



Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is a Publisher's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/24005>

To cite this version:

Agius, Dominique  and Cecutti, Marie-Christine  and Roques, Christine 
and Gaset, Antoine  *Huile adjuvante : devenir des esters méthyliques dans le sol.* (1999) *Oilseeds & fats Crops and Lipids*, 6 (5). 1-5. ISSN 2272-6977

Any correspondence concerning this service should be sent
to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

Huile adjuvante : devenir des esters méthyliques dans le sol

Dominique AGIUS*, Christine CECUTTI*, Christine ROQUES**, Antoine GASET*

* ENSCT-INPT-Laboratoire de chimie agro-industrielle

UMR INRA, 118, route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 04

<dagius@ensct.fr>

** Faculté de Pharmacie, Laboratoire de bactériologie, virologie et microbiologie industrielle, 35, chemin des maraîchers, 31062 Toulouse cedex

Abstract : *The fate of vegetal oil, oleic acid methyl ester, in soil was investigated and compared to that of a mineral oil. Experiments were both carried out in laboratory conditions (soil columns or lysimeters) and in field conditions. A microbiology study was performed using the same soil.*

Vegetal and mineral oils were applied on soil of lysimeter or field at the phytosanitary application dose. Migration and primary degradation profiles of the oils and their metabolites were determined during a period of 120 days by gas chromatography analysis. Results showed a total degradation of the vegetal oil and its metabolites after 60 days whereas mineral oil required 90 days.

A microbiology study was performed to identify some micro-organisms of the soil and to evaluate ecotoxicity effects of the oils. Vegetal oil was revealed to be less toxic than mineral oil even at high concentration.

The high biodegradability of the vegetal ester in soil was confirmed as well as their environmental qualities.

Key-words : *biodegradability, vegetal oil, soil, ecotoxicity, environmental impact.*

Introduction - Présentation de l'étude

L'agriculture moderne est une grande consommatrice de produits phytosanitaires et on estime que 2,5 millions de tonnes de pesticides sont appliquées chaque année sur les cultures de la planète. Dès lors se pose le problème de l'impact environnemental de ces produits qui peuvent polluer les sols et les eaux, modifiant ainsi des écosystèmes entiers. Les adjuvants de produits phytosanitaires peuvent être incorporés aux préparations afin d'en modifier certaines caractéristiques telles que l'efficacité ou la phytotoxicité [1]. Leur rôle est d'améliorer les performances de principes actifs en permettant notamment une réduction de leurs doses d'emploi tout en limitant leur impact sur la faune et la flore environnante [2]. Actuellement les huiles adjuvantes classiques d'origine minérale tendent à être remplacées par la nouvelle génération d'huiles adjuvantes d'origine végétale qui présentent des qualités environnementales [3, 4].

C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux menés dans le Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle : la thématique présentée ici porte sur l'étude du devenir dans le sol d'une molécule modèle, l'ester méthylique de l'acide oléique, principal constituant d'un « adjuvant phytosanitaire vert », Actirob B®, commercialisé par la Société Novance. On entend, par devenir, la migration et la dégradation dans le sol du composé parent et des produits de dégradation. Ce vaste sujet implique des domaines différents mais interdépendants les uns des autres qui sont la microbiologie, la pédologie, l'hydrodynamique des fluides et la chimie.

Il nous a paru également intéressant de comparer le comportement de l'ester méthylique et d'une huile d'origine minérale utilisée également comme adjuvant phytosanitaire.

Nous présentons ici une partie de ces travaux, à savoir le suivi spatio-temporel des deux huiles dans le sol qui renseigne sur la cinétique et les processus de dégradation des composés. Une étude microbiologique nous permet de mesurer l'éventuelle toxicité des produits auprès de certains micro-organismes présents dans le sol, qu'ils soient ou non impliqués dans la biodégradation. A travers la compréhension des mécanismes de migration et de biodégradation de l'ester méthy-

lique de l'acide oléique dans le sol, l'objectif final des travaux est l'élaboration d'un nouveau test simplifié d'évaluation de la biodégradabilité des produits liquides et solides dans le sol [5].

Matériel et méthodes

Les huiles

• L'huile d'origine végétale est l'ester méthylique de l'acide oléique de pureté 99% fournie par Sigma .

Dans la formule finale de la préparation adjuvante phytosanitaire Actirob B®, l'huile est présente à plus de 90 % et utilisée avec un émulsifiant qui permet sa dispersion dans l'eau. Pour toutes les expérimentations nous avons utilisé l'ester méthylique avec l'émulsifiant à la dose d'application de l'adjuvant qui est de 2 l/ha.

• L'huile d'origine minérale est une huile isoparaffinique comportant des molécules de longueur de chaîne de C6 à C36 et déjà formulée avec un émulsifiant. Nous testons ce produit avec son émulsifiant et à la dose d'application qui est dans ce cas de 3 l/ha.

Suivi spatio-temporel de l'ester méthylique dans le sol

• Les sols

Le suivi spatio-temporel de l'oléate de méthyle dans le sol a été réalisé sur deux sols caractéristiques de deux régions françaises : un sol du Sud-Ouest de la France classiquement utilisé pour la culture du maïs et un sol du Nord de la France destiné à la culture de la betterave.

Actirob B® est essentiellement utilisé comme adjuvant de bouillies herbicides pour ces deux types de culture et les deux sols choisis sont donc assez représentatifs des domaines d'utilisation de l'adjuvant.

• Les sites d'expérimentation

L'étude a été menée à deux niveaux : situation réelle en plein champ et simulation en laboratoire avec des colonnes de sol appelées encore lysimètres.

Le site du Sud-Ouest de la France est à 30 km de Toulouse sur la propriété de « Poucharramet » de L'INPT-ENSAT .

Dans le Nord de la France, l'étude a été réalisée à Mons-Etrees sur une propriété de l'INRA de Laon.

• Déroulement de l'étude

Les huiles sont pulvérisées sur le sol et à la surface des lysimètres aux doses d'emploi et au printemps qui est l'époque habituelle des trai-

tements herbicides. Le suivi spatio-temporel des composés parents, et des métabolites dans le cas de l'huile végétale, est réalisé à l'aide de prélèvements à différentes profondeurs au cours du temps. Les produits sont retirés de la terre par extraction solide/liquide avec l'éthanol, puis analysés qualitativement et quantitativement par chromatographie en phase gazeuse.

• Mise en place des essais

Les lysimètres

Des colonnes de terre de 70 cm de hauteur et de 20 cm de diamètre sont prélevées par carottage [6] sur les deux sites de l'étude, dans un tube en PVC équipé dans la partie inférieure d'une grille permettant la récupération des eaux de drainage. Le principe du prélèvement conduit à des colonnes de sol non perturbé caractéristique de la situation réelle du champ.

Les colonnes sont ensuite placées dans le laboratoire de l'Institut de Mécanique des fluides de l'INPT-ENSEEIH. Un système d'arrosage programmable permet de simuler les chutes de pluies relevées sur le terrain. Différents capteurs positionnés sur une colonne témoin enregistrent le pH, la température et l'humidité relative du sol tout au long de l'étude. Ces différents paramètres permettent de décrire les transferts hydriques qui interviennent dans les processus de migration des composés étudiés ; ils seront utilisés par la suite pour la mise au point d'un programme informatique de modélisation/prédiction du devenir des composés dans le sol [7].

Les prélèvements sont réalisés par découpage des colonnes de terre les unes après les autres aux intervalles de temps choisis pour l'étude. Chaque lysimètre est ainsi découpé en tranches d'épaisseur variant de 2,5 à 10 cm selon la profondeur et toutes les tranches subissent ensuite le traitement général : extraction de produits organiques et analyse chromatographique.

Plein champ

Des échantillons de 200 g de terre sont prélevés à différentes profondeurs par carottage à l'aide d'une tarière à des temps déterminés. Les sites d'essais subissent bien sûr les conditions climatiques réelles.

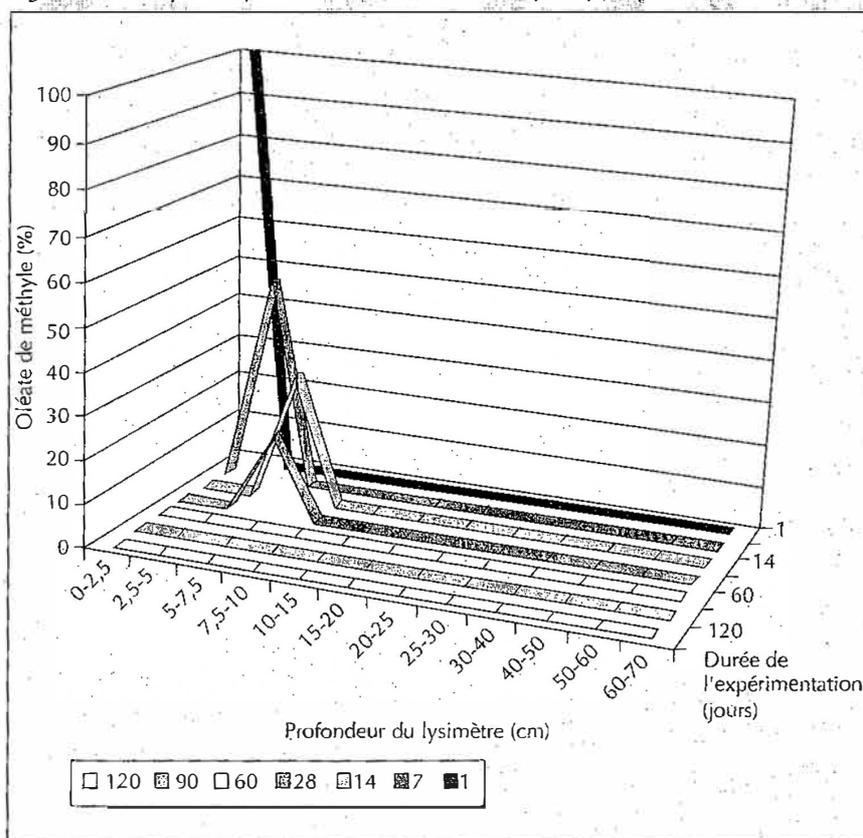
Etude microbiologique

• Isolement et identification des micro-organismes

Nous avons procédé à l'isolement d'une partie des micro-organismes contenus dans le sol à partir d'une suspension de 10 g de sol avec 90 ml d'eau distillée stérile.

Des fractions de 100 ml de suspension sont prélevées et diluées puis déposées sur des milieux de culture pour bactéries (milieu trypticase-soja) et pour moisissures et levures (milieu de

Figure 1 : Evolution spatio-temporelle de la teneur en oléate de méthyle en lysimètre.



Sabouraud). Les milieux sont incubés à 30 °C et repiqués tous les deux jours jusqu'à isolement parfait de toutes les souches.

L'identification de chaque souche est ensuite réalisée à l'aide de tests classiques [8] : tests coloration Gram + oxydase, réductase, mobilité, API 20, API 50 CHB, catalase, culture anaérobie et culture à 30 °C, 40 °C et 50 °C pour les bactéries. L'identification des moisissures s'est avérée plus délicate et a nécessité une étude morphologique microscopique.

• Tests d'écotoxicité

Nous avons testé l'oléate de méthyle et l'huile minérale aux doses d'emploi des adjuvants phytosanitaires et avec des doses 5, 10, 50 et 100 fois plus élevées, afin de simuler une éventuelle accumulation des produits phytosanitaires dans le sol au fur et à mesure des traitements.

On ensemence les boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé et les différentes concentrations en huiles avec chaque souche de micro-organisme. Pour chaque souche de micro-organisme, on réalise un essai témoin sans adjonction de produit qui nous a permis de comparer leur développement. La croissance des micro-organismes est ensuite évaluée à l'aide d'observations macroscopiques à des temps déterminés.

Résultats et discussion

Suivi spatio-temporel dans le sol

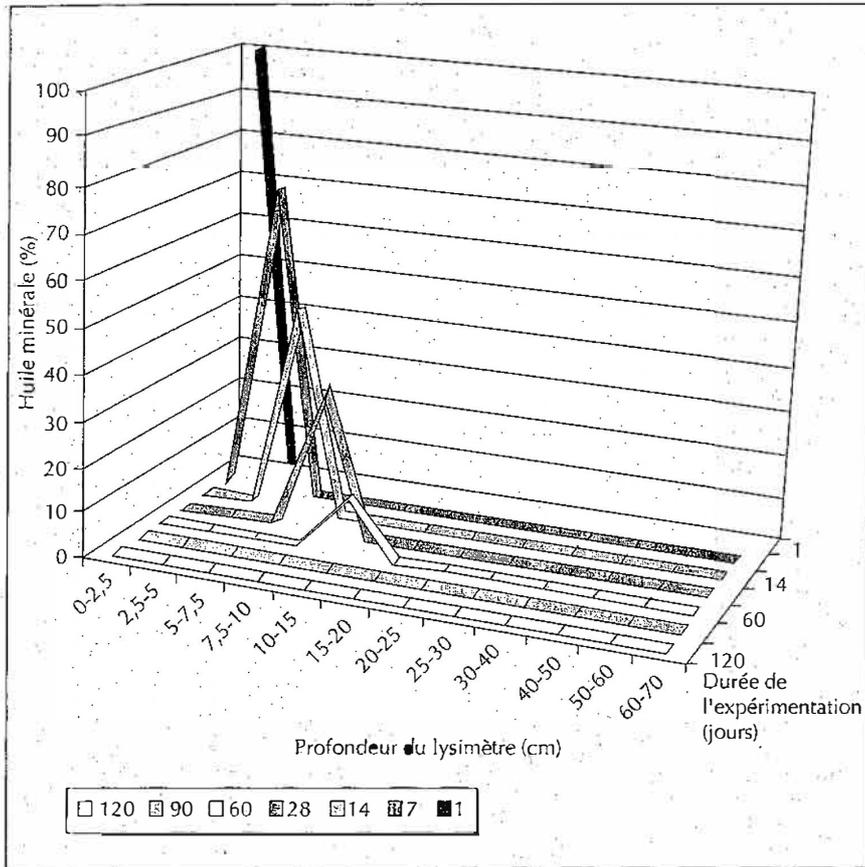
• Oléate de méthyle et produits de dégradation

Quel que soit le sol utilisé, les essais sur lysimètres ont montré la disparition complète de l'ester méthylique 60 jours après son dépôt sur le sol et une très faible migration du produit sur les 15 premiers centimètres. La figure 1 représente le profil du composé dans le sol en fonction du temps.

En plein champ nous obtenons des résultats analogues, c'est à dire une dégradation totale de l'ester méthylique au bout de 60 jours d'expérimentation, mais le profil de migration s'étend aux 20 premiers centimètres.

Il semble donc que la nature des deux sols choisis pour l'étude n'ait que très peu d'influence sur la dégradation de l'ester méthylique, ce résultat demandant à être étendu à d'autres sols. En outre, les lysimètres simulent parfaitement la dégradation du composé, bien que pour la migration dans l'espace il y ait une légère différence entre le lysimètre et le champ. Cette donnée devra être prise en compte par le modèle informatique de modélisation.

Figure 2. Evolution spatio-temporelle de la teneur en huile minérale en lysimètre.



Ces premiers résultats sont importants car ils montrent la disparition totale et relativement rapide de l'ester méthylique dans le sol. En ce qui concerne le profil spatial de la dégradation, il n'est pas surprenant que le composé reste dans la zone de surface du sol car, du fait de son caractère lipophile, il est très peu entraîné par les eaux de drainage. De plus, la dégradation se produit tellement rapidement que l'on peut aussi penser qu'il n'a pas le temps de migrer plus profondément dans le sol. Après avoir montré la disparition de l'ester méthylique, le travail a été poursuivi par l'étude de ses produits de dégradation. Les essais sur lysimètres et en plein champ ont conduit à la mise en évidence de tous les acides gras de C4 à C18, indiquant dans les deux situations une dégradation pas à pas de la chaîne hydrocarbonée. Les acides gras sont observés à des profondeurs variables pouvant aller jusqu'à 70 cm et à des temps variables ne suivant pas la chronologie de l'expérience. Cela est probablement dû au fait que l'oléate de méthyle et ses produits de dégradation peuvent être stockés sous la forme de métabolites dans les micro-organismes puis rejetés par ces derniers selon des processus complexes difficilement interprétables.

Mais le point important à souligner dans cette étude est que, pour l'ensemble de ces métabolites, la dégradation est complète au bout de 60 jours. La comparaison des résultats obtenus avec les deux sols montre ici aussi que la nature du sol

n'a pas d'influence sur la dégradation de l'ester méthylique.

• Huile minérale

L'analyse spatio-temporelle de l'huile minérale (figure 2) montre également une dégradation complète du composé, que ce soit en lysimètre ou en champ et avec les deux sols, mais après une période plus longue : en effet il faut attendre 90 jours pour ne plus observer l'huile dans les sols. Nous avons aussi relevé qu'elle migrait un peu plus profondément (25 cm en lysimètre et 30 cm en champ). Sur la figure 3 nous pouvons comparer les profils cinétiques de disparition des deux huiles et il apparaît clairement une cinétique de dégradation plus rapide pour l'ester méthylique.

Le suivi spatio-temporel dans le sol de l'ester méthylique et de ses produits de dégradation a montré pour tous les essais une disparition complète de tous les composés, 60 jours après le dépôt dans le sol. A travers cette étude nous pouvons donc affirmer que cet ester méthylique d'origine végétale présente une très bonne biodégradabilité dans le sol, de même que tous ses produits de dégradation. Ces résultats ont été obtenus sur deux sols de nature différente qui sont représentatifs des régions françaises où l'adjuvant phytosanitaire peut être largement utilisé du fait de la nature des cultures pratiquées (maïs et betterave).

En revanche, les processus de déplacement des produits dans le sol semblent être plus difficiles à comprendre car ils ne suivent pas une évolution logique et sont probablement fortement dépendants des micro-organismes impliqués dans la biodégradation.

La comparaison des profils de dégradation de l'huile végétale et de l'huile minérale a montré

Figure 3. Comparaison de la biodégradation en lysimètre des huiles végétale et minérale.

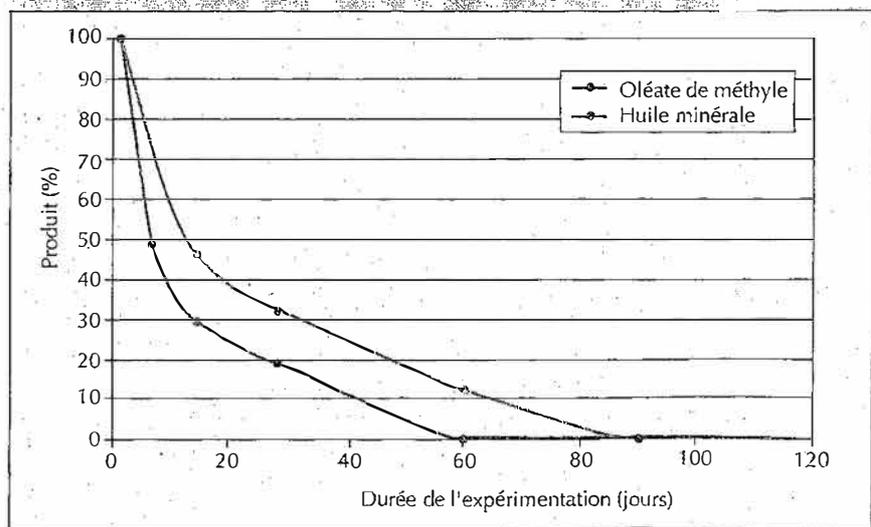


Tableau 1. Identification de quelques micro-organismes du sol du Sud-Ouest.

Micro-organismes	Identification	Unité formant colonie (10 ⁸ /g de sol)	
Bactéries	<i>B. bardius</i>	0,1	
	<i>B. brevis</i>	0,1	
	<i>B. circulans</i>	0,08	
	<i>B. fastidiosus</i>	0,06	
	<i>B. firmus</i>	0,1	
	<i>B. globosporus</i>	0,2	
	<i>B. lentus</i>	0,01	
	<i>B. megaterium</i>	0,6	
	<i>B. sphaericus</i>	0,2	
	<i>B. subtilis</i>	0,1	
	Moisissures	<i>Penicillium</i>	0,01
		<i>Paecilomyces</i>	0,01
		<i>Acremonium</i>	0,1
Souche non-identifiée		0,1	
Levure	<i>C. tropicalis</i>	0,1	

la supériorité de la première en matière de cinétique de disparition du composé parent. De plus, le devenir des produits de dégradation de l'huile minérale n'a pas été abordé dans cette étude et il est possible qu'ils soient encore présents dans le sol après 90 jours.

Etude microbiologique

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de la biodégradation mise en évidence dans la première partie du travail, nous avons abordé l'étude microbiologique sur le sol du Sud-Ouest.

Cette étude a porté sur l'identification de quelques micro-organismes impliqués dans les processus de biodégradation et sur des tests d'écotoxicité de l'ester méthylique et de l'huile minérale envers ces micro-organismes.

• Identification des micro-organismes du sol impliqués dans la biodégradation

Nous avons tout d'abord procédé à l'isolement de certaines souches de micro-organismes présents dans le sol du Sud-Ouest de la France qui a été utilisé pour le suivi spatio-temporel des huiles.

Une fois les souches isolées les unes des autres, nous avons identifié quatorze espèces de micro-organismes à l'aide des tests classiques. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1.

Nous avons mis en évidence une flore bactérienne dominante (presque 90 %) composée de dix espèces de *Bacillus*. Les tests ont également permis d'observer une levure (*Candida tropicalis*) qui représente environ 6 % de la flore

Tableau 2. Écotoxicité de l'oléate de méthyle envers les micro-organismes du sol.

Micro-organismes du sol	Témoin glucose	Oléate de méthyle 2 l/ha	Oléate de méthyle 10 l/ha	Oléate de méthyle 20 l/ha	Oléate de méthyle 100 l/ha	Oléate de méthyle 200 l/ha
<i>B. firmus</i>	N	N	N	N	FD	FD
<i>B. bardius</i>	N	N	N	N	N	FD
<i>B. circulans</i>	N	N	N	N	FD	TFD
<i>B. megaterium</i>	N	N	N	N	N	TFD
<i>B. globosporus</i>	N	N	N	N	N	FD
<i>B. brevis</i>	N	N	N	N	N	FD
<i>B. subtilis</i>	N	N	N	N	N	FD
<i>B. sphaericus</i>	N	N	N	N	FD	TFD
<i>B. lentus</i>	N	N	N	N	FD	FD
<i>B. fastidiosus</i>	N	N	N	N	FD	TFD
<i>Penicillium</i>	N	N	N	N	FD	FD
<i>Paecilomyces</i>	N	N	N	N	FD	TFD
<i>Acremonium</i>	N	N	N	N	N	FD
Moisissure	N	N	N	N	N	FD
<i>C. tropicalis</i>	N	N	N	N	FD	FD

N : développement normal ;
FD : faible développement ;
TFD : très faible développement

totale. Enfin, parmi les quatre moisissures, nous en avons identifié trois appartenant aux genres *Penicillium*, *Paecilomyces* et *Acremonium*.

Tous ces micro-organismes sont aérobies et couramment observés dans la plupart des sols à faible profondeur. Ces résultats corroborent l'hypothèse d'une dégradation des huiles se produisant en surface et cela pour les deux sols étudiés dans les expérimentations de biodégradation. En corrélant ces données microbiologiques aux résultats obtenus dans l'étude de l'oléate de méthyle et de ses produits de dégradation, nous pouvons avancer l'hypothèse de β et ω oxydations du composé [9,10] qui conduisent à la perte des groupements méthyle étape après étape.

• Tests d'écotoxicité

L'étude microbiologique se devait d'être complétée par des tests d'écotoxicité de l'ester méthylique et de l'huile minérale envers les micro-organismes du sol afin de vérifier l'impact environnemental des produits sur la microflore du sol.

Les tableaux 2 et 3 rassemblent les résultats pour l'huile végétale et l'huile minérale.

Nous n'observons aucun effet toxique de l'ester méthylique pour des concentrations allant jusqu'à 50 fois la dose d'emploi de l'adjuvant. Simplement à cette dose (100 l/ha), l'effet du produit commence à se faire sentir sur certaines souches qui se développent moins bien et on observe une réelle toxicité pour la dose maximale de 200 l/ha. A la vue de ces résultats, on ne peut donc pas craindre une toxicité liée à l'accumulation du produit dans le sol.

Quant à l'huile minérale, la toxicité apparaît pour des concentrations beaucoup plus faibles, puisque certaines souches de micro-organismes voient leur développement altéré à partir de 30 l/ha, soit seulement 10 fois la dose d'emploi. La toxicité devient très importante pour la dose de 150 l/ha qui correspond à 50 fois la dose d'emploi. Cette information indique que, dans le cas de l'huile minérale, le risque de toxicité envers les micro-organismes du sol est réel du fait d'une accumulation possible du composé dans le sol.

L'ensemble de ces résultats montre que l'huile végétale est beaucoup moins toxique envers les micro-organismes du sol que l'huile minérale. Par ailleurs des tests d'écotoxicité pratiqués sur des poissons d'eau douce ont confirmé la supériorité du dérivé végétal qui ne présente aucune toxicité pour des doses de 100 mg/l alors que l'huile minérale engendre une morbidité importante à partir de 37mg/l.

Conclusion

Nous présentons ici un travail original et novateur sur le devenir d'un dérivé d'huile végétale dans le sol. Ce composé, utilisé comme adjuvant phytosanitaire, bénéficiait déjà de la mention « biodégradable » car il présentait une biodégradabilité supérieure à 90 % selon le test ISO 29439 [11]. Ce test, classique dans le domaine de l'évaluation de la biodégradabilité, est fondé sur la méthode de Sturm ; il est réalisé en milieu liquide avec des inocula provenant des boues d'épuration. Mais ces conditions expérimentales sont très différentes des

Tableau 3. Écotoxicité de l'huile minérale envers les micro-organismes du sol.

Micro-organismes du sol	Témoin glucose	Huile minérale 3 l/ha	Huile minérale 15 l/ha	Huile minérale 30 l/ha	Huile minérale 150 l/ha	Huile minérale 300 l/ha
<i>B. firmus</i>	N	N	N	FD	FD	TFD
<i>B. bardius</i>	N	N	N	N	N	FD
<i>B. circulans</i>	N	N	N	N	FD	TFD
<i>B. megaterium</i>	N	N	N	N	N	TFD
<i>B. globiosporus</i>	N	N	N	FD	FD	FD
<i>B. brevis</i>	N	N	N	N	N	FD
<i>B. subtilis</i>	N	N	N	N	FD	FD
<i>B. sphaericus</i>	N	N	N	FD	FD	TFD
<i>B. lentus</i>	N	N	N	N	FD	PD
<i>B. fastidiosus</i>	N	N	N	FD	FD	TFD
<i>Penicillium</i>	N	N	N	FD	FD	TFD
<i>Paecilomyces</i>	N	N	N	N	FD	TFD
<i>Acremonium</i>	N	N	N	N	N	FD
Moisissure	N	N	N	N	FD	FD
<i>C. tropicalis</i>	N	N	N	N	FD	FD

N : développement normal ;
 FD : faible développement ;
 TFD : très faible développement ;
 PD : pas de développement.

conditions réelles d'utilisation de l'adjuvant et aucune donnée scientifique ne permettait jusqu'à ce jour d'évaluer le réel impact du composé lorsqu'il entre en contact avec le sol suite à son utilisation. De plus, outre la dégradation de l'ester lui-même, il était important de s'assurer de la biodégradation des métabolites produits au cours du temps.

Cette étude menée à la fois sur le terrain et en laboratoire a établi la biodégradabilité totale dans le sol de l'ester méthylique de l'acide oléique et de tous ses produits de dégradation au bout de 60 jours. L'étude comparative avec l'huile minérale met en avant la supériorité du dérivé végétal qui se dégrade plus rapidement que son homologue minéral. De plus les produits de dégradation de l'huile minérale n'ont pas été étudiés et nous ne pouvons donc pas conclure sur sa réelle biodégradabilité.

Les tests d'écotoxicité envers certains micro-organismes du sol ont montré l'innocuité de l'ester végétal à l'opposé du composé minéral qui présente une certaine toxicité. Ces résultats ont été confortés par des essais sur les poissons. Si la migration des composés semble suivre des processus complexes, en revanche, une partie des micro-organismes impliqués dans la biodégradation ont été clairement identifiés : il s'agit de bactéries, levures et moisissures aérobies très largement répandues dans les différents sols, ce qui vraisemblablement permettra d'étendre les résultats de l'étude à d'autres sols. L'ensemble des informations recueillies dans le cadre de ces travaux montre les qualités environnementales de l'ester végétal pour la préservation des qualités du sol et des eaux souterraines comme pour le respect de la micro-flore et de la faune environnante.

Remerciements

Nous remercions l'Onidol et l'Ademe pour leur soutien financier et plus particulièrement MM. S. Claude et E. Poitrat pour l'aide apportée au projet. Nous remercions également C. Roques et B. Caussade pour leur collaboration scientifique et l'INRA de Mons-Etrees (MM. Boizard et Regnier) pour leur aide technique.

REFERENCES

- CORNISH A, BATTERSBY NS, WATKINSON RJ (1993). Environmental fate of mineral, vegetable and transesterified vegetable oils. *Pestic Sci* 37: 173-8.
- GAUVRIT C (1994). Les huiles en phytosanitaire : le cas des herbicides. *Phytoma, la défense des végétaux* 458 : 37-41.
- PARMENTIER J (1994). Phytosanitaire et huiles végétales. *OCL* 2 : 111-2.
- CHARLEMAGNE D (1995). Huiles végétales et protection des cultures. *Biofutur*: 32-4.
- Projet de canevas de Norme Française. Projet. Corps gras d'origine végétale. Caractérisation des huiles végétales adjuvantes de produits phytosanitaires.
- KORETA R (1996). *Sur le devenir des pesticides dans le sol*. Thèse INPT.
- AGIUS D (2000). *Étude et devenir dans le sol des huiles d'origine végétale utilisées comme adjuvant dans les formulations phytosanitaires*. Thèse INPT.
- BERGEY R (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 8th ed. Londres: Williams and Wilkins Baltimore, 2:1104-38.
- LOEHR RC, ROTH JC (1968). Aerobic degradation of long-chain fatty acid salts. *Journal WPCF* 40: 385-403.
- GOOTSCHALK G (1975). Bacterial metabolism. In : *Microbial production and utilization of gases (H₂, CH₄, CO₂)*. Proceeding of the symposium, Göttingen, Allemagne, 1-5. 09. 1975. Akademie der wissenschaften: 149-54.
- ISO 29439 (1993). Qualité de l'eau. Évaluation, en milieu aqueux, de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques. Norme européenne, norme française.