

ETUDE DE L'INHIBITION PAR LES ANTIBIOTIQUES DU SYSTEME DE
TRAITEMENT BIOLOGIQUE DES EAUX USEES A BOUES ACTIVEES.

SAKHRAOUI MAHFOUDI ET BENCHEIKH LEHOCINE MOSSAABI

5. ¹ *Laboratoire de l'Ingénierie des Procédés d'Environnement " LIPE", Faculté
de Génie de Procédés Pharmaceutiques, Université Constantine 3.*

6. mahfoudsakh@yahoo.com

1. INTRODUCTION

La majorité des eaux usées domestiques et industrielles sont collectées puis épurées dans des stations d'épurations (STEP) avant d'être rejetées dans le milieu naturel. Les STEP fonctionnent pour la majorité selon le principe du procédé biologique à boues activées et sont conçues pour épurer les eaux usées et limiter ainsi l'apport en excès de matière organique et de polluants minéraux dans le milieu naturel. [2] Parmi les polluants importants et le plus persistants, les produits pharmaceutiques, l'Amoxicilline, molécule pharmaceutique consommée en très grande quantité, est aussi celle que l'on retrouve le plus dans les milieux aquatiques et dans les effluents de station d'épuration domestiques, ce qui a motivé notre choix pour ce polluant type.[9]

Dans notre travail, l'évaluation de l'effet inhibiteur de l'Amoxicilline sur l'activité microbienne, par l'utilisation de la technique respirométrique à aération continue, afin de définir une valeur seuil pour la protection des systèmes à boues activées ainsi que pour l'évaluation de l'inhibition, se basant sur les observations du taux de consommation de l'oxygène des boues activées qui diminue quand l'effluent synthétique injecté contient des inhibiteurs. [4]

2. MATERIELS ET METHODES.

Ce travail a été divisé en deux volets principaux, dont le premier visait à la mise en place d'un respiromètre pour les tests d'inhibition, lors de la seconde partie du travail, des tests d'inhibition ont été réalisés dans ce type de respiromètre afin d'effectuer des analyses et de traitement des respirogrammes obtenus et ainsi vérifier l'applicabilité de la méthode. [4]

Respiromètre

Le respiromètre construit est un réacteur ouvert pour l'air fermé pour l'écoulement liquide, il est destiné à mesurer l'activité respiratoire des microorganismes. Ce respiromètre se compose :

D'une cellule respirométrique de verre (0,5 L de volume total, 0,4 L volume fonctionnant),

Equipé d'une sonde à oxygène FDO925-IDS de WTW qui mesure l'évolution de la concentration de l'oxygène dissous en fonction de temps,

Et une sonde pH IDS de WTW,

Un diffuseur d'air en plastique relié avec un bulleur d'aquarium SHARK-RS-510 qui délivre un débit maximal de 150 L/h d'oxygène environ,

Un barreau aimanté et un agitateur magnétique,

Un microordinateur avec logiciel d'acquisition WTW relié à l'Oxymètre Multi-3430 de WTW. [2, 1]

De plus, on effectue ces tests dans une enceinte thermostatée à 20 °C. De cette façon, la température est constante dans le réacteur et n'influence pas sur la respiration des microorganismes. Le fonctionnement du système est relativement simple, mais les paramètres sont peu évidents à caler comme le débit d'aération et la vitesse d'agitation et qui doivent rester constante pendant une expérience. Après avoir rempli le réacteur de boues activées ou d'effluent et fixé les différentes sondes dans le réacteur, on met l'agitation en marche et on aère la solution grâce à la pompe d'aquarium. On ajuste les réglages afin de garantir une concentration en oxygène dissous dans le réacteur d'au moins 3 mgO₂/L et un pH aux alentours de 7 – 8. On suit ensuite la concentration en oxygène dissous en mg/L en fonction du temps par un pas de temps réglable, grâce au logiciel d'acquisition. [1, 2]

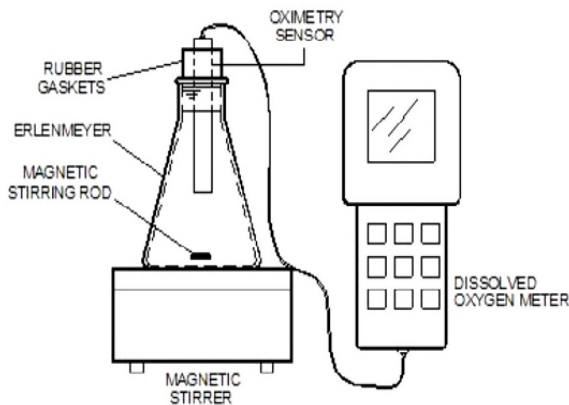


Figure 01 : Équipements et appareil pour les essais respirométrique.

Source et préparation des boues

Les boues activées ont été obtenues à partir du bassin d'aération d'une installation de traitement municipale d'IBN ZIADE de Constantine. Les boues ont été stockées à 4 °C avant d'être employées [10]. Les boues activées ont été analysées MES, DCOt, DCOs, COT et DBO₅, [6] par l'utilisation des procédures standard [5]. La boue a été lavée et laissée décanter puis le surnageant a été alors remplacé avec de l'eau distillée afin de réduire la concentration initiale en DCOs dans les boues. Ce procédé de lavage a été répété jusqu'à ce que la concentration théorique de la matière soluble ait été réduite de plus de 95 %. [7] Enfin, la boue a été alors aérée pour au moins 2 heures à la température ambiante avant qu'elle ait été employée pour des expériences. [1]

Produits chimiques

Le substrat synthétique utilisé est composé de CH₃COOH : 470mg/L et NH₄Cl : 250mg/L. [8]

Les nutriments suivants ont été ajoutés aux boues afin d'éviter n'importe quelle limitation nutritive : MgSO₄-166mg/L, FeCl₃-2,3mg/L, CaCl₂-412mg/L, NH₄Cl-N-6,8mg/L et la solution tampon de phosphate pH=7,24 : H₂PO₄⁻-90mg/L, HPO₄⁻-410mg/L. [6, 7]

L'Amoxicilline tri hydraté, est employé en tant que produit chimique toxique. Et les produits chimiques étaient utilisés pour mesurer COT, DCO, DBO.

Procédures expérimentales

Le procédé respirométrique est simple pour la détection de toxicité qui est basé sur la méthode 209 d'OCDE. Cette méthode est prise comme référence parce qu'elle est simple [10]. Il s'agit de mesurer la consommation dynamique d'accepteurs d'électrons de la biomasse hétérotrophes et autotrophes en contact avec l'effluent sous des conditions contrôlées. L'inoculum est généralement un échantillon de boue, prélevée dans un procédé à boue activées, et normalement acclimatées à l'effluent [2]. De plus l'ajout d'ATU (Allyl-Thio-urée) n'est pas nécessaire car on travaille sur l'effet inhibiteur sur les bactéries hétérotrophes et autotrophes [15].

Le respiromètre fermé avec un espace libre très petit permet pour considérer le coefficient de transfert d'oxygène $K_L a$ à partir du gaz de la phase liquide. Le taux respiratoire OUR de la biomasse peut être évalué par le profit de concentration en oxygène détecté dans la phase liquide. Dans ces tests on utilise l'acétate comme substrat synthétique au lieu d'eau d'égout, et des concentrations optimales de biomasse, ainsi on travaille avec un rapport biomasse – substrat S_0/X_0 faible afin de réduire la modification de culture pendant l'essai. [10]

La première étape du procédé est la préparation de la suspension de biomasse, pour au moins 1 h, afin d'enlever la DCO résiduelle dans la boue. Après ce, l'échantillon

est oxygéné jusqu'à ce qu'une valeur en concentration d'oxygène dissous stable et constante. Le même procédé expérimental est suivi pour évaluer le taux respiratoire pour le composé toxique à examiner, l'Amoxicilline, qui a été injecté dans le respiromètre sous forme de poudre puis une deuxième addition de substrats synthétique de référence pour avoir l'évaluation de la toxicité sue la consommation du substrat par le calcul de OUR.

Les boues activés ont été utilisées pour seulement un essai, en d'autres termes, les différentes masses en toxique ont été examinées avec les échantillons remplacés de boues pour éviter l'acclimatation partielle de la biomasse à la sous-estimation possible composée et conséquente des effets de toxicité. [10]

Evaluation de toxicité

La toxicité a été estimée en termes d'EC20 et EC80, défini comme deux concentrations du toxique causant la réduction de 20 % et 80 % successivement de fonction d'activité de la culture bactérienne (méthode ISO 8192). Dans le cas de la méthode respirométrique proposée, des données de OUR obtenues aux différentes concentrations en toxique et celle d'injection témoin ont été utilisées pour évaluer le pourcentage d'inhibition comme indiqué dans l'équation (1) [10,11];

$$\text{Inhibition \%} = \frac{OUR_T - OUR_E}{OUR_T} * 100 \quad (1)$$

Où, OUR_T le taux de la respiration spécifique maximum détecté dans l'échantillon témoin juste après l'addition du substrat synthétique de référence.

OUR_E est le taux respiratoire spécifique maximum détecté dans l'échantillon de mesure après la double addition du toxique poudre puis du substrat de référence. Des données de pourcentage d'inhibition ont été utilisées pour construire la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en toxique examinée. Des données expérimentales ont calculés on déduite par l'interpolation pour évaluer les concentrations empêchant la consommation de l'oxygène EC20 et EC80.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude d'inhibition de l'activité respiratoire des bactéries hétérotrophes et autotrophes par la méthode respirométrique repose sur la mesure du taux de consommation d'oxygène qui diminue quand l'Amoxicilline est présent dans le milieu. Dans ce travail, le substrat synthétique est de concentration de 300 mg_{DCO}/L, et on effectue deux tests respirométrique séparé, l'un consiste d'évaluer l'OUR du substrat seule sans injection de l'Amoxicilline, et l'autre test consiste d'injecter l'Amoxicilline sous forme de poudre dans le respiromètre et après 1 heure on injecte la même concentration du substrat injecté dans l'essai témoin. La figure 02 représente un exemple de respirogramme l'OUR obtenu dans le respiromètre témoins. Et la figure 04 montre un respirogramme obtenue dans le test d'injection de l'Amoxicilline suivi par l'injection du substrat synthétique.

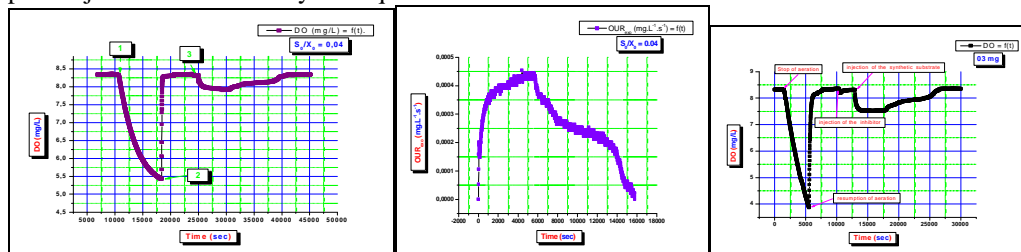


Figure 02 : respirogramme de consommation d'oxygène dissous en fonction de temps obtenu après injection du substrat synthétique dans l'essai témoin.

Figure 03 : exemple du respirogramme de taux de consommation d'oxygène pour l'essai témoin obtenu après l'intégration du respirogramme de consommation d'oxygène en fonction de temps.

Figure 04 : exemple d'un respirogramme de consommation d'oxygène en fonction de temps après injection de l'Amoxicilline poudre.

Le tableau 01 regroupe les résultats obtenus de différents tests d'inhibition.

Tableau 01 : les résultats d'inhibition de différentes masses injectées dans le respiromètre.

Masse d'inhi	[Inhib] mg/L	K_{La}	OUR _{exo} Témoin	OUR _{exo} inhib
01 mg	3,33	0,001781	6,24397	7,32742
03 mg	10	0,0019103	11,6654	12,4804
05 mg	18,5	0,0015647	12,5226	14,4764
07 mg	26	0,0015679	13,4367	11,0324
10 mg	37	0,0016517	17,2119	15,8574
13 mg	48	0,001923	11,1192	10,9309
15 mg	55,6	0,001402	11,5845	10,5874
20 mg	74,07	0,001391	10,6773	1,7896
25 mg	94,4	0,0017531	18,0811	4,9539
30 mg	113,2	0,001671	11,1176	8,0540

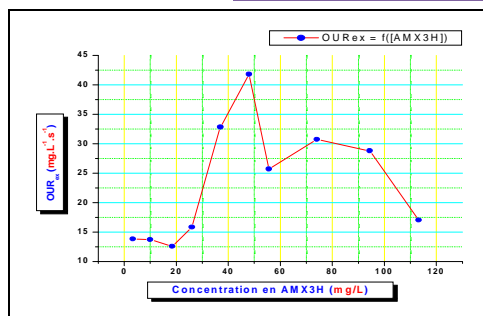


Figure 05 : l'évaluation de l'OURexo en fonction de la concentration en Amoxicilline tri hydraté.

Le tableau 01 et la figure 05 montre que la masse 13 mg d'Amoxicilline qui représente une concentration d'environ 50 mg/L dans le respiromètre nous donne une bonne identification de l'effet inhibiteur car il représente 80 % (EC80) de réduction de consommation d'oxygène et la masse 05 mg d'Amoxicilline qui représente une concentration d'environ 18 mg/L représente une réduction de 20 % du taux maximal de consommation d'oxygène (EC20). A la lumière de ces exemples de résultats nous constatant que l'Amoxicilline à un effet inhibiteur à des différentes concentrations et généralement leur effet toxique ou plutôt inhibiteur va apparaitre dans les premiers très faible concentration dans le respiromètre. Ces résultats nous permettent aussi de moduler les procédés d'inhibition et aussi de démunie l'intervalle de travail pour l'évaluation de l'effet inhibiteur de l'Amoxicilline à des doses très faible en ppb.

3. CONCLUSION

Cette étude a permis de caractériser l'influence de l'antibiotique Amoxicilline tri hydraté sur l'activité de la biomasse épuratrice hétérotrophes et autotrophes. Les résultats expérimentaux obtenus et leur évaluation, les remarques de conclusion de l'étude au sujet du mérite d'employer des mesures respirométriques pour l'évaluation d'inhibition au moyen d'un simple mesure d'OUR.

REFERENCES

- Giuseppina R., and al., "toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge : comparison between respirometry and Microtox", water resea 38.2004-2013-2110.
- Christian B., et al., "étude bibliographique, économique et essays sur différentes methods de fonctionnement de la demande chimique en oxygène d'un effluent urbain", l'école nationale du genie de l'eau et de l'environnement de Strasbourg, mai 2004.
- Blake W., et al., « comparing the responses of nitrifiers to differing ammonia loading », university of Illion at Urbana-champaign, 2010.
- Yan Gilbert, et al., "application de la respirométrie pour le suivi de l'activité de la biomasse d'un biofiltre sur lit organique traitant du lisier de porc", water qual res.J. Canada.2005.40.No.2-155-163.
- Lenoro S., et al., « Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater », 20e edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.

Fraccoroli M., et al., "optimization d'un décanteur primaire", rapport de stage, IUT de Marseille, 24/05/2012.

Klaus D., et al., « yield determination by respirometry – the possible influence of storage under aerobic condition in activated sludge », département of environment science 1999.

Athama sias S., et al., « effet of chloromium on bacterial kinetecs of tréeratropic biomass of activated sludge », water resear.36.2002.

Luis Fernando D., et al., « Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux » thèse de doctorat, L'institut National Polytechnique de Toulouse, 17 février 2009.

Giuseppina R. et al., « Toxicity assessment of common xenobiotic compound on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox », Water Research 38 (2004) 2103–2110.

E. Ubay C., et al., « Critical appraisal of respirometric methods for metal inhibition on activated sludge », Journal of Hazardous Materials B139 (2007) 332–339.

Jean RODIER, et al., "l'Analyse de l'eau", 9e édition, Paris, 2009.

Junejo Y, et al., "Synthesis and Characterization of Amoxicillin derived Silver nanoparticles: Its catalytic effect on degradation of some pharmaceutical Antibiotics." Applied Surface Science 2014, 317:914-922

Kümmerer K. et al., "Deactivation and Transformation Products in Biodegradability Testing of β -Lactams Amoxicillin and Piperacillin" by Andreas Längin, Radka Alexy, Armin König, Klaus Kümmerer [Chemosphere 75(3) (2009) 347-354].

Lamm A, et al., "Detection of amoxicillin-diketopiperazine-2', 5' in wastewater samples." Journal of Environmental Science and Health, Part A 2009, 44(14):1512-1517.

Längin A, et al., "Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin." Chemosphere 2009, 75(3):347-354.