25.5
Iode	(mg)	0.09
Magnésium	(mg)	375.0
Cuivre	(mg)	3.07
Zinc	(mg)	10.65
Potassium	(mg)	1210.0
Manganèse	(mg)	5.0
Sodium	(mg)	640.0

Tableau N° 11: Composition nutritive du labnamine

Eléments	Unité	Concentrations par 100 g de poids sec
Calories	(cal)	410
Protides	(g)	14.0
Lipides	(g)	4.3
Glucides	(g)	77.7
Acide folique	(mcg)	20.0
Vitamine A	(U.I.)	1500
Vitamine E	(mg)	2.0
Vitamine C	(mg)	40.0
Vitamine B1	(mg)	0.4
Vitamine B2	(mg)	0.6
Vitamine B6	(mg)	1.0
Vitamine B12	(mcg)	2.0
Ca-Pantothénate	(mg)	3.0
Niacine	(mg)	6.0
Calcium	(mg)	300

**** Tensio-actifs et LAB:**

Le tensio-actif anionique LAS, commercialisé par l'ENAD, est composé de différents homologues et isomères. Il est synthétisé à l'ENAD par sulfonation du LAB. Celui-ci est constitué d'alkylbenzènes linéaires dont le nombre de carbone est réparti essentiellement entre C₁₀ et C₁₃ [146] .

Le tensio-actif anionique laurylsulfate de sodium (LSS) CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na fourni par le laboratoire de génie de l'environnement de l'école polytechnique de Montréal est de type alkylsulfate primaire.

IV.1.1.1 Premier essai: Etude de la biodégradabilité du tensio-actif LAS:

Le 1^{er} essai comporte l'étude de la biodégradabilité du LAS en présence du substrat nutraforce.

A cet effet, sept cellules de boues activées C1 à C7 ayant un temps de séjour θ_c égal à 4; 6; 8; 10; 12; 15 et 8 jours respectivement ont été alimentées quotidiennement durant 28 jours avec une solution de nutraforce ayant une DCO totale de 487.80 mg/l et une DCO soluble de 341.46 mg/l. La 7^{ème} cellule recevait également, en plus de nutraforce, 10.8 mg/l de la matière active LAS, soit une DCO totale et une DCO soluble à l'influent égales à 508.80 mg/l et à 359.94 mg/l respectivement. Cette période de 28 jours devait permettre l'acclimatation des boues activées au nutraforce et au LAS.

Le LAS est introduit ensuite, à partir du 29^{ème} jour, à une concentration de 10.8 mg/l dans les cellules de boues activées C1 à C6 et de 21.6 mg/l dans la cellule de boues activées C7.

IV.1.1.2 Deuxième essai: Etude de la biodégradabilité des tensio-actifs LAS, LSS et du LAB:

Le 2^{ème} essai comporte l'étude de la biodégradabilité, en présence de labnamine, des tensio-actif LAS et LSS (périodes A, B et C) et du LAB (période C). Les trois périodes A, B et C ont une durée de 100; 78 et 135 jours respectivement. Le temps de séjour θ_c des boues activées est fixé à 30 jours (le système d'épuration fonctionne en aération prolongée) pour les périodes A et B. En ce qui concerne la période C, θ_c est variable à cause du volume de purge des boues activées qui varie comme indiqué dans le tableau N° 12.

Tableau N° 12: Variation du volume de purge des boues activées.

Jour	Volume de purge des boues activées (ml/j)	θ_c (jours)
1-26	100	30
27-47	25	120
48-60	500	6
61-135	25	120

Les conditions opératoires régissant les trois périodes A, B et C peuvent être caractérisées comme suit:

*** Période A:**

Cinq cellules de boues activéesensemencées avec 25 ml de boues activées d'une station d'épuration des eaux usées urbaines ont été alimentées durant cette période comme indiqué dans le tableau N° 13:

Tableau N°13: Composition des substrats.

Cellule Influent	C1	C2	C3	C4	C5
Labnamine (mg/l)	100	100	100	100	100
LAS (mg/l)	0	17.85	17.85	17.85	0
LSS (mg/l)	0	0	0	0	13.65
DCO totale de l'influent (mg/l)	169.78	205.11	205.11	205.11	207.18

*** * Période B:**

Compte tenu de la détérioration de l'épuration durant la période A, l'ajout du LAS dans les cellules de boues activées C2, C3 et C4 a été interrompu et celles-ci ont étéensemencées, au début de cette période, avec les microorganismes provenant de C1 ou C5 comme indiqué dans le tableau N° 14.

L'alimentation des boues activées durant cette période a été effectuée selon le tableau N° 15.

Tableau N° 14: Ensemencement des cellules de boues activées C2, C3 et C4

Volume d'ensemencement (ml)			
Cellules de boues activées ensemencées			
Type d'ensemencement	C2	C3	C4
Boues activées de C1	500	0	0
Surnageant après décantation des boues activées de C1	0	0	500
Boues activées de C5	0	500	0

Tableau N° 15 : Composition des substrats.

cellule	C1	C2	C3	C4	C5
Influent					
Labnamine (mg/l)	200	200	200	200	200
LSS (mg/l)	0	0	0	0	13.65
DCO influent (mg/l)	264.62	264.62	264.62	264.62	302.02

***** Période C:**

Cette période comporte l'étude de la réponse des cellules de boues activées à différents chocs tels que : augmentation de la concentration de labnamine, introduction brutale et augmentation de la concentration des tensio-actifs LAS ou LSS, variation de la concentration des microorganismes par le changement du volume de purge des boues activées (voir tableau N° 12).

Elle comporte également l'étude de la biodégradabilité du LAB. A cet effet, une cellule de boues activées C6 destinée à recevoir ultérieurement le LAB a été mise en marche. Celle-ci est identique aux 5 précédentes et a été ensemencée au départ avec le même volume de boues activées (25 ml) provenant de la même station d'épuration des eaux usées.

Au cours de cette période qui a duré 135 jours, la concentration de labnamine a été doublée et portée à 400 mg/l ce qui correspond à une DCO de 433.74 mg/l. Les cellules C1 à C6 contenant les boues activées ont été alimentées durant tout l'essai de biodégradabilité avec 400 mg/l de labnamine. Outre le labnamine, celles-ci ont également reçu le LAS (cellules C1, C2, C3, C4 et C5), le LSS (cellules C1, C2 et C5) et le LAB (cellule C6). Les tensio-actifs LAS ou LSS ont été ajoutés à différentes concentrations dans les cellules de boues activées. Le LAB a été introduit dans la cellule C6 à une concentration de 10 mg/l.

Les concentrations de labnamine, LAS, LSS et LAB étudiées au cours de cet essai ainsi que les DCO correspondantes sont indiquées dans le tableau N°16. Le tableau N°17 indique la durée des tests pendant l'ajout des tensio-actifs LAS ou LSS et du LAB.

Tableau N° 16: Composition, concentrations et DCO des différents substrats.

Cellules de boues activées	Produit(s) testé(s)	DCO (mg/l)
C1, C2, C3, C4, C5, C6	400 mg/l labnamine	433.74
C1, C5	400 mg/l labnamine+13.65 mg/l LSS	471.14
C1, C2	400 mg/l labnamine +27.3 mg/l LSS	510.66
C2	400 mg/l labnamine +54.6 mg/l LSS	586.97
C2, C3, C4, C5	400 mg/l labnamine +8.7 mg/l LAS	451.67
C2, C3, C4, C5	400 mg/l labnamine +13 mg/l LAS	459.85
C1, C2, C3, C4, C5	400 mg/l labnamine +18 mg/l LAS	469.35
C1, C3, C4, C5	400 mg/l labnamine +26 mg/l LAS	484.56
C1, C3, C4, C5	400 mg/l labnamine +30 mg/l LAS	492.17
C1, C3, C4, C5	400 mg/l labnamine +50 mg/l LAS	530.19
C6	400 mg/l labnamine +10 mg/l LAB	443.86

Tableau N° 17: durée des tests.

Concentration de la matière active ou du LAB à l'influent	Durée des tests (jours) dans les différentes cellules de boues activées					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
13.65 mg/l LSS	9-47	-	-	-	1-8	-
27.3 mg/l LSS	48-57	59-77	-	-	-	-
27.3 mg/l LSS	-	79-81	-	-	-	-
54.6 mg/l LSS	-	82-135	-	-	-	-
8.7 mg/l LAS	-	9-14	9-14	9-14	9-14	-
13 mg/l LAS	-	30-47	30-47	30-47	30-47	-
18 mg/l LAS	57-58	48-58	48-58	48-58	48-58	-
26 mg/l LAS	59-77	-	59-77	59-77	59-77	-
50 mg/l LAS	78-79	78-79	78-79	78-79	78-79	-
50 mg/l LAS	82-83	-	82-83	82-83	82-89	-
30 mg/l LAS	85-90	-	87-90	-	90-93	-
10 mg/l LAB	-	-	-	-	-	9-63

IV.1.2. Méthodes analytiques:

IV.1.2.1. Analyses physico-chimiques:

Afin de suivre l'évolution de l'épuration, nous avons effectué des analyses de différents paramètres tels que DCO, DBO, pH, matière active, LAB et croissance des microorganismes assimilés aux matières volatiles en suspension (MVES).

La DCO et les MVES ont été mesurées selon les méthodes décrites dans le standard methods [147].

La DBO a été mesurée par la méthode manométrique. L'appareillage utilisé est un respiromètre Hach [49].

La biodégradation des tensio-actifs LAS et LSS a été suivie par la méthode au bleu de méthylène. Quelques analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été également utilisées en ce qui concerne le LAS.

- Méthode au bleu de méthylène [47]:

Le principe est basé sur la formation d'un complexe tensio-actif anionique-bleu de méthylène (méthylène blue active substance ou MBAS). Ce complexe peut être extrait par le chloroforme et dosé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 650 nm. La méthode détaillée est donnée en annexe I.

- Méthode par chromatographie en phase gazeuse (CPG):

Cette méthode qui nécessite au préalable la désulfonation chimique ou biologique (biodésulfonation) du LAS nous a permis de suivre qualitativement la biodégradation de ce tensio-actif.

Une désulfonation chimique du LAS a été effectuée par ébullition, en présence d'acide phosphorique concentré, du résidu obtenu après évaporation d'un litre de solution contenant le LAS. Les produits volatils (hydrocarbures) sont ensuite extraits avec de l'hexane [148].

La biodégradation du LAS après sa biodésulfonation est déterminée de la façon suivante: 100 ml d'échantillon à analyser et 20 ml d'hexane sont introduits dans une ampoule à decanter. Après agitation durant 15 minutes et décantation, la phase organique est recueillie. Celle-ci est ensuite déshydratée à l'aide de sulfate de sodium anhydre.

L'analyse chromatographique des hydrocarbures contenus dans l'échantillon obtenu (après désulfonation chimique du LAS) ou dans l'effluent à analyser (après biodésulfonation du LAS par les microorganismes) et extraits avec de l'hexane a été effectuée sur un appareil chromatographique Philips 1500 dont les caractéristiques et les conditions opératoires sont comme suit:

- 1) Colonne capillaire: BP5 (silice fondue), phase apolaire, longueur:
25 m x 0.53 mm
- 2) Détecteur: - Type: Ionisation de flamme (F.I.D.)
- Température: 300° c
- 3) Four: 80° à 250° c à raison de 3°/min
- 4) Injecteur: 250° c, quantité injectée 0.1 à 2 µl
- 5) Gaz vecteur: azote 0.4 bar. 2 ml/min

En ce qui concerne la biodégradation du LAB, celle-ci a été suivie par des analyses chromatographiques avec le même appareillage et dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour le suivi de la biodégradation du tensio-actif LAS.

IV.1.2.2. Analyses bactériologiques:

Quelques analyses bactériologiques ont été effectuées durant le 2^{ème} essai, à titre indicatif, au laboratoire de microbiologie de l'EPEAL de BEN-OMAR et du Centre National de Médecine Sportive (CNMS) de Ben Aknoun, sur des échantillons de boues activées prélevés dans les différentes cellules afin de déterminer certains types de bactéries ayant pu intervenir dans l'épuration. Les méthodes ainsi que la composition des différents milieux utilisés pour les analyses bactériologiques sont indiquées de façon détaillée en annexe II.

IV.1.3 Résultats et discussions:

IV.1.3.1 Résultats du premier essai:

Nous avons effectué, durant cet essai, une étude sur la biodégradabilité du LAS en présence du substrat organique nutraforce. Outre le nutraforce, les cellules de boues activées ont reçu le LAS à une concentration de 10.8 mg/l (à partir du 29^{ème} jour pour les cellules C1 à C6 et du 1^{er} jour pour C7) et de 21,6 mg/l à partir du 29^{ème} jour en ce qui concerne la cellule C7.

Les analyses ont porté sur l'évolution de la DCO, de la matière active LAS et des MVES. Les résultats obtenus sont illustrés sur les figures 30 à 36.

IV.1.3.1.1 Evolution de la DCO:

On relève, entre le 1^{er} et le 25^{ème} jour, pour les cellules de boues activées C1 à C4 (fig.30 a à 30 d), C5 et C6 (fig.31 a et 31 b) des valeurs de DCO totale à l'effluent variant entre 62.26 et 252.92 mg/l (soit un rendement d'élimination fluctuant entre 48.15% et 87.24 %) pour une DCO totale à l'influent égale à 487.80 mg/l.

Pour la cellule C7 (fig.31 c), la DCO totale de l'effluent varie entre 140 et 229.52 mg/l (soit entre 54.89% et 72.48% de rendement d'élimination) pour une DCO totale à l'influent égale à 508.80 mg/l. JANICKE [149] a trouvé 83-96% d'élimination de la DCO durant la biodégradation d'un LAS commercial dans le procédé d'épuration par boues activées en continu.

On constate également une augmentation des DCO solubles des effluents pour toutes les cellules (fig.32 et 33), après l'ajout de 10.8 mg/l de LAS dans les cellules de boues activées C1 à C6 (339.45 mg/l de DCO soluble à l'influent) et l'augmentation de la concentration de LAS dans C7 de 10.8 mg/l à 21.6 mg/l (la DCO soluble à l'influent de C7 est égale à 376.02 mg/l) ce qui a entraîné une diminution des rendements d'épuration qui varient entre 36.27 et 79.64 % . Mc Clelland [150] a remarqué, dans un système d'épuration par boues activées en continu, une détérioration significative dans l'utilisation du substrat avec 5 ppm de TBS ou 10 ppm de LAS à l'influent.

IV.1.3.1.2 Evolution de la matière active:

La concentration de la matière active (MBAS) à l'effluent varie, entre le 31^{ème} et le 39^{ème} jour, entre 0.2 et 1.8 mg/l (entre 83.33 et 98.15 % de rendement d'élimination) pour les cellules C1 à C4 (fig.34 a à 34 d) et C5 à C6 (fig.35 a et 35 b) pour une concentration de 10.8 mg/l de LAS à l'influent. En ce qui concerne C7 (fig.35 c), elle a atteint 0.03 mg/l (99.72 % de rendement d'élimination) au 29^{ème} jour pour une concentration de LAS à l'influent de 10.8 mg/l et a fluctué entre 1.3 et 2.8 mg/l (entre 87 et 93.98% de rendement d'élimination) avec une concentration de 21.6 mg/l de LAS à l'influent. PITTER [112,151,152] a obtenu 90-91% d'élimination de MBAS de différents tensio-actifs synthétiques (LAS) par boues activées.

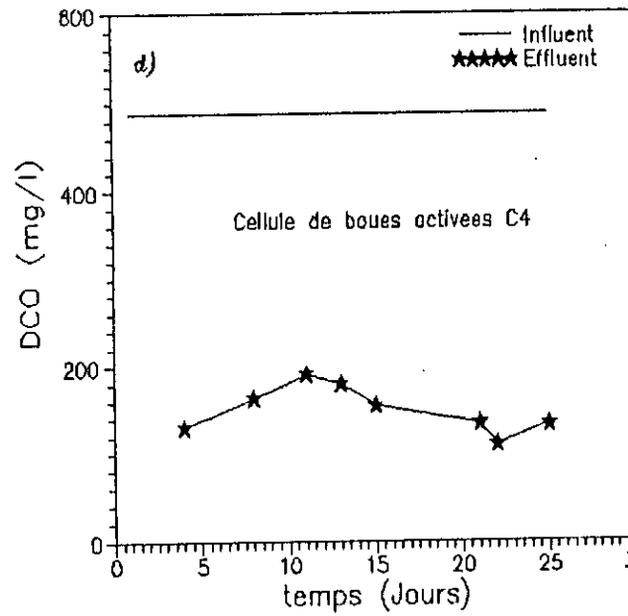
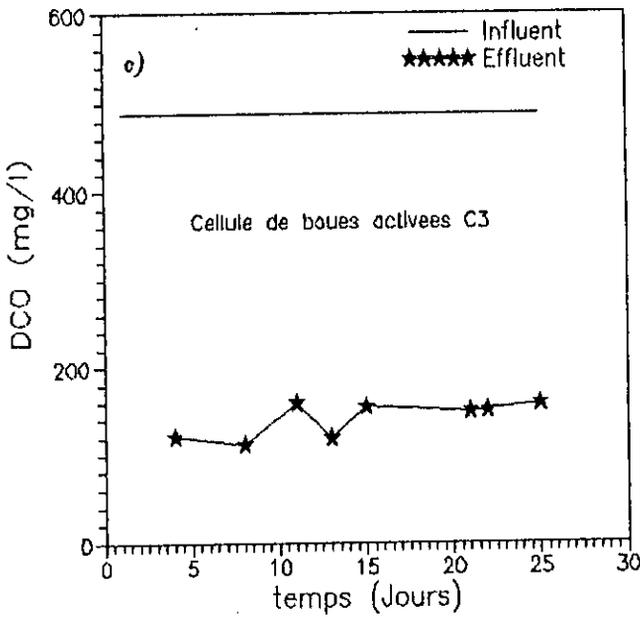
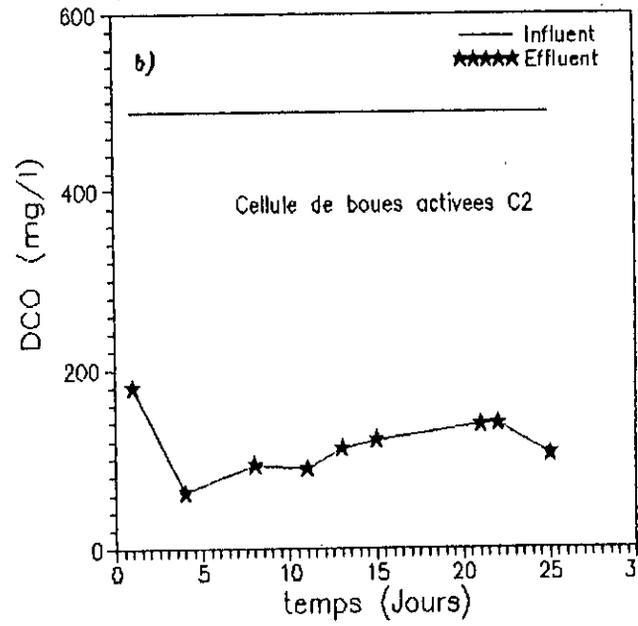
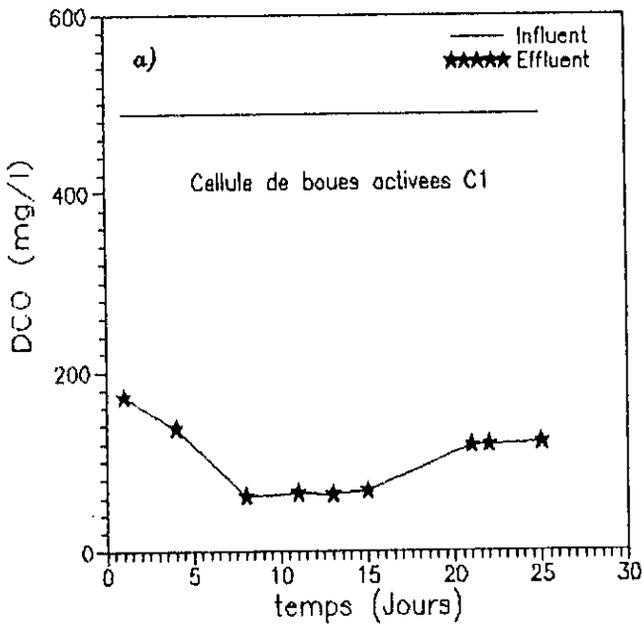


Fig.30: EVOLUTION DE LA DCO TOTALE A L'INFLUENT ET A L'EFFLUENT

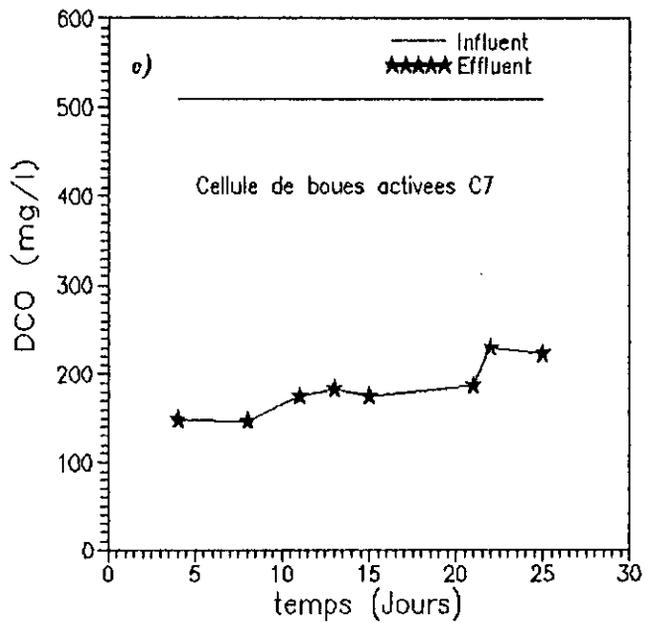
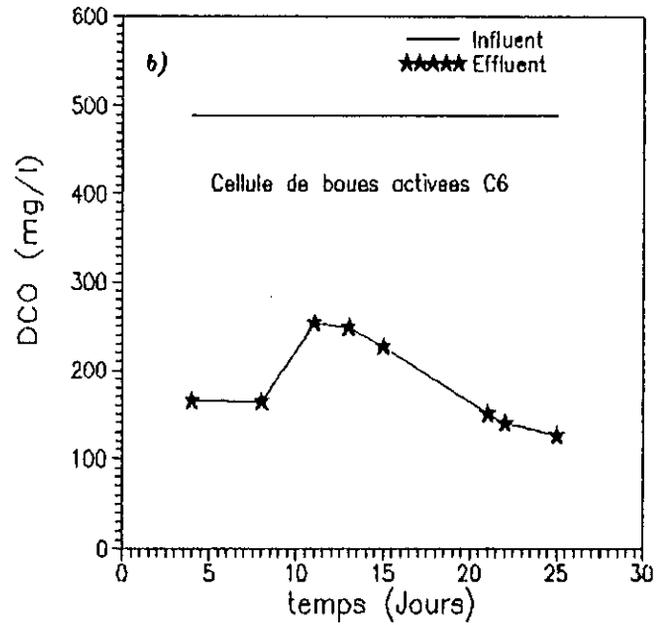
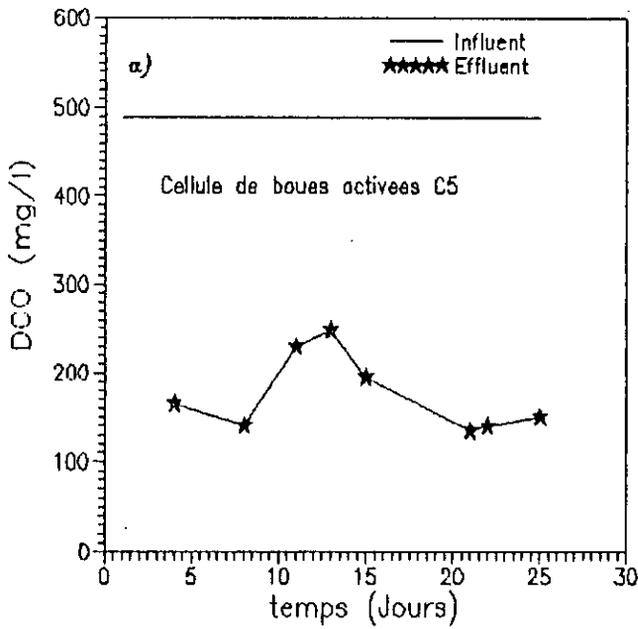


Fig.31:EVOLUTION DE LA DCO TOTALE A L'INFLUENT ET A L'EFFLUENT

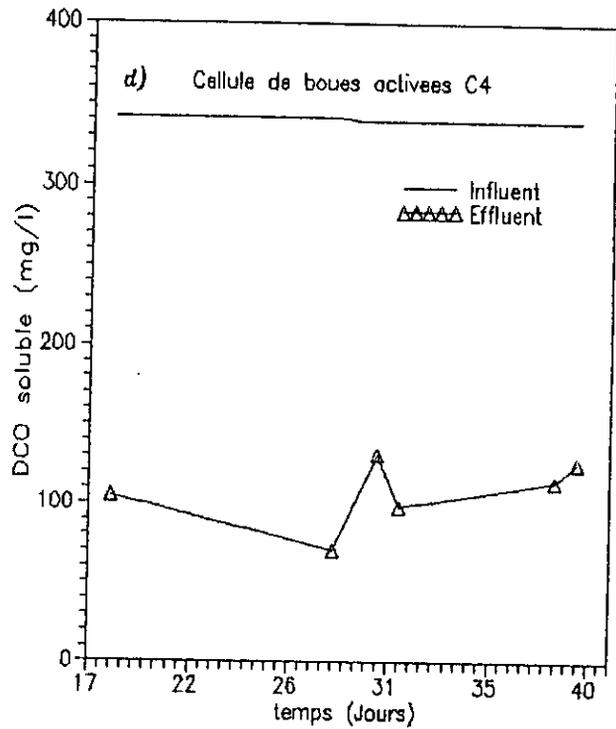
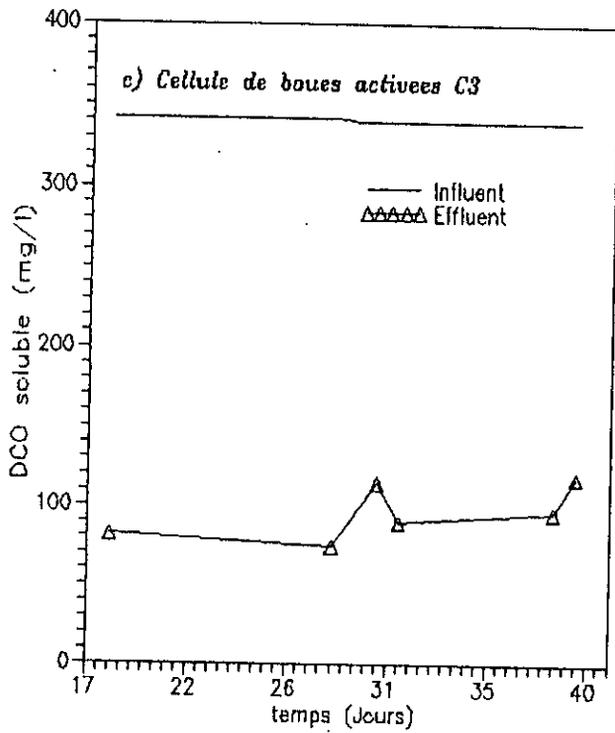
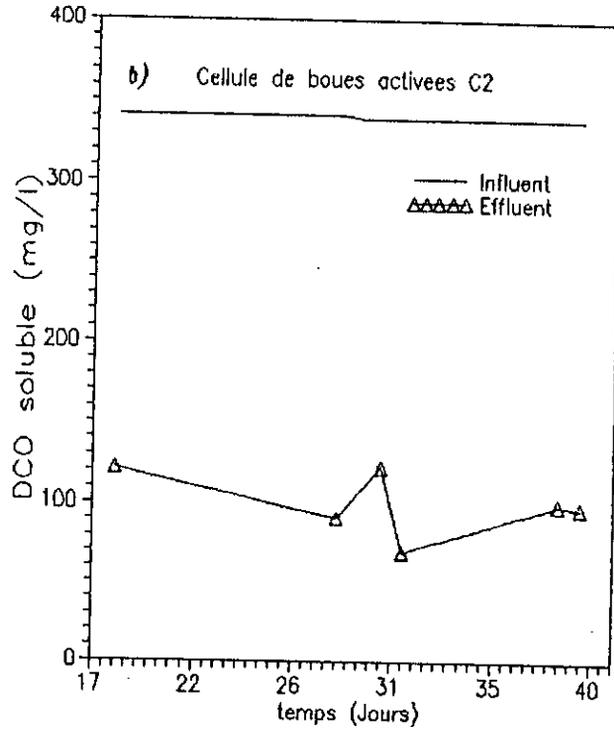
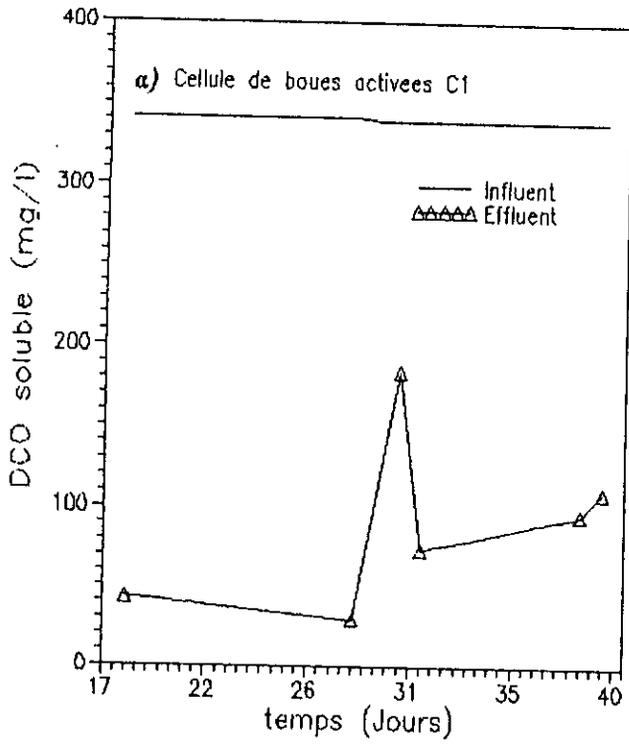


Fig.32: EVOLUTION DE LA DCO SOLUBLE A L'INFLUENT ET A L'EFFLUENT

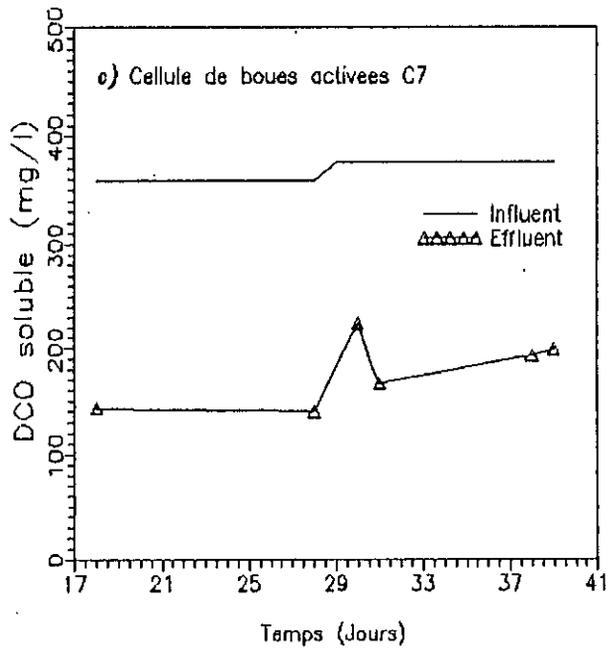
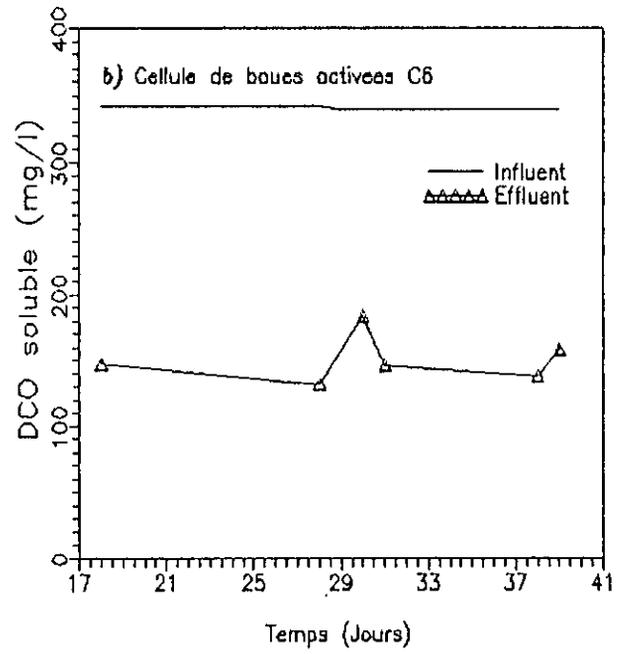
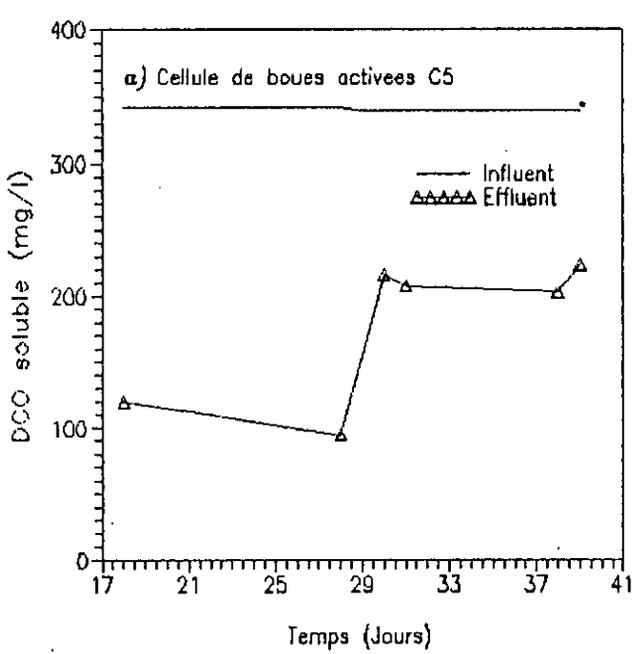


Fig.33: EVOLUTION DE LA DCO SOLUBLE A L'INFLUENT ET A L'EFFLUENT

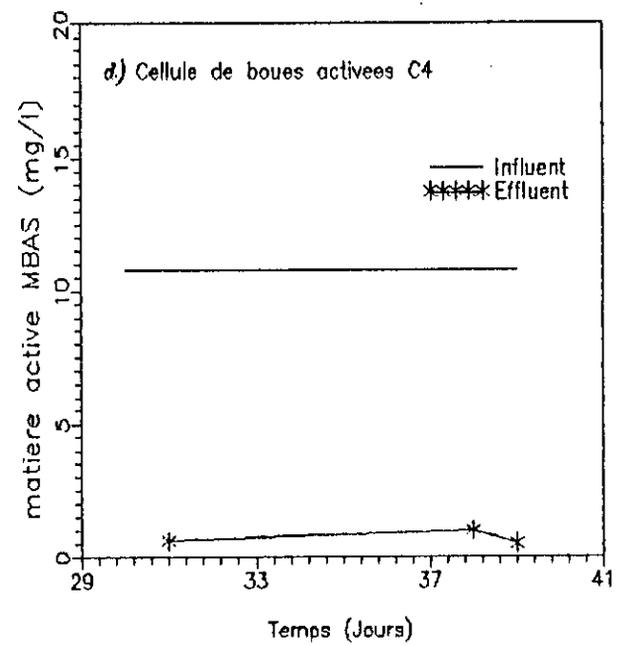
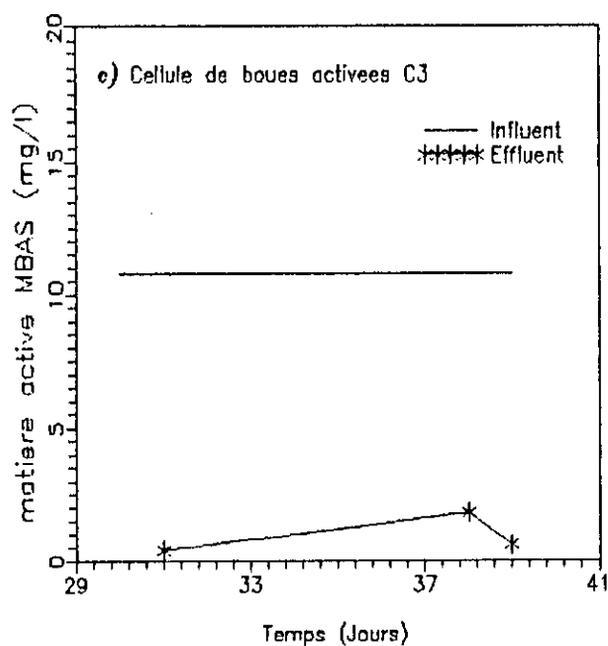
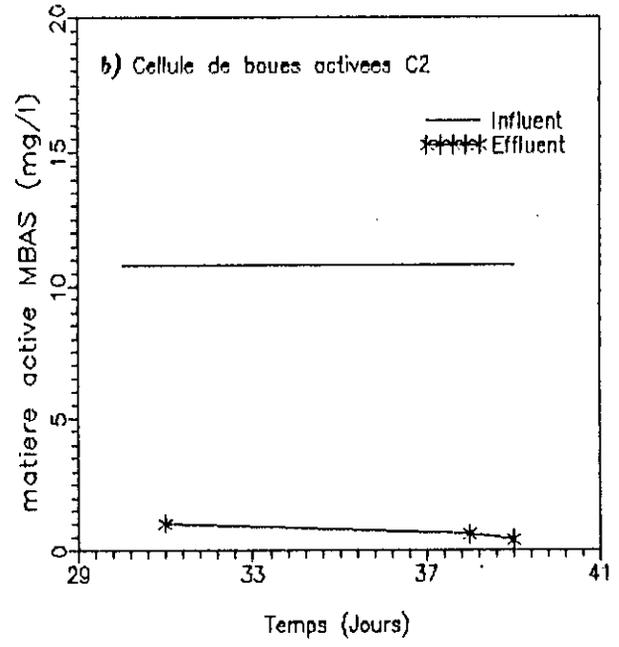
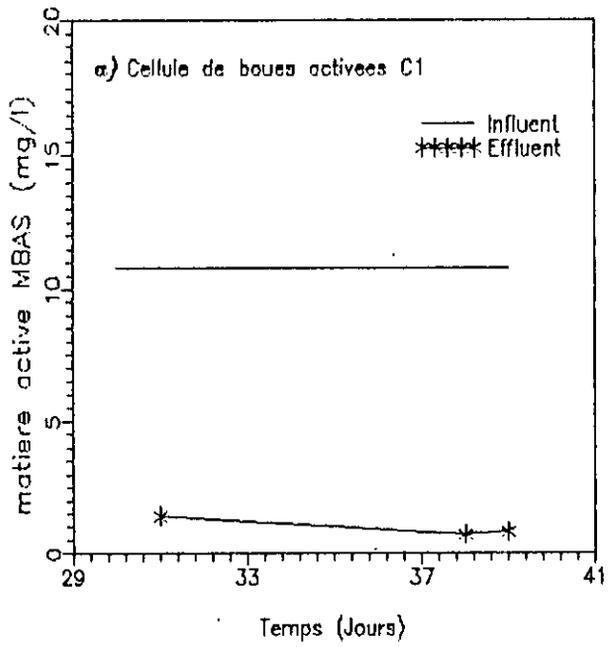


Fig.34: EVOLUTION DE LA MATIERE ACTIVE LAS (MBAS) A L'INFLUENT ET A L'EFFLUENT

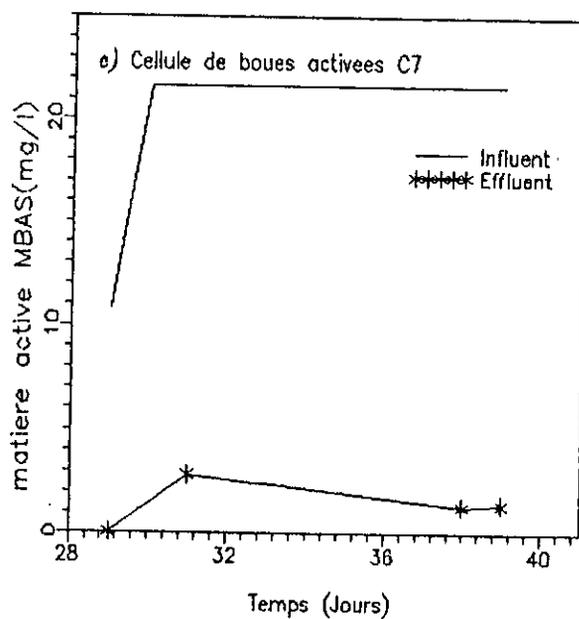
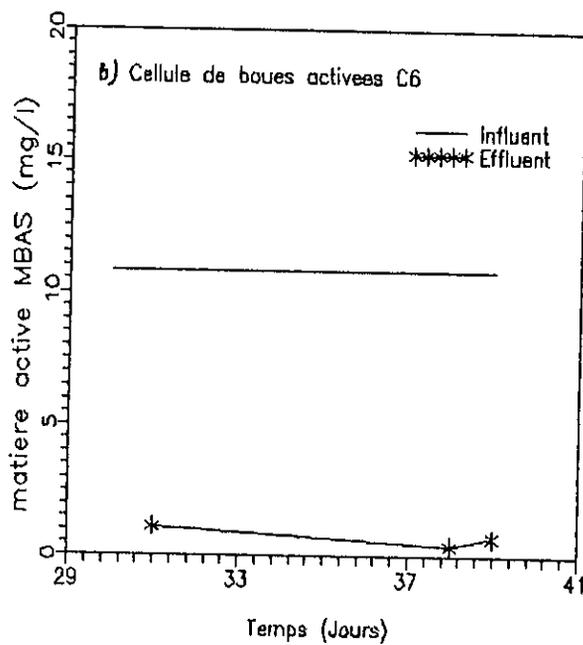
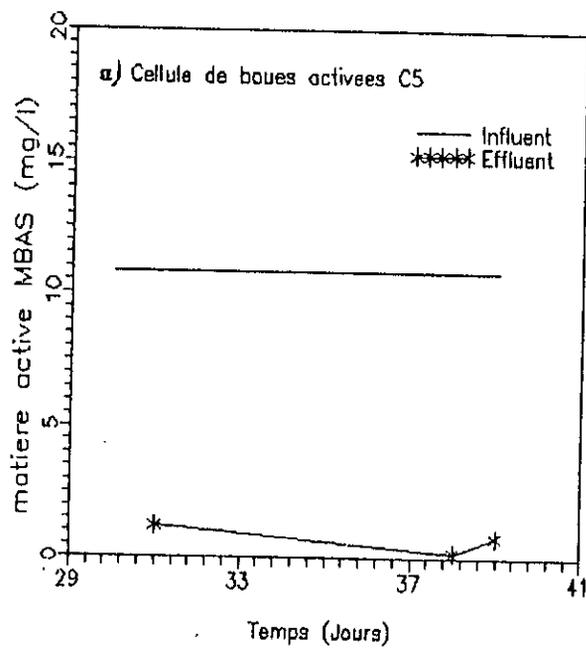


Fig.35: EVOLUTION DE LA MATIERE ACTIVE LAS (MBAS) A L'INFLUENT ET A L'EFFLUENT

IV.1.3.1.3 Evolution des MVES:

La figure 36 montre l'évolution des MVES. On constate tout d'abord une diminution qui est probablement due au choc provoqué par la purge quotidienne des boues activées. On observe par la suite une certaine stabilisation de la concentration des MVES dans toutes les cellules ce qui indique l'approche de l'état d'équilibre pour ces systèmes de boues activées. La teneur des MVES varie entre 792 et 1690 mg/l (21^{ème}-28^{ème} jour) avec la concentration la plus élevée correspondant à l'âge de boues le plus élevé appliqué à la cellule C6.

Discussion:

La diminution de l'efficacité de l'épuration par les boues activées en présence de LAS est indiquée par l'augmentation de la DCO soluble des effluents et la diminution des rendements d'épuration lors de l'ajout de 10.8 mg/l de LAS dans les cellules de boues activées C1 à C6 et de 21.6 mg/l de LAS dans C7.

Les faibles concentrations de matière active (MBAS) relevées à l'effluent ainsi que les rendements élevés d'élimination de celle-ci indiquent une biodégradation pratiquement totale du LAS pour toutes les cellules de boues activées. Cependant, bien que l'on retrouve à peu près les mêmes concentrations de matière active dans tous les effluents de C1 à C6, les DCO solubles des effluents sont beaucoup plus élevées pour C5 et C6 dont les temps de séjours θ_c (12 et 15 jours respectivement) sont plus élevés que pour les autres cellules. Ce résultat peut s'expliquer par la présence de composés non biodégradables issus de la décomposition biologique du tensio-actif LAS. En effet, l'augmentation de la DCO résiduelle d'un effluent de boues activées avec l'âge des boues a été souvent reliée à la présence de composés solubles résistants à la biodégradation [49].

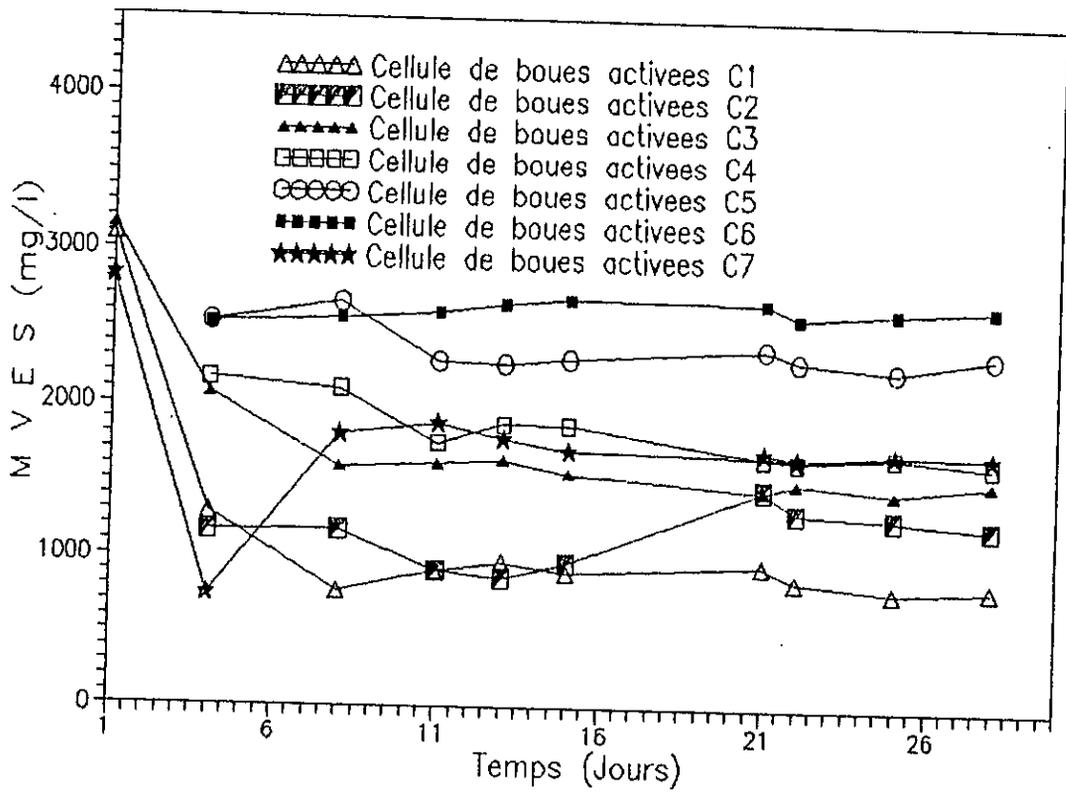


Fig.36 : EVOLUTION DES M V E S DANS LES DIFFERENTES CELLULES DE BOUES ACTIVEES.

IV.1.3.2 Résultats du deuxième essai:

Nous rappelons que lors de cet essai, l'évolution de l'épuration a été suivie au cours de trois périodes, à savoir A, B et C (voir partie expérimentale chapitre IV.1.1.2).

La période A correspond au démarrage de l'essai de traitabilité biologique des tensio-actifs LAS et LSS en présence du substrat organique labnamine, avec au départ, un faible ensemencement des cellules de boues activées. La période B comporte l'étude du pouvoir de recouvrement de l'efficacité d'épuration des boues activées après cessation de l'ajout du LAS dans les cellules C2, C3 et C4. Enfin, les effets de différents chocs tels que: augmentation et ajouts brusques des tensio-actifs LAS ou LSS ou introduction du LAB dans les cellules de boues activées ont été étudiés au cours de la période C.

IV.1.3.2.1 Période A:

Les résultats obtenus au cours de cette période sont indiqués dans les figures 37 à 39.

IV.1.3.2.1.1 Evolution de la DCO et de la DBO₅:

On observe, pour une concentration de 100 mg/l de labnamine (169.78 mg/l de DCO totale à l'influent), une diminution de la DCO à l'effluent jusqu'entour de 20-39 mg/l (entre environ 77 et 88.22 % de rendement d'élimination) entre le 21^{ème} et le 45^{ème} jour pour C1 (fig.37 a) ce qui indique que le labnamine est biodégradable. La DCO augmente ensuite au dessus de 50 mg/l et se situe entre 56 et 97 mg/l entre le 48^{ème} et le 70^{ème} jour après que C1 ait été contaminée par le surnageant provenant d'une des cellules de boues activées recevant le LAS. Cette contamination s'est produite par l'intermédiaire des tuyaux d'aération lors de l'arrêt de celle-ci afin de permettre la décantation des boues activées et le prélèvement des effluents. La DCO fluctue par la suite entre 32 et 64 mg/l (entre 62.30 et 81.15 % de rendement d'élimination) et la DBO₅ entre 10 et 40 mg/l.

Pour les cellules de boues activées recevant 100 mg/l de labnamine et environ 18 mg/l de LAS c'est à dire C2, C3 et C4 (fig.37 b, c et d) respectivement), on constate une plus grande fluctuation de la DCO à l'effluent avec des valeurs variant de 89 à 199 mg/l environ. Donc pour une DCO totale à l'influent de 205.11 mg/l, le rendement d'élimination varie entre environ 3 et 56.61 % . La DBO₅ à l'effluent varie entre 0 et 120 mg/l avec la valeur nulle correspondant à la DCO la plus élevée (192-194 mg/l) ce qui indique une inhibition des boues activées par les concentrations élevées de matière active se trouvant dans les cellules et relevées dans les effluents. Une DBO₅ nulle d'une eau contenant des matières organiques biodégradables indique une inhibition de l'activité microbienne par les composés toxiques contenus dans cette eau [20]. Ainsi, on constate que les rendements d'épuration diminuent en présence de LAS ce qui peut entraîner des effets nuisibles pour l'environnement. On relève dans les eaux d'égout des concentrations de détergents de l'ordre de 20-30 mg/l [20]. Une concentration de 23.5 mg/l de LAS a été trouvée dans l'Oued Lakhel qui reçoit les eaux résiduaires de la ville de Sour El Ghozlane et les rejets du complexe de détergents de cette même ville contiennent en moyenne 819.80 mg/l de LAS [153].

Pour la cellule de boues activées C5 (fig.37 e) recevant 100 mg/l de labnamine et environ 14 mg/l de LSS (207.18 mg/l de DCO totale à l'influent), la DCO à l'effluent fluctue entre 44.80 et 98.21 mg/l (entre 52.60 % et 78.38 % de rendement d'élimination) entre le 1^{er} et le 100^{ème} jour; elle diminue ensuite jusqu'à 25.60 mg/l (87.64 % de rendement d'élimination). La DBO₅ à l'effluent reste inférieure à 30 mg/l après le 21^{ème} jour.

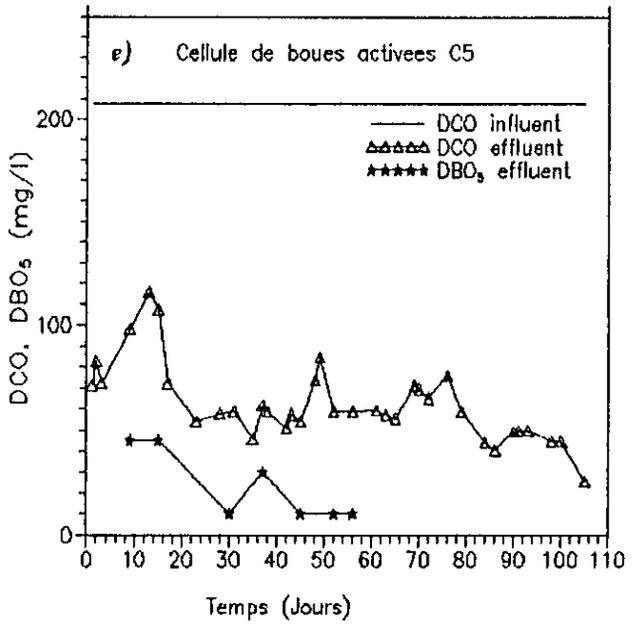
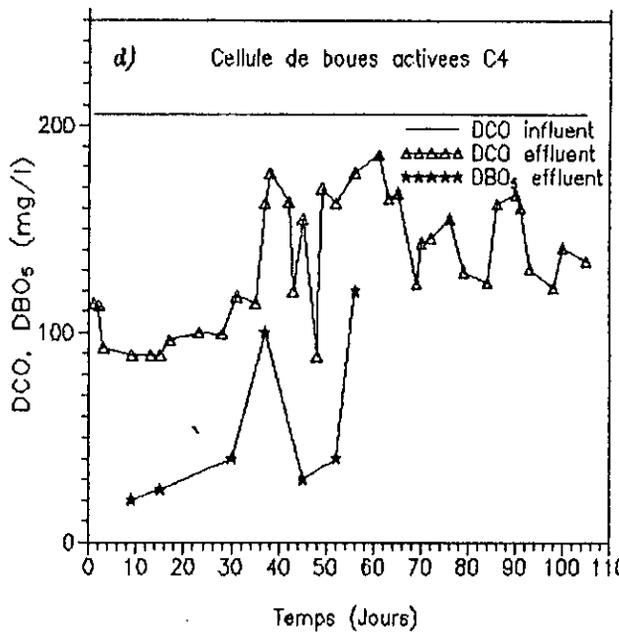
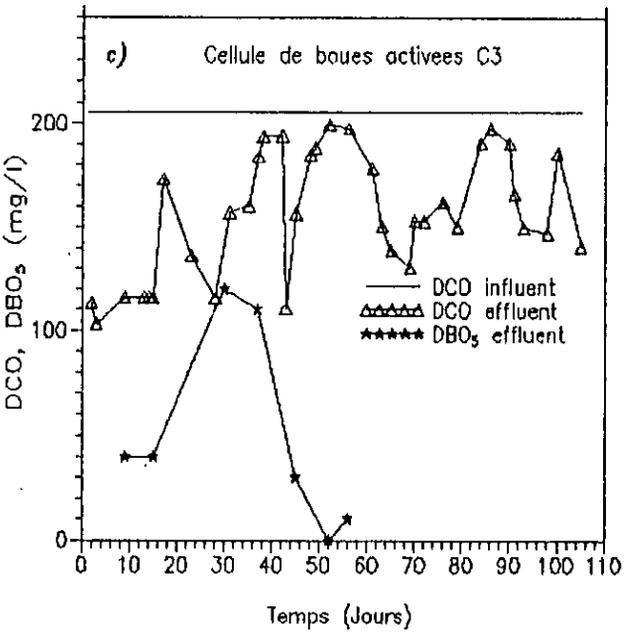
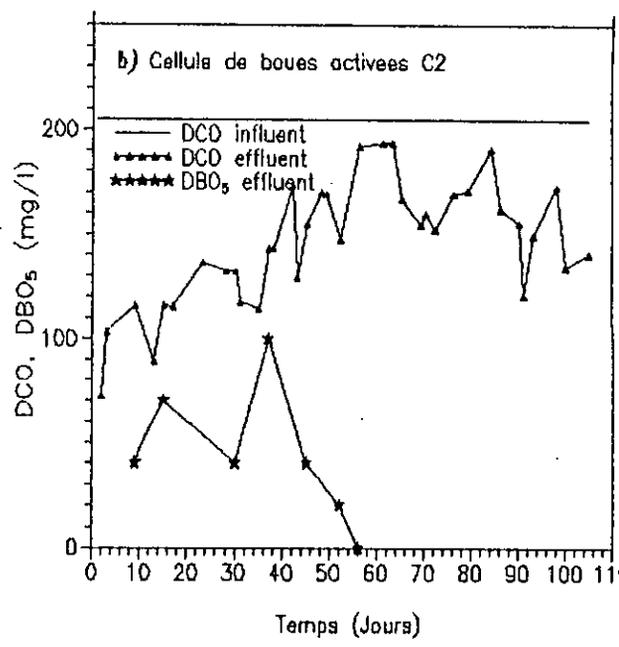
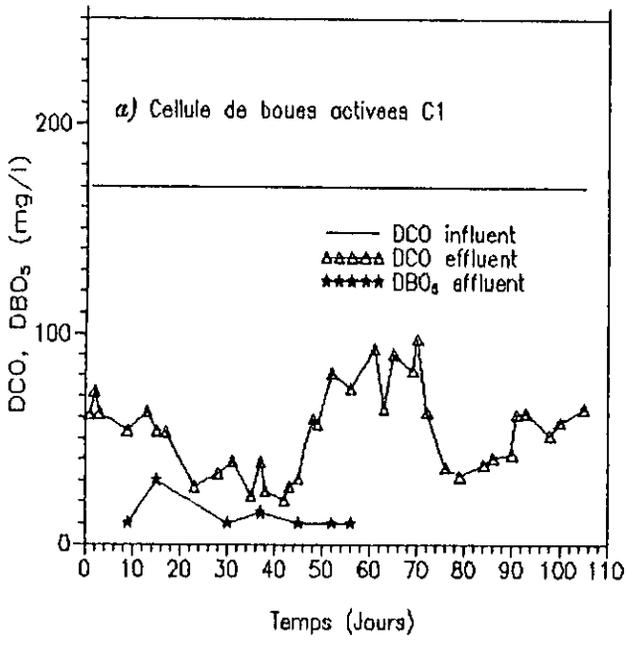


Fig.37: EVOLUTION DE LA DCO ET DE LA DBO₅.

IV.1.3.2.1.2 Evolution de la matière active:

a) LAS:

La figure 38 a, b et c montre que la concentration de la matière active (MBAS) à l'effluent fluctue entre 0.40 et 25.25 mg/l avec des rendements d'élimination variant entre 0 et 97.76 %. Une concentration de MBAS atteignant plus de 25 mg/l dépasse largement celle de l'influent et indique une inhibition totale des microorganismes pour la biodégradation du LAS. Toutefois, il doit être signalé que l'augmentation de la matière active à l'effluent tout comme celle de la DCO survient après de fréquentes coupures de courant électrique ayant entraîné l'arrêt du système d'aération. Ainsi, on constate une diminution de biodégradation du LAS avec la diminution de l'aération ou le manque d'oxygène.

b) LSS:

La concentration de la matière active (MBAS) à l'effluent de C5 (fig.38 d) varie entre 0 et 0.70 mg/l soit un rendement d'élimination supérieur à 94 %

IV.1.3.2.1.3 Evolution des MVES:

Deux semaines après l'ensemencement et le début d'opération des différentes cellules de boues activées, la coloration du liquide dans celles-ci a commencé à foncer indiquant par là un développement des microorganismes. La couleur de la liqueur mixte de C1 et C5 devenait de plus en plus marron foncé tandis que celle de C2, C3 et C4 prenait un aspect jaune. L'observation microscopique d'échantillons de boues activées a révélé, dans les cellules C1 et C5, la présence de différents microorganismes tels que aspidisca et vorticelles qui indiquent une absence de substances toxiques [6]. Dans C2, C3 et C4, on retrouve uniquement des zooflagellés type bodo qui sont caractéristiques des boues traitant des eaux industrielles qui contiennent des produits synthétiques organiques [23].

L'évolution des MVES est indiquée dans la figure 39. Pour des raisons de détérioration de matériel de mesure, il ne nous a pas été possible de

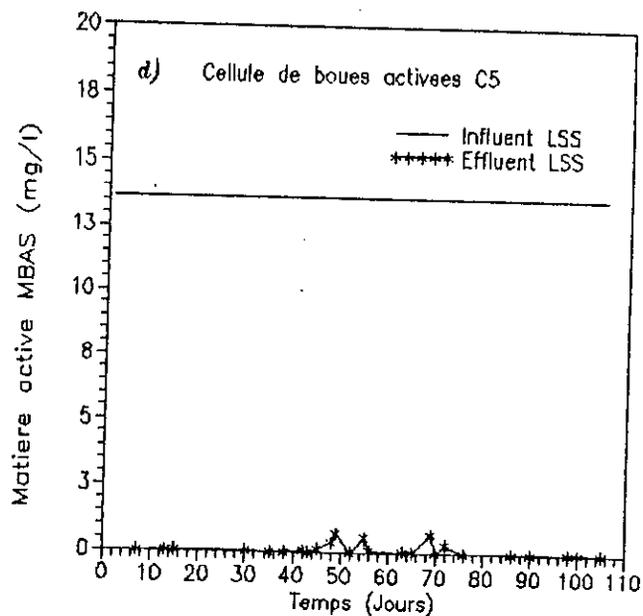
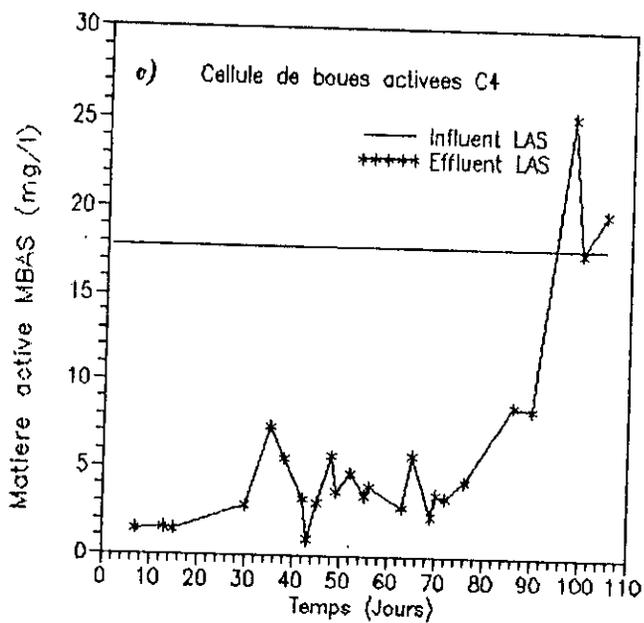
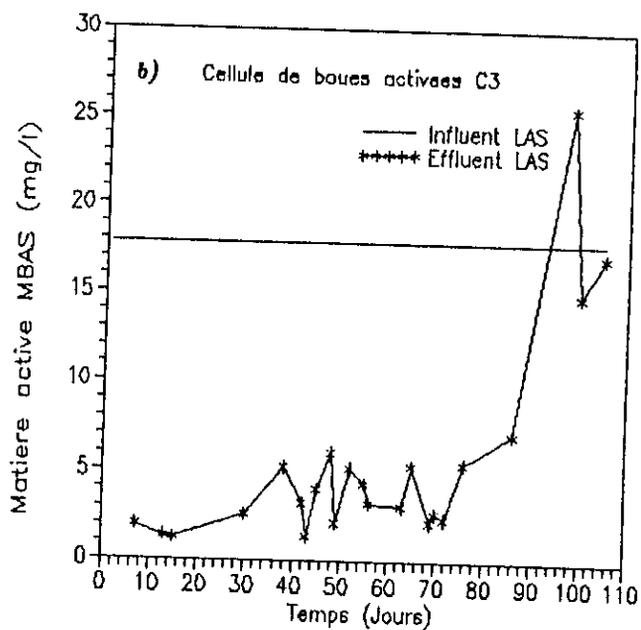
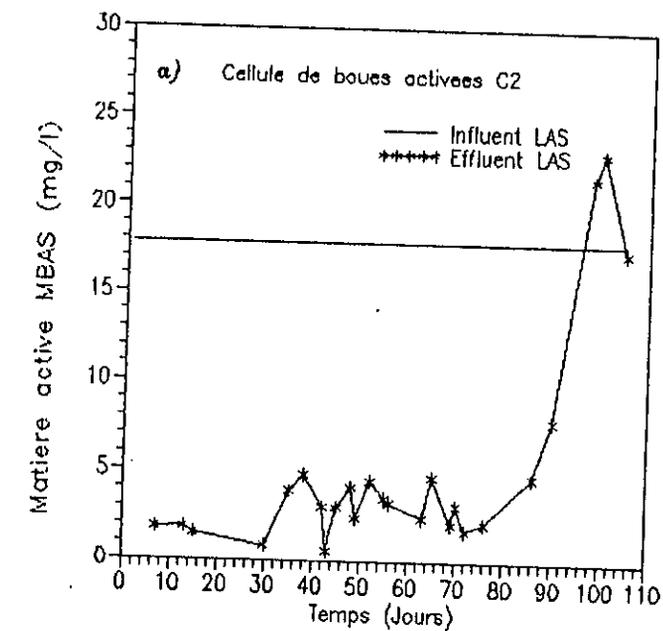


Fig.38: EVOLUTION DE LA MATIERE ACTIVE (MBAS) A L'INFLUENT ET A L'EFFLUENT

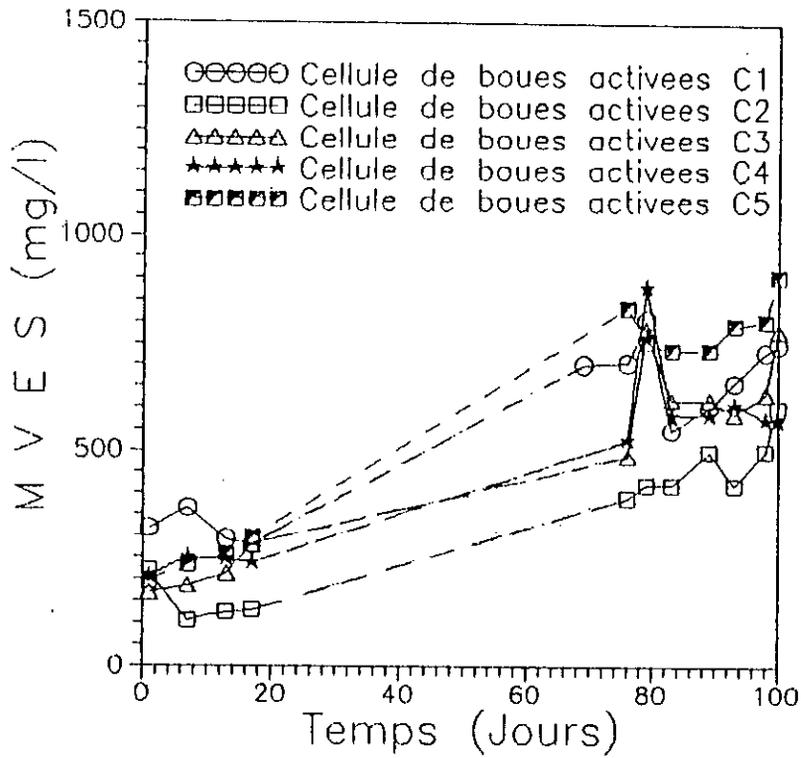


Fig.39: EVOLUTION DES M V E S DANS LES DIFFERENTES CELLULES.

mesurer les MVES entre le 18^{ème} et le 75^{ème} jour. On observe tout de même, malgré ce manque de données, une tendance vers l'augmentation des MVES. On remarque par ailleurs qu'à la cellule de boues activées C5 correspond une augmentation plus rapide et une concentration plus grande des MVES. Ceci confirme le très bon rendement d'élimination de la matière active LSS constaté précédemment et illustré en fig.38 d.

IV.1.3.2.1.4 Analyse bactériologique:

L'analyse bactériologique a révélé la présence dans les cellules de boues activées C1, C2, C3, C4 et C5 de plusieurs colonies d'Escherichia et de quelques colonies de Pseudomonas. On trouve dans toutes les cellules des coliformes et des Pseudomonas qui sont des bactéries (bacilles) gram⁻ ce qui montre que ces bactéries ont résisté à une concentration d'au moins 25 mg/l de LAS. L'absence des bactéries gram⁺ peut s'expliquer par une plus faible résistance de celles-ci à l'effet toxique des tensio-actifs anioniques [9,130].

IV.1.3.2.2 Période B:

Durant cette période, les boues activées des cellules C1, C2, C3 et C4 ont été alimentées avec uniquement 200 mg/l de labnamine tandis que celles de C5 ont reçu, en plus de 200 mg/l de labnamine, 13.65 mg/l de LSS. D'autre part C2, C3 et C4 ont étéensemencées comme indiqué dans le tableau N° 12 chapitre IV.1.1.2.

IV.1.3.2.2.1 Evolution de la DCO et de la DBO₅:

L'évolution de l'épuration durant cette période est indiquée en fig.40. D'après les résultats, on observe, pour une concentration de 200 mg/l de labnamine à l'influent, soit une DCO totale égale à 264.62 mg/l, une diminution de la DCO à l'effluent jusqu'au dessous de 100 mg/l, après le 6^{ème} jour, pour la cellule de boues activées C1 (fig.40 a). La DCO fluctue ensuite entre 23.23 et 50 mg/l soit entre 80.78 et 91.22 % de rendement d'élimination entre le 48^{ème} et le 78^{ème} jour.

Pour les cellules de boues activées C2, C3 et C4 (fig.40 b, c et d respectivement), la qualité de l'effluent ne s'est améliorée qu'avec la disparition de la mousse et la diminution de la concentration de la matière active à l'effluent. Pour ces cellules, la DCO à l'effluent ne diminue pas en dessous de 100 mg/l qu'au delà du 30^{ème} jour respectivement. Elle reste par la suite inférieure à 50 mg/l (soit plus de 81% de rendement d'élimination) après le 61^{ème} jour pour C2 et le 68^{ème} jour pour C3 et C4 ce qui indique une diminution de l'inhibition des microorganismes avec la diminution de la matière active. L'amélioration de la qualité de l'effluent coïncide avec l'augmentation de la concentration des MVES dont l'évolution est indiquée dans la figure 42.

Pour la cellule de boues activées C5 recevant 200 mg/l de labnamine et environ 14 mg/l de LSS (soit 302.02 mg/l de DCO totale à l'influent), la figure 40 (e) montre, au bout de 8 jours, une diminution de la DCO de l'effluent jusqu'à 53.61 mg/l, ce qui correspond à un rendement d'épuration de 82.25 %. La DCO augmente ensuite et fluctue entre 71.59 et 113.33 mg/l (entre 62.48 % et 76.29 % de rendement d'épuration) entre le 11^{ème} et le 57^{ème} jour. La détérioration de l'épuration (augmentation de la DCO de l'effluent) pour C5 est probablement due aux différents chocs subis par les microorganismes. Ces chocs sont dus à la perte d'une grande quantité de la liqueur mixte (environ 2 litres) suite à la fissuration d'une des parois de la cellule de boues activées au 16^{ème} jour ce qui a entraîné la diminution de la concentration des boues activées. Ils sont également dus à une aération insuffisante des microorganismes à cause de fréquentes coupures de courant électrique entraînant l'arrêt des pompes d'aération. Cependant, au bout d'un certain temps, la qualité de l'effluent s'est de nouveau améliorée jusqu'à atteindre un rendement d'élimination de la DCO d'environ 92 % .

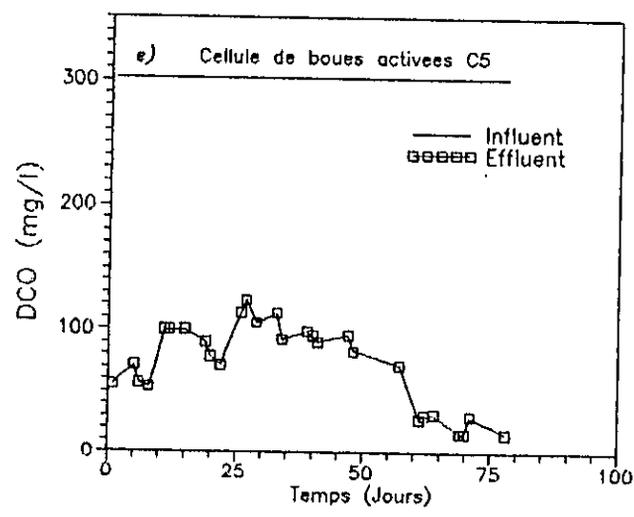
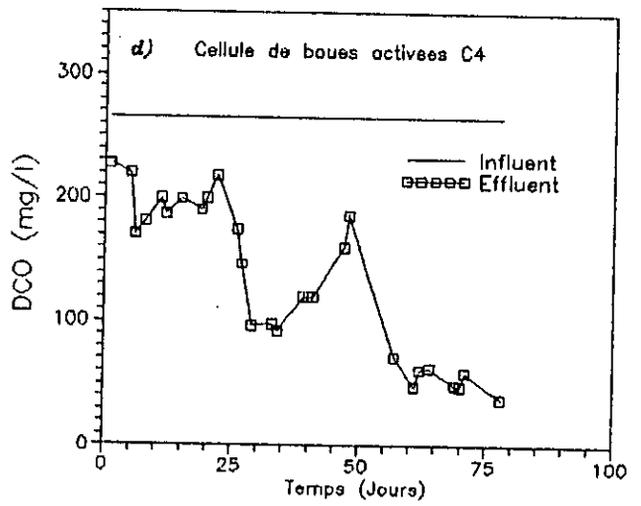
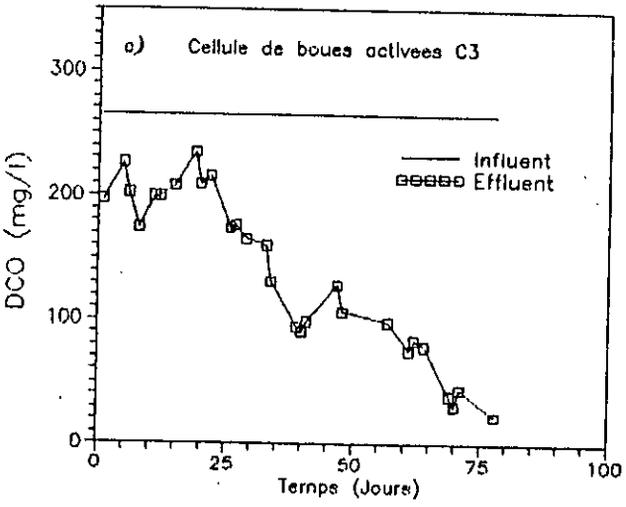
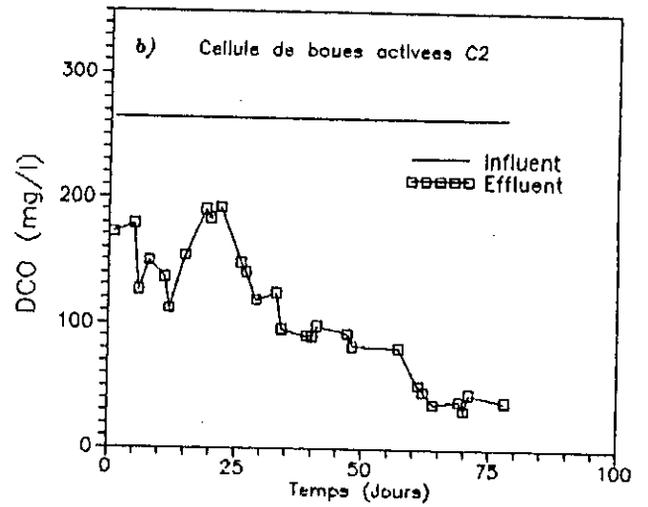
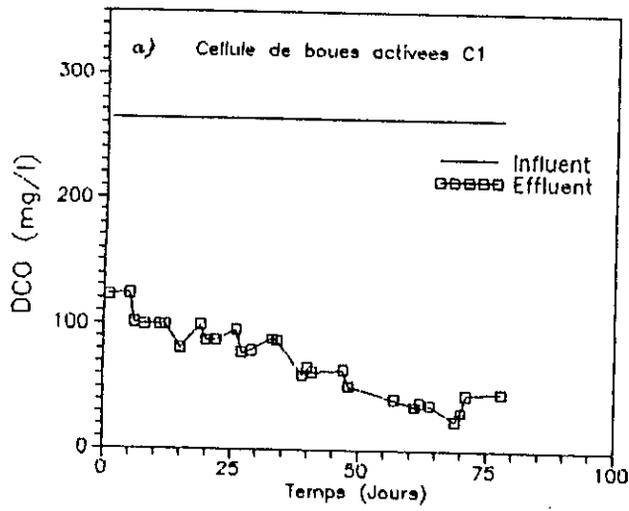


Fig.40: EVOLUTION DE LA DCO A L'INFLUENT ET A L'EFFLUENT

IV.1.3.2.2 Evolution de la matière active :

a) LAS:

Les figures 41 a, b et c montrent l'évolution de la matière active (MBAS) pour C2, C3 et C4 respectivement.

On constate sur ces figures que la concentration de la matière active à l'effluent augmente après avoir diminué et ceci sans qu'il y ait eu ajout de LAS dans les cellules. Cette augmentation peut s'expliquer par la désorption du LAS adsorbé auparavant par les cellules bactériennes. Swisher [9] indique que les boues activées peuvent adsorber de grandes quantités de tensio-actif alkylbenzènesulfonate et que l'augmentation de la concentration de la matière active qui est parfois observée après une diminution initiale est expliquée par le relargage du tensio-actif dans la solution par les bactéries après leur mort.

b) LSS:

On observe, sur la figure 41 d, une augmentation de la concentration de la matière active à l'effluent, entre le 1^{er} et le 26^{ème} jour, probablement due aux différents chocs subie par les microorganismes (pertes de boues et aération insuffisantes). Celle-ci varie entre 0.31 et 4.18 mg/l (entre 69.38 % et 94.87 % de rendement d'élimination). Elle diminue par la suite jusqu'à un seuil très bas correspondant à une élimination quasi totale du LSS.

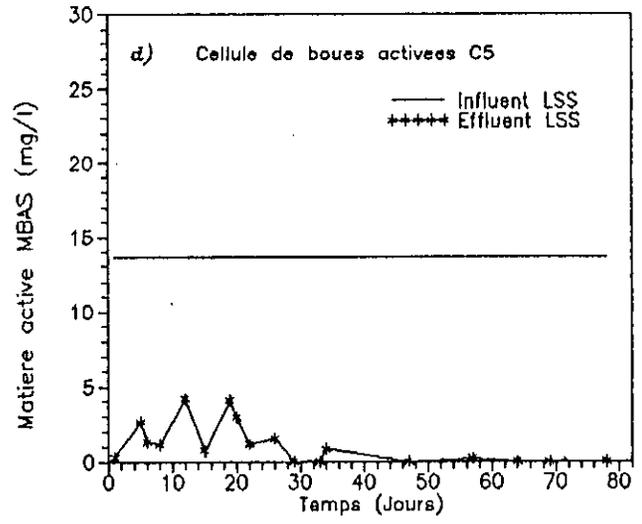
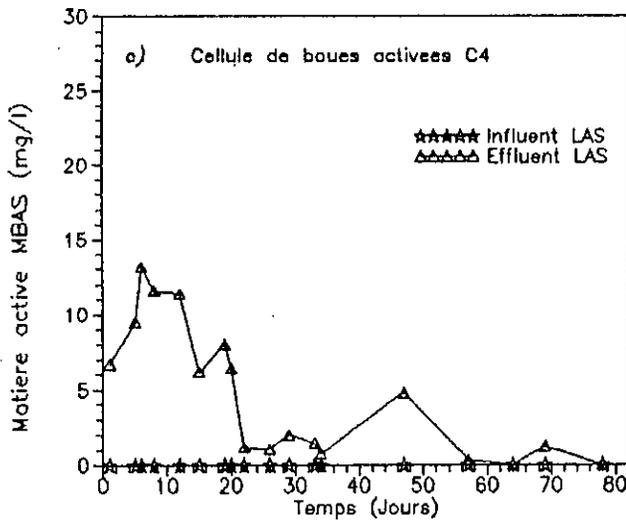
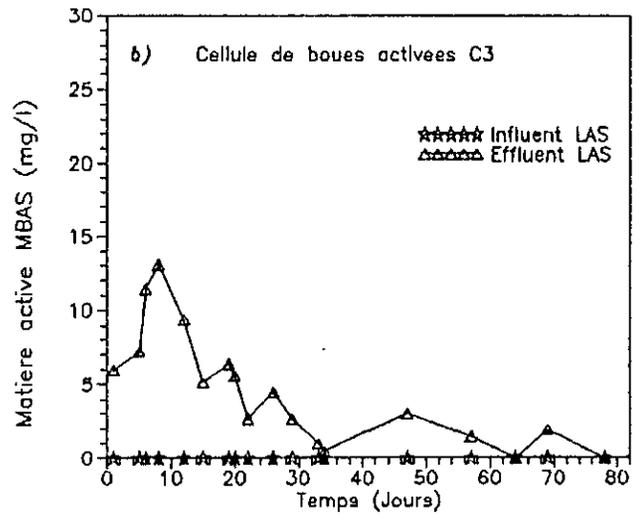
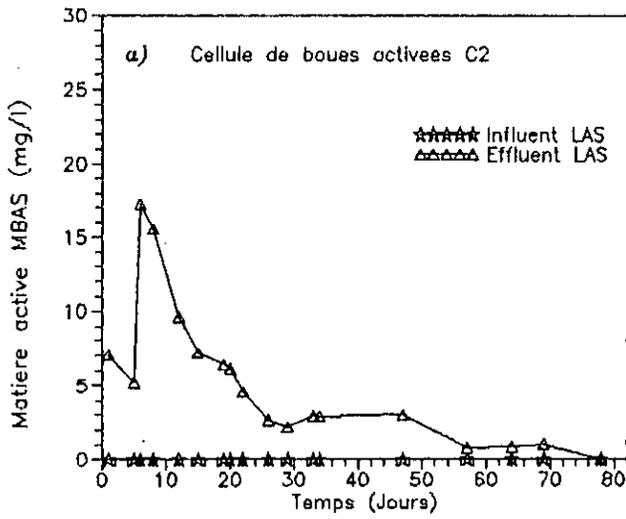


Fig.41: EVOLUTION DE LA MATIERE ACTIVE (MBAS) A L'INFLUENT ET A L'EFFLUENT

IV.1.3.2.2.3 Evolution des MVES:

La figure 42 montre une augmentation rapide de la concentration des MVES dans les cellules de boues activées C1 et C5 ce qui indique que le labnamine est bien assimilé par les microorganismes. On constate cependant, par la suite, une diminution et une fluctuation des MVES de C5, dues à la dilution et au choc des microorganismes suite à la perte accidentelle des boues activées. On observe également des fluctuations au niveau de C2, C3 et C4, dues probablement à une intoxication des microorganismes par la présence d'une concentration élevée de LAS. A partir du 50^{ème} jour et conformément aux résultats obtenus sur l'évolution de la DCO (fig.40) et de la matière active (fig.41), les MVES augmentent progressivement, montrant par là une diminution de la toxicité avec la diminution de la concentration du LAS et une bonne adaptation des microorganismes au labnamine et au LSS.

IV.1.3.2.2.4 Evolution du pH:

On relève pour toutes les cellules de boues activées des valeurs de pH généralement proches de la neutralité (fig.43) ce qui est favorable à l'activité biologique.

IV.1.3.2.2.5 Analyse bactériologique:

On trouve dans toutes les cellules de boues activées des champignons (levures et moisissures), des staphylocoques, des streptocoques ainsi que des entérobactéries dont des Escherichia et beaucoup de colonies de Protéus. La présence de ces bactéries est probablement favorisée par le labnamine qui est un substrat facilement assimilé par ces microorganismes comme l'indique l'épuration satisfaisante de l'influent.

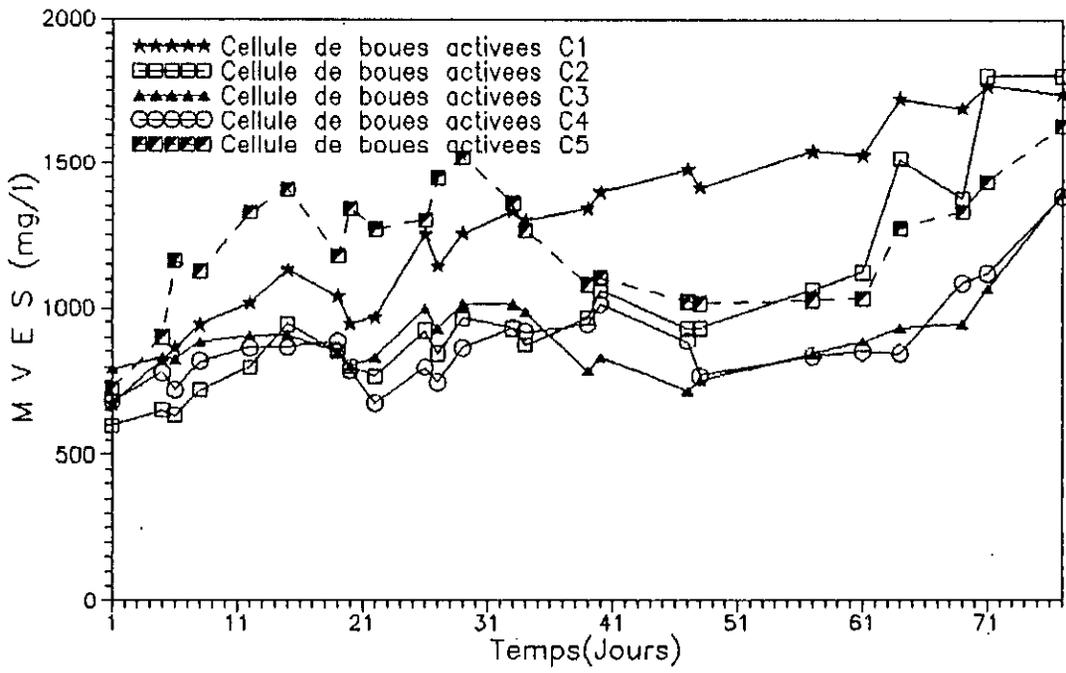


Fig.42: EVOLUTION DES M V E S DANS LES DIFFERENTES CELLULES DE BOUES ACTIVEES.

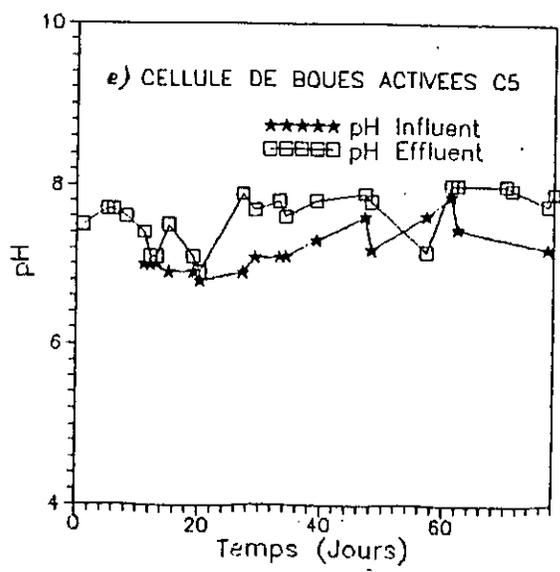
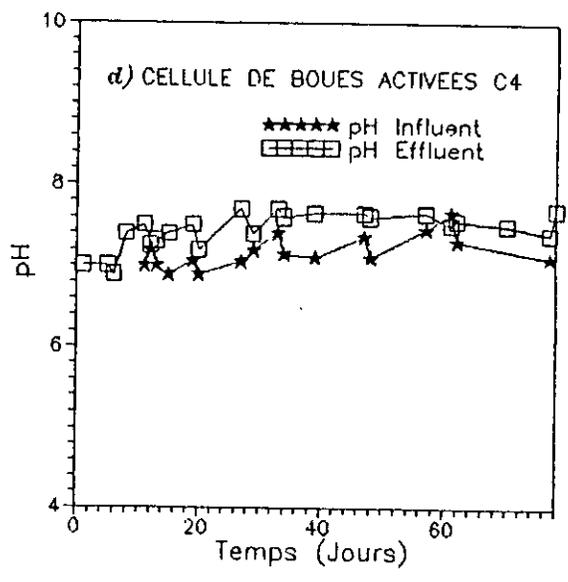
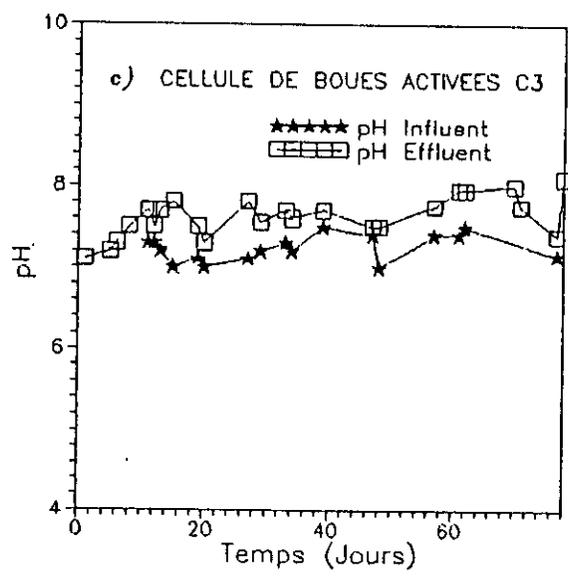
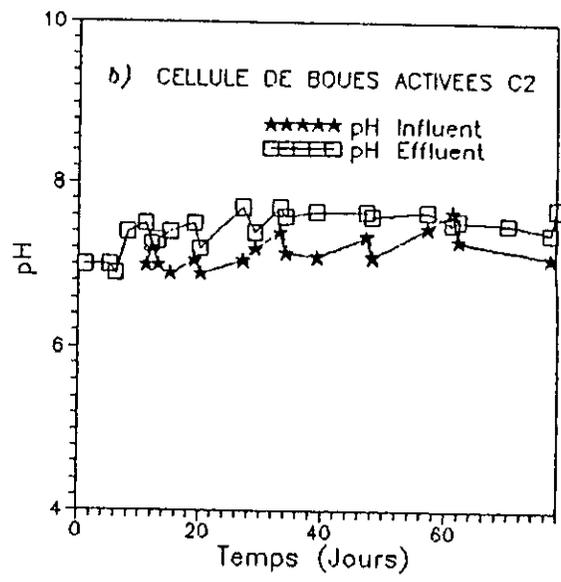
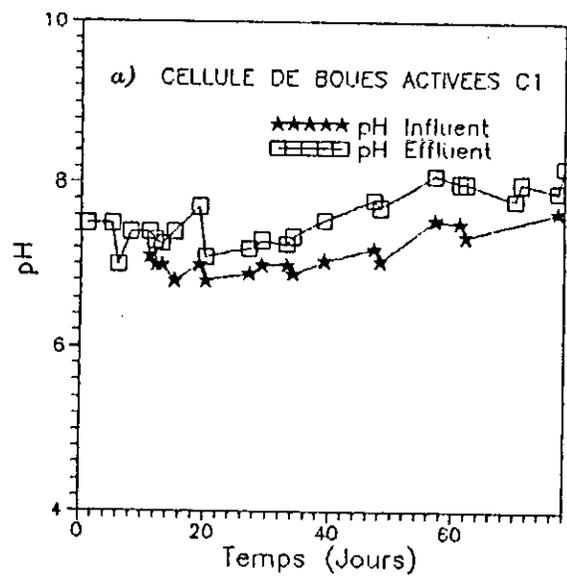


Fig.43 : EVOLUTION DU pH EN FONCTION DU TEMPS

IV.1.3.2.3 Période C:

Les cellules C1 à C6 contenant les boues activées ont été alimentées durant tout l'essai de biodégradabilité (135 jours) avec 400 mg/l de labnamine. Outre le labnamine, celles-ci ont reçu le LAS (cellules C1, C2, C3, C4 et C5), le LSS (cellules C1, C2 et C5) et le LAB (cellule C6). Les concentrations de LAS, de LSS et de LAB étudiées au cours de cet essai ainsi que les DCO à l'influent sont indiquées dans le tableau N°16 (chapitre IV.1.1.2).

IV.1.3.2.3.1 Evolution de la DCO et de la DBO₅:

a) Effet de l'ajout des tensio-actifs LAS ou LSS:

Les figures 44 a, b, c, d, e et f illustrent l'évolution de la DCO et de la DBO₅ pour les cellules de boues activées C1 à C6. L'examen de ces figures indique une épuration correcte de l'influent entre le 1^{er} et le 8^{ème} jour avec des DCO à l'effluent inférieures ou égales à 82.41 mg/l (soit un rendement d'élimination de plus de 80%) pour une DCO à l'influent de 433.74 mg/l correspondant à 400 mg/l de labnamine pour C1, C2, C3, C4 et C6 et de 471.14 mg/l correspondant à 400 mg/l de labnamine et 13.65 mg/l de LSS pour C5.

L'assimilation facile du labnamine par les microorganismes est ainsi confirmée de nouveau.

L'épuration demeure satisfaisante, avec des DCO à l'effluent inférieures ou autour de 100 mg/l et des DBO₅ inférieures à 40 mg/l après l'ajout du LAS à une concentration de 8.7 mg/l (9^{ème}-14^{ème} jour), 13 mg/l (30^{ème}-47^{ème} jour) dans C2, C3, C4 et C5, 18 mg/l dans C1 (57^{ème}-58^{ème} jour) et C2, C3, C4 et C5 (48^{ème}-58^{ème} jour) et 26 mg/l dans C1, C3, C4 et C5 (59^{ème}-77^{ème} jour). Les valeurs élevées de DCO (142.22 mg/l et 177.5 mg/l) relevées au 44^{ème} et au 14^{ème} jour pour C2 (fig.44 b) et C3 (fig.44 c) respectivement sont probablement dues à une aération insuffisante des boues activées par suite du mauvais fonctionnement d'une pompe d'aération.

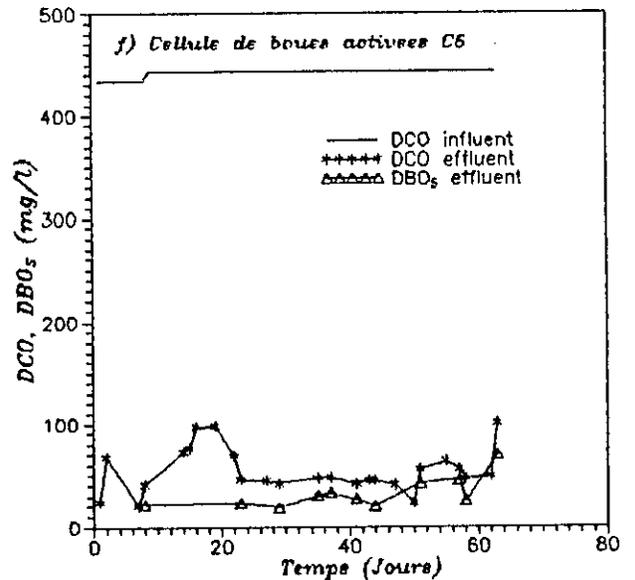
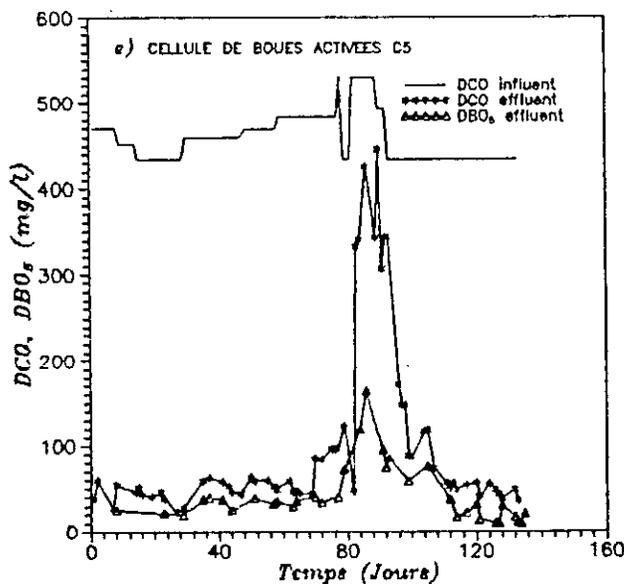
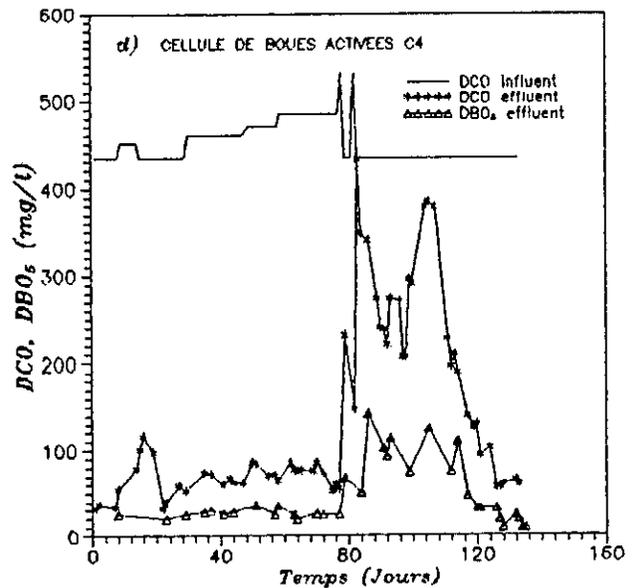
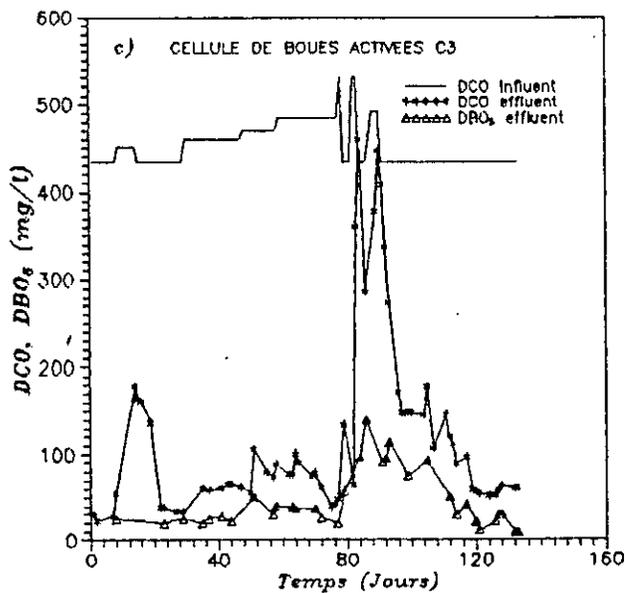
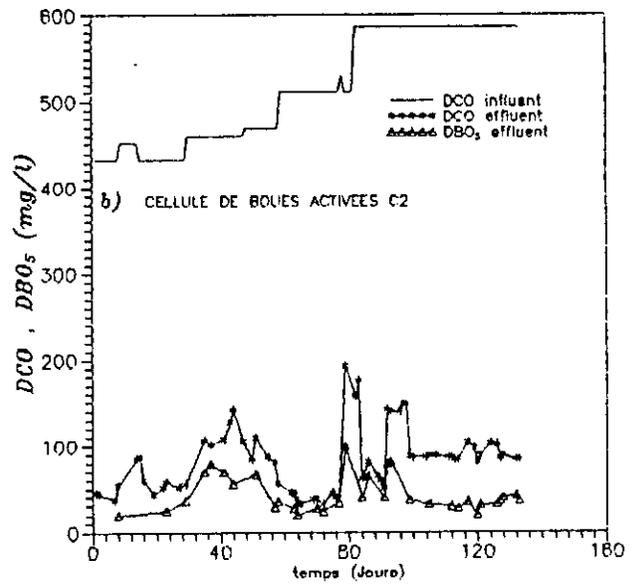
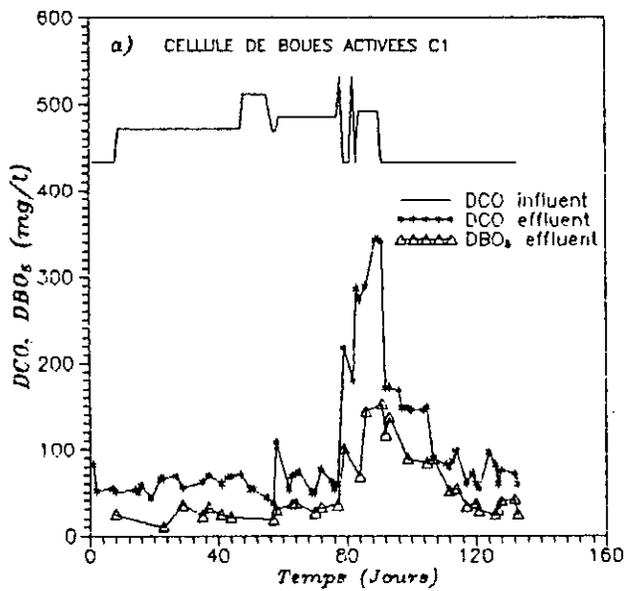


Fig.44: EVOLUTION DE LA DCO ET DE LA DBO₅ EN FONCTION DU TEMPS.

Comme l'indiquent les figures 44 a, c, d et e, l'augmentation de la concentration du LAS à 50 mg/l, à partir du 78^{ème} jour, à l'entrée des cellules de boues activées C1, C3, C4 et C5 a entraîné une nette détérioration de la qualité de l'effluent pour toutes ces cellules, ce qui s'est caractérisé par des valeurs de DCO et de DBO₅ très élevées à la sortie. On relève ainsi à l'effluent, au 79^{ème} jour, 216.59; 134.63; 231.66 et 122.93 mg/l de DCO et 100; 57; 68 et 72 mg/l de DBO₅ pour C1, C3, C4 et C5 respectivement. L'élimination de la matière organique a largement fluctué (entre 13 et 83 % pour la DCO et entre 12 et 93 % pour le COD) quand la concentration du LAS a été doublée dans un système de boues activées en continu [154].

Après la suppression de l'ajout du LAS dans les cellules (79^{ème}-81^{ème} jour), la DCO a diminué au 82^{ème} jour pour atteindre des teneurs de 180; 64.71; 147 et 47 mg/l à l'effluent de C1, C3, C4 et C5 respectivement. Les valeurs de DCO beaucoup plus faibles relevées à la sortie de C3 et de C5 sont probablement dues à une plus grande concentration, au départ, de microorganismes ou MVES. Celle-ci a en effet atteint, au 79^{ème} jour, 1384; 2172; 836 et 2396 mg/l pour C1, C3, C4 et C5 respectivement (voir fig.64). La biodégradation des tensio-actifs LAS augmente avec la concentration des microorganismes [9,155]. La réintroduction à nouveau de 50 mg/l de LAS dans C1, C3 et C4 (82^{ème}-83^{ème} jour) et dans C5 (82^{ème}-89^{ème} jour) a entraîné une plus grande détérioration de l'épuration. Cette détérioration s'est principalement caractérisée par des valeurs de DCO à l'effluent très élevées allant jusqu'à environ 80 % de celles mesurées à l'influent. L'arrêt temporaire de l'ajout du LAS (83^{ème}-84^{ème} jour) dans C1 et (84^{ème}-86^{ème} jour) dans C3 ou la diminution de sa concentration à 30 mg/l à l'influent (85^{ème}-90^{ème} jour) pour C1, (87^{ème}-90^{ème} jour) pour C3 et (90^{ème}-93^{ème} jour) pour C5 n'a pas entraîné l'amélioration de la qualité de l'effluent, les valeurs de DCO et de DBO₅ restant très élevées. Janicke [156] a trouvé un seuil de concentration entre 20 et 30 ppm de LAS à l'influent au dessus duquel il y a détérioration de l'élimination de la DBO et de la DCO.

La détérioration de la qualité de l'effluent avec des valeurs de DCO et de DBO₅ très élevées (augmentation de la DCO de l'effluent jusqu'à environ 216-450 mg/l et de la DBO₅ jusqu'à 68-146 mg/l) et dépassant largement les normes de rejets (120 mg/l et 40 mg/l pour la DCO et la DBO₅ respectivement) [47] pour toutes les cellules de boues activées, après

l'augmentation de la concentration du LAS à 50 mg/l, indique une inhibition des microorganismes et ce même après l'arrêt temporaire de l'ajout du LAS ou la diminution de sa concentration à 30 mg/l. Cette inhibition est d'ailleurs confirmée par les valeurs de DBO₅ indiquées dans le tableau N°18 où on constate une diminution de la DBO₅ lorsque la concentration du LAS est augmentée de 26 à 50 mg/l.

Tableau N°18: Effet de différentes concentrations des tensio-actifs LAS et LSS sur la DBO₅ de l'eau usée synthétique contenant 400 mg/l de labnamine.

Produits testés	DBO ₅ (mg/l)
400 mg/l labnamine+13 mg/l LAS	243
400 mg/l labnamine+18 mg/l LAS	320
400 mg/l labnamine+26 mg/l LAS	330
400 mg/l labnamine+30 mg/l LAS	280
400 mg/l labnamine+50 mg/l LAS	230
400 mg/l labnamine+13.65 mg/l LSS	247
400 mg/l labnamine+27.30 mg/l LSS	346
400 mg/l labnamine+54.60 mg/l LSS	398

Après arrêt définitif de l'ajout du LAS dans C1 et C3 (91^{ème}-135^{ème} jour), dans C4 (84^{ème}-135^{ème} jour) et dans C5 (94^{ème}-135^{ème} jour), les DCO et les DBO₅ de l'effluent sont restées très élevées au début avant d'amorcer une lente déclinaison. La même efficacité d'épuration constatée avant le début de l'ajout de 50 mg/l de LAS au 78^{ème} jour, c'est à dire des DCO à l'effluent inférieures ou autour de 100 mg/l, n'a été récupérée par les quatre cellules de boues activées C1, C3, C4 et C5 qu'après 26, 23, 43 et 18 jours respectivement. Cette situation peut s'expliquer par une inhibition ou une intoxication des microorganismes par cette concentration élevée de LAS ou par la présence de sous-produits de biodégradation relativement stables [129]. En comparaison, les boues activées des cellules C3, C4 et C5 ont

récupéré pratiquement, en une semaine ou moins après arrêt de l'introduction du LAS dans les cellules entre le 15^{ème} et le 29^{ème} jour, le même pouvoir d'épuration que celui qui a été mesuré la première semaine avant le début de l'ajout du LAS. Ce constat rejoint les résultats obtenus par Painter [157] qui a trouvé que des boues activées alimentées avec un influent contenant un tensio-actif de type LAS ont un rendement d'épuration plus faible après cessation de l'ajout du tensio-actif que celles qui sont alimentées avec le même influent mais sans tensio-actif.

L'effet inhibiteur et toxique du LAS à une concentration de 50 mg/l est d'ailleurs confirmé par une mauvaise décantation et un aspect visqueux des boues activées, une grande quantité de mousse dans les cellules, un débordement de la liqueur mixte hors de celles-ci et une perte de boues dans les effluents qui prirent un aspect très trouble ce qui a entraîné la diminution de la concentration des MVES et ceci malgré la diminution du volume de purge des boues activées de 500 à 25 ml entre le 61^{ème} et le 135^{ème} jour (voir tableau N° 12).

L'observation microscopique des boues activées des différentes cellules a révélé la disparition des protozoaires dont des amibes et des ciliés (*Lionotus*, *Vorticella convallaria*, *Vorticella microstoma*, *Epistylis Opercularia* et *Aspidisca costata*) et de certains microorganismes non identifiés ainsi qu'une nette diminution du nombre de métazoaires tels que les rotifères *Philodina* et proales qui sont signes d'une bonne épuration. Des effluents de haute qualité sont, en effet obtenus avec une grande variété et un grand nombre de protozoaires et des espèces de *vorticella* telles que *V.convallaria*, *V.octava* et *V.aequilata* [27]. La présence des rotifères indique également une épuration satisfaisante car c'est une faune détritivore qui se nourrit de débris organiques (cadavres de protozoaires etc...) et qui peut être bactérivore et prédatrice des protozoaires [20].

Tous ces microorganismes se trouvaient en grand nombre dans les cellules de boues activées avant l'introduction dans celles-ci de 50 mg/l de LAS au 78^{ème} jour. Des résultats similaires ont été obtenus par Janicke [154] qui a constaté qu'une concentration de 50 mg/l d'un tensio-actif LAS provoque la diminution de l'efficacité de traitement, l'altération des boues activées et l'augmentation des DCO et des DBO₅ à l'effluent. Pitter [129] signale

également un ralentissement de la biodégradation et enfin un arrêt de celle-ci après une diminution initiale rapide du LAS introduit dans un système de boues activées à une concentration de 50 mg/l. Une inhibition de 1-5 % de la respiration des boues activées en présence d'une concentration entre 30-40 ppm de LAS a été également signalée par Dazai [158].

Contrairement au LAS, l'ajout du LSS à une concentration de 13.65 mg/l (9^{ème}-47^{ème} jour) et 27.3 mg/l (48^{ème}-57^{ème} jour) dans C1 (fig.44 a), de 27.30 mg/l (59^{ème}-77^{ème} jour et 79^{ème}-81^{ème} jour) et 54.6 mg/l (82^{ème}-135^{ème} jour) dans C2 (fig.44 b) et de 13.65 mg/l (1^{er}-8^{ème} jour) dans C5 (fig.44 e) ne provoque pas de perturbation de l'épuration. Une très bonne épuration de l'influent est obtenue (fig.44 a) et ceci malgré l'augmentation de la concentration du LSS de 13.65 mg/l à 27.3 mg/l et la diminution des microorganismes, due à l'augmentation du volume de purge des boues activées de 25 à 500 ml par jour (48^{ème}-60^{ème} jour). On constate même une amélioration de la qualité de l'effluent, après le remplacement de 18 mg/l de LAS (48^{ème}-58^{ème} jour) par 27.3 mg/l de LSS dans C2, avec des DCO à l'effluent variant entre 32 et 46.15 mg/l (soit plus de 90 % de rendement d'élimination) et des DBO₅ fluctuant entre 20 et 34 mg/l entre le 62^{ème} et le 77^{ème} jour (fig.44 b). Une meilleure épuration de l'influent est obtenue avec le LSS qu'avec le LAS et ceci malgré une concentration initiale de LSS plus grande. Comme signalé en bibliographie [9,129,154,159], ce résultat montre que les tensio-actifs de type alkylsulfate sont facilement biodégradés par les microorganismes. Ceci est d'ailleurs confirmé par l'augmentation de la DBO₅ avec l'augmentation de la concentration du LSS comme l'indiquent les valeurs du tableau N° 18.

Le remplacement, au 78^{ème} jour, du LSS par 50 mg/l de LAS dans C2, a engendré une augmentation de la DCO à l'effluent au 79^{ème} jour (fig.44 b). Celle-ci reste également élevée au 82^{ème} jour après la réintroduction à nouveau, dans C2, de 27.3 mg/l de LSS. La concentration de 50 mg/l de LAS a de nouveau induit une inhibition des microorganismes. L'épuration redevient ensuite satisfaisante après l'introduction, dans C2, de 54.6 mg/l de LSS (82^{ème}-135^{ème} jour) et après 2 semaines d'adaptation des boues activées à cette nouvelle concentration.

b) Effet de l'ajout du LAB:

L'influent est également correctement épuré en présence de 10 mg/l de LAB avec des DCO à l'effluent de l'ordre de 60 mg/l (soit un rendement d'élimination de plus de 80 %) et des DBO₅ fluctuant entre 19 et 45 mg/l entre le 22^{ème} et le 55^{ème} jour (fig.44 f). Le LAB a été introduit dans la cellule de boues activées C6 à partir du 9^{ème} jour.

Une comparaison des résultats obtenus sur la biodégradation du LAB et du LAS à des teneurs voisines montre qu'on obtient un meilleur rendement d'épuration avec le LAB et en l'absence du groupement sulfonate, . En d'autres termes, cela signifie que le groupement sulfonate retarde la biodégradation.

Il y eut cependant une brusque détérioration de la qualité de l'effluent au 63^{ème} jour avec une augmentation de la DCO et de la DBO₅ jusqu'à 100 mg/l et 69 mg/l respectivement. Cette situation est probablement due à la prolifération des bactéries filamenteuses ou des champignons filamenteux ce qui a entraîné le gonflement des boues, une mauvaise décantation de celles-ci ainsi que leur perte dans les effluents. Les hydrocarbures peuvent être utilisés comme substrats par de nombreuses levures et différents champignons filamenteux [75]. En raison de la grande détérioration du système de boues activées, l'essai de biodégradabilité a été interrompu au 63^{ème} jour.

IV.1.3.2.3.2 Evolution de la matière active :

Pour les tensio-actifs LAS et LSS, les résultats relatifs à l'évolution des teneurs en matière active sont illustrés graphiquement en fig.45 et 46.

a) LAS:

On constate d'après les figures 45 b et c et 46 a, b et d que pour des concentrations de LAS à l'influent inférieures à 30 mg/l, la concentration de la matière active (MBAS) à l'effluent est très faible. Les teneurs mesurées sont soit nulles, soit proches de zéro, ce qui indique une biodégradation primaire totale ou pratiquement totale du LAS. On relève,

par contre, des valeurs beaucoup plus élevées (supérieures à 5 mg/l) pour une concentration à l'influent de 30 ou 50 mg/l de LAS. Janicke [154] signale que le LAS est modérément biodégradable dans l'intervalle de concentration de 30-100 mg/l.

Des analyses qualitatives par chromatographie en phase gazeuse (C.P.G) ont été effectuées sur des échantillons d'effluents de C1 à C5 .

Les chromatogrammes des figures 51, 52, 54, 55, 57 et 58 montrent qu'une certaine quantité du LAS introduit a été attaquée et désulfonée par les microorganismes car on retrouve sur ces chromatogrammes plusieurs pics du LAB pur (fig.47). Ces derniers sont également en partie présents aussi sur le chromatogramme du produit obtenu après désulfonation chimique d'un échantillon de LAS (fig.48). Aucun pic du LAB pur n'est retrouvé sur le chromatogramme du LAS initial c'est à dire non désulfoné (fig.49) et sur les chromatogrammes des effluents prélevés avant ajout de 30 mg/l de LAS dans C1 et C3 (fig.50 et 53 respectivement) et de 50 mg/l de LAS dans C5 (fig.56) ainsi que sur ceux des effluents de C2 (fig.59 et 60) et de C4 (fig.61) servant de témoins. On constate également une disparition ou une diminution de la hauteur de certains pics 3 heures après l'ajout de 30 mg/l de LAS dans C1 et C3 (fig.52 et 55 respectivement) ou 50 mg/l de LAS dans C5 (fig.58) ce qui montre que la diminution de la concentration du LAS est également due à la biodégradation du LAS par les microorganismes et non pas uniquement à une adsorption de celui-ci sur ces derniers ou aux pertes entraînées par le débordement de la liqueur mixte à cause de la présence de la mousse. Cependant, si pour la cellule C3, la variation de la hauteur des pics est nettement perceptible, ce n'est pas le cas en ce qui concerne C5 qui contient plus de LAS et où l'on constate une plus faible diminution de cette hauteur, ce qui confirme donc l'inhibition des microorganismes à des taux élevés des celui-ci.

b) LSS:

L'élimination du LSS est excellente, la concentration de la matière active (MBAS) à l'effluent demeurant inférieure à 1 mg/l pour toutes les concentrations de LSS étudiées c'est à dire 13.65 mg/l (fig.45 a et 46 c), 27.3 mg/l (fig 45 a et d), 54.6 mg/l (fig.45 d). On observe sur ces figures une élimination totale du LSS ce qui est en accord avec les résultats obtenus par différents auteurs dont Pitter [129], Janicke [154] et Fisher [159].

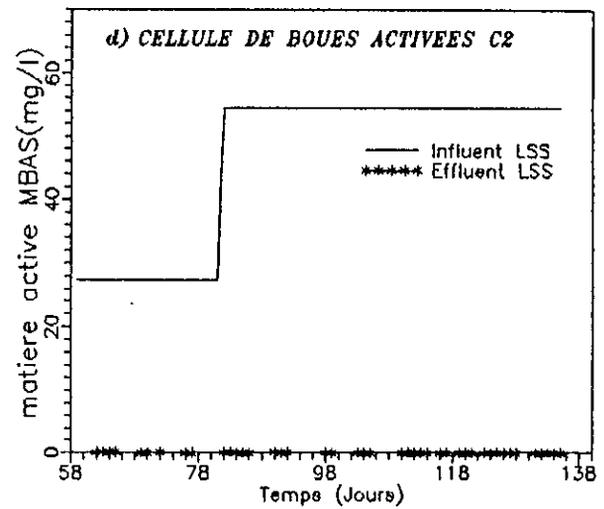
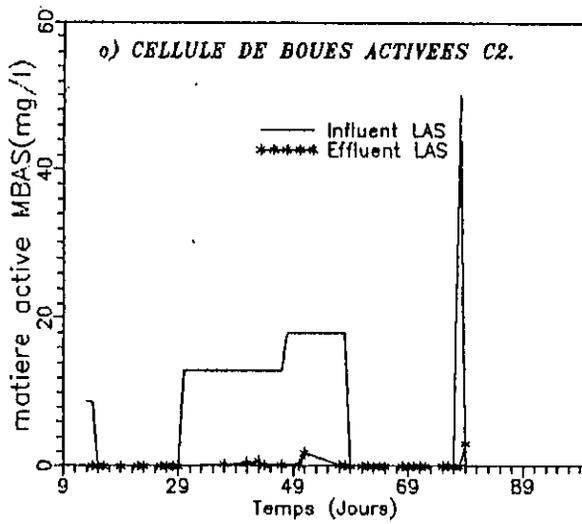
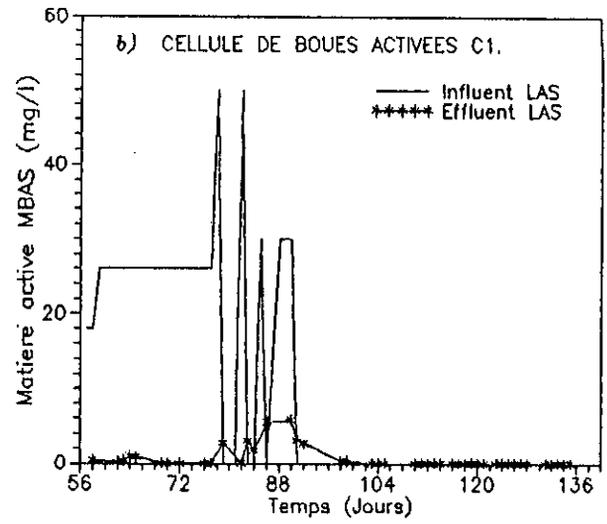
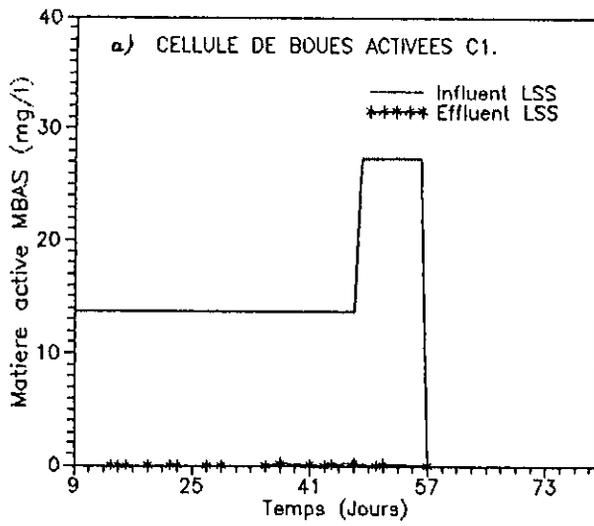


Fig.45: EVOLUTION DE LA MATIERE ACTIVE (MBAS) EN FONCTION DU TEMPS

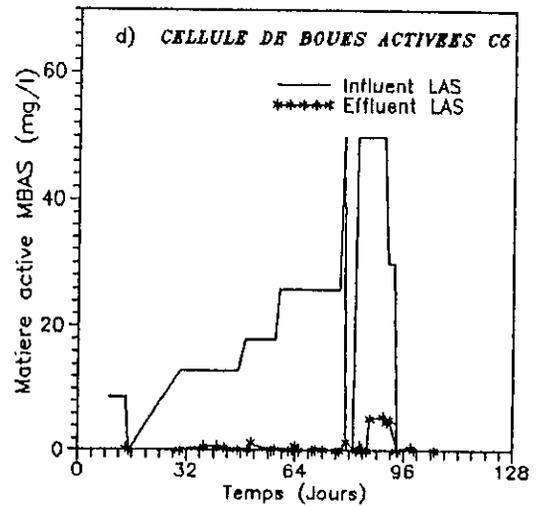
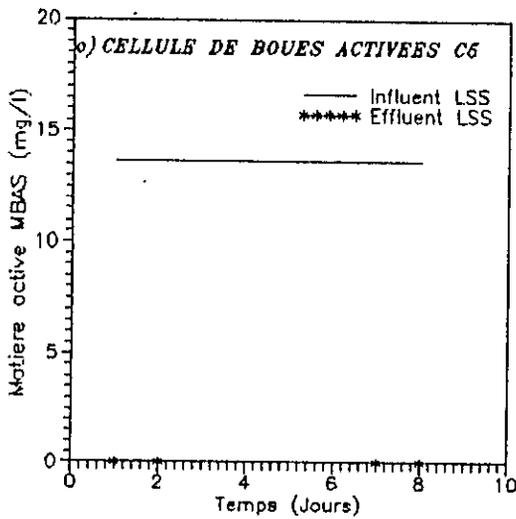
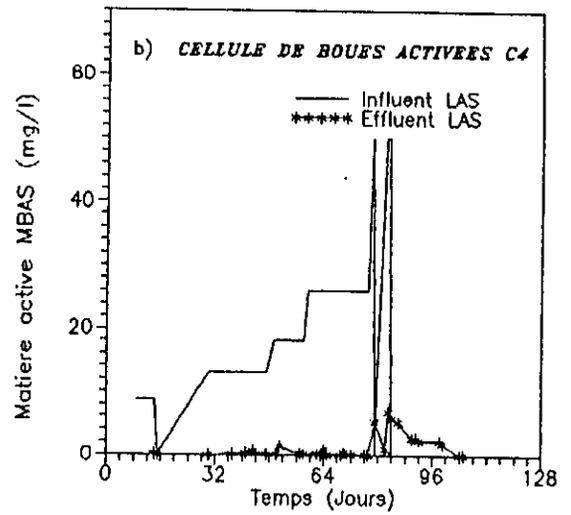
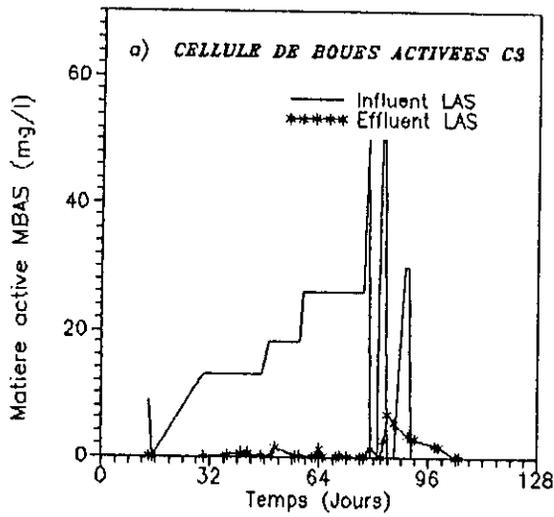


Fig.46: EVOLUTION DE LA MATIERE ACTIVE (MBAS) EN FONCTION DU TEMPS

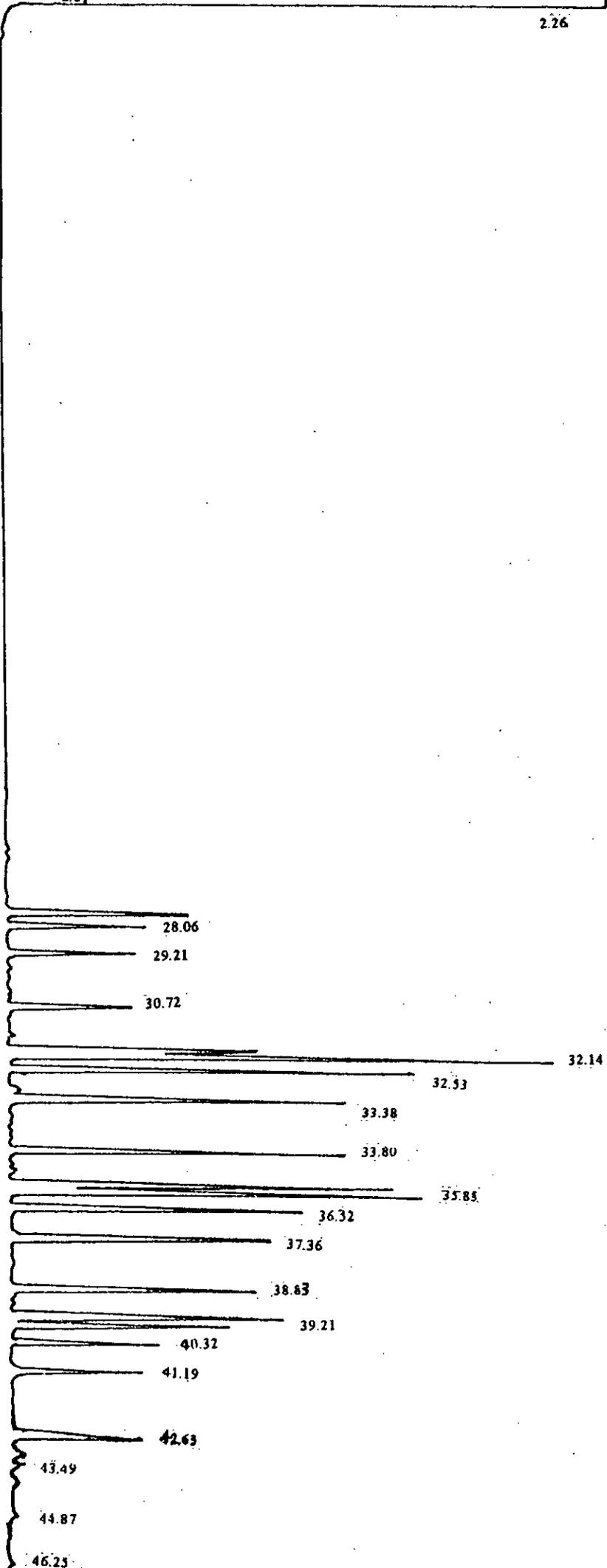


Fig.47: Chromatogramme d'un échantillon de LAB pur. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

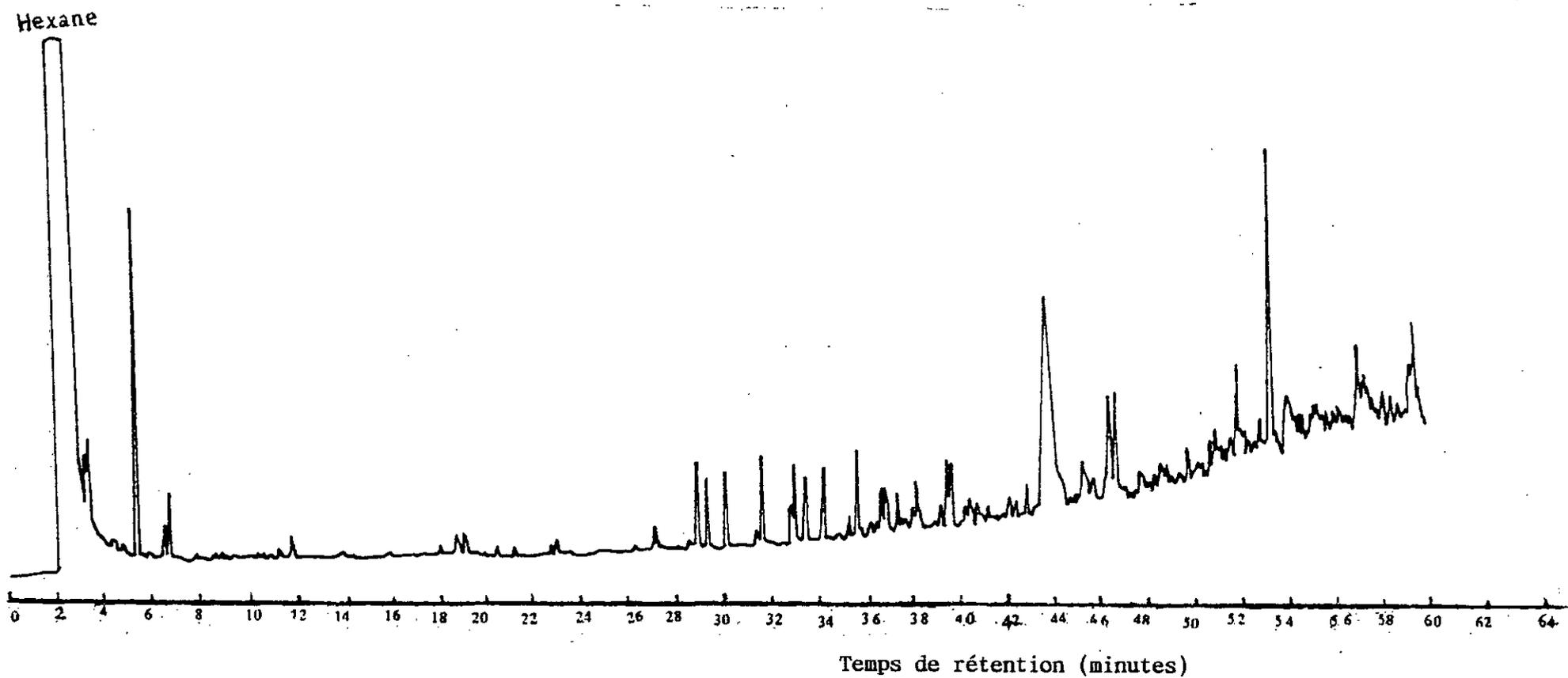


Fig.48: Chromatogramme de l'échantillon obtenu après désulfonation du LAS par voie chimique .

Hexane

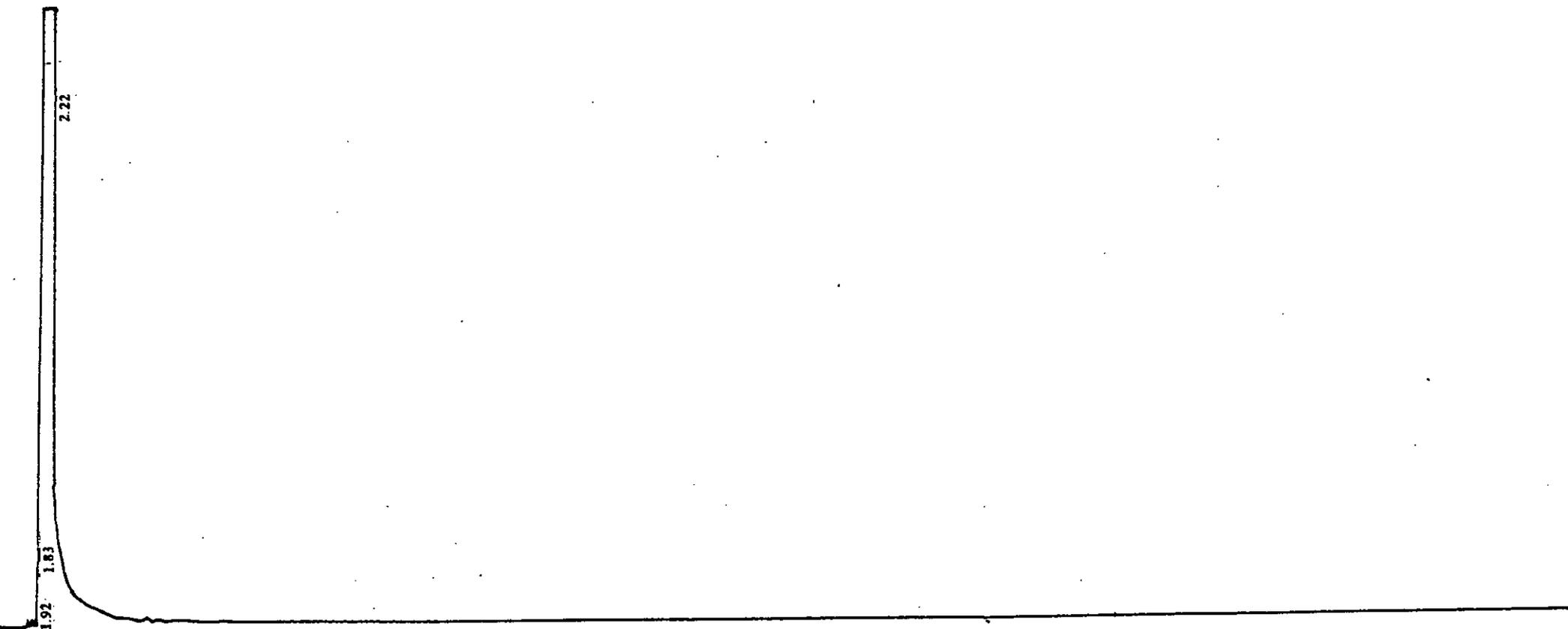


Fig.49: Chromatogramme d'un échantillon de LAS initial. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

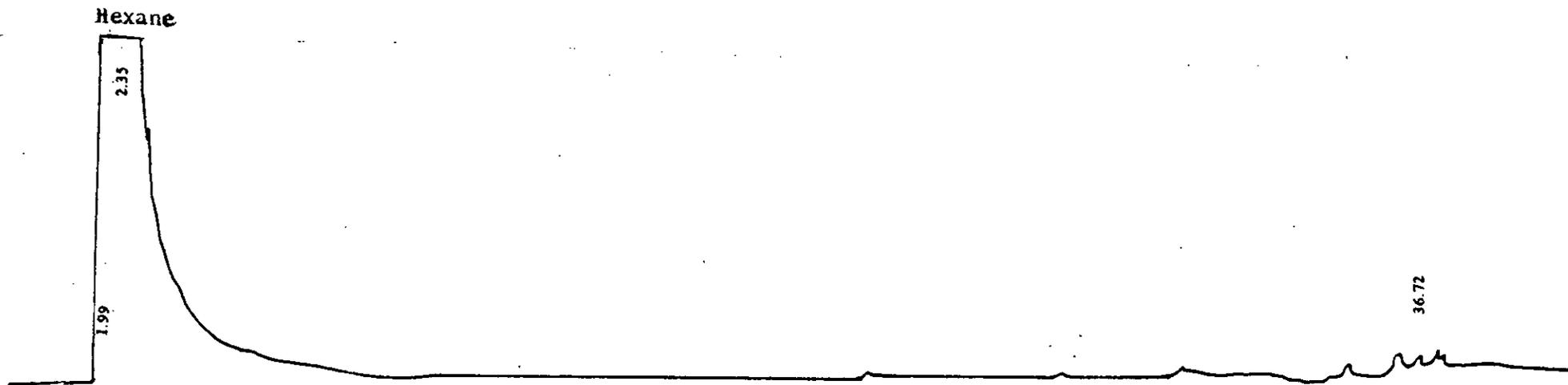


Fig.50: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C1 prélevé avant ajout de 30 mg/l de LAS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

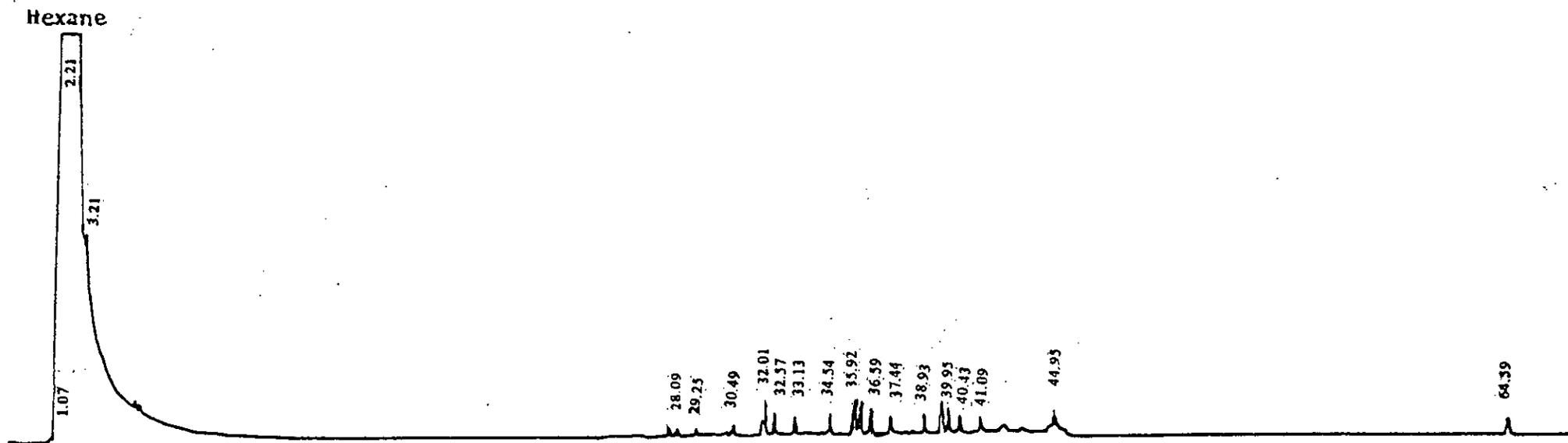


Fig.51: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C1 prélevé une demi-heure après ajout de 30 mg/l de LAS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

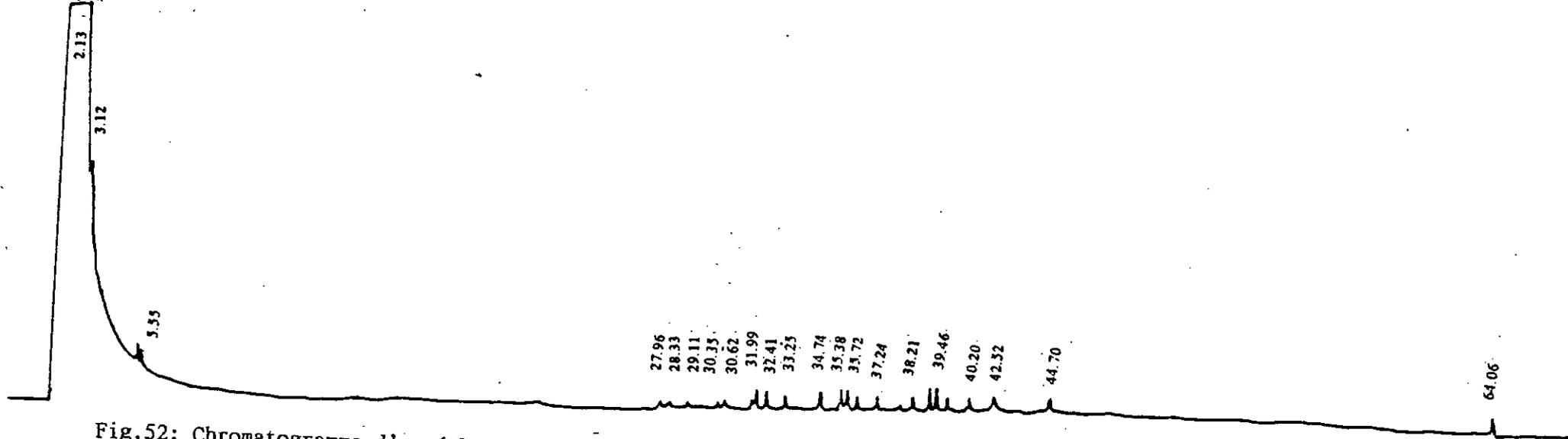


Fig.52: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C1 prélevé 3 heures après ajout de 30 mg/l de LAS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

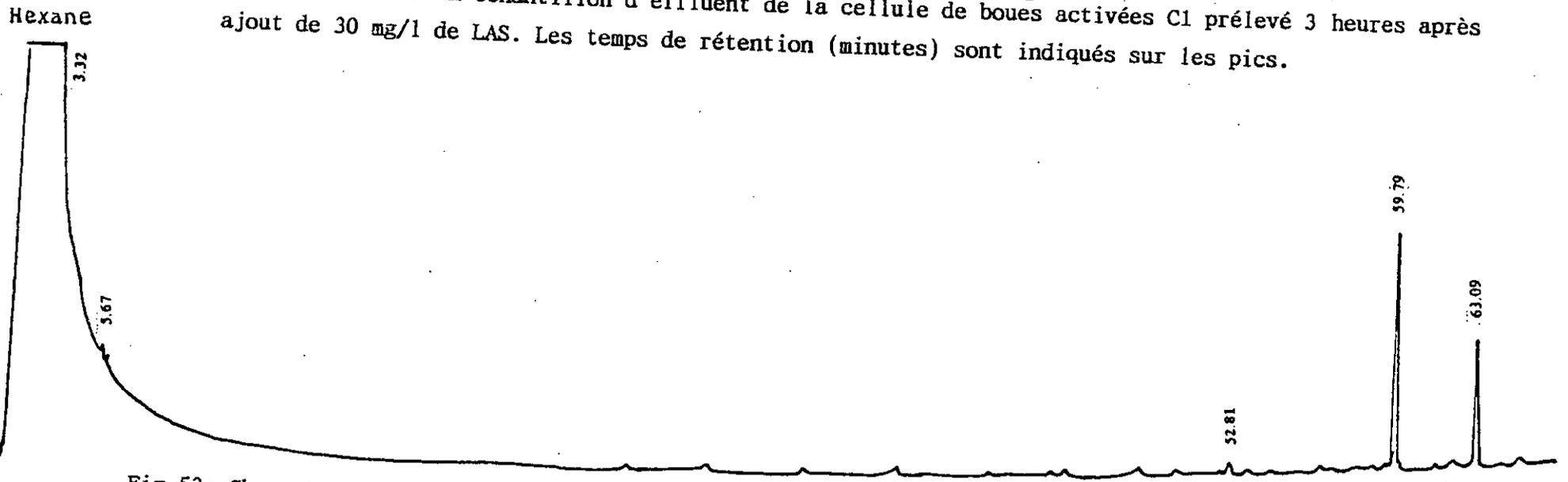


Fig.53: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C3 avant ajout de 30 mg/l de LAS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

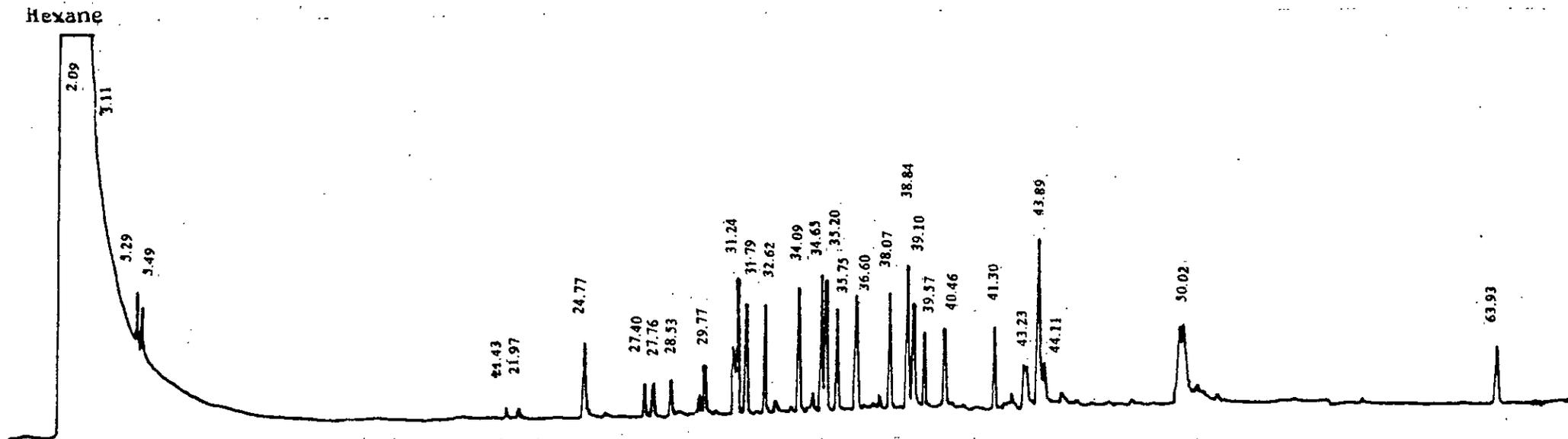


Fig.54: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C3 prélevé une demi-heure après ajout de 30 mg/l de LAS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

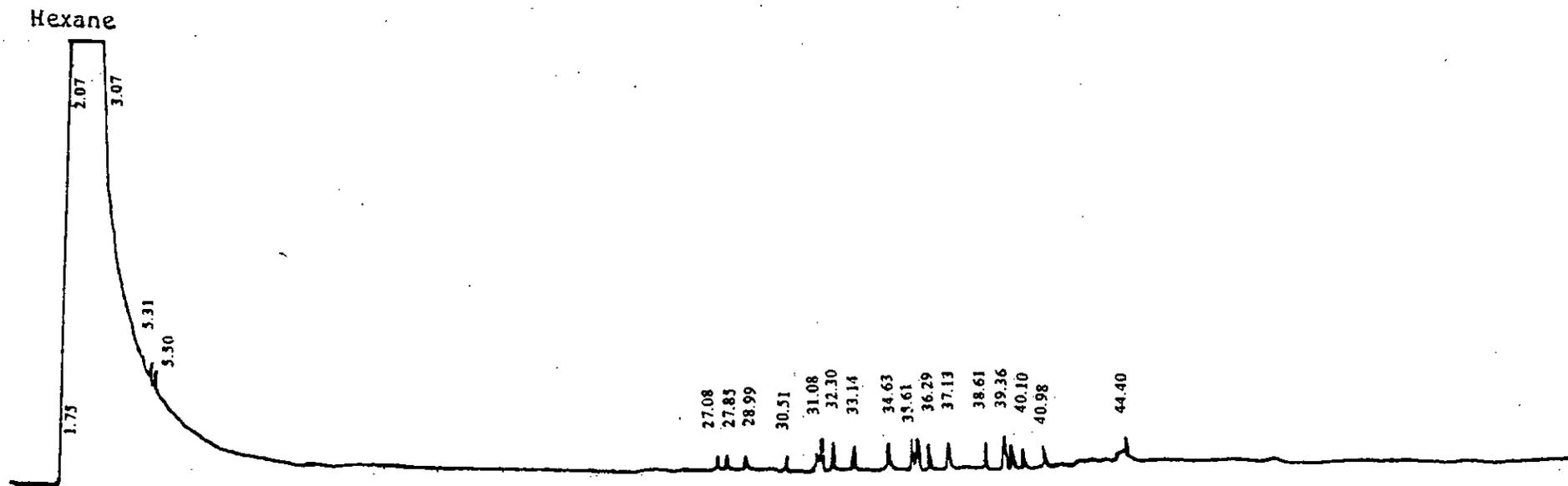


Fig.55: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C3 prélevé 3 heures après ajout de 30 mg/l de LAS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

Hexane

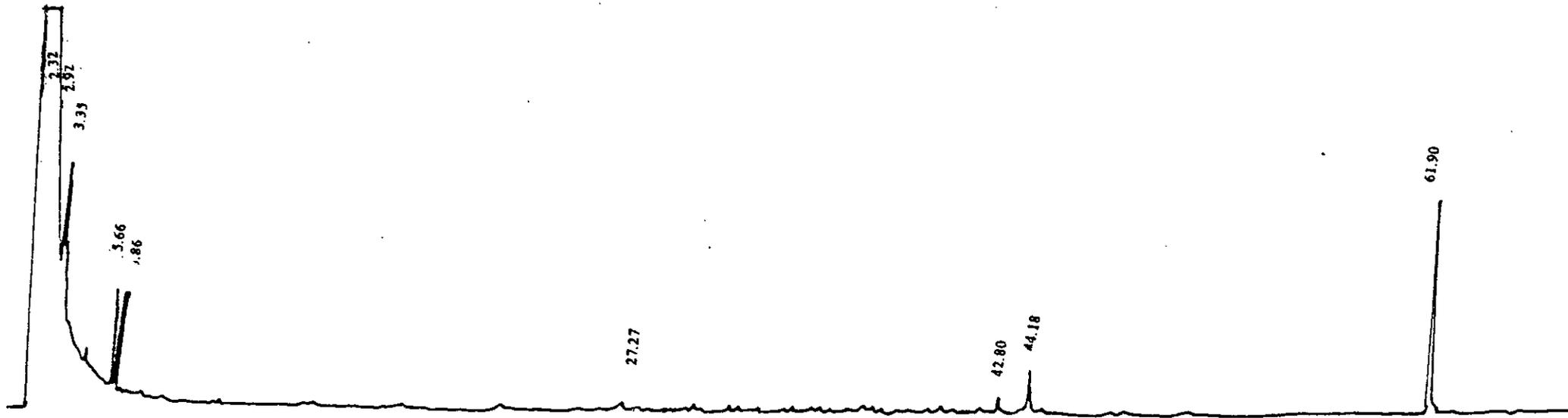


Fig.56: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C5 avant ajout de 50 mg/l de LAS.

Hexane

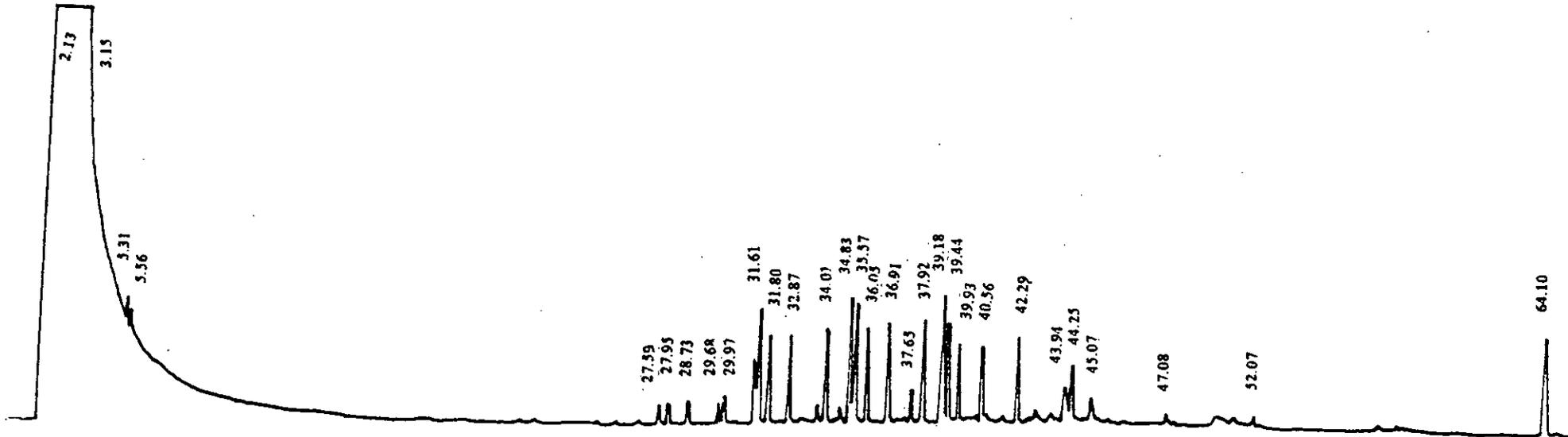
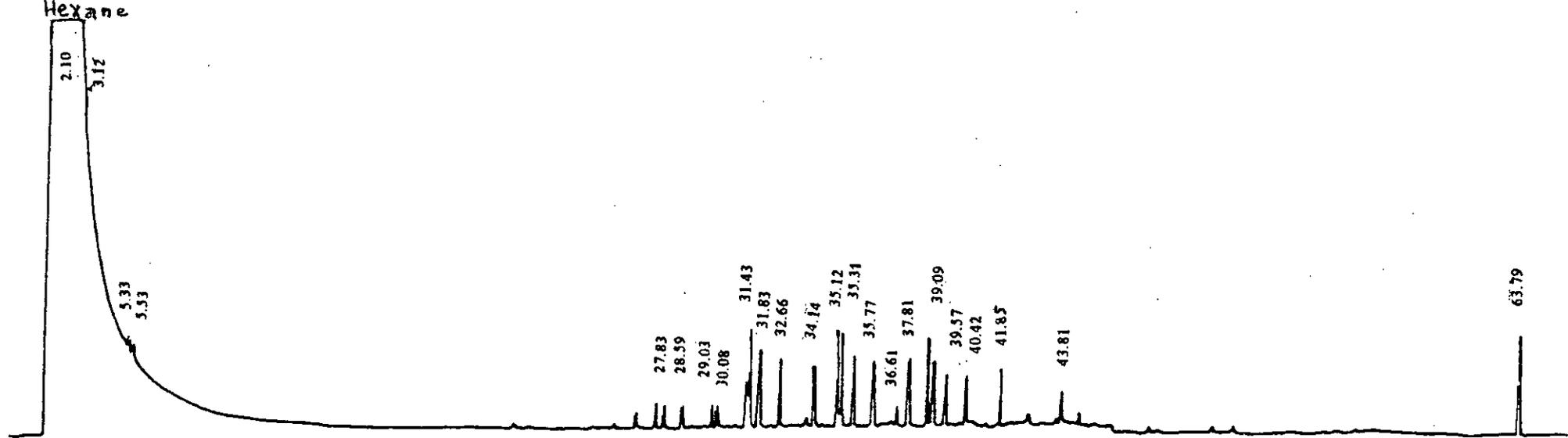


Fig.57: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C5 prélevé une demi-heure après ajout de 50 mg/l de LAS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.



Hexane Fig.58: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C5 prélevé 3 heures après ajout de 50 mg/ de LAS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

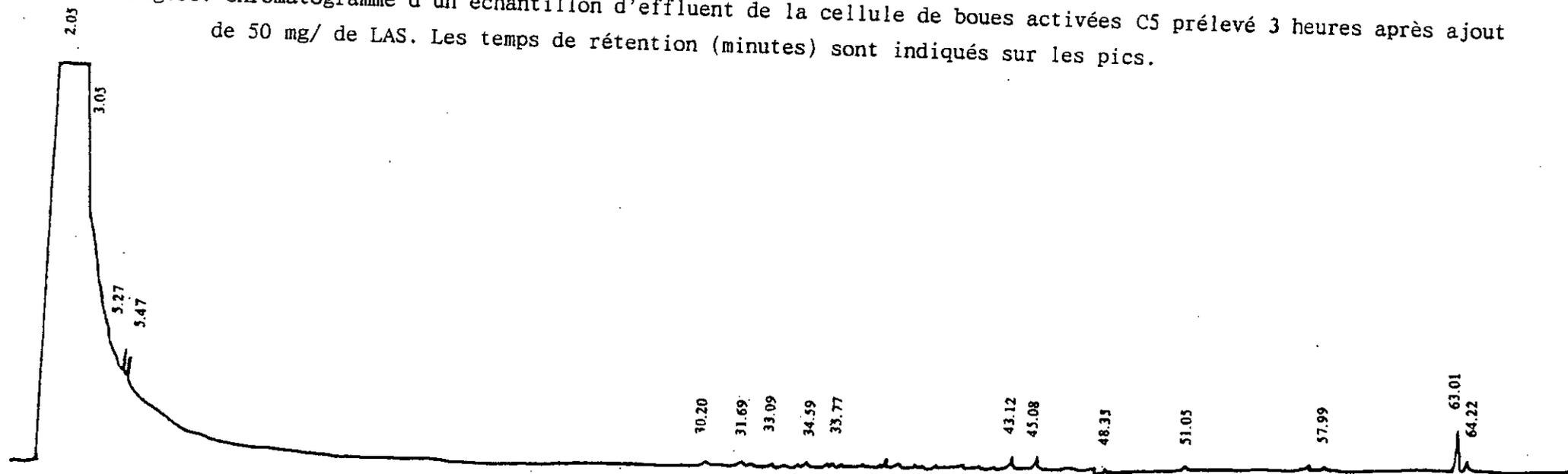


Fig.59: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C2 prélevé une demi-heure après ajout de 54.6 mg/l de LSS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

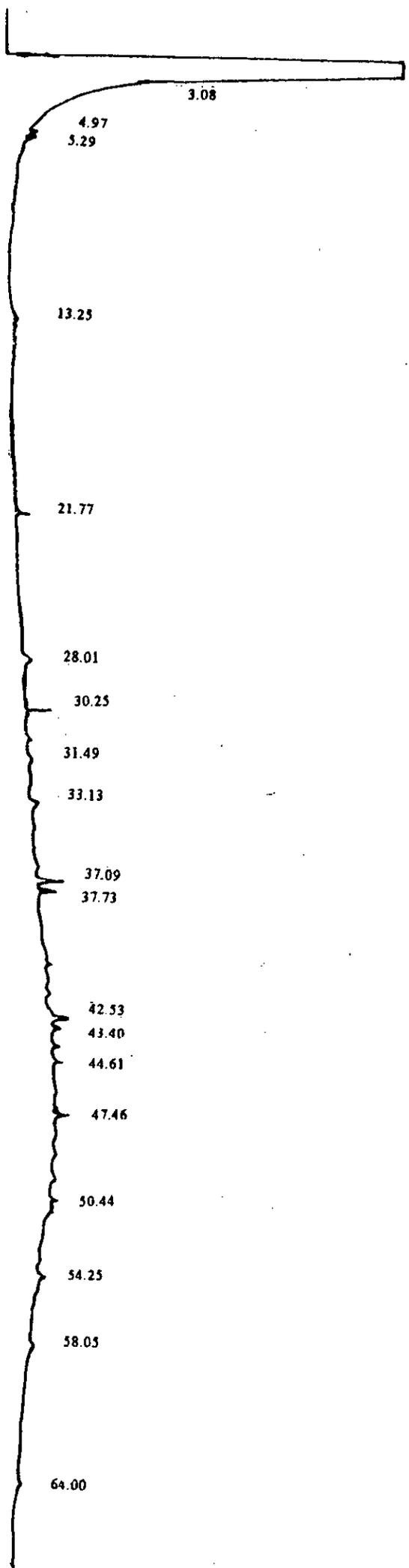


Fig.60: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C2 prélevé 3 heures après ajout Hexane de 54.6 mg/ de LSS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

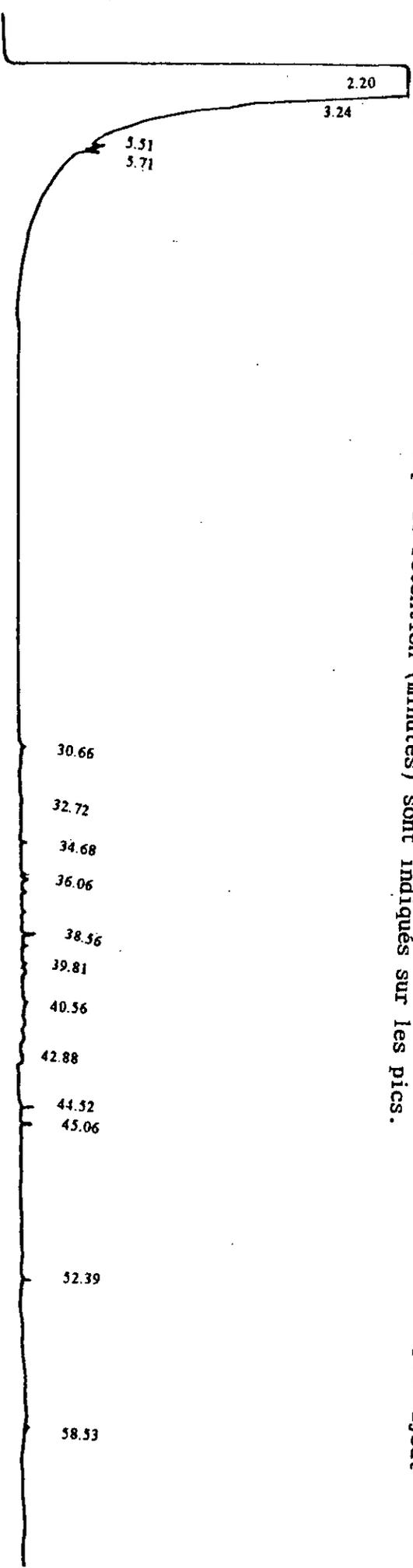


Fig.61: Chromatogramme d'un échantillon d'effluent de la cellule de boues activées C4 prélevé 4 jours après arrêt de l'ajout du LAS. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

IV.1.3.2.3.3 Evolution du LAB:

Afin de vérifier la biodégradabilité du LAB, nous avons effectué l'analyse par C.P.G du LAB initial et de l'effluent de la cellule de boues activées C6 recueilli 24 heures après ajout de 10 mg/l de LAB. Une comparaison des chromatogrammes illustrés en figures 62 et 63 montre que celui-ci est entièrement biodégradé par les boues activées. Le chromatogramme de l'effluent (fig.63) ne contient, en effet, aucun pic caractéristique du LAB initial (fig.62).

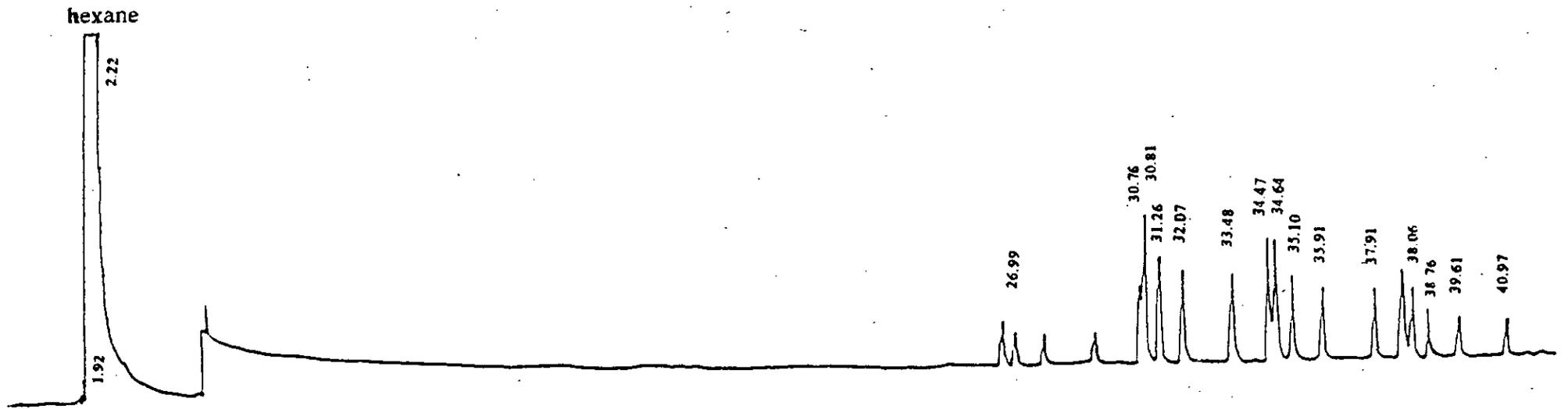


Fig.62:Chromatogramme de l'échantillon de LAB introduit dans la cellule de boues activées C6. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

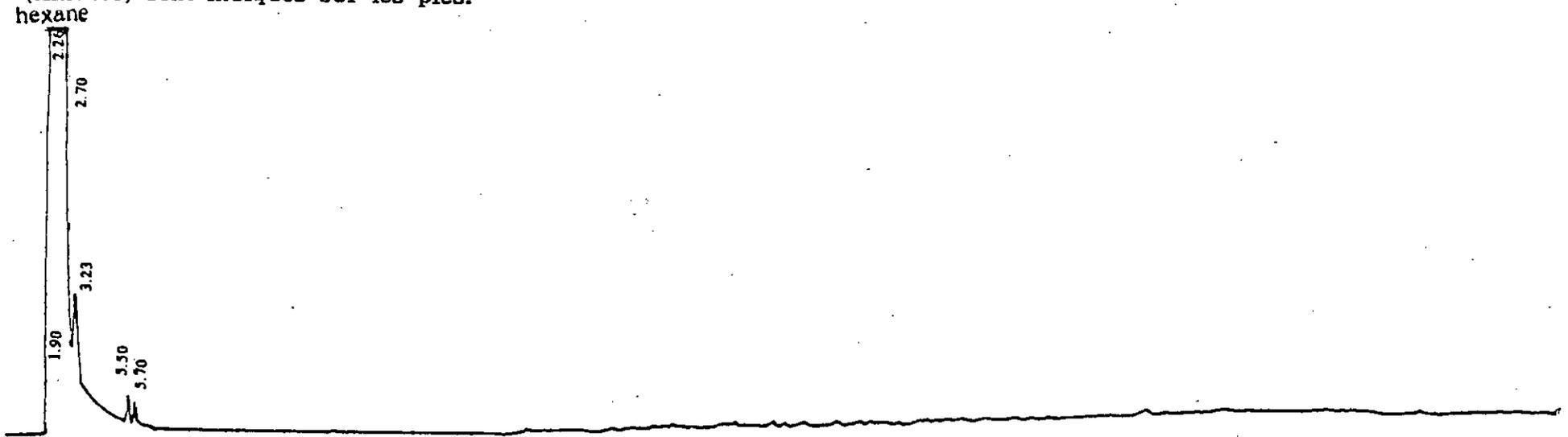


Fig.63:Chromatogramme de l'échantillon d'effluent prélevé 24 heures après ajout du LAB dans la cellule de boues activées C6.. Les temps de rétention (minutes) sont indiqués sur les pics.

IV.1.3.2.3.4 Evolution des MVES:

L'évolution des MVES suivie au cours de cette période est indiquée en figure 64 pour les six cellules de boues activées . On constate, dans un premier temps, une évolution croissante de la concentration des MVES pour des volumes de purge des boues activées de 25 ou 100 ml. L'augmentation de ces volumes à 500 ml, à partir du 49^{ème} jour, a entraîné une diminution rapide des teneurs en MVES. Celles-ci augmentent ensuite progressivement lorsque le volume de purge est ramené à nouveau à 25 ml/jour (61^{ème} jour pour les cellules de boues activées C1 à C5 et 57^{ème} jour pour C6). Bien que la tendance globale soit vers la croissance, on constate toutefois, des fluctuations plus ou moins importantes dans l'évolution des MVES. Ces fluctuations peuvent être dues, entre autres, au flottement des boues activées à la surface des cellules durant l'ajout de 10 mg/l de LAB dans C6, de 26 mg/l de LAS dans C1, C3, C4 et C5 et de 27.3 mg/l et 54.6 mg/l de LSS dans C2, probablement à cause du phénomène de dénitrification qui peut se produire en aération prolongée [17]. Elles peuvent être également liées au débordement de la liqueur mixte hors des cellules et aux pertes des boues activées dans les effluents du fait de la formation d'une grande quantité de mousse, après l'ajout de 30 mg/l ou 50 mg/l de LAS dans les cellules C1 à C5. La présence de celle-ci montre l'inhibition et l'intoxication des microorganismes par ces concentrations de LAS, ce qui est d'ailleurs constaté par la nette diminution des MVES.

IV.1.3.2.3.5 Evolution du pH:

La figure 65 montre une fluctuation du pH qui est probablement due aux variations de conditions opératoires. Celui-ci reste toutefois dans un intervalle de 7-8 qui est optimale pour l'épuration biologique et conforme aux normes de rejet [23].

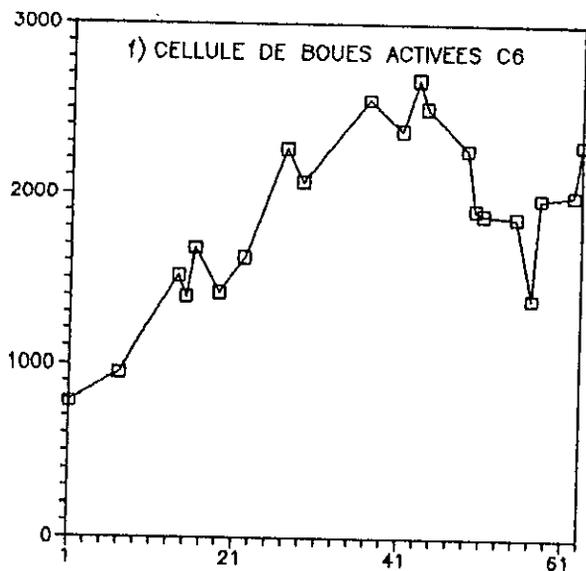
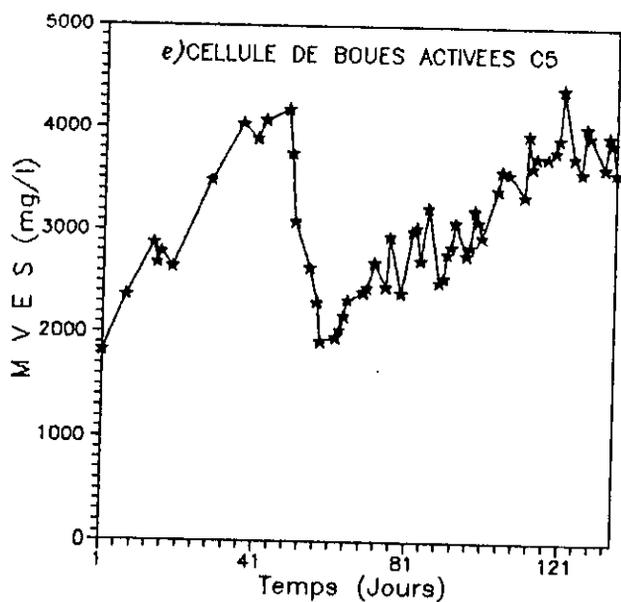
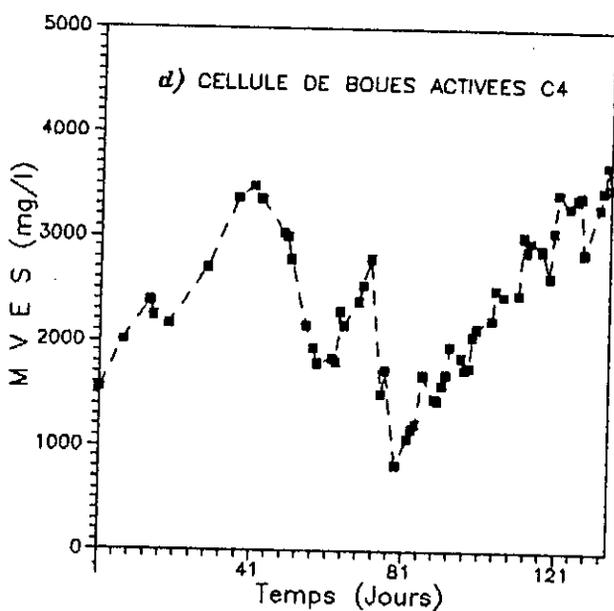
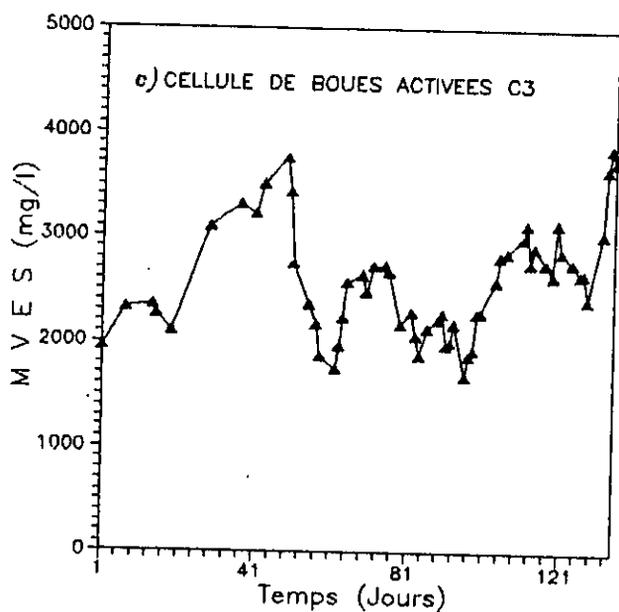
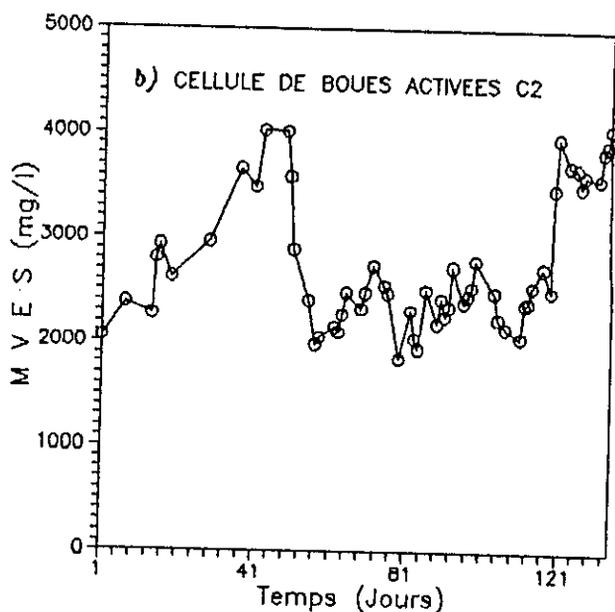
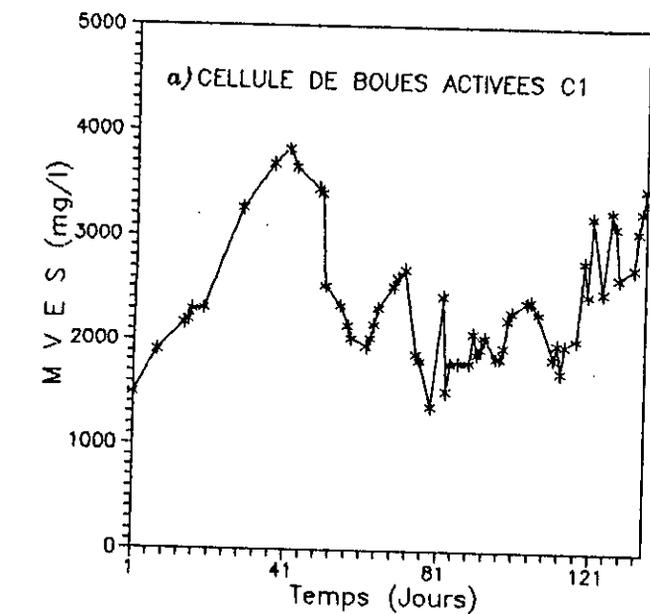


Fig.64: EVOLUTION DES M V E S DANS LES DIFFERENTES CELLULES DE BOUES ACTIVEES.

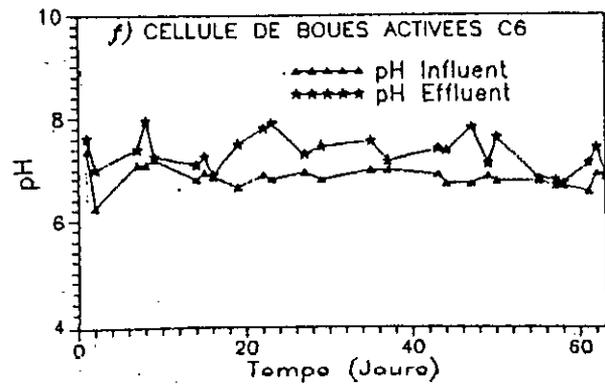
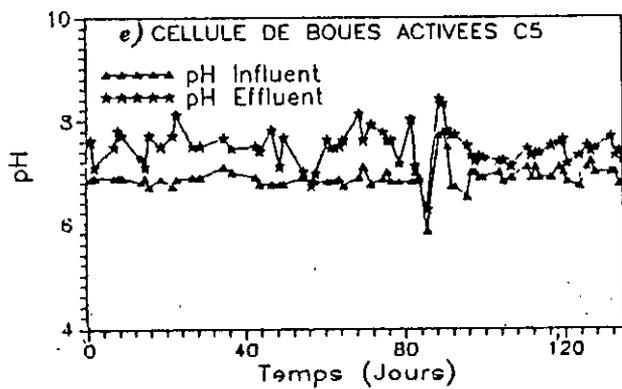
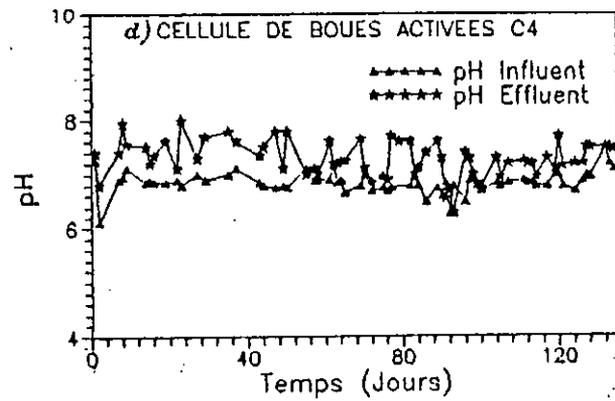
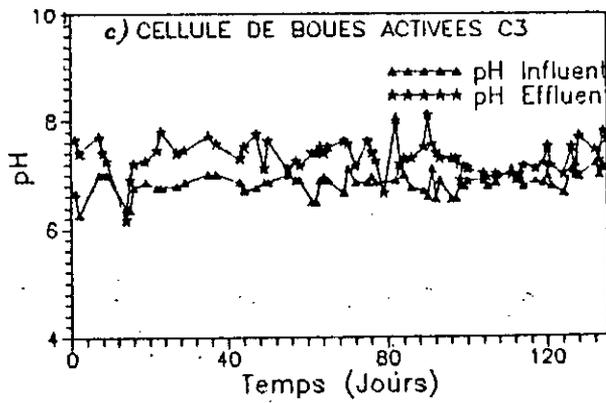
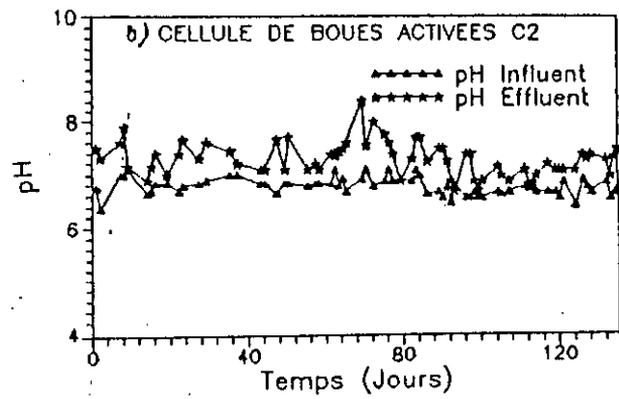
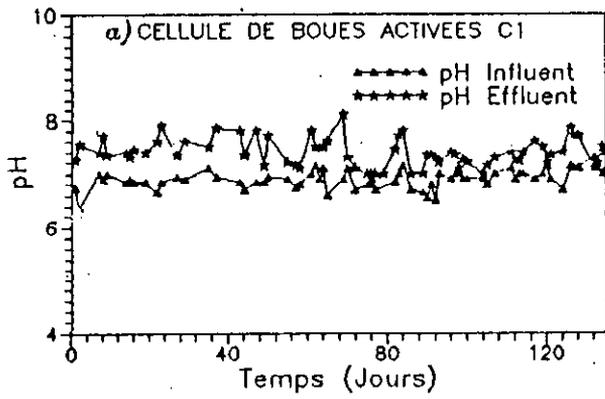


Fig. 65 : EVOLUTION DU pH EN FONCTION DU TEMPS

IV.1.3.2.3.6 Analyse bactériologique:

L'analyse bactériologique effectuée dans toutes les cellules de boues activées avant ajout du LAS, du LSS et du LAB, a révélé la présence de streptocoques, de staphylocoques, de champignons (levures et moisissures) et d'entérobactéries dont *Escherichia Coli* et de nombreuses colonies de *Protéus*. Après ajout du LAS, du LSS ou du LAB, les analyses réalisées ont donné les résultats que nous résumons comme suit:

- Des colonies saumon ou entérobactéries pouvant appartenir au genre *Escherichia*, *Levinea*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Yersinia* ont été isolées sur gélose hektoen.
- Des colonies bleu-vert ou vertes (suspicion de *shigella* ou de *salmonella*) ont été également isolées sur gélose hektoen.
- Des colonies rouges ou coliformes ont été isolées sur gélose salmonella-shigella (SS).
- Des colonies jaunes avec halo jaune pouvant appartenir au genre *Escherichia Coli*, *Klebsiella* et *Citrobacter* ont été isolées sur milieu BCP Lactosé.
- des colonies jaunes (levures et moisissures) ont été isolées sur milieu OGA.
- Des colonies avec un halo jaune ou *Staphylococcus auréus* ont été isolées sur milieu de Chapman.

On constate que l'on retrouve les mêmes espèces de bactéries et de champignons dans toutes les cellules de boues activées. Les tensio-actifs alkylbenzènesulfonates et alkylsulfates peuvent être dégradés par ces types de microorganismes [9,155,160]. Il en est de même en ce qui concerne les alkylbenzènes [9]. On note cependant la disparition des streptocoques et des *Escherichia Coli*, pour une concentration de 18 mg/l de LAS, et celle des *Protéus* et des *Staphylocoques*, pour une concentration de LA

supérieure à 18 mg/l. La disparition de ces différentes espèces de bactéries peut s'expliquer par leur intoxication par ces concentration de LAS ou par la présence de sous-produits toxiques résultant de sa biodégradation [140].

IV.2 Evaluation de la biodégradabilité des tensio-actifs LAS, ABS et LSS par les tests de demande biochimique en oxygène (DBO):

IV.2.1 Matériels et méthodes:

Les tests de DBO ont été également utilisés pour la détermination, dans un milieu faiblementensemencé, de la biodégradabilité et de la toxicité pour les microorganismes des tensio-actifs anioniques alkylbenzène sulfonates LAS, ABS et alkysulfate LSS.

Une eau de DBO aérée (milieu minéral) [161] estensemencée avec des microorganismes provenant d'une des cellules de boues activées. On ajoute à ce milieu différents volumes d'une solution concentrée de tensio-actifs LAS ou LSS constituant la seule source de carbone pour les microorganismes.

Les concentrations étudiées sont égales à 17.85; 35.70; 107.10 et 178.50 mg/l pour le LAS. Pour le LSS, les concentrations utilisées sont égales à 13.65; 27.30 et 136.50 mg/l.

Afin d'étudier l'effet des tensio-actifs LAS et ABS sur l'oxydation biologique d'un substrat organique biodégradable, différents volumes de solution concentrée de LAS ou d'ABS ont été ajoutés à l'eau de DBOensemencée et contenant 100 mg/l de nutraforce. Les concentrations étudiées sont égales à 26; 52; 78; 104 et 130 mg/l pour le LAS. Des concentrations de 17; 38; 59.23; 80.52 et 101.81 mg/l ont été étudiées pour l'ABS. De même, l'effet des tensio-actifs LAS et LSS sur l'oxydation biologique du labnamine a été étudié avec une eau de DBOensemencée contenant 200 mg/l de labnamine, 13; 26 et 130 mg/l de LAS. Des concentrations de 27.30 et de 136 mg/l ont été utilisées en ce qui concerne le LSS.

La mesure de la DBO par la méthode manométrique a été effectuée grâce à un respiromètre Hach [20].

IV.2.2 Résultats et discussions:

Les résultats des tests ainsi que les différentes concentrations des tensio-actifs utilisées sont indiqués dans les figures 66 à 72.

On constate que les tensio-actifs LAS et ABS sont lentement dégradés par les microorganismes et que la DBO diminue lorsqu'on utilise des teneurs élevées en LAS (fig.66, 68, 69 et 70) ou en ABS (fig. 71 et 72) ce qui indique, à ce stade, un effet inhibiteur ou toxique de ces tensio-actifs pour les microorganismes. La littérature mentionne que, dans un test de DBO, la consommation d'oxygène a été inhibée par 60 ppm d'ABS commercial [134] et que la vitesse de métabolisation est fortement diminuée en présence de tensio-actifs [18].

Les figures 69 à 72 montrent que l'inhibition par les tensio-actifs LAS et ABS dépend également de la concentration des microorganismes et que la DBO augmente avec celle-ci. En effet, le milieu contenant le nutraforce et le tensio-actif LAS ou ABS a étéensemencé avec 25 ml de surnageant de boues activées (1^{er} essai) (fig.69 et 71) et 25 ml de boues activées non décantées (2^{ème} essai) (fig.70 et 72). On constate par exemple que la DBO du milieu contenant le nutraforce et le LAS reste inférieure à la DBO du milieu qui contient uniquement le nutraforce, pour des concentrations de LAS supérieures à 26 mg/l et pour un ensemencement du milieu synthétique avec 25 ml de surnageant de boues activées (fig.69). Lorsque l'ensemencement du milieu synthétique est effectuée avec 25 ml de boues activées non décantées et donc contenant plus de microorganismes, la DBO du milieu composé de nutraforce et de LAS devient supérieure à la DBO du nutraforce seul et ceci pour des concentrations de LAS allant de 52 à 104 mg/l (fig.70).

Larson et al [162] indiquent une nette diminution de la vitesse de dégradation d'un LAS (vitesse de consommation d'oxygène) à partir d'une concentration de 20 mg/l, ce qu'ils attribuent à un effet toxique de ce tensio-actif sur les microorganismes. Ces auteurs signalent également que la toxicité du LAS a été partiellement surmontée quand la concentration initiale des microorganismes a été triplée. Ils signalent toutefois une période d'adaptation prolongée (environ 7 jours) et une diminution de la vitesse de biodégradation à 20 mg/l de LAS par rapport à 5 et 10 mg/l.

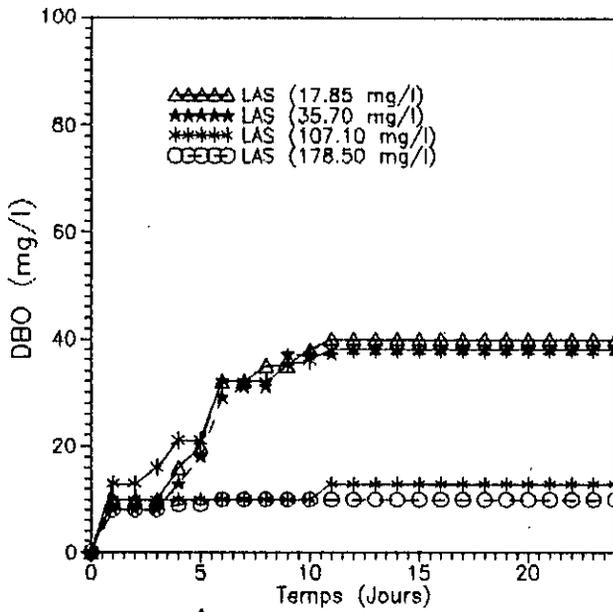


Fig.66: DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGENE DU LAS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS

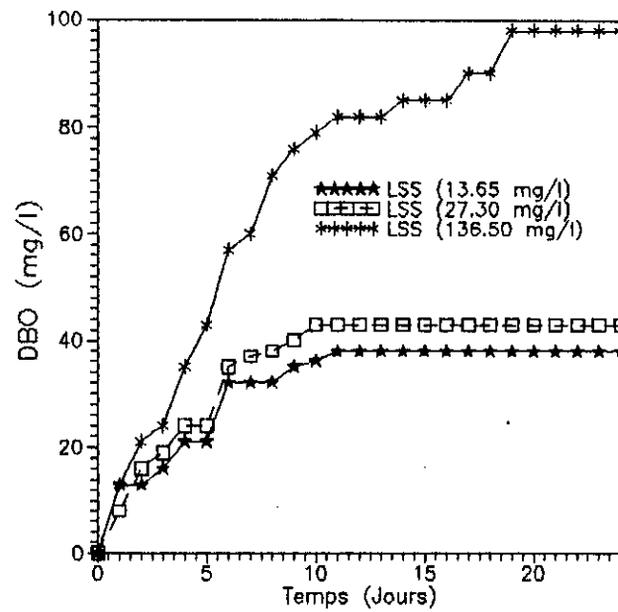


Fig.67: DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGENE DU LSS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS.

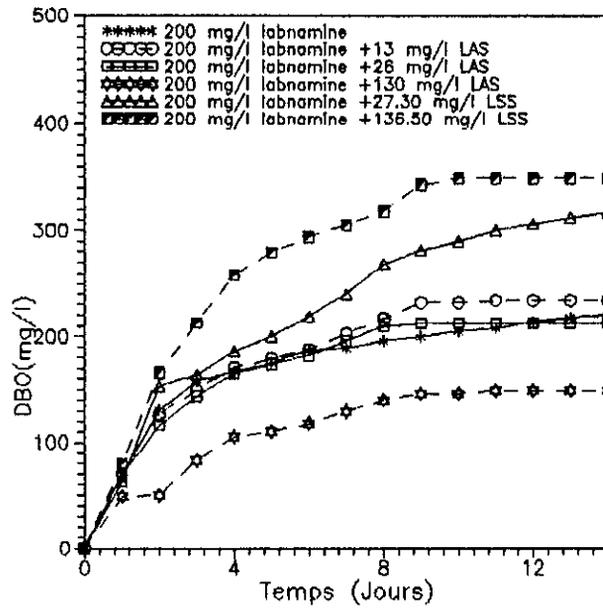


Fig.68: EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE LAS ET DE LSS SUR L'OXYDATION BIOLOGIQUE DU LABNAMINE.

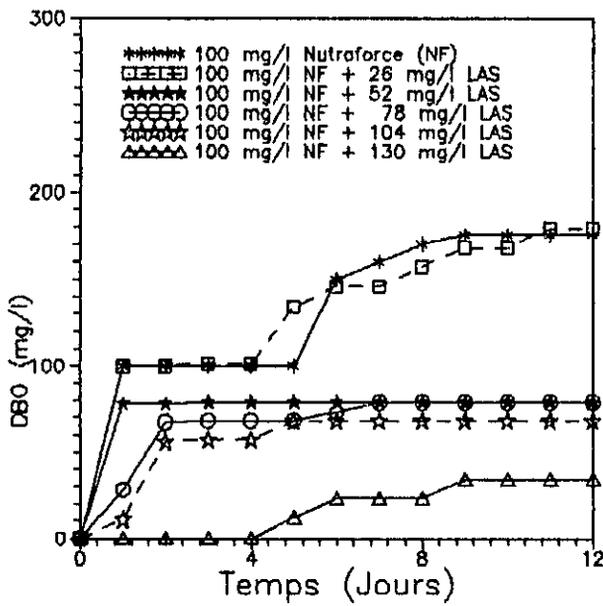


Fig.69: EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE LAS SUR L'OXYDATION BIOLOGIQUE DU NUTRAFORCE (1^{er}essai).

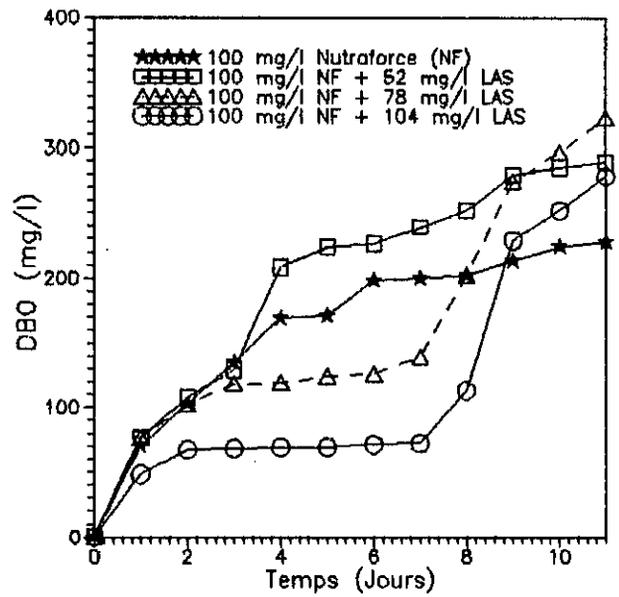


Fig.70: EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE LAS SUR L'OXYDATION BIOLOGIQUE DU NUTRAFORCE (2^{eme}essai).

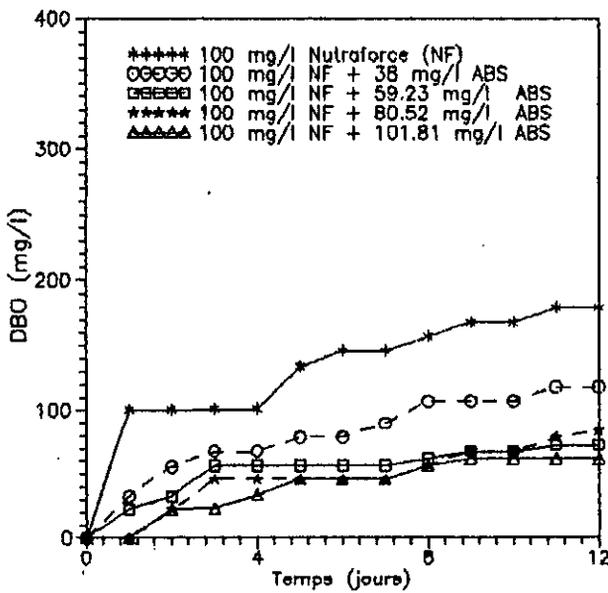


Fig.71: EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ABS SUR L'OXYDATION BIOLOGIQUE DU NUTRAFORCE (1^{er}essai).

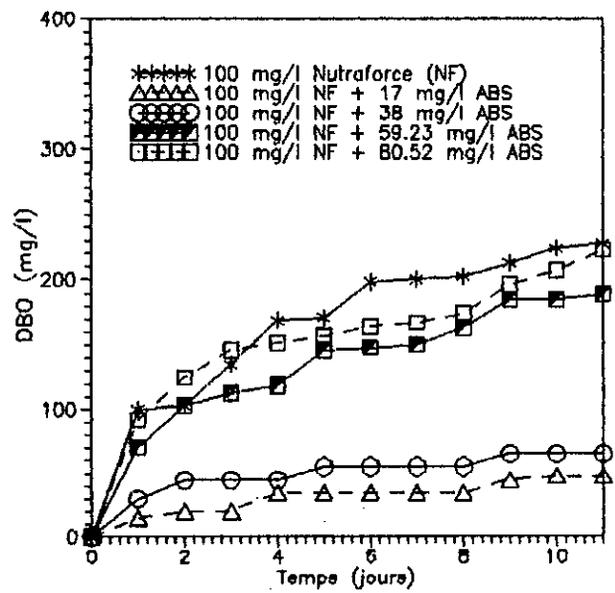


Fig.72: EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ABS SUR L'OXYDATION BIOLOGIQUE DU NUTRAFORCE (2^{eme}essai).

En ce qui concerne le LSS, on observe, contrairement aux tensio-actifs LAS ou ABS, une augmentation de la DBO pour des concentrations croissantes de ce tensio-actif (fig.67 et 68) ce qui montre qu'il n'y a aucune inhibition des microorganismes pour toutes les concentrations de LSS étudiées.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Sheets et al [163] qui indiquent que le laurylsulfate de sodium augmente la DBO d'une eau usée et qu'une concentration d'environ 2 ppm de ce tensio-actif suffit à doubler celle-ci. Ces auteurs ont trouvé que le laurylsulfate de sodium est plus actif dans l'augmentation de la DBO qu'un dodécylbenzènesulfonate de sodium ce qui peut s'expliquer par le fait que le lauryl sulfate de sodium soit un composé à chaînes linéaires et que le dodécylbenzène sulfonate de sodium contienne un noyau aromatique. Ainsi et conformément aux résultats d'autres études [164], les microorganismes métabolisent plus rapidement les tensio-actifs à longues chaînes alkyles que ceux qui ont des noyaux aromatiques.

IV.3 Evaluation de la biodégradabilité du LAS par les tests de croissance bactérienne:

IV.3.1 Matériels et méthodes:

Des tests de croissance, en présence de LAS, ont été effectués avec des souches de bactéries provenant de l'institut Pasteur: *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), *Pseudomonas fluorescens* (*P.fluorescens*) et *Pseudomonas chlororaphis* (*P.chlororaphis*).

Le milieu de culture utilisé est un milieu minéral PAS (phosphate ammonium salt) décrit par Blanchet [165] et contenant différentes concentrations de LAS.

- Composition du milieu minéral:

* PA (phosphate ammonium) concentré:

$K_2 HPO_4$ (M)-----100 ml
 KH_2PO_4 (M)----- --50 ml
 NH_4Cl (M)----- 160 ml

** Solution concentrée de sels (x100):

$MgSO_4, 7H_2O$ -----19.5 g
 $MnSO_4, H_2O$ -----5 g
 $FeSO_4, 7H_2O$ -----5 g
 $CaCl_2, 2H_2O$ -----0.3 g
Acide ascorbique-----1.0 g
 H_2O q.s.p.-----1 litre

*** Milieu PAS:

910 ml d'eau sont ajoutés à 77.5 ml de PA concentré . On ajoute ensuite stérilement 10 ml de la solution concentrée à la solution obtenue et autoclavée à 210° c.

200 ml du milieu de culture sont introduits dans des erlenmeyers de 250 ml et ensemencés avec les souches de *Pseudomonas*. Les erlenmeyers sont ensuite fermés avec du coton stérile recouvert de papier aluminium et les cultures sont réalisées à 30° c sur agitateur magnétique.

Deux tests de croissance ont été réalisés:

Le 1^{er} test a permis d'étudier la croissance de *P.aeruginosa* en présence de 5; 10; 20; 50 et 100 mg/l de LAS. La croissance de *P.aeruginosa*, *P.chlororaphis*, *P.fluorescens* et de ces trois souches prises ensemble a été étudiée en présence de 26 mg/l de LAS au cours du 2^{ème} test.

La croissance bactérienne a été déterminée par spectrophotométrie (turbidimétrie) à 620 nm [166].

IV.3.2 Résultats et discussions:

La figure 73 montre une croissance faible pendant 10 jours de *P.aeruginosa* pour des concentrations de LAS allant de 5 à 20 mg/l. La croissance est légèrement inhibée pour une concentration de 50 mg/l de LAS et une concentration de 100 mg/l de LAS s'est révélée nettement bactéricide pour *P.aeruginosa*. Swisher [9] indique que l'inhibition des microorganismes par des tensio-actifs anioniques devient évidente dans l'intervalle de concentrations compris entre 100-1000 mg/l et que les bactéries peuvent être intoxiquées ou inhibées à des concentrations de l'ordre de 25-50 mg/l. Aubert et al [167] ont trouvé un seuil de toxicité directe entre 10-20 mg/l d'un tensio-actif ABS pour une bactérie marine appartenant au genre *Pseudomonas*. On constate sur la figure 74 une croissance plus importante, après 10 jours, des différentes souches de *Pseudomonas* en présence de 26 mg/l de LAS utilisé comme seule source de carbone. On remarque sur les courbes de croissance des paliers pouvant correspondre à des phases d'adaptation des bactéries pour la biodégradation du LAS ou des sous-produits résultant de celle-ci. Ainsi, la métabolisation des détergents nécessite une période d'adaptation. La biodégradation du LAS est indiquée par la diminution de la concentration de la matière active (MBAS) qui a atteint à la fin de l'essai 13.8 mg/l, 13.5 mg/l et 6.8 mg/l soit 47 % ; 48 % et 73.85 % de rendement d'élimination du LAS par *P.aeruginosa*, *P.chlororaphis* et par les trois souches en mélange respectivement.

Du fait de la perte accidentelle du milieu de culture, la croissance de *P.fluorescens* n'a pu être suivie que jusqu'au 15^{ème} jour. Le meilleur rendement d'élimination est obtenu avec le mélange des trois souches; on observe cependant, à partir du 21^{ème} jour, une diminution de la croissance des bactéries qui pourrait être due à une intoxication des microorganismes par la formation de sous-produits de biodégradation car ceux-ci peuvent s'avérer plus toxiques que le LAS lui-même [140].

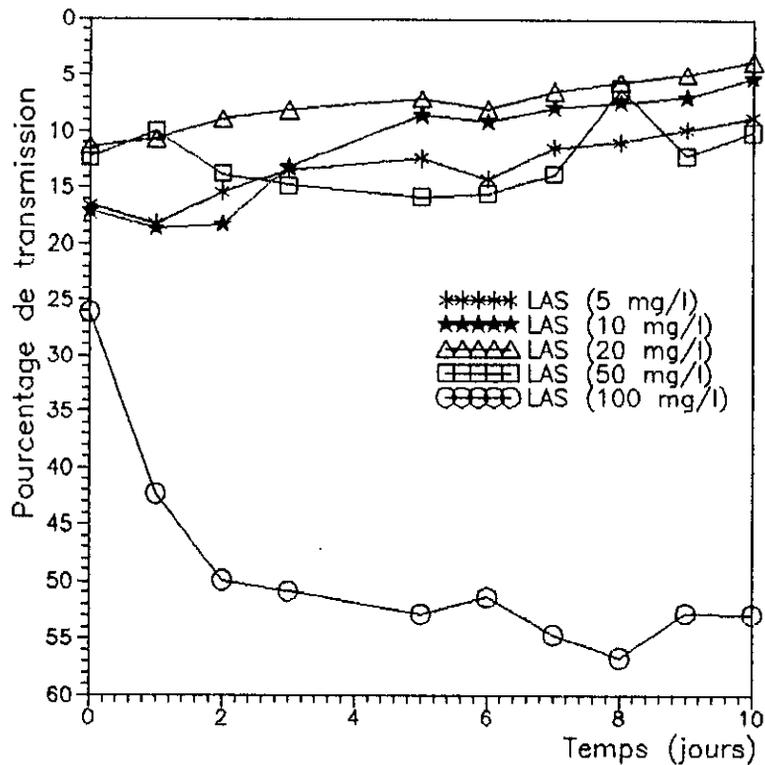


Fig.73: Courbes de croissance de *P.aeruginosa* en presence de concentrations croissantes de LAS.

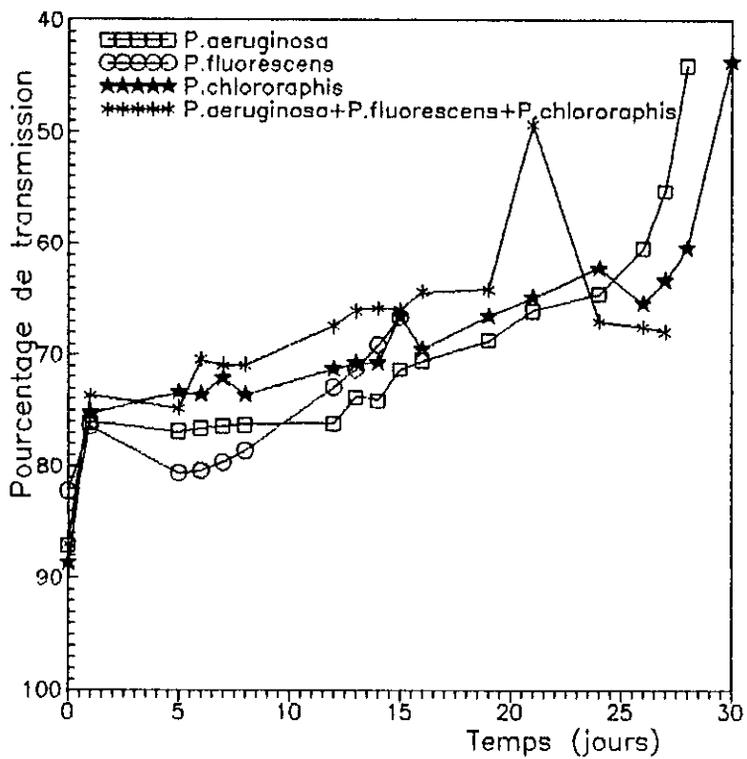


Fig.74: Courbes de croissance des bacteries *Pseudomonas*:*P.aeruginosa*+*P. fluorescens*+*P.chlororaphis* en presence de 26 mg/l de LAS.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de notre travail a été l'étude de la biodégradabilité d'un tensio-actif anionique alkylbenzènesulfonates de sodium linéaires (LAS) entrant dans la composition d'un produit commercial couramment utilisé, notamment dans le domaine domestique. A cet effet, le LAS a été soumis à des tests de traitabilité biologique par boues activées, de demande biochimique en oxygène (DBO) et de croissance bactérienne.

Pour comparaison, la biodégradabilité des tensio-actifs anioniques alkylbenzènesulfonates de sodium (ABS) et alkylsulfate de sodium (LSS) et du mélange d'alkylbenzènes linéaire (LAB) a été également étudiée.

La traitabilité par boues activées du LAS en présence d'un deuxième polluant organique a été étudiée en deux parties.

La première partie a porté sur l'étude de l'élimination biologique du LAS en présence du substrat organique nutraforce.

La deuxième partie a concerné l'étude de l'épuration biologique du LAS en présence du substrat organique labnamine. La biodégradabilité du laurylsulfate de sodium (LSS) et du composé alkylbenzènes linéaires (LAB) a été également étudiée, à titre de comparaison.

Durant la première partie de l'étude, pour des concentrations de LAS de 10.8 mg/l et de 21.6 mg/l, l'élimination de la matière active LAS par les boues activées aussi bien acclimatées que non acclimatées au tensio-actif a été excellente en termes de MBAS avec des rendements d'élimination de l'ordre de 80-90 % . Cependant, la DCO soluble à l'effluent a augmenté fortement, suggérant par là la formation de sous-produits de biodégradation du LAS non ou difficilement biodégradables.

La deuxième partie comporte trois périodes: A, B et C.

La période A nous a permis d'étudier la biodégradabilité du LAS et du tensio-actif anionique alkylsulfate LSS avec un faible ensemencement, au départ, de boues activées.

Les résultats obtenus au cours de cette période ont montré qu'une concentration de LAS d'environ 18 mg/l (17.85 mg/l) ne permet pas une bonne épuration de l'influent lorsque, d'une part, la concentration en microorganismes est faible au départ et d'autre part lorsqu'il n'y a pas eu d'adaptation préalable de ces derniers au LAS.

Au cours de la période B, nous avons étudié, après arrêt de l'ajout du LAS dans les cellules, la possibilité de récupération du pouvoir épurateur des boues activées. Cette période a permis de mettre en évidence l'adsorption du LAS sur les microorganismes et sa désorption ce qui s'est traduit tout d'abord par une diminution et ensuite une augmentation de la concentration du LAS dans l'effluent et cela sans qu'il y ait eu le moindre ajout du tensio-actif dans les cellules de boues activées. Elle nous a permis également de constater, au cours du temps une amélioration ou une récupération de l'efficacité d'épuration avec l'augmentation de la concentration des boues activées.

Durant la période C, les boues activées ont été soumises à différentes concentrations de LAS et de LSS. Cette période nous a montré qu'après adaptation progressive des microorganismes au LAS, la qualité de l'effluent reste acceptable pour des concentrations de LAS inférieures ou égales à 26 mg/l. Cependant, celle-ci s'est détériorée nettement pour une concentration de 30 ou 50 mg/l de LAS ce qui s'est caractérisé par des valeurs de DCO, DBO₅ et MBAS très élevées à l'effluent. Elle nous a montré également que le temps de récupération de l'efficacité d'épuration des boues activées est beaucoup plus long après cessation de l'ajout du LAS lorsque la concentration à l'influent est égale à 30 ou 50 mg/l que lorsque celle-ci est plus faible. En effet, après l'arrêt de l'ajout du LAS, la qualité de l'effluent s'est améliorée en une semaine ou moins pour une concentration de LAS ajoutée de 8.7 mg/l et seulement après plusieurs semaines pour une concentration supérieure ou égale à 30 mg/l de LAS. Cette situation traduit, à cette dernière concentration, un effet toxique ou inhibiteur du LAS pour les microorganismes.

Les résultats obtenus montrent également que le LSS est facilement et rapidement biodégradé et ne nécessite donc, par conséquent, aucune

adaptation préalable des microorganismes. La qualité de l'effluent a été excellente en termes de DCO, DBO₅ et MBAS pour toutes les concentrations de LSS étudiées c'est à dire 13.65, 27.30 et 54.6 mg/l.

Les différentes analyses bactériologiques effectuées ont confirmé que les bactéries Gram⁺ sont plus sensibles aux tensio-actifs anioniques que les bactéries Gram⁻.

Parallèlement au procédé d'épuration par boues activées, des tests de DBO ont été effectués. Dans ces tests, les milieux de culture employés sont des milieux minéraux contenant une plus faible concentration de microorganismes que dans les boues activées. Les microorganismes ont été soumis à différentes concentrations des tensio-actifs LAS, ABS et LSS. Il ressort de ces tests que les tensio-actifs LAS et ABS peuvent inhiber, à certaines concentrations, la biodégradation d'un polluant organique facilement biodégradable tel que le nutraforce ou le labnamine. Les tests de DBO sont en concordance avec les résultats trouvés avec les boues activées, à savoir que l'inhibition des microorganismes augmente lorsque la concentration du LAS augmente. L'effet inhibiteur du LAS a été confirmé par la diminution de la DBO en présence de concentrations croissantes de celui-ci.

Contrairement à ce qui a été trouvé pour les tensio-actifs LAS et ABS, aucune toxicité du laurylsulfate de sodium (LSS) pour les microorganismes n'a été révélée même pour des concentrations supérieures à 50 mg/l. On constate sur les courbes que la DBO augmente avec la concentration du LSS ce qui confirme la facilité de biodégradabilité des tensio-actifs de type alkylsulfate.

Les tests de croissance bactérienne où des bactéries *Pseudomonas* (*P.aeruginosa*, *P.fluorescens* et *P.chlororaphis*) ont été utilisées ont également révélé que le LAS, à fortes concentrations, exerce une inhibition sur les microorganismes. Une concentration de 100 mg/l de LAS s'est révélée toxique pour les bactéries *P.aeruginosa*. Ils ont montré encore une fois que sa biodégradation nécessite une concentration élevée de microorganismes et des périodes d'adaptation ou d'acclimatation des

bactéries (phases de latence) comme le montrent les différents paliers relevés sur les courbes de croissance. Ces conditions de concentration et d'acclimatation des bactéries au LAS sont d'ailleurs prouvées par les rendements d'élimination du LAS qui ont atteint à la fin de l'essai qui a duré plus de 25 jours, pour une concentration initiale de 26 mg/l, 47 % ; 48 % et 73.85 % pour *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* et les trois souches en mélange respectivement.

Ces rendements sont plus faibles que ceux qui ont été obtenus avec les boues activées avec cette même concentration. Le meilleur rendement d'élimination du LAS a été obtenu avec le mélange des trois souches de *Pseudomonas* ce qui confirme qu'une culture mixte favorise la biodégradation du tensio-actif [9].

Ces différents tests ont montré que le tensio-actif LAS peut être biodégradé par les microorganismes mais qu'il exerce cependant une toxicité qui augmente avec sa concentration. Une concentration de 50 mg/l de LAS s'est révélée toxique pour les microorganismes quel que soit le test de biodégradabilité utilisé. Liebmann [145] situe un seuil de toxicité pour les boues activées entre 7-9.5 mg/l de tensio-actifs alkylbenzènesulfonates. Janicke [154] a trouvé un seuil de concentration entre 20 et 30 ppm de LAS à l'influent au dessus duquel il y a détérioration de l'élimination de la DBO et de la DCO.

Les résultats obtenus ont montré également que le LAB à une concentration de 10 mg/l peut être facilement et entièrement biodégradé par les micro-organismes et qu'il ne nécessite pas d'acclimatation particulière de ces derniers, du moins à cette concentration. Ils ont révélé que le LAB est plus facilement biodégradé que le LAS ce qui indique que le groupement sulfonate retarde la biodégradation.

La production et l'utilisation de plus en plus importantes des tensio-actifs anioniques a entraîné de nombreuses études sur leur biodégradabilité.

Une des méthodes utilisées pour la mesure de celle-ci, à savoir la méthode au bleu de méthylène (MBAS) ne peut détecter que la disparition de certaines propriétés caractéristiques de ces tensio-actifs et ne peut être

utilisée pour la détermination de leur biodégradation ultime c'est à dire leur transformation ou minéralisation en CO_2 et H_2O .

L'efficacité de l'épuration par boues activées a été évaluée par différentes analyses incluant la détermination de la DCO, de la DBO_5 et de la matière active (MBAS).

Tandis que la mesure par la méthode colorimétrique au bleu de méthylène (MBAS) indique une biodégradation totale (biodégradation ultime) ou pratiquement totale du LAS (le taux d'élimination a atteint plus de 90 % avec une concentration initiale de LAS allant de 8.7 à 26 mg/l et 90 % avec une concentration de 30 ou 50 mg/l), les autres méthodes d'analyse telles que DCO et DBO_5 ont nettement révélé que celle-ci est souvent loin d'être atteinte. En effet les concentrations résiduelles importantes de ces dernières contrastant avec celles beaucoup plus faibles de la matière active MBAS indiquent qu'il y a formation de sous-produits non ou difficilement biodégradables, particulièrement pour des concentrations de LAS élevées au départ.

Les résultats obtenus au cours de notre étude ont confirmé que la mesure de la matière active par la méthode au bleu de méthylène ne permet pas d'évaluer effectivement la biodégradation ultime de celle-ci d'où la nécessité d'utiliser d'autres méthodes plus spécifiques telles que l'analyse chromatographique qui permet d'identifier, à l'aide d'étalons adéquats, les différents sous-produits résultant de la biodégradation primaire et de suivre leur évolution au cours de la biodégradation.

Compte-tenu des résultats souvent contradictoires d'innombrables études effectuées sur leur biodégradabilité et leur toxicité, les tensio-actifs alkylbenzènesulfonates montrent la complexité du problème liée aux rejets, dans l'environnement, de polluants organiques synthétiques et à leur devenir; aussi est-il nécessaire, du fait de leur utilisation massive dans plusieurs domaines, de s'assurer que ces tensio-actifs peuvent être entièrement biodégradés ou du moins que les sous-produits résultant de leur biodégradation n'exercent pas d'effets toxiques pour les microorganismes de l'environnement lors des rejets d'effluents après traitement des eaux usées.

La biodégradabilité des alkylbenzènesulfonates avec des microorganismes bien acclimatés et le plus souvent en concentration élevée a été confirmée par plusieurs études. Néanmoins, des rejets soudains de ces tensio-actifs résultant temporairement en une concentration élevée peuvent bouleverser le fonctionnement du système d'épuration particulièrement pour le processus de nitrification, compte tenu de la sensibilité des bactéries nitrifiantes vis à vis de ces derniers [6].

En résumé ce travail nous permet de conclure:

- de la nécessité d'avoir initialement une concentration élevée de microorganismes. En effet, une concentration de 17.85 mg/l de LAS s'est avérée toxique pour les microorganismes existant en faible quantité dans les cellules de boues activées.
- que les microorganismes doivent être adaptés progressivement au LAS.
- que la toxicité des tensio-actifs alkylbenzènesulfonates augmente avec leur concentration.
- que la durée de récupération du pouvoir épurateur des boues activées est d'autant plus longue que la concentration du LAS est élevée.

Aussi, nous préconisons à l'issue de cette étude les recommandations et perspectives suivantes:

- L'identification plus précise des bactéries participant à la biodégradation des tensio-actifs afin de sélectionner les souches bactériennes les plus performantes et ceci dans le but d'un meilleur rendement d'épuration.
- L'identification ainsi que le suivi de l'évolution des sous-produits résultant éventuellement de la biodégradation du LAS soumis à l'action des microorganismes avec des méthodes analytiques plus précises que l'analyse par MBAS afin de vérifier la disparition effective du tensio-actif.

- L'application des tests de toxicité du LAS et des sous-produits issus de sa biodégradation sur différents organismes de la faune et de la flore afin d'évaluer leur impact sur l'environnement.

- L'étude de l'éventualité d'actions synergiques du LAS avec d'autres polluants toxiques.

- L'étude de la possibilité d'amélioration des procédés de fabrication du tensio-actif par l'entreprise E.N.A.D afin de limiter les pertes et les rejets nuisibles pour l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAKALEM.A.,ROMANO.J.C.Pollution et peuplements benthiques dans la région algéroise (baie d'Alger et baie de Bou-Ismaïl) VI^{es} Journées Etud. Pollutions, Cannes, C.I.E.S.M.(1982).
- [2] EGANHOUSE.R.P.,BLUMFIELD.D.L.,KAPLAN.I.R.Long-chain alkylbenzènes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment.Env. Sci.Technol.17:523-530 (1983).
- [3] ISHIWATARI.R.,TAKADA.H.,SUN.J.YUN.,MATSUMOTO.E.Akylbenzènes pollution of Tokyo Bay sediments.Nature 301:599-600 (1983).
- [4] GREENPEACE.Grande Bleue ou Méditerranée?Trimestriel Juin-Juillet-Aout 1989-2.
- [5] SWISHER,R.D.Biodegradation of ABS in relation to chemical structure.JWPCF 35:877-892.(1963).
- [6] PESSON.P.La pollution des eaux continentales.Incidence sur les biocénoses aquatiques, Ed.Gauthiers-Villars.C.Bordas, Paris, 1980.
- [7] DE CHATILLON CHARLES A.Les savons et les détergents. Que sais-je N°980. (1980).
- [8] BENOUNICHE.N.,KASSA.D.,OUALI.A.,DENINE.R.Eléments de cosmétologie. Ed.O.P.U. Alger (1989).
- [9] SWISHER.R.D.Surfactant biodégradation.Surfactant Science Serie, Vol.18, Ed. Marcel Dekker (U.S.A) 1987.
- [10] LEENAERTS.R.Synthèse industrielle du sulfonate sodique de dodécylbenzène.Séminaire de chimie industrielle. Tome 1. Louvain-La-Neuve.1977.
- [11] ASPA.Syndicat national des fabricants d'agents de surface et de produits auxiliaires industriels. Les agents de surface ou produits tensio-actifs: 5-29 (1990).
- [12] ALLINGER,CAVA,JONHSON DEJONGH.LEBEE,STEVENS.Structure des molécules;Mc graw Hill (1985).
- [13] HAUT COMMISSARIAT À LA RECHERCHE.Programme national de recherche en technologie. Domaines industries chimiques. Annexe. Janvier 1988.
- [14] DE HENAU.H. Rencontres chimiques de l'Ouest.<<Les détergents et l'industrie>>. Ecole Nationale Supérieure de chimie de Rennes. (10 et 11 Mai 1988).

- [15] EDELIN.F.L'épuration biologique des eaux.Théorie et technologie.Edition CEBEDOC.3^{ème} édition 1988.
- [16] GOMELLA.C.,GUERÉE.H.Les eaux usées dans les agglomérations urbaines ou rurales.Ed.Eyrolles.2^{ème} Edition.(1983).
- [17] GAID.A.Epuration biologique des eaux usées urbaines,Tome 1.Ed.O.P.U., Alger (1984).
- [18] ROQUES.H.Fondements théoriques du traitement biologique des eaux. Volume I, technique et documentation, Paris 1979.
- [19] MIMURA.A.,KAWANO.T.YAMAGA.K.Utilisation des microorganismes dans l'industrie pétrochimique.II-Un type de culture commensale pour la préparation des boues activées.-J.Ferment.Technol.,Jap.1970,48 (68-72).
- [20] VANDEVENNE.L. Epuration biologique des eaux usées.Principes-Calculs-Technologie (Notes de cours). Janvier 1985, Université de Liège, Belgique.
- [21] CHARBONNEAU.J.P.Les pollutions chimiques.Pollution par les détergents, Encyclopédie de l'écologie, Le présent en question, Librairie Larousse, 1977.
- [22] LECLERC.H., BUTTIAUX.R., GUILLAUME.J., WATTRE.P. Microbiologie appliquée.Ed. Doin. Paris (1977).
- [23] DEGRÉMONT. Memento technique de l'eau.Huitième Edition.Techniques et documentation. Paris (1978).
- [24] DUNCAN MARA. Sewage treatment in hot climate. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley and Sons, Ltd. London, New-York, Sidney, Toronto (1976).
- [25] ADAMSE.A.D.Formation and final composition of the bacterial flora of a dairy waste activated sludge. Water. Res. 2:665-671 (1968).
- [26] GUIRAUD.J.,GALZY.P.L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Collection Génie Alimentaire, les éditions de l'usine nouvelle (1980).
- [27] BUATTOIS J.Contribution à l'étude de l'épuration biologique d'un effluent industriel par le procédé des boues activées.Thèse Doctorat d'Etat (1972). Université Claude Bernard (Lyon I).
- [28] GLEDHILL.W.E.LAS biodegradation and aquatic interactions, Adv. Appl. Microbiol, 17:265-294 (1974).
- [29] PACQUOT.C.Biodégradation des agents de surface.Technicuir N°4.49-55

- [29] PACQUOT.C.Biodégradation des agents de surface.Technicuir N°4.49-55 (1972).
- [30] COSSA.D.,AVERTY.B.Evaluation de la pollution par les détergents anioniques en cinq zones du littoral français.Rev.Trav.Inst.Pêches marit. 37(3):429-469 (1973).
- [31] PECENIK.G.,BORGONOVE.G.,EGLIARDI.L.Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates (LAS). Surf. Cong. Munich. 1:121-127(1984).
- [32] GLEDHILL.W.E.Screening test for assessment of ultimate biodegradability: LAS. Appl. Microbiol. 30:922-929 (1975).
- [33] JOHNSTON.J.B.,MURRAY.K.,CAIN.R.B.Microbial metabolism of arylsulfonates.A reassessment of colorimetric methods for the determination of sulfites and their use in measuring desulfonation of aryl and alkylbenzene sulfonates. Avanc. Leeuwenhoek 41:493-511 (1975).
- [34] NAKAE.A.,TSUJI.K.,YAMANAKA.M.Determination of trace amounts of ABS by HPLC with fluorimetric detection. Anal. Chem.52:2275-2277 (1980).
- [35] KNIGHT.J.O.,HOUSE.R.Analysis of surfactants mixtures.I. JAOCS 36:195-200 (1959).
- [36] SETZKORN.E.A.,CAREL.B.The analysis of alkylarylsulfonates by micro-desulfonation and gas chromatography. JAOCS 40:57-59 (1963).
- [37] SWISHER,R.D.Biodegradation rates of isomeric diheptylbenzene sulfonates. Dev. Ind. Microbiol.4:39-45 (1963).
- [38] SWISHER,R.D.Transient intermediates in the biodegradation of LAS. JWPCF 35:1557-1564. (1963).
- [39] SWISHER,R.D.Biodegradation of LAS in benzene ring in activated sludge. JAOCS 44:717-724 (1967). Purdue conf. 22:375-392.
- [40] SWISHER,R.D.Biodegradation of surfactant benzene rings.Ind.Chim.Belge 32 (special N°) III:718-722 (1967).
- [41] SWISHER,R.D.Biodegradation surfactant benzene rings in shake cultures. Dev. Ind. Microbiol. 9:270-279 (1968).
- [42] SWISHER,R.D.Benzene ring biodegradation in quaternary ABS.Tenside 6:135-139 (1969).
- [43] SWISHER,R.D.LAS benzene rings:Biodegradation and acclimation studies. Yukagaku 21:130-142 (1972).

- [44] RYCKMAN.D.W.The significance of chemical structure in biodegradation of alkylbenzenesulfonate,Sc.D.Thesis,Massachusetts Institute of technology, Cambridge (1956).
- [45] RYCKMAN.D.W.,SAWYER.C.N.Chemical structure and biological oxydizability of surfactants, Purdue. Conf.270-284 (1957).
- [46] HOUSE.R.,FRIES.B.A.Radioactive ABS in activated sludge sewage treatment. Sewage Ind. Wastes 28:492-506 (1956).
- [47] RODIER.J.L.'analyse de l'eau, 7^{ème} édition.Dunod,Bordas, Paris (1984).
- [48] TARDAT-HENRY.M.,BEAUDRY.J.P.Chimie des eaux, Ed. Le Griffon d'argile inc.Canada (1984).
- [49] ECKENFELDER.W.W.Gestion des eaux usées urbaines et industrielles, Technique et documentation Lavoisier, Paris (1982).
- [50] LUDZACK.F.J.,ETTINGER.M.B.Biological oxidation of hexadecanol under laboratory conditions. J. Am. Waterworks Assn. 49:849-858 (1957).
- [51] LUDZACK.F.J.,SCHAFFER.R.B.,BLOOMHAFT.R.N.,Ettinger.M.B.Biochemical oxidation of some commercially important cyanides. Sewage Ind. Wastes 31:33-44 (1959).
- [52] LUDZACK.F.J.,ETTINGER.M.B.Biodegradability of organic chemicals isolated from rivers. Purdue Conf.18:278-282 (1963).
- [53] THOMPSON.J.A.DUTHIE.J.R.J.Water Pollution Contr.Fed.40,306-319(1968).
- [54] STURM.R.N.J.Am.Oil Chem.SOC.50,159-167 (1973).
- [55] NYNS.E.J.,LAMBERT.M.,WIAUX.A.L.Comparative bacterial degradation of detergents. I.Comparative bacterial biodegradation of anionic detergents and their hydrocarbon or alcohol bases. Tenside 6:192-194 (1969).
- [56] MC KINNEY.R.E.,SYMONS.J.M.Bacterial degradation of ABS.I.Fundamental biochemistry. Sewage Ind.Wastes 31: 549-556 (1959).
- [57] SCHÖNBORN.W.Methods for testing biodegradability of detergents.Seifen-Öle-Fette-Wachse 88:870-875 (1962).
- [58] ILISESCU.A.,MAVRIANOPOL.A.Relation between anionic surfactant biodegradability and microorganisms development in the activated sludge treatment. Studii de Protectia si Epurarea Apelor 7:363-385 (1966).
- [59] HSU.Y.C.Detergent-Splitting enzyme from Pseudomonas.Nature 207:385-388, 1965.

- [60] RZECKOWSKA.E.Studies on the biodegradability of nonionic surfactants applied in the polyester fiber industry.I. Activated sludge bacteria degrading the surfactants. *Acta Microbiol. Polonica*.25:211-217 (1976).
- [61] D'ARCA.S.U.ANNICCHIARICO SEBASTIANI.L.,TARSITANI.G.Degradability and environmental degradation of anionic surfactants. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* 23:393-418 (1972).
- [62] BALEUX.M.,BALEUX.B.,CAUMETTE.P.Biodegradation of anionic surfactants by heterotrophic microflora of waste-water.II. Degradation potential of different bacterial species isolated from an urban effluent toward anionic surfactants. *Rev.Inst.Pasteur Lyon* 6:65-81 (1973).
- [63] PHILLIPS.W.K.Symbiotic Biodegradation of LAS.Ph.D.Thesis.Memphis State Univ. 1978.Univ.Microfilms 901118.
- [64] WURTZ-ARLET.J.Disappearance of detergents in algal cultures.*Surf.Cong.* Brussels 43:937-943 (1967).
- [65] KLEIN.S.A.,MC GAUHEY.P.H.Fate of detergents in septic tank and oxidation ponds. SERL (sanitary Engineering research Laboratory) Report 64-1 and supplement, Univ. California, Berkeley, 1964.
- [66] DAVIS.E.M.,GLOYNA.E.F.Biodegradation of nonionic and anionic surfactants by blue-green and green algae. Report to the center for Research in Water Resources., CRWR 20 A, University of Texas Austin, 1967; Later versions in *JWPCF*.41:1494-1504 (1969).
- [67] KLEIN .S.A,JENKINS.D.,MC GAUHEY.P.H.Travel of Synthetic Detergents With Percolating Water, 2nd Ann. Rep. Univ. California, Berkeley, 1962.
- [68] KLEIN .S.A,JENKINS.D.,MC GAUHEY.P.H. The fate of ABS on soil and plants. *JWPCF* 35:636-654 (1963).
- [69] COOKE.W.B.,MATSUURA.G.S.Removal of ABS from solutions by a common fungus of sewage. *Mycopatho. Mycolog. Appl.* 19:287-295 (1963).
- [70] LEE.D.H.K.The effect of anionic and nonionic detergents on soil micro-fungi. *Can, J.Bot.* 48:583-589 (1970).
- [71] MAHAN BRUCE.H.Chimie.inter Edition,Paris (1977).
- [72] CAIN.R.B., WILLETS.A.J.,BIRD.J.A.*Proc.Int.Biodeterior.Symp.*, 2nd, pp.136-144 (1971).
- [73] OBA.K.*Nippon Eiseigakuzasshi* 25,494-511 (1971).
- [74] GILBERT.P.A.,PETTIGREW.R.Surfactant and the environment.*International of Cosmetic Science* 6,149-158 (1984).

- [75] RIVIERE.J.Les applications industrielles de la microbiologie, Collection Sciences agronomiques, Ed. Masson et C_{ie}, Paris, 1975.
- [76] BOGAN.R.H.,SAWYER.C.N.Biochemical Degradation of Synthetic Detergents, II. Studies on the relation between chemical structure and biochemical oxidation. Sewage and Ind. Wastes, 27:917-928 (1955).
- [77] SAWYER.C.N.,BOGAN.R.H.,SIMPSON.J.R.Biochemical behavior of synthetic detergents. Ind. Eng. Chem. 48:236-240 (1956).
- [78] HAMMERTON.C.Observations on the decay of synthetic anionic detergents in naturel waters.J. Appl. Chem. (London) 5:517-524 (1955).
- [79] HAMMERTON.C. Synthetic detergents and water supplies. Proc. Soc. Water Treat. Exam. 5:145-174 (1956).
- [80] GERIKE.P.,JASIAK.W.Surfactants in the recalcitrant metabolite test. Surf.Cong. Munich. 1984. 1:195-208 (1984).
- [81] FUJIWARA.Y., TAKEZONO.T., KYONO.S., SAKAYANIGI.S, YAMASATO. K.,IISUKA. H. Effect of alkyl chain branching on the biodegradability of alkylbenzene sulfonates. Yukagaku. 17,396-399 (1968).
- [82] NELSON.J.F., MC KINNEY. R.E., MC ATEER. J.H., KONECKY. M.S. Biodegradability of ABS. Dev. Ind. Microbiol. 2:93-101 (1961).
- [83] SWEENEY.W.A.,FOOTE.J.K.J.Water.Pollut.Contr.Fed.36,14-37 (1964).
- [84] PITTER.P.Proc.Int.Congr.Surface Active Subst.4th.vol.3,pp 861-869.1964.
- [85] RENN.C.E.,KLINE.W.A.,ORGEL.G.J.Water.Pollut.Contr.Fed. 36:864-8791 (1964).
- [86] HUDDLESTON.R.L.,ALLRED.R.C.Microbial oxidation of sulfonated alkylbenzenes. Dev. Ind. Microbial. 4:24-38 (1963).
- [87] DIVO.C.,CARDINI.G.Primary and total biodegradation of alkylbenzene sulfonates. Tenside 17:3036 (1980).
- [88] ALLRED.R.C.,SETZKORN.E.A.SETZKORN.E.A.,HUDDLESTON.R.L.J. Amer. Oil. Chem. Soc. 41,13-17 (1964).
- [89] DURAND.R.R.Chim.Ind.(Paris) 94,345-365 (1965).
- [90] SMITH .F.D,STIRTON.A.J.,NUNEZ-PONZOA.MV. J. Amer. Oil. Chem. Soc.43, 501-504 (1966).
- [91] KRÜGER.R.Lichtbogen 15, 24-27 (1966).
- [92] BOCK.K.J.,WICKBOLD.R.Vom Wasser 33, 242-252 (1967).
- [93] WICKBOLD.R.Intermediate products in the biodegradation of a linear ABS. Surf. Cong. Brussels. 3:903-912 (1967).

- [94] CIATTONI.P.,SCARDIGNO.S.New contributions to the knowledge of the biodegradability of LAS. Riv. Ital. Sost. Grasse:45:15-26 (1968).
- [95] KRAVETZ.L.,H.CHUNG.,SHEBS.W.T.II.Surfactant concentration and polyoxyethylene chain effects.Presented at AOCS 70th Annual Meeting, San Francisco, May 1979.
- [96] HRSÂK.D.,BOSNJAK.M.,JOHANIDES.V.Kinetics of LAS and secondary alkanesulfonate biodegradation. Tenside 18: 137-140 (1981).
- [97] HRSÂK.D.,BOSNJAK.M.,JOHANIDES.V. Remarks on the commentary <<Kinetics of sulfonate surfactant biodegradation>> made by Dr.Swisher. Tenside 19: 299-300 (1982).
- [98] HUYSER.H.W.Relation between the structure of detergents and their biodegradation. Surf. Cong. Cologne. 3:295-301.(1960).
- [99] HUDDLESTON.R.L.,ALLRED.R.C.Evaluation of detergents in activated sludge. JAOCS 41:732-735 (1964).
- [100] DEGENS.P.N.,VAN DER ZEE.JR.H.,KOMMER.J.D.Influence of anionic detergents on the diffused air activated sludge process.Sewage Ind.Wastes 27:10-25 (1955).
- [101] TRUESDALE.G.A.,JONES.K.VANDYKE.K.J.Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes; Trials of a new biological attackable material. Water Waste Treat. J:441-444 (1959).
- [102] WPRL (1967). Water Pollution Research 1967, HMSO, London, 1968.
- [103] HALVORSON.H.,ISHAQUE.M. Can. J. Microbiol. 15, 563-576 (1969).
- [104] ROBERT.F.W.Assesment of softness in a synthetic by biological means. Chem. Ind. (London) 1960:1282-1284 (1960).
- [105] WAYMAN.C.H.,ROBERTSON.J.B.Biodegradation of nonionic and anionic surfactants under aerobic and anaerobic conditions. Biotechnol. Bioeng. 5:367-384 (1963).
- [106] KRONE.M.,SCHNEIDER.Biodegradability of secondary alkane sulfonate under laboratory and practice conditions.FSA.70:753-757 (1968).
- [107] HOLLIS.C.G.,PHILLIPS.W.K.,JONHSON.Thermal effects on biodegradation of LAS. Dev.Ind. Microbial.17:345-350 (1976).
- [108] COOK.T.M.,GOLDMAN.C.K.Degradation of anionic detergents in Chesapeake Bay. Chesapeake Sci.15(1):52-55 (1974).

- [109] MICHELSEN.E.R. The performance of anionic detergents in biodegradation flask tests. In Lipids, vol. 2, Technology (Paoletti.R.,Jacini., Porcelatti.R., eds) Raven, New York,1976,pp.435-445.
- [110] BRÜSCHWEILER.H.Properties and biodegradation characteristics of surfactants. *Chimia* 29:31-42 (1975).
- [111] PITTER.P.,FRANCK.J.,KRIZOVA'-CHLUMOVA'.Synthetic surfactants in waste waters.VII.The influence of surfactants on anaerobic sludge digestion. Discontinuous laboratory experiments.Sb VSCh T8(1):175-193 (1964).
- [112] PITTER.P.Alkylsulfates resistant to biodegradation and persistence of n-alkylbenzenesulfonates under anaerobic conditions.Surf.Cong.Brussels, 1964. 3:861-869 (1967).
- [113] KLEIN.S.A.Travel of Synthetic Detergents With Percolating Water,4th Ann. Rep. SERL 65-4, Univ. California, Berkeley, 1965.
- [114] MAURER.E.W.,CORDON.T.C.,WEIL.J.K.NUNEZ-PONZOA. M.V., AULT. W.C., STIRTON.A.J. The effect of tallow based detergents on anaerobic digestion. *JAOCs* 42:189-192 (1965).
- [115] OBA.K.,YOSHIDA.Y.,TOMIYAMA.Studies on biodegradation of synthetic detergents.I.Biodegradation of anionic surfactants under aerobic and anaerobic conditions. *Yukagaku* 16:517-523 (1967).
- [116] SWISHER,R.D.The problem of ultimate biodegradability of LAS:An extension. *Tenside* 18:57-63 (1981).
- [117] LARSON.R.J.Evaluation of biodegradation of xenobiotic organic chemicals. *Appl. Env. Microbiol.* 38:1153-1161 (1979).
- [118] MANN.A.H.,REID.V.W.J.Amer.Oil.Chem.Soc.48,588-594 (1971).
- [119] SPOHN.H.*Tenside* 1:1-8 and 18-26 (1964).
- [120] SPOHN.H.*Tenside* 4:241-247 (1967).
- [121] HUBERT.L.*Tenside* 5:65-76 (1968).
- [122] STEBER.J.Studies on the biodegradation of C¹⁴ ring tagget LAS in surface water and sewage treatment plant models.*Tenside* 16:140-145 (1979).
- [123] HUDDLESTON.R.L.,NIELSEN.A.M. LAS biodegradation:The fate of the aromatic ring. *Soap Cosm. Chem. Spec.* 55 (3):34-44 (1979).
- [124] NIELSEN.A.M.,MEYERS.J.D.,BLECKMANN.C.A.,HUDDLESTON.R.L. LAS biodegradation: ultimate fate of alkyl and ring carbon. *Soap Cosm. Chem. Specialties* 56(3):48-59 (1980).

- [125] LINDER.D.E.,ALLEN.M.C.HPLC analysis of intact and partially degraded LAS. JAOCs 59:152-155 (1982).
- [126] COMMONER.B.The environmental cost of economic growth.Britain 8:52-65 (1972).
- [127] WUHRMANN.K.(1974).Contamination of water by persistent refractory pollutants. Föderation Eur. Gewässerschutz Informationsblatt (19):13-21 (1972).
- [128] LEIDNER.H.,GLOOR.R.,WUHRMANN.Biodegradation Kinetics of LAS.Tenside 13: 122-130 (1976).
- [129] PITTER.P.,FUKA.T.The problem of ultimate biodegradability of LAS, Tenside 16:298-302 (1979).
- [130] KRIVETS.I.A.Change in properties of microorganisms under the effect of surface-active substances. Khimiya: tehnologiya. Vody. Vol. 6, N°5:55-469. 1984.
- [131] VOSS.J.G.Effect of inorganic cations on bactericidal activity of anionic surfactants. J. Bact. 86:207-211 (1963).
- [132] KNÖPP.H.Comparative experimental investigations on the toxicity, foaming potential and degradation of various detergents in river water. Deutsche Gewässer-Kundliche Mitteilungen 5:1-5 (1961).
- [133] MEINCK.F,BRINGMANN.The behavior of tetrapropylenebenzene sulfonate in sewage treatment. Schriftenreihever. Wasser-Boden-Lufthyg.(19):68-81.
- [134] LECLERC.E.,BEAUJEAN.P.Influence of synthetic detergents on the self purification of waste waters. Bull. Centre Belge Etude Doc.Eaux (17): 152-158 (1952).
- [135] FISHER.W.K.Action of high concentrations of anionic surfactants on bacteria. Arch. Mikrobiol.31:33-49 (1958).
- [136] HARRISSON.D.E.F.PARR.C.,PAINTER.H.A.Microbial Degradation of surfactants.III. Studies of the kinetics of breakdown of surfactants by pure cultures of bacteria.Water Research Centre Technical Report TR 21,Stevenage, (1976).
- [137] PAYNE.W.J.,FEISAL.V.E.Bacterial utilisation of dodecyl sulfate and dodecylbenzenesulfonate. Appl. Microbiol.11:339-344 (1963).
- [138] ANDERSON.D.A.Growth response of certain bacteria to ABS and other surfactants. Purdue Conf.19:592-601 (1964).

- [139] PETRE.I.,CALCIU.A.Savons et surfactifs.Aspect de la toxicité des détergent anioniques.Parf. Cosm. Sav. France-vol.1-N°1 Janvier 1971.
- [140] MONNIER-BESOMBES.G.Etude de la contamination de la Posidonie (Posidonia Océanica.L.Delile) et de son milieu par des composants de détergents synthétiques. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle d'Ecologie. Université d'AIX-Marseille II. Faculté des Sciences de Luminy (1983).
- [141] SCIENCE ET VIE.Mensuel N°8.pp 14-23 (15 Août 1985).
- [142] BERNHARD.M.,ZATTERA.A.Major pollutants in the marine environment.In : Marine pollution and marine waste disposal.pp 195-300.Pearson E.A.et E.de Fraga Frangipane eds., Oxford, Pergamon press. (1973).
- [143] PORE.J.Les dispersions aqueuses-suspensions-émulsions-mousses. Editeur: Société des Publications <<cuir>> (1976).
- [144] THERIEN.N.,LE CALVÉ.P.,JONES.P.Respirometric study of the influence of aliphatic alcohols on activated sludges.Water.Res.vol 18.N°7:905-910 (1984).
- [145] LIEBMANN.H.Handbuch der Frishwasser und Abwasserbiologie Verlag. R., Oldenbourg, Munchen (1960).
- [146] AHMED ZAID.T.,CHITOUR.C.E.Characterisation de la matière active Noor (coupe d'alkylbenzènes) par C.P.G./SM. J.S.A.C. Vol.1.N°2:137-149 (1991).
- [147] STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 17th edition, American Public Health Association, Washington.D.C. (1989).
- [148] SWISHER.R.D.Identification and estimation of LAS in waters and effluents. JAOCS 43:137-140 (1966).
- [149] JANICKE.W.Indirect determination of biodegradation of organic compounds through COD analysis, Gesundh.-Ing, 89:309 (1968).
- [150] MC CLELLAND.N.I.,MANCY.K.H.Effect of surfactants on substrate utilisation of an experimental activated sludge system, Purdue.Conf.24:1361-1384 (1969).
- [151] PITTER.P. Sb.Vys.Sk.Chem.Technol.Praze.Technol.Vody.7,19-32 (1963).
- [152] PITTER.P.Sb.Vys.Sk.Chem.Technol.Praze.Technol.Vody.8, 167-174 (1964).
- [153] IDIR.N.Etude préliminaire des eaux résiduaires d'un complexe de détergents.E.N.A.D.Sour-El-Ghozlane.Projet de fin d'étude.E.N.P.Alger (1991).

- [154] JANICKE.W.On the behavior of synthetic organic substances during the treatment of waste liquors,IV.Progress of the biodegradation of<<soft>> anionic synthetic detergents, Water. Res, 5:917-931 (1971).
- [155] ABDEL-SHAFY.H.I.,AZZAM.A.M.,EL-GAMAL.I.M.Study on the Degradation of Synthetic Detergents by Sewage, Bull.Environ.Contam.Toxicol, (1988). 41:310-316.(C) 1988 Springer-Verlag New-York Inc.
- [156] JANICKE.W.,NIEMITZ.W.Comparative tests with surfactants and detergents in biological wastewater treatment.Vom Wasser 40:369-389 (1973).
- [157] PAINTER.H.A.,KING.E.F.,The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Water Res., 42: 909-915 (1978).
- [158] DAZAL.M.,ITO.J.,OGAWA.M.,NISONO.T.Industrial waste treatment by activated sludge, 17. Synthetic detergent biodegradability and tolerance of activated sludge. Kogyo Gijutsuin, Hakko Konkyusho kenkyu Hokoku (Rep.Ferm.Res.Inst.) 34: 1-8 (1968).
- [159] FISCHER.W.K.,GERIKE.Biodegradability Determination Via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, Dissolved Organic Carbon) in coupled Units of the OECD Confirmatory Test-II.Results, Water.Res, 9: 1137-1141.(1975).
- [160] OKPOKWASILI.G.C., OLISA.A.River-water biodegradation of surfactants in liquid detergents and shampoos.
- [161] MONOD.J.La croissance des cultures microbiennes.Ann Rev.Microbiol. 3:371-394 (1949).
- [162] LARSON.R.J.,PERRY.R.L.Use of the electrolytic respirometer to measure biodegradation in natural waters. Water. Res. 15:697- 702 (1981).
- [163] SHEET.W.D.,MALANEY.G.D.Effect of Synthetic Detergents on BOD test. The Ohio State University Columbus. Engineering Experiment Station. Bulletin N°57, July 1955.
- [164] BOGAN.R.H.,SAWYER.C.N.Biochemical Degradation of Synthetic Detergents, Sewage and Ind.Wastes, 26,9,1069 (1954).
- [165] BLANCHET.D.Etude enzymologique de l'oxydation des alcanes chez les bactéries du genre Pseudomonas, Thèse Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, France (1981).
- [166] LARPENT.J.P.,LARPENT-GOURGAUD.M.Eléments de microbiologie. Hermann, Paris. 1980.

- [167] AUBERT.M.,GAUTHIER.M.,PESANDO.D.Effets des pollutions chimiques vis à vis des télémédiateurs intervenant dans l'écologie microbologique et planctonique en milieu marin, Rev. Intern.Océanogr.Med, Tomes XXXVII-XXXVIII (1975).
- [168] MANUEL DE MICROBIOLOGIE, MERCK. Ed.Merck, Darmstadt (1986).

Annexe I

Dosage de la matière active (MBAS) [17].

Méthode colorimétrique

Principe

En solution aqueuse, la méthode polaire des surfactifs anioniques forme, avec le bleu de méthylène (cationique), un complexe soluble dans le chloroforme et susceptible d'un dosage colorimétrique.

Réactifs

— Solution tampon :

phosphate disodique anhydre	10 g
solution d'hydroxyde de sodium	q.s.p. pH 10,5
eau distillée	q.s.p. 1000 ml

— Solution neutre de bleu de méthylène :

bleu de méthylène	0,20 g
eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Ne pas utiliser au-delà de 12 heures. A laver par le chloroforme, immédiatement avant l'emploi.

— Chloroforme pur fraîchement bidistillé (P.E. 61 °C) stabilisé avec 10 ml d'éthanol pur par litre.

— Solution mère étalon de surfactif à 0,1 g/l :

surfactif anionique	0,1 g
eau distillée	q.s.p. 1000 ml

— Solution fille étalon de surfactif à 0,01 g/l. Amener 100 ml de la solution mère à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Etablissement de la courbe d'étalonnage

Dans une série d'erlenmeyers de 250 ml numérotés, ajouter successivement :

Numéro des erlenmeyers	T	I	II	III	IV	V
Solution fille étalon de surfactif à 0,01 g/l (ml)	0	1	2	5	7,5	10
Eau distillée (ml)	100	99	98	95	92,5	90
Solution tampon (ml)	10	10	10	10	10	10
Solution de bleu de méthylène neutre (ml) .	5	5	5	5	5	5
Chloroforme (ml)	15	15	15	15	15	15
Correspondance en mg/l de surfactif	0	0,1	0,2	0,5	0,75	1

Agiter doucement et uniformément pendant 2 minutes à l'agitateur électromagnétique en évitant l'émulsion. Verser le contenu des erlenmeyers dans une série d'ampoules à décanter. Recueillir les extraits chloroformiques dans des erlenmeyers contenant :

eau distillée	100 ml
solution neutre de bleu de méthylène	5 ml
acide sulfurique <i>N</i>	1 ml

Boucher soigneusement pour éviter les pertes de chloroforme par évaporation. Agiter 1 minute à l'agitateur électromagnétique. Transvaser dans une deuxième série d'ampoules à décanter. Recueillir les extraits chloroformiques dans des fioles jaugées de 25 ml en filtrant sur filtre de papier à filtration rapide imprégné de chloroforme.

Reverser dans les erlenmeyers correspondants les phases basiques et les phases acides de chaque série d'ampoules. Recommencer 2 fois les extractions et les lavages avec seulement chaque fois 5 ml de chloroforme. Réunir les extraits chloroformiques dans les fioles jaugées de 25 ml et compléter à 25 ml avec du chloroforme pour remplacer celui qui s'est évaporé au cours des manipulations. Effectuer la lecture spectrométrique à la longueur d'onde de 650 nm. Construire la courbe d'étalonnage.

Mode opératoire

Dans deux erlenmeyers de 250 ml, ajouter successivement :

	A	B
Eau à analyser (ml)	—	100
Eau distillée (ml)	100	—
Solution tampon (ml)	10	10
Solution de bleu de méthylène neutre (ml)	5	5
Chloroforme pur (ml)	15	15

Pour chaque erlenmeyer, procéder à l'extraction comme indiqué pour la préparation de la courbe d'étalonnage. Effectuer les lectures au spectromètre à la longueur d'onde de 650 nm et tenir compte de la valeur lue pour le témoin. Se reporter à la courbe d'étalonnage.

Expression des résultats

Pour une prise d'essai de 100 ml, la courbe donne directement la teneur en surfactif anionique exprimée en milligrammes par litre d'eau. Bien préciser le nom chimique du produit de référence utilisé pour l'étalonnage.

Remarques

— Les surfactifs les plus utilisés pour l'étalonnage sont le dodécylbenzène sulfonate et le dioctylsulfosuccinate de sodium (Manoxol O.T.). Ce dernier est très stable et, quelle que soit son origine, donne des résultats reproductibles ce qui n'est pas le cas du laurylsulfate de sodium. Les produits commerciaux ne peuvent être utilisés car ce ne sont pas des substances chimiquement pures et ils sont souvent constitués par des mélanges d'isomères qui diffèrent suivant la production.

ANNEXE II

Analyses bactériologiques

Composition des milieux de culture et méthodes d'isolement et d'identification des bactéries [26-168]:

a) Principe et méthode:

Un échantillon de boues activées est dilué jusqu'à 10^{-7} ou 10^{-9} en procédant de la façon suivante: on prélève 1 ml de l'échantillon et on lui ajoute 9 ml d'eau de dilution (eau distillée + NaCl), on obtient ainsi une dilution de 10^{-1} . On effectue, à partir de celle-ci, une autre dilution et ainsi de suite jusqu'à la dilution désirée.

On fait fondre la gélose nutritive qui permet l'isolement des bactéries. On la coule ensuite dans des boîtes de pétri et on laisse refroidir. Une petite quantité d'une des dilutions précédentes (1 ml) est déposée dans une boîte de pétri et étalée en stries très serrées. Les boîtes de pétri ainsiensemencées sont mises en incubation dans une étuve à une température de 20°C ou 28°C pendant 48 heures ou plus jusqu'à apparition des colonies qui seront identifiées ultérieurement.

- La gélose nutritive:

* Composition du milieu en g/l:

Extrait de viande	5
Peptone	10
Gélose	15
Eau distillée	1000 ml

Ajuster à pH 7.2. Répartir en tubes à essai (6 à 7 ml) et autoclaver 20 minutes à 120°C ou répartir en boîtes à pétri (contenant éventuellement l'inoculum après autoclavage). Solidifier les tubes en position inclinée.

b) Recherche des coliformes:

On désigne sous le terme de <<coliformes>>, outre *Escherichia coli*, diverses espèces d'entéro-bactéries fermentant généralement le lactose: *Enterobacter* spp, *Klebsiella pneumoniae* et *oxytoca*, *Citrobacter freundii*...

Selon le but recherché, on utilise différents milieux de culture:

1- Milieu BCP Lactosé (Pourpre de bromocrésol lactose) (test présomptif) :

* Composition du milieu en g/l:

Peptone de viande	5
Extrait de viande	3
Agar-agar	15
Lactose	10
Pourpre de bromocrésol	0.025

Ce milieu d'isolement des coliformes est utilisé comme test présomptif. On ensemence 1 ml de dilution dans un tube contenant le milieu BCP lactosé puis on incube ensuite de 18 à 24 heures à 37°C. La dégradation du lactose en acide est révélée par le virage du pourpre de bromocrésol au jaune (résultat positif).

Lecture:

Colonies	Microorganismes
Jaunes avec halo jaune	Lactose-positifs: Escherichia Coli, Klebsiella, Citrobacter
Beu-violacé ou incolores sans halo	Lactose-négatifs: Salmonelles, protéus et autres.

2- Milieu de Shubert (test confirmatif) :

Le milieu de Shubert est utilisé comme test confirmatif pour Escherichia Coli. Ce milieu liquide, commercialisé <<prêt à l'emploi>>, permet la confirmation directe d'Escherichia Coli, à la fois par la présence de gaz dans la cloche de Durham (fermentation du mannitol) et par la production d'indole à partir du tryptophane contenu dans le milieu.

La méthode consiste à ensemencer, à partir des tubes positifs du test présomptif, des tubes contenant le milieu de Schubert. On laisse incubé à 44°C pendant 24 heures.

Lecture:

Un résultat positif se traduit par une croissance bactérienne, un dégagement de gaz dans la cloche de Durham et une coloration rouge en présence de réactif de Kovaks, due à la production d'indole.

3- Milieux d'isolement des salmonelles et des shigelles:

- Gélose Hektoen:

* Composition du milieu en g/l:

protéose peptone	12
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	5
Sels biliaires	9
Citrate de fer ammoniacal	1.5
Salicine	2
Lactose	12
Saccharose	12
Fuchsine acide	0.04
Bleu de bromothymol	0.064
Agar-agar	13.5

pH 7.7 environ

Dissoudre le milieu sec (soit 75 g/l) en chauffant légèrement. faire bouillir ensuite quelques secondes sans autoclaver. Laisser refroidir aux environs de 50°c et couler en boîtes de pétri.

Ce milieu est utilisé pour la caractérisation et l'isolement des entérobactéries pathogènes. La croissance des salmonelles et des shigelles est favorisée par la présence d'extraits de levures et de sucres et la qualité des peptones. Le pouvoir sélectif est renforcé par les sels biliaires qui limitent le développement des coliformes et des protéus. L'identification des bactéries isolées est basée sur l'attaque ou non de trois sucres: Lactose, salicine et saccharose. Aucun de ces sucres n'est attaqué par les salmonelles et les shigelles. Une réaction positive est indiquée par le virage au jaune à un pH acide d'un indicateur (le bleu de bromothymol) et la coloration, en présence d'aldéhyde, d'un autre indicateur (la fuchsine) ce qui donne une teinte saumonée en cas d'utilisation par la souche d'un ou de plusieurs des sucres présents. La production d'H₂S à partir de thiosulfate et de citrate de fer permet également une indication supplémentaire.

La méthode consiste à ensemer les boîtes de pétri contenant le milieu avec 1 ml de dilution.

Lecture:

- Colonies saumon : Escherichia, Levinea, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Yersinia.
- Colonies saumon à centre noir : Protéus vulgaris
- Colonies bleu-vert à centre noir : suspicion de salmonella
- Colonies bleu-vert ou vertes : suspicion de shigella ou de salmonella
- Colonies petites, brunes ou bleuâtres: Pseudomonas.

- Gélose salmonella-shigella (SS):

* Composition du milieu en g/l:

Extrait de viande	5.0
Peptone de viande	5.0
Lactose	10.0
Bile de boeuf désséchée	8.5
citrate de sodium	10.0
Thiosulfate de sodium	8.5
Citrate ferrique	1.0
Vert brillant	0.0003
Rouge neutre	0,0250
Agar-agar	12.00

Le milieu utilisé est un milieu commercialisé, prêt à l'emploi et présenté en flacons. Il suffit de le couler en boîte de Pétri.

Ce milieu est utilisé pour l'isolement des salmonelles et des shigelles. Le vert brillant, les sels biliaries inhibent le développement de la flore secondaire gram-positif tandis que les fortes concentrations en thiosulfate et citrate inhibent plus ou moins les coliformes.

La croissance éventuelle des coliformes est indiquée, lors de la dégradation du lactose en acide, par le virage de l'indicateur de pH, le rouge neutre.

Des colonies à centre noir sont formées en présence d'ions ferriques par des bactéries capables de produire H₂S par réduction de thiosulfate.

La méthode consiste à ensemer les boîtes de pétri contenant le milieu avec 1 ml de dilution.

Lecture:

- Colonies lactose-positives: Colonies rouges: Escherishia Coli.
- Colonies lactose-négatives : Colonies incolores, transparentes: shigelles et la plupart des salmonelles.
- Colonies H₂S-positives : Colonies, incolores, transparentes à centre noir: Proteus et quelques salmonelles.

L'identification différentielle de shigella sera envisagée à partir des colonies incolores, celle de salmonella à partir des colonies incolores avec ou sans centre noir.

c) Recherche des streptocoques fécaux dans l'eau:

Deux milieux de sélectivité différentes ont été utilisés pour la recherche des streptocoques fécaux dans l'eau.

1- Milieu de Rothe (test présomptif) :

* Composition du milieu en g/l:

Peptone de caséine	20.0
Glucose	5.0
Chlorure de sodium	5.0
Phosphate bipotassique	2.7
Phosphate monopotassique	2.7
Azide de sodium	0.2

pH 6.8 à 7.

Répartir en tubes et autoclaver.

L'azide de sodium contenu dans ce milieu inhibe la flore secondaire gram⁻. Un tube contenant le milieu de rothe estensemencé avec 1 ml de la dilution de l'échantillon à analyser. Les tubesensemencés, mis en incubation à 37°C, sont examinés après 24 et 48 heures. Un test confirmatif est effectué pour lestubes présentant un trouble bactérien (tubes positifs) et pouvant donc contenir éventuellement des streptocoques.

2- Milieu de Litsky (test confirmatif) :

* Composition du milieu en g/l:

Peptone de caséine trypsique	20
Glucose	5
Chlorure de sodium	5
Phosphate bipotassique	2.7
Phosphate monotassique	2.7
Azide de sodium	0.3
Ethyl-violet	0.0005
Eau distillée	1000 ml

La présence d'éthyl violet rend le milieu plus sélectif des streptocoques fécaux.

La méthode consiste à prélever une anse bouclée à partir des tubes présentant un trouble microbien dans le test présomptif avec le milieu de rothe et à la reporter dans un tube du milieu de Litsky. La confirmation de la présence des streptocoques fécaux est indiquée, après 24-48 heures d'incubation à 37°c, par un trouble et (ou) la formation d'une pastille violette au fond du tube.

d) Recherche des staphylocoques:

- Milieu de Chapman:

* Composition du milieu en g/l:

Peptone de viande	10.0
Extrait de viande	1.0
Chlorure de sodium	75.0
D(-) Mannitol	10.0
Rouge de phénol	0.025
Eau distillée	1000 ml

Le milieu de Chapman est utilisé pour l'isolement sélectif des staphylocoques. La sélectivité est basée sur la tolérance à une forte teneur en NaCl.

La méthode consiste à ensemercer, en surface et de façon massive, une boîte de pétri contenant ce milieu. La dégradation du mannitol (indiquée par le virage de l'indicateur rouge de phénol) ainsi que l'élaboration fréquente d'un pigment permettent de différencier l'espèce staphylococcus auréus.

Lecture:

Colonies	Microorganismes
avec un halo jaune	Mannitol positifs: Staphylococcus auréus
Petites et sans virage de couleur	Mannitol négatifs: la plupart des staphylocoques coagulases négatifs

e) Recherche des champignons (levures et moisissures) :

Les levures et moisissures sont isolées sur le milieu gélose à l'oxytétracycline au glucose et à la levure (OGA). Le développement bactérien peut être inhibé en ajoutant au milieu à l'extrait de levure glucose à 45°C, avant emploi, 100 ml d'oxytétracycline à 1 mg/ml.

- Milieu gélose à l'oxytétracycline au glucose et à la levure (OGA):

* Composition du milieu en g/l:

Extrait de levure	5
D(+)-Glucose	10
Agar-agar	15
Oxytétracycline	0.1
Eau distillée	1000 ml

Autoclaver 20 mn à 115°C.

f) Recherche des Pseudomonas:

1- Milieu TSI (Triple Sugar Iron):

* Composition du milieu en g/l:

Extrait de viande	3.0
Extrait de levure	3.0
Peptone de caséine	15.0
Peptone de viande	5.0
Lactose	10.0
Saccharose	10.0

Ce milieu permet d'étudier le pouvoir d'utilisation, comme source d'énergie, de la dégradation des sucres par un germe ce qui entraîne la formation d'acides. Ces derniers sont révélés par le virage d'un indicateur (rouge de phénol) du rouge orangé (pH basique) au jaune (pH acide). Une alcalinisation se traduit par une coloration rouge-orangé. Le thiosulfate est réduit par certains germes en hydrogène sulfuré qui réagit avec des sels ferriques en donnant du sulfure de fer noir.

On inocule la culture pure à analyser à la fois en stries à la surface de l'agar et par une pique centrale sur toute la profondeur du tube. L'incubation dure plus de 48 heures à 37°C.

Lecture:

Pas de modification de la couleur originale du milieu (pas de virage) donc il n'y a pas eu de dégradation des sucres, pas de dégagement de gaz ni de formation de H₂S, donc c'est un germe purement oxydatif (aérobie strict) comme *P.aeruginosa* par exemple.

2 - Milieu au citrate de Simmons:

* Composition du milieu en g/l:

Sulfate de magnésium	0.2
Ammonium dihydrogénophosphate	1.0
Phosphate dipotassique	1.0
Citrate de sodium	2.0
Chlorure de sodium	5.0
Bleu de bromothymol	0.08
Agar-agar	12.5

Ajuster à pH 6.6 environ. Autoclaver 15 mn à 115°C.

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone, le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de s'y développer. Une bactérie est <<citrate positive>> lorsqu'elle utilise le citrate en provoquant une alcalinisation du milieu ce qui provoque le virage au bleu foncé du bleu de bromotymol (indicateur coloré) .

Le milieu estensemencé en surface en stries à partir de colonies isolés en milieu solide. Il est ensuite mis en incubation à température adéquate, 37°C, 30°C ou 22°C pendant 5 jours. L'observation a lieu chaque jour.

Lecture:

- Bactéries <<citrate-positives>>: culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu). Parmi ces bactéries, on trouve, P.aeruginosa.
- Bactéries <<citrate-négatives>>: pas de culture (coloration verte du milieu inchangée).

3- Milieu MEVAG (milieu d'étude pour la voie d'attaque des glucides):

* Composition du milieu en g/l:

Extrait de viande	3
KCl	5
Gélose	3
Rouge de phénol (solution aqueuse à 0.2%)	10 ml

Ajuster à pH 7.7. Répartir en tubes à essai (9 à 10 ml). Autoclaver 15 mn à 120°c.

Ce milieu est utilisé pour la détermination du type de métabolisme du glucose (voie fermentative ou voie oxydative).

Le métabolisme fermentatif, favorisé par l'anaérobiose, engendre de nombreux produits acides. Le métabolisme oxydatif (aérobie) ne donne naissance qu'à de petites quantités de composés acides et uniquement lorsque seront présentes de bonnes conditions d'oxygénation.

La méthode consiste à ensemercer, par piqûre centrale, deux tubes contenant le milieu et dont l'un est recouvert de vaseline. Les tubes sont mis, ensuite, en incubation à une température de 30°c pendant 24 heures ou plus.

Lecture:

-Bactéries fermentatives: acidification rapide et égale dans les deux tubes qui deviennent jaunes sur toute la hauteur de la piqûre d'inoculation.

-Bactéries oxydatives ou inactives: acidification modérée et assez lente commençant à la surface du tube non recouvert de vaseline. Il n'y a aucune acidification dans le tube recouvert de vaseline. On trouve, parmi ces bactéries, P.aeruginosa.

-Bactéries inactives: pas d'acidification ou alcalinisation du milieu qui vire au bleu.

4- Milieux de King:

Ces milieux permettent la différenciation des espèces de *Pseudomonas* en mettant en évidence leurs pigments spécifiques. Deux milieux sont employés simultanément: le milieu de King A et le milieu de King B.

- Milieu King A:

* Composition du milieu en g/l:

Peptone de gélatine	20
Glycérol	10
Sulfate de potassium anhydre	10
Chlorure de magnésium anhydre	1.4
Gélose (Agar)	15

pH 7.2

Ce milieu permet l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* en favorisant la production de pyocyanine spécifique à cette bactérie (bacille pyocyanique) d'où la coloration typique en bleu-vert des colonies de bactéries.

- Milieu King B:

* Composition du milieu en g/l:

Peptone de caséine	10
Peptone de viande	10
Glycérol	10
Phosphate bipotassique anhydre	1.5
Sulfate de magnésium (7 H ₂ O)	1.4
Gélose (Agar)	15

pH 7.2

Le milieu King B favorise la synthèse du pigment vert fluorescent (pyoverdine) par *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que par d'autres *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*). La coloration du milieu de culture en vert indique la présence de pyoverdine.

La méthode consiste à ensemercer, par strie médiane à la surface de la gélose, des tubes de milieu King A et King B respectivement. On remet ensuite, sans revisser, la capsule sur chaque tube. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 1 à 4 jours.