

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Adoptée par le Conseil le 17 juillet 1992

Biodégradabilité Facile

INTRODUCTION

Dans cette Ligne directrice sont décrites six méthodes qui permettent le classement des produits chimiques en fonction de leur biodégradabilité facile en milieu aqueux aérobique. Ces méthodes sont :

- 301 A : Essai de disparition du COD
- 301 B : Essai de dégagement de CO₂ (Essai de Sturm modifié)
- 301 C : Essai MITI modifié (I) (Ministry of International Trade and Industry, Japon)
- 301 D : Essai en flacon fermé
- 301 E : Essai de « screening » modifié de l'OCDE
- 301 F : Essai de respirométrie manométrique

1. La méthode 301 A est semblable à la norme ISO 7827-1984. Elle remplace l'ancien essai AFNOR modifiée (l'AFNOR ayant adopté la norme ISO). Les méthodes 301B, 301 D et 301 E sont des versions modifiées des précédentes lignes directrices de l'OCDE adoptées en 1981. La méthode 301 C est pratiquement identique à la précédente Ligne directrice 301 C (MITI I). La méthode 301 F est nouvelle ; elle ressemble à la méthode 301 C, la principale différence portant sur les inocula employés.

2. Au cours des années, on a acquis pour ces six méthodes une expérience importante avec notamment un exercice comparatif inter-laboratoires de l'OCDE (essai circulaire) réalisé en 1988. L'expérience accumulée et l'essai circulaire ont confirmé que ces méthodes pouvaient être utilisées pour l'évaluation de la biodégradabilité facile. Cependant, en fonction des propriétés physiques de la substance à tester, on peut choisir une méthode particulière.

3. Ci-après sont mentionnées des considérations générales et des considérations communes à l'ensemble des six méthodes. Les détails spécifiques aux différentes méthodes sont décrits dans des chapitres séparés (301 A à 301 F). Tout au long du texte le lecteur est invité à se reporter aux annexes qui contiennent les définitions (Annexe I), les formules et les références utiles.

PRINCIPE GÉNÉRAL DES MÉTHODES

4. Une solution ou une suspension de la substance à tester dans un milieu minéral estensemencée et incubée en aérobiose, dans l'obscurité ou sous lumière diffuse. La quantité de COD apportée par l'inoculum dans la solution d'essai doit être aussi faible que possible par rapport à la quantité de carbone organique provenant de la substance à tester. On prend en compte l'activité endogène de l'inoculum, réalisant en parallèle des témoins contenant l'inoculum mais sans addition de la substance à tester, bien que l'activité endogène des cellules en présence d'un produit chimique ne corresponde pas

exactement à celle des témoins endogènes. Un essai avec une substance de référence est conduit en parallèle afin de contrôler la procédure.

5. En général la dégradation est suivie par la détermination de paramètres tels que le COD, la production de CO₂ ou la consommation d'oxygène ; les mesures sont effectuées à des intervalles de temps suffisamment rapprochés pour pouvoir identifier le début et la fin de la biodégradation. Les respiromètres automatiques permettent d'effectuer des mesures en continu. Le COD est parfois mesuré en plus d'un autre paramètre, mais ceci n'est généralement le cas qu'au début et à la fin de l'essai. Une analyse chimique spécifique peut également servir à évaluer la dégradation primaire de la substance à tester et à déterminer la concentration de toutes les substances intermédiaires qui se forment. Cette analyse est obligatoire dans l'essai MITI modifié (301 C).

6. L'essai dure normalement 28 jours. Un essai peut cependant être interrompu avant, dès lors que la courbe de biodégradation atteint un plateau qui se prolonge au moins sur trois mesures. Un essai peut également être prolongé au-delà de 28 jours si la courbe montre que la biodégradation a commencé sans toutefois avoir atteint un palier, mais dans ce cas, le produit chimique ne devrait pas être classé comme facilement biodégradable.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Il est essentiel, pour choisir la méthode la plus appropriée, de disposer d'informations concernant la solubilité, la pression de vapeur et les caractéristiques d'adsorption de la substance à tester. Pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la DThO, le CO₂Th, le COD, le COT et la DCO, il est nécessaire de connaître la structure chimique ou la formule du produit. Afin d'interpréter les résultats obtenus, en particulier quand ceux-ci se situent près des valeurs « seuil », on doit disposer d'informations sur la pureté du produit étudié ou sur les proportions relatives de ses principaux composants.

8. Des informations sur la toxicité du produit à tester vis à vis bactéries (Annexe II) peuvent être extrêmement utiles pour choisir les concentrations d'essai appropriées, voire essentielles pour interpréter correctement de faibles valeurs de biodégradation.

CRITÈRES D'APPLICATION ET DE CHOIX DES MÉTHODES

9. Toutes ces méthodes sont applicables aux substances d'essai qui sont solubles dans l'eau à des concentrations d'au moins 100 mg/l, à condition qu'elles ne soient ni volatiles ni adsorbables. Dans le cas de produits peu hydrosolubles, volatils ou adsorbables, les méthodes appropriées sont indiquées dans le tableau I. La manière de procéder avec les produits faiblement hydrosolubles et volatils est décrite dans l'Annexe III, mais pour l'essai MITI modifié on ne doit utiliser ni solvant ni agent émulsifiant. On peut tester les substances modérément volatiles à l'aide de la méthode de disparition du COD pourvu que les récipients d'essai (qui devront être correctement fermés) disposent d'un volume suffisant pour les gaz. Dans ce cas, un essai de contrôle abiotique doit être prévu afin de tenir compte de toute perte physique de la substance.

TABEAU 1 APPLICABILITÉ DES MÉTHODES D'ESSAI

Essai	Méthode d'analyse	Appropriée pour les composés qui sont :		
		faibl. solubles	volatiles	adsorbables
Disparition du COD (301 A)	Carbone organique dissous	-	-	+/-
Dégagement de CO ₂ (301 B)	Respirométrie : CO ₂ dégagé	+	-	+
MITI (I) (301 C)	Respirométrie : consommation d'oxygène	+	+/-	+
Flacon fermé (301 D)	Respirométrie : oxygène dissous	+/-	+	+
Essai de « screening » modifié de l'OCDE (301 E)	Carbone organique dissous	-	-	+/-
Respirométrie manométrique (301 F)	Consommation d'oxygène	+	+/-	+

NIVEAUX DE SEUIL

10. Pour la biodégradabilité facile, les niveaux de seuil sont une diminution de 70 % du COD et dans le cas des méthodes respirométriques une consommation de 60 % de la DThO ou une production de 60 % du CO₂. Les niveaux de seuil sont inférieurs dans les méthodes respirométriques ; en effet, une partie du carbone provenant de la substance d'essai étant incorporée dans de nouvelles cellules, le pourcentage de CO₂ produit est plus faible que le pourcentage de carbone utilisé. Ces valeurs de seuil doivent être atteintes dans un intervalle de temps de 10 jours compris à l'intérieur de la durée d'essai de 28 jours, sauf dans les cas mentionnés ci-dessous. Cet intervalle de 10 jours débute lorsque le taux de biodégradation atteint 10 % du COD, de la DThO ou du CO₂Th et doit se terminer avant le 28^{ème} jour de l'essai. On considère les substances chimiques qui atteignent les niveaux de seuil après la période d'essai de 28 jours comme n'étant pas facilement biodégradables. Le concept de l'intervalle de 10 jours ne s'applique pas à la méthode MITI modifié. La valeur seuil, obtenue dans un intervalle de 14 jours, peut être acceptable dans la méthode de la fiole fermée si l'on juge que le nombre de bouteilles nécessaires pour faire les mesures à l'intérieur des 10 jours rendrait l'essai trop pesant.

COMPOSÉS DE RÉFÉRENCE

11. Afin de vérifier la procédure, des composés de référence qui répondent aux critères de biodégradabilité facile sont testés en parallèle en ajoutant une fiole appropriée à la série normale d'essais. L'aniline (fraîchement distillée), l'acétate de sodium et le benzoate de sodium sont des composés de référence adéquats. Dans les méthodes étudiées ici, tous ces composés de référence subissent une dégradation, même quand aucun inoculum n'est délibérément ajouté. Il a été proposé de rechercher un composé de référence qui soit facilement biodégradable mais qui nécessite l'addition d'un

inoculum. On a proposé l'hydrogénéphthalate de potassium, mais on doit obtenir davantage d'informations sur ce produit avant de l'accepter comme composé de référence.

REPRODUCTIBILITÉ DES ESSAIS

12. Les mesures doivent être effectuées au moins en double du fait de la nature du phénomène de biodégradation et de l'hétérogénéité des populations bactériennes utilisées comme inoculum. On observe habituellement que, plus la concentration initiale en micro-organismes ajoutés au milieu d'essai est importante, plus la variation entre les essais en double est faible. Des essais circulaires ont également montré qu'il pouvait exister de grandes variations entre les résultats provenant de différents laboratoires, mais avec les composés facilement biodégradables on obtient normalement une bonne concordance.

PROCÉDURES GÉNÉRALES ET PRÉPARATIONS

13. Les conditions générales qui s'appliquent à ces méthodes sont résumées dans le Tableau 2. Les appareils et autres conditions expérimentales spécifiques d'un essai particulier sont décrits ci-après dans les chapitres consacrés à chaque essai.

Eau

14. On utilise de l'eau déminéralisée ou distillée exempte de substances toxiques (par exemple les ions Cu^{++}) à des concentrations inhibitrices. Cette eau ne doit pas contenir plus de 10 % de la quantité de carbone organique introduite par le produit à tester. L'eau d'essai doit être d'une grande pureté afin d'éviter des valeurs élevées dans les essais à témoins. Les contaminations peuvent provenir d'impuretés naturelles ainsi que des résines échangeuses d'ions et de la lyse de matières provenant de bactéries et d'algues. Pour chaque série d'essais, n'utiliser qu'un même lot d'eau, dont la teneur en COD doit être analysée au préalable. Une telle vérification n'est pas nécessaire pour l'essai en fiole fermée, mais la consommation en oxygène de l'eau doit être faible (voir 301 D, paragraphe 25).

Milieus minéraux

15. Les milieux minéraux sont préparés à partir de solutions mères ayant une concentration appropriée en composés minéraux, à savoir, phosphates de potassium et de sodium plus chlorure d'ammonium, chlorure de calcium, sulfate de magnésium et chlorure de fer (III). Puisque, pour la méthode de « screening » modifiée de l'OCDE (301 E), on n'utilise qu'un très petit inoculum, contenant de faibles concentrations d'oligo-éléments et de facteurs de croissance, il peut être nécessaire, dans ce cas, de fortifier le milieu avec des composés supplémentaires. Dans les chapitres consacrés aux différents essais, on trouve des détails sur les solutions mères de sels minéraux, d'oligo-éléments et de facteurs de croissance, ainsi que les proportions utilisées.

Méthodes d'addition des substances d'essai et de référence

16. La méthode utilisée pour ajouter les substances d'essai et les substances de référence au mélange réactionnel dépend de la nature du produit chimique, en particulier de sa solubilité dans l'eau. Pour les substances dont la solubilité est supérieure à environ 1 g/l, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées et utiliser des parties aliquotes pour préparer la solution d'essai finale. Dissoudre les substances moins solubles dans le milieu minéral afin d'éviter la dilution de la solution tampon. Ajouter les substances encore moins solubles directement dans le milieu minéral final. Enfin, pour la manipulation des substances faiblement solubles ou insolubles, se référer à l'Annexe III, mais noter que dans l'essai MITI modifié (301 C), aucun solvant organique ni agent émulsifiant ne doit être utilisé.

Inoculum

17. L'inoculum peut provenir de diverses sources : boue activée, effluent d'une station d'épuration (non chloré), eaux de surface et sols, ou d'un mélange de celles-ci. Pour les méthodes de disparition du COD (301 A), de dégagement de CO₂ (301 B) et de respirométrie manométrique (301 F), quand on utilise des boues activées, celles-ci doivent provenir d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement des eaux ménagères. On a constaté que les inocula provenant d'autres sources, qui montrent généralement des densités cellulaires inférieures, donnent des résultats plus dispersés. Pour l'essai de « screening » modifié de l'OCDE et l'essai en fiole fermée, il convient d'utiliser un inoculum plus dilué ne contenant pas de floccs bactériens, et la source la plus appropriée consiste en un effluent secondaire d'une station d'épuration des eaux ménagères ou d'une installation à l'échelle du laboratoire. Pour l'essai du MITI modifié (I), l'inoculum provient d'un mélange de plusieurs sources. Les détails concernant les sources et la préparation des inocula sont donnés dans les chapitres consacrés à chaque essai.

Préconditionnement de l'inoculum

18. L'inoculum peut être préconditionné aux conditions expérimentales, mais non préadapté au produit à tester. Le préconditionnement consiste à aérer la boue activée (dans un milieu minéral) ou l'effluent secondaire pendant 5 à 7 jours à la température de l'essai. Le préconditionnement permet parfois d'améliorer la précision des méthodes d'essai en réduisant les valeurs obtenues dans les témoins. Il est inutile de préconditionner l'inoculum destiné à l'essai MITI modifié (I).

Témoins abiotiques

19. Vérifier, si nécessaire, la dégradation abiotique éventuelle de la substance à tester en mesurant la disparition du COD, la consommation d'oxygène ou le dégagement de dioxyde de carbone dans des témoins stériles ne contenant pas d'inoculum. La stérilisation s'effectue par filtration sur membrane (0,2-0,45 µm) ou par addition d'une substance toxique adéquate à une concentration appropriée. Si l'on utilise la filtration sur membrane, les échantillons doivent être prélevés de façon aseptique afin de préserver la stérilité. A moins que l'adsorption de la substance d'essai n'ait été préalablement écartée, les essais qui mesurent la biodégradation par la disparition du COD, en particulier avec des inocula provenant de boue activée, devraient inclure un essai témoin abiotique avec l'inoculum et une substance inhibitrice.

Nombre de flacons et d'échantillons

20. On doit utiliser au moins deux flacons ou récipients contenant la substance d'essai avec l'inoculum, et au moins deux autres flacons ne contenant que l'inoculum. Des récipients uniques suffisent pour les substances de référence avec inoculum et, si nécessaire, pour les témoins de toxicité, témoin abiotique et témoin d'adsorption. L'essai en flacon fermée et l'essai MITI modifié (I) ont des exigences particulières en ce qui concerne le nombre de flacons. Celui-ci est précisé dans les chapitres consacrés à ces essais. Il est obligatoire de suivre le COD et/ou les autres paramètres en parallèle dans la suspension d'essai et dans l'essai témoin contenant l'inoculum. Il est également conseillé de suivre en parallèle le COD dans les autres flacons. Ce n'est cependant pas toujours possible.

21. Bien qu'il soit nécessaire de s'assurer que le nombre d'échantillons et de mesures est suffisant pour pouvoir évaluer le pourcentage d'élimination dans l'intervalle des 10 jours, il n'est pas possible d'indiquer avec précision la fréquence des prélèvements à cause de la grande disparité des temps de latence et des taux de dégradation. Dans la méthode MITI modifié (301 C), et dans la méthode de respirométrie manométrique (301 F) avec respiromètre automatique, les prélèvements pour déterminer la consommation d'oxygène ne posent aucun problème. Dans cette dernière méthode, si on utilise des

respiromètres non automatiques, des lectures quotidiennes sont suffisantes. Dans les chapitres consacrés aux quatre autres méthodes, des conseils spécifiques sur les prélèvements sont donnés.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

22. Le pourcentage de dégradation, D_t , est calculé à partir de la valeur moyenne des mesures en double du paramètre réalisées dans chacun des récipients d'essai et des témoins contenant l'inoculum. Les formules sont données dans les paragraphes consacrés aux méthodes spécifiques. L'évolution de la dégradation est représentée sur un graphique indiquant, s'il y a lieu, l'intervalle de temps de 10 jours. Calculer et mentionner dans le rapport le pourcentage d'élimination atteint et la valeur au niveau du plateau, ou à la fin de l'essai, et/ou à la fin de l'intervalle de 10 jours, selon les cas. Dans les essais de respirométrie, les composés azotés peuvent affecter la consommation d'oxygène en raison de la nitrification (voir Annexes IV et V). Si on ne peut pas calculer la DThO parce que la substance d'essai n'est pas clairement définie, on peut utiliser la valeur de la DCO pour calculer le pourcentage de dégradation. On doit cependant garder à l'esprit que la DCO est souvent inférieure à la DThO, car certains produits chimiques sont très faiblement oxydés dans l'essai de la DCO, ce qui conduit à des valeurs faussement élevées du taux de biodégradation.

23. Quand on dispose des données spécifiques d'analyse chimique, on calcule la biodégradation primaire à partir de la formule :

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

avec :

D_t = pourcentage de dégradation primaire au temps t, normalement 28 jours ;

S_a = quantité résiduelle (en mg) de la substance d'essai dans le milieu inoculé à la fin de l'essai ;

S_b = quantité résiduelle (en mg) de la substance d'essai dans le témoin abiotique à la fin de l'essai.

Critères de validité des essais

24. Un essai est considéré comme valide si les valeurs critères des mesures de disparition de la substance d'essai, au niveau du plateau, à la fin de l'essai ou à la fin de l'intervalle de 10 jours, selon les cas, ne présentent pas de différence de plus de 20 %, et si le taux de dégradation du composé de référence a atteint le niveau seuil en moins de 14 jours. Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'essai devra être recommencé. En raison du caractère rigoureux de ces méthodes, des valeurs peu élevées ne signifient pas nécessairement que la substance soumise à l'essai n'est pas biodégradable dans les conditions de l'environnement, mais elles indiquent que des études complémentaires seront nécessaires pour évaluer sa biodégradabilité.

25. Si, lors d'un essai de toxicité mettant en oeuvre à la fois la substance à tester et un produit de référence, la dégradation est inférieure à 35 % (établie d'après le COD) ou à 25 % (établie d'après le DThO ou le CO₂Th) au cours des 14 premiers jours, on peut estimer que la substance d'essai a un effet inhibiteur (voir l'Annexe II pour les autres essais de toxicité). La série d'essais doit être répétée, en utilisant une concentration de substance à tester plus faible (si cela est possible sans trop diminuer la précision du dosage du COD) et/ou une concentration d'inoculum plus élevée, sans toutefois dépasser 30 mg/l de matières en suspension.

26. Les autres critères de validité, qui sont spécifiques aux différentes méthodes, sont décrits dans les chapitres consacrés à celles-ci.

Rapport

27. Le compte-rendu d'essai doit contenir les renseignements suivants :

Substance d'essai :

- état physique et s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques ;
- données relatives à l'identification.

Conditions de l'essai :

- inoculum : nature et lieu(x) de prélèvement, concentration ainsi que tout traitement de préconditionnement ;
- proportion et nature des rejets industriels dans les eaux alimentant la station d'épuration, si elles sont connues ;
- durée et température de l'essai ;
- dans le cas où les substances à tester sont faiblement solubles, méthodes de préparation des solutions/suspensions d'essai ;
- méthode d'essai appliquée ; raisons scientifiques et explication de tout changement dans le procédé ;

Résultat :

- résultats sous forme de tableaux ;
- tout phénomène d'inhibition observé ;
- toute dégradation abiotique observée ;
- résultats spécifiques d'analyse chimique, s'ils sont disponibles ;
- résultats d'analyse de produits intermédiaires, s'ils sont disponibles ;
- courbe représentant le taux de dégradation en fonction du temps, pour les substances à tester et les substances de référence, la phase de latence, la phase de dégradation, l'intervalle de 10 jours et la pente (voir l'Annexe I pour les définitions) ;
- taux de disparition au niveau du plateau, à la fin de l'essai et/ou à l'issue de l'intervalle de temps de 10 jours.

Discussion des résultats.

TABLEAU 2 : CONDITIONS D'ESSAI

ESSAI	DISPARITION DU COD	DÉGAGEMENT DE CO ₂	RESPIROMÉTRIE MANOMÉTRIQUE	SCREENING OCDE MODIFIÉ	FLACON FERMÉ	MITI MODIFIÉ (I)
Concentration de la substance d'essai :						
mg/l			100		2 - 10	100
mg COD/l	10 - 40	10 - 20		10 - 40		
mg DThO/l			50 - 100		5 - 10	
Concentration de l'inoculum:						
mg/l SS		≤ 30				30
ml effluent/l		≤ 100		0,5	≤ 5	
cell/l (approx.)		10 ⁷ - 10 ⁸		10 ⁵	10 ⁴ - 10 ⁶	10 ⁷ - 10 ⁸
Concentration des éléments dans le milieu minéral (mg/l) :						
P		116			11,6	29
N		1,3			0,13	1,3
Na		86			8,6	17,2
K		122			12,2	36,5
Mg		2,2			2,2	6,6
Ca		9,9			9,9	29,7
Fe		0,05 - 0,1			0,05 - 0,1	0,15
pH			7,4 ± 0,2			de préférence 7
Température ° C			22 ± 2			25 ± 1°

301 A « ESSAI DE DISPARITION DU COD »**INTRODUCTION**

1. Les points d'intérêt général concernant l'évaluation de la biodégradabilité sont examinés dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » qu'il est conseillé de lire avant de commencer les expériences. Pour cette méthode, la substance d'essai doit être non volatile et sa solubilité dans l'eau doit être supérieure ou égale à 100 mg/l. On doit également connaître la teneur en carbone et, si possible, le degré de pureté ou les proportions relatives des principaux composants. Cet essai est pratiquement le même que la norme ISO 7827-1984. Il ressemble à l'essai de « screening » modifié de l'OCDE (301 E), mais il permet d'utiliser des densités microbiennes beaucoup plus élevées.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2. Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de substance à tester (10 à 40 mg/l de COD) comme unique source nominale de carbone organique, est aéré dans l'obscurité ou sous lumière diffuse, à $22 \pm 2^\circ\text{C}$. La dégradation est suivie en analysant le COD à des intervalles de temps fréquents pendant une durée de 28 jours. Le taux de biodégradation est calculé en exprimant la concentration de COD disparu (corrigée de la valeur obtenue dans l'essai témoin contenant l'inoculum) en pourcentage de la concentration initiale. La biodégradation primaire peut également être calculée à partir de l'analyse chimique de la substance d'essai réalisée au début et à la fin de l'incubation.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Appareillage**

3. Matériel courant de laboratoire et :
- a) Des flacons coniques d'une contenance comprise par exemple entre 250 ml et 2 litres, selon le volume requis pour l'analyse du COD. Les récipients doivent être soigneusement nettoyés avec, par exemple, de l'acide chlorhydrique alcoolique, puis rincés et séchés avant chaque essai ;
 - b) Un dispositif d'agitation adapté aux fioles coniques, soit muni d'un système automatique de contrôle de la température, soit placé dans une pièce à température constante, et permettant de maintenir des conditions aérobies dans tous les récipients ;
 - c) Un dispositif de filtration équipé des membranes adéquates ;
 - d) Un analyseur de COD ;
 - e) Un appareil de mesure de l'oxygène dissous, afin de vérifier que les contenus des fioles sont dans des conditions aérobies ;
 - f) Une centrifugeuse.

Eau

4. L'eau qui doit être utilisée est décrite dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » (paragraphe 15).

Solutions-mère pour le milieu minéral

5. Préparer les solutions-mères suivantes en utilisant des réactifs de qualité analytique :

(a) Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4	8,50 g
Hydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4	21,75 g
Hydrogénophosphate de sodium dihydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,40 g
Chlorure d'ammonium, NH_4Cl	0,50 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.
Le pH de la solution doit être égal à 7,4.

(b) Chlorure de calcium anhydre, CaCl_2	27,50 g
<u>ou</u> chlorure de calcium dihydraté, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,40 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.

(c) Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
--	---------

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.

(d) Chlorure de fer (III) hexahydraté, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
--	--------

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.

Remarque : Pour éviter d'avoir à préparer cette solution juste avant usage, ajouter une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g par litre d'acide éthylènediamine-tétraacétique (sel disodique de l'EDTA).

S'il se forme un précipité dans une solution-mère, la remplacer par une solution fraîchement préparée.

Préparation du milieu minéral

6. Mélanger 10 ml de solution (a) avec 800 ml d'eau, ajouter ensuite 1 ml des solutions (b), (c) et (d) et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau.

Solutions-mères des substances d'essai

7. Si la solubilité de la substance dépasse 1g/l, dissoudre dans l'eau, selon les cas, de 1 à 10 g de la substance d'essai (ou du produit de référence) et compléter le volume à un litre. Sinon préparer les solutions mères dans du milieu minéral ou ajouter directement la substance dans le milieu minéral final en s'assurant qu'elle se dissout bien.

Inoculum

8. L'inoculum peut provenir de diverses sources : boue activée ; effluents de stations d'épuration ;

eaux de surface ; sols ; ou d'un mélange de celles-ci.

Inoculum provenant de boue activée

9. Prélever un échantillon de boue activée dans le compartiment d'aération d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement des eaux ménagères. Eliminer, si nécessaire, les grosses particules par filtration au travers d'un tamis fin et ensuite conserver la boue dans des conditions aérobies.

10. Une autre possibilité après avoir éliminé toutes les grosses particules, consiste à laisser décanter la boue ou à la centrifuger (par exemple à 1 100 g pendant 10 minutes). Eliminer le surnageant. La boue peut être lavée dans le milieu minéral. Mettre la boue concentrée en suspension dans le milieu minéral de façon à obtenir une concentration de 3 à 5 g/l de matières en suspension. Aérer ensuite la suspension jusqu'à son utilisation.

11. La boue doit provenir d'une station d'épuration classique en bon état de fonctionnement. Les boues issues d'une station d'épuration dont le débit est important, ainsi que les boues susceptibles de contenir des inhibiteurs, doivent être lavées. Laisser décanter ou centrifuger la boue remise en suspension après agitation vigoureuse, éliminer le surnageant et remettre la boue lavée de nouveau en suspension dans un milieu minéral frais. Répéter cette opération jusqu'à ce que l'on puisse considérer que la boue est exempte de substrat en excès ou d'inhibiteur.

12. Prélever un échantillon de boue remise en suspension ou de boue non traitée juste avant le moment de son utilisation afin de déterminer le poids sec des matières en suspension.

13. Une autre possibilité consiste à homogénéiser la boue activée (entre 3 et 5 g/l de matière en suspension). Passer la boue dans un mélangeur mécanique pendant 2 minutes à vitesse moyenne. Laisser reposer la boue homogénéisée pendant 30 minutes ou plus longtemps si besoin est, et prélever la phase liquide, qui sera utilisée comme inoculum à raison d'environ 10 ml par litre de milieu minéral.

Autres sources d'inoculum

14. L'inoculum peut également provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire recevant principalement des eaux ménagères. Prélever un échantillon et le maintenir dans des conditions aérobies pendant le transport. Laisser décanter pendant une heure ou filtrer à travers un papier filtre grossier et conserver en aérobiose l'effluent décanté ou le filtrat, jusqu'au moment de son utilisation. On peut employer jusqu'à 100 ml de ce type d'inoculum par litre de milieu.

15. L'eau de surface est une autre source d'inoculum. Dans ce cas, recueillir un échantillon d'une eau de surface appropriée, par exemple eau de rivière ou de lac, et le maintenir en aérobiose jusqu'au moment de son utilisation. Si nécessaire, concentrer l'inoculum par filtration ou par centrifugation.

Préconditionnement de l'inoculum

16. L'inoculum peut être préconditionné aux conditions expérimentales, mais non préadapté au produit à tester. Le préconditionnement consiste à aérer la boue activée (en milieu minéral) ou l'effluent secondaire pendant 5 à 7 jours à la température de l'essai. Le préconditionnement permet parfois d'améliorer la précision de la méthode d'essai en réduisant les valeurs obtenues dans les témoins.

Préparation des flacons

17. Verser par exemple 800 ml de milieu minéral dans des flacons coniques de 2 litres, puis ajouter

dans des flacons différentes un volume suffisant de solutions-mères de substance d'essai et de substance de référence afin d'obtenir une concentration représentant l'équivalent chimique de 10 à 40 mg/l de COD. Vérifier les valeurs du pH et les ajuster, si besoin est, à 7,4. Ensemencer les flacons avec la boue activée ou avec un inoculum provenant d'une autre source, de telle sorte que la concentration finale n'excède pas 30 mg par litre de matière en suspension. Préparer également des témoins d'inoculum dans le milieu minéral, mais sans la substance d'essai ou de référence.

18. Consacrer, si nécessaire, un récipient à la détection d'un éventuel effet inhibiteur du produit étudié. Pour cela, ensemencer une solution contenant des concentrations à la fois de la substance d'essai et du produit de référence dans le milieu minéral, comparables à celles des autres flacons.

19. Vérifier également, si nécessaire, si la substance d'essai subit une dégradation abiotique, en ajoutant un récipient contenant cette substance en solution stérile non ensemencée. Stériliser par filtration sur membrane (0,2 à 0,45 µm) ou par addition d'une substance toxique à une concentration appropriée.

20. De surcroît, si on suspecte que la substance à tester va s'adsorber d'une façon importante sur le verre, la boue, etc., effectuer un essai préliminaire afin d'évaluer l'étendue probable de cette adsorption et, par conséquent, de déterminer si l'essai est adapté à ce produit (voir le Tableau 1). Ajouter un récipient contenant la substance d'essai, l'inoculum et un agent stérilisant.

21. Dans tous les récipients compléter le volume à 1 litre avec du milieu minéral, et après avoir mélangé, prélever un échantillon dans chaque flacon afin de déterminer en double la concentration initiale du COD (voir l'Annexe IV.4). Couvrir l'ouverture des fioles, par exemple avec du papier d'aluminium, de telle sorte que les échanges gazeux puissent s'effectuer librement entre la fiole et l'atmosphère environnante. Pour démarrer l'essai, placer les récipients dans le dispositif d'agitation.

Nombre de récipients

22. Dans un essai type, on utilise les fioles suivantes :

- | | |
|----------------|---|
| Flacons 1 et 2 | - contiennent la substance d'essai et l'inoculum (suspension d'essai) ; |
| Flacons 3 et 4 | - ne contiennent que l'inoculum (témoin inoculum) ; |
| Flacon 5 | - contient le produit de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure) ; et de préférence, et si nécessaire, également : |
| Flacon 6 | - contient la substance d'essai et l'agent stérilisant (témoin stérile abiotique) ; |
| Flacon 7 | - contient la substance d'essai, l'inoculum et l'agent stérilisant (témoin d'adsorption) ; |
| Flacon 8 | - contient la substance d'essai, le produit de référence et l'inoculum (témoin de toxicité). |

EXÉCUTION DE LA MÉTHODE

Dosages du COD

23. Tout au long de l'essai, déterminer en double les concentrations de COD dans les échantillons prélevés dans chaque flacon à des intervalles de temps donnés. Il est obligatoire de déterminer le COD parallèlement dans la suspension d'essai et dans le témoin contenant l'inoculum. Il est souhaitable de suivre également, en parallèle, le COD dans les autres flacons. Ce n'est cependant pas toujours possible.

Prélèvement

24. Pour chaque dosage, ne prendre que le volume de suspension d'essai strictement nécessaire. Avant chaque prélèvement, compenser toute perte due à l'évaporation dans les flacons, par ajout de la quantité d'eau nécessaire. Avant de prélever un échantillon, le milieu de culture doit être soigneusement mélangé et la matière adhérant aux parois du récipient doit être redissoute ou remise en suspension. Après prélèvement, l'échantillon doit être immédiatement filtré sur membrane ou centrifugé (voir l'Annexe IV.4). Analyser le jour même les échantillons filtrés ou centrifugés ; sinon les conserver entre 2 et 4°C pendant au maximum 48h, ou en dessous de -18°C pendant une plus longue période.

Fréquence des prélèvements

25. S'assurer que le nombre d'échantillons est suffisant pour permettre de déterminer le pourcentage de disparition au cours de l'intervalle de temps de 10 jours. On ne peut pas donner un programme précis d'échantillonnage. Si les analyses sont effectuées le jour du prélèvement, déterminer la date du prélèvement suivant au vu des résultats de l'analyse. Si les échantillons sont conservés, effectuer des prélèvements tous les jours ou tous les deux jours. En analysant d'abord les derniers échantillons (prélevés le 28ème jour), puis des échantillons convenablement choisis en revenant par étapes vers le début de l'expérience, on peut obtenir une description correcte de la courbe de biodégradation avec un nombre de dosages relativement faible. Il est évident que s'il n'y a aucune dégradation dans les derniers échantillons (au 28ème jour), il n'est pas nécessaire d'effectuer d'autres analyses.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Traitement des résultats**

26. Les résultats de l'essai doivent être reportés sur la feuille de résultats jointe.

27. A chaque temps de prélèvement, on doit calculer séparément le pourcentage de dégradation (D_t) pour chacun des 2 flacons contenant la substance d'essai (c'est-à-dire les flacons 1 et 2), en se servant de la valeur moyenne des mesures en double du COD (voir la feuille de résultat). On peut ainsi contrôler la validité de l'essai (voir le chapitre « Résultats et Rapport », p. 7). D_t est calculé d'après la formule suivante :

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_o - C_{bl(o)}} \right] \times 100$$

avec :

- D_t = % de dégradation au temps t ;
- C_o = concentration initiale moyenne de COD dans le milieu de cultureensemencé contenant la substance à tester (en mg/l de COD) ;
- C_t = concentration moyenne de COD dans le milieu de cultureensemencé contenant la substance à tester, au temps t (en mg/l de COD) ;
- $C_{bl(o)}$ = concentration initiale moyenne de COD dans le témoin contenant le milieu minéralensemencé (en mg/l de COD) ;
- $C_{bl(t)}$ = concentration moyenne de COD dans le témoin contenant le milieu minéralensemencé, au temps t (en mg/l de COD).

Toutes les concentrations sont mesurées expérimentalement.

28. Si les critères de validité de l'essai sont respectés, on trace sur un graphique la courbe

d'évolution de la dégradation en fonction du temps, en utilisant la moyenne des valeurs obtenues dans les deux flacons qui contiennent la substance d'essai. Indiquer sur cette courbe l'intervalle de temps de 10 jours. Calculer et mentionner dans le rapport le pourcentage d'élimination atteint au niveau du plateau, à la fin de l'essai et/ou à la fin de l'intervalle de temps de 10 jours, selon les cas.

29. Quand on dispose de données d'analyse chimique spécifique, on calcule la biodégradation primaire (voir le chapitre « Résultats et Rapport », p. 6).

30. Quand on réalise un témoin stérile abiotique, on calcule le pourcentage de dégradation abiotique selon la formule :

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

avec :

$C_{s(o)}$ = concentration du COD dans le témoin stérile au jour 0 ;

$C_{s(t)}$ = concentration du COD dans le témoin stérile au jour t.

Critères de validité de l'essai

31. Appliquer les critères de validité donnés dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 6).

Rapport d'essai

32. Le rapport d'essai doit comprendre les renseignements décrits dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 7).

**ESSAI DE DISPARITION DU COD
FEUILLE DE RÉSULTATS**

1. LABORATOIRE :

2. DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI :

3. SUBSTANCE D'ESSAI :

Nom :
 Concentration de la solution mère : mg/l de substance
 Concentration initiale dans le milieu à t₀ : mg/l de substance

4. INOCULUM :

Origine :
 Traitement :
 Préconditionnement éventuel :
 Concentration des matières en suspension
 dans le mélange réactionnel : mg/l

5. DOSAGES DU CARBONE :

Analyseur de carbone :

	Flacon no.		COD après n jours (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Substance d'essai plus inoculum	1	a ₁					
		a ₂					
		moyenne, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		moyenne, C _{b(t)}					
Témoin inoculum sans la substance d'essai	3	c ₁					
		c ₂					
		mean, C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		moyenne, C _{d(t)}					
	moyenne, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES

Flacon no.	Calcul des résultats	% de dégradation après n jours				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left[1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}} \right] \times 100$	0				
2	$D_2 = \left[1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}} \right] \times 100$	0				
Moyenne *	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

* On ne doit pas faire la moyenne de D₁ et D₂ s'il existe une grande différence entre ces deux valeurs.

Remarque : Des tableaux similaires peuvent être utilisées pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

7. DÉGRADATION ABIOTIQUE (facultatif)

	Temps (en jours)	
	0	t
Concentration du COD (en mg/l) dans le témoin stérile	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ANALYSE CHIMIQUE SPÉCIFIQUE (facultatif)

	Quantité résiduelle de la substance étudiée, à la fin de l'essai	% de dégradation primaire
Témoin stérile	S_b	
Milieu d'essaiensemencé	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

301 B, ESSAI DE DÉGAGEMENT DE CO₂**INTRODUCTION**

1. Les points d'intérêt général concernant l'évaluation de la biodégradabilité sont examinés dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » qu'il est conseillé de lire avant de commencer les expériences. Pour cette méthode, la substance d'essai doit être non volatile et on doit connaître sa teneur en carbone, et, si possible, son degré de pureté ou les proportions relatives des principaux composants.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2. Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de substance à tester (10 à 20 mg/l de COD ou de COT) comme unique source nominale de carbone organique, est aéré dans l'obscurité ou sous lumière diffuse, par passage d'air exempt de dioxyde de carbone sous débit contrôlé. La dégradation est suivie par l'analyse du dioxyde de carbone produit pendant une période de 28 jours. Le CO₂ est piégé par de l'hydroxyde de baryum ou de sodium, puis il est dosé par titration de l'hydroxyde en excès ou en tant que carbone inorganique. La quantité de dioxyde de carbone produit par la substance d'essai (corrigée de la valeur obtenue pour le témoin contenant l'inoculum) est exprimée sous forme de pourcentage du CO₂Th (théorique). Le taux de biodégradation peut également être calculé à partir d'une analyse supplémentaire du COD au début et à la fin de l'incubation.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Appareillage**

3. Matériel courant de laboratoire et :
- (a) Des flacons de 2 à 5 litres, munis chacun d'un tube d'aération atteignant presque le fond du récipient et d'un orifice pour l'évacuation des gaz (le tube ne doit pas gêner l'agitateur magnétique, si on en utilise un) ;
 - (b) Des agitateurs magnétiques pour les produits peu solubles ;
 - (c) Des flacons pour l'absorption des gaz ;
 - (d) Un appareil pour le contrôle et la mesure du débit d'air ;
 - (e) Un dispositif pour piéger le dioxyde de carbone, permettant d'obtenir de l'air exempt de CO₂ ; on peut également utiliser des bouteilles de gaz comprimé pour faire un mélange d'oxygène et d'azote exempt de CO₂ dans les proportions correctes (20 % de O₂ : 80 % de N₂) ;
 - (f) Un dispositif pour le dosage du dioxyde de carbone, soit par titrimétrie soit à l'aide d'un appareil d'analyse du carbone inorganique ;
 - (g) Un appareillage de filtration sur membrane (facultatif) ;
 - (h) Un analyseur de COD (facultatif).

Eau

4. L'eau qui doit être utilisée est décrite dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » (paragraphe 15).

Solutions mères pour le milieu minéral

5. Préparer les mêmes solutions mères que celles décrites dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 5).

Préparation du milieu minéral

6. Se référer à la Ligne directrice 301 A (paragraphe 6).

Solutions mères des substances d'essai

7. Les préparer comme indiqué dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 7). Pour la manipulation des substances peu solubles, voir l'Annexe III.

Inoculum

8. L'inoculum peut provenir de différentes sources : boue activée ; effluents de stations d'épuration ; eaux de surface ; sols ; ou un mélange de celles-ci.

Inoculum provenant de boue activée

9. Se reporter à la Ligne directrice 301 A (paragraphe 9 à 13) pour avoir les détails sur le prélèvement et sur la préparation de l'inoculum provenant de boue activée.

Autres sources d'inoculum

10. L'inoculum peut aussi provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire recevant principalement des eaux ménagères, ou encore des eaux de surface. Pour les détails, se reporter à la Ligne directrice 301 A (paragraphe 14 et 15).

Préconditionnement de l'inoculum

11. Se reporter à la Ligne directrice 301 A (paragraphe 16).

Préparation des flacons

12. Les volumes et les poids suivants sont donnés à titre indicatif pour des récipients de 5 litres contenant 3 litres de milieu. Si l'on utilise des volumes plus petits, on doit modifier en conséquence les valeurs correspondantes, tout en s'assurant que l'on peut mesurer de façon précise le dioxyde de carbone formé. Dans chaque flacon de 5 litres, verser 2 400 ml de milieu minéral. Ajouter un volume de boue activée préparée au préalable tel que la concentration en matières en suspension ne dépasse pas 30 mg/l dans le volume final de 3 litres du mélangeensemencé. Ou bien, diluer d'abord la boue préparée dans le milieu minéral afin d'obtenir une concentration de 500 à 1 000 mg par litre de matière en suspension, puis ajouter une partie aliquote de cette suspension au contenu du récipient de 5 litres de façon à atteindre une concentration de 30 mg/l ; ceci permet d'obtenir la concentration désirée avec une plus grande précision (on peut utiliser d'autres sources d'inoculum, voir les paragraphes 14 et 15 de la Ligne directrice 301 A). Aérer ces mélangesensemencés pendant une nuit avec de l'air exempt de CO₂ afin

d'éliminer le dioxyde de carbone.

13. Ajouter séparément des volumes connus de solutions mères de la substance d'essai et du composé de référence dans des flacons préparés en double de telle sorte que les produits ajoutés conduisent à des concentrations de 10 à 20 mg/l de COD ou de COT ; ne pas ajouter de produits dans les flacons qui serviront de témoins pour l'inoculum. Pour les substances d'essai peu solubles, ajouter un certain poids ou volume de substance directement dans les flacons, ou procéder comme indiqué à l'Annexe III. Dans tous les récipients, compléter les volumes des suspensions à 3 litres avec le milieu minéral aéré préalablement au moyen d'air exempt de CO₂.

14. Si besoin est, afin de vérifier l'éventuel effet inhibiteur de la substance d'essai, ajouter ensemble dans un flacon les substances d'essai et de référence à des concentrations identiques à celles des autres flacons.

15. Si nécessaire, vérifier également si la substance d'essai subit une dégradation abiotique en utilisant une solution de la substance stérilisée et nonensemencée. La stérilisation s'effectue par l'ajout d'une substance toxique à une concentration appropriée.

16. Si on utilise de l'hydroxyde de baryum, connecter à chaque flacon de 5 litres trois flacons absorbeurs en série, contenant chacun 100 ml de solution d'hydroxyde de baryum 0,0125 M. La solution doit être exempte de sulfate et de carbonate précipités, et il convient d'en déterminer la teneur juste avant son utilisation. Si on utilise de l'hydroxyde de sodium, connecter 2 flacons piègeurs, le second servant à contrôler que tout le dioxyde de carbone a bien été absorbé par le premier. On peut employer des flacons absorbeurs équipés de fermetures de bouteille à serum. Verser 200 ml d'hydroxyde de sodium à 0,05 M dans chacun des flacons. Ceci est suffisant pour absorber tout le dioxyde de carbone dégagé lors de la dégradation complète de la substance d'essai. Même quand elle est fraîchement préparée, la solution d'hydroxyde de sodium contient des traces de carbonates ; ceci est corrigé par déduction des carbonates présents dans le témoin.

17. Si on le désire, on peut prélever des échantillons pour l'analyse du COD (voir l'Annexe IV.4) et/ou pour des analyses chimiques spécifiques.

Nombre de récipients

18. Dans un essai type, on utilise les flacons suivantes :

- Flacons 1 et 2 - contiennent la substance d'essai et l'inoculum (suspension d'essai) ;
- Flacons 3 et 4 - ne contiennent que l'inoculum (témoin inoculum) ;
- Flacon 5 - contient le produit de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure) ; et de préférence, si nécessaire, également :
- Flacon 6 - contient la substance d'essai et l'agent stérilisant (témoin stérile abiotique) ;
- Flacon 7 - contient la substance d'essai, le produit de référence et l'inoculum (témoin de toxicité).

EXÉCUTION DE LA MÉTHODE

19. Commencer l'essai en faisant barboter de l'air exempt de CO₂ dans les suspensions, à un débit de 30 à 100 ml/min.

Dosages du CO₂

20. Il est obligatoire de suivre le dégagement de CO₂ en parallèle dans les suspensions d'essai et

dans les témoins contenant l'inoculum et il est conseillé de faire la même chose dans les autres récipients d'essai.

21. Au cours des dix premiers jours, il est recommandé d'effectuer les analyses du CO₂ tous les deux ou trois jours, puis au moins tous les cinq jours jusqu'au 28^{ème} jour, de façon à pouvoir identifier l'intervalle de temps de dix jours. Le jour de l'analyse du CO₂, débrancher le flacon absorbeur contenant de l'hydroxyde de baryum situé le plus près du récipient d'essai et titrer la solution d'hydroxyde par de l'HCl à 0,05 M en utilisant de la phénolphthaléine comme indicateur. Rapprocher du récipient d'essai les flacons absorbeurs restants en les décalant d'une place et ajouter à l'extrémité de la série un nouveau flacon absorbeur contenant 100 ml d'une solution fraîche d'hydroxyde de baryum à 0,0125 M. Effectuer les titrations quand cela est nécessaire, par exemple quand on voit un précipité important dans le premier flacon piègeur et avant qu'un précipité n'apparaisse dans le second ou, à défaut au moins une fois par semaine. Une autre méthode consiste, avec NaOH comme absorbant, à prélever à l'aide d'une seringue un échantillon de la solution d'hydroxyde de sodium dans le flacon absorbeur le plus proche du récipient d'essai. Le volume d'échantillon nécessaire dépendra de l'analyseur de carbone utilisé, mais les prélèvements ne devront pas modifier significativement le volume d'absorbant durant l'essai. L'échantillon est ensuite injecté dans la partie CI (carbone inorganique) de l'analyseur de carbone afin de déterminer directement le dioxyde de carbone dégagé. On analyse, seulement à la fin de l'essai, le contenu du deuxième flacon absorbeur, afin d'apporter des corrections éventuelles si du dioxyde de carbone est transporté dans ce flacon.

22. Le 28^{ème} jour, on peut éventuellement prélever des échantillons pour déterminer le COD et/ou pour des analyses chimiques spécifiques. Ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré dans chaque récipient d'essai, puis aérer jusqu'au lendemain afin de chasser le dioxyde de carbone présent dans les suspensions d'essai. Le 29^{ème} jour, effectuer la dernière analyse du dioxyde de carbone dégagé.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

23. Les résultats de l'essai doivent être reportés sur la feuille de résultats jointe.

24. On calcule la quantité de CO₂ produite à partir de la quantité d'hydroxyde restant dans le flacon absorbeur. Quand on utilise comme absorbant du Ba(OH)₂ 0,0125 M, on détermine la quantité restante par titration avec de l'HCl 0,05 M (Ainsi pour titrer 100 ml de Ba(OH)₂, on utilisera 50 ml de HCl).

25. Puisque 1 mmole de CO₂ est produite pour chaque mmole de Ba(OH)₂ utilisée, et que 2 mmoles d'HCl sont nécessaires pour titrer 2 mmole de Ba(OH)₂ restante, entraînant la formation de BaCl₂, et sachant que le poids moléculaire du CO₂ est de 44 g, on en déduit le poids de CO₂ dégagé (en mg) d'après la formule :

$$\frac{0,05 \times (50 - \text{ml HCl titré}) \times 44}{2} = 1,1 \times (50 - \text{ml HCl titré})$$

Ainsi, dans ce cas, le facteur de conversion du volume d'HCl titré en mg de CO₂ produit est de 1,1. Calculer les quantités de CO₂ produites à partir de l'inoculum seul et du mélange inoculum plus substance d'essai, en utilisant les valeurs respectives de titration ; la différence donne la quantité de CO₂ produite uniquement par la substance d'essai. Par exemple, si, lors de la titration, l'inoculum seul donne une valeur de 48 ml, et l'inoculum plus la substance d'essai une valeur de 45 ml,

CO ₂ de l'inoculum	= 1,1 × (50 - 48) = 2,2 mg
CO ₂ de l'inoculum plus la substance d'essai	= 1,1 × (50 - 45) = 5,5 mg

et ainsi, la quantité de CO₂ produite par la substance d'essai est de 3,3 mg.

26. Le taux de biodégradation est calculé à partir de la formule :

$$\% \text{ dégradation} = \frac{\text{mg de CO}_2 \text{ produit}}{\text{CO}_2\text{Th} \times \text{mg de substance d'essai ajoutée}} \times 100$$

ou

$$\% \text{ dégradation} = \frac{\text{mg de CO}_2 \text{ produit}}{\text{mg de COT ajoutée dans l'essai} \times 3,67} \times 100$$

où 3,67 est le facteur de conversion (44/12) du carbone en dioxyde de carbone. On obtient le pourcentage de dégradation à un instant donné, en effectuant la somme des pourcentages de CO₂Th calculés pour chaque jour où des mesures ont été réalisées, pendant la période considérée.

27. Quand on utilise du NaOH comme absorbant, on calcule la quantité de CO₂ produite après un intervalle de temps déterminé à partir de la concentration en carbone inorganique et du volume d'absorbant employé.

On calcule le pourcentage de dégradation à partir de la formule :

$$\% \text{ de CO}_2\text{Th} = \frac{\text{mg de CI du récipient d'essai} - \text{mg de CI du témoin}}{\text{mg de COT ajoutée comme substance d'essai}} \times 100$$

28. Tracer la courbe de dégradation en fonction du temps et y indiquer l'intervalle de temps de dix jours. Calculer et mentionner dans le rapport le pourcentage de disparition atteint au niveau du plateau, à la fin de l'essai et/ou à la fin de l'intervalle de temps de dix jours, selon les cas.

29. S'il y a lieu, calculer l'élimination du COD en utilisant l'équation donnée dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 27).

30. Quand on utilise un témoin abiotique, on calcule le taux de dégradation abiotique à partir de la formule :

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{\text{CO}_2 \text{ produit par le flacon stérile après 28 jours (en mg)}}{\text{CO}_2\text{Th (en mg)}} \times 100$$

Critères de validité d'essai

31. La teneur en CI de la suspension d'essai en milieu minéral doit être inférieure à 5 % du carbone total au début de l'essai ; le dégagement de CO₂ total dans le témoin avec inoculum ne doit normalement pas dépasser 40 mg/l de milieu en fin d'essai. Si on obtient des valeurs supérieures à 70 mg/l de CO₂, on doit examiner les résultats et les méthodes expérimentales avec un esprit critique.

32. On applique également les autres critères de validité donnés dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 6).

Rapport d'essai

33. Le rapport d'essai doit contenir les renseignements décrits dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 7).

**ESSAI DE DÉGAGEMENT DE CO₂
FEUILLE DE RÉSULTATS**

1. LABORATOIRE :**2. DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI :****3. SUBSTANCE D'ESSAI :**

Nom :
 Concentration de la solution mère : mg/l de substance
 Concentration initiale dans le milieu : mg/l de substance
 C total ajouté dans le flacon : mg de C
 CO₂Th : mg de CO₂

4. INOCULUM :

Origine :
 Traitement :
 Préconditionnement éventuel :
 Concentration des matières en suspension
 dans le mélange réactionnel : mg/l

5. DÉGAGEMENT DE CO₂ ET DÉGRADABILITÉ :

Méthode : Ba(OH)₂ / NaOH / autre.

Temps (en jours)	CO ₂ produit (mg)					CO ₂ produit cumulé (mg) essai moyenne témoins	% CO ₂ Th CO ₂ cumulé x 100 CO ₂ Th				
	Substance d'essai		Témoin				Flac 1	Flac 2	Flac 1	Flac 2	Moy.
	Flac 1	Flac 2	Flac 3	Flac 4	Moy.						
0											
n ₁											
n ₂											
n ₃											
n ₄											
28											

Remarque : des tableaux similaires peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre les répliquats.

6. ANALYSE DU CARBONE (facultatif) :

Analyseur de carbone :

Temps (en jours)	Substance d'essai (mg/l)	Témoin (mg/l)
0	(C _o)	(C _{bl(0)})
28*	(C _t)	(C _{bl(t)})

* ou à la fin de l'incubation

$$\% \text{ de COD éliminé} = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_o - C_{bl(o)}} \right] \times 100$$

7. DÉGRADATION ABIOTIQUE (facultatif) :

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{CO_2 \text{ formé dans le flacon stérile après 28 jours (mg)}}{CO_2 Th (mg)} \times 100$$

301 C ESSAI DU MITI MODIFIÉ (I)**INTRODUCTION**

1. Les points d'intérêt général concernant l'évaluation de la biodégradabilité sont examinés dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » qu'il est conseillé de lire avant de commencer les expériences. Dans cette méthode, afin de calculer la DThO, on doit connaître la formule de la substance d'essai ainsi que son degré de pureté ou les proportions relatives des principaux composants. On peut effectuer cet essai sur des substances insolubles et volatiles à condition de prendre certaines précautions. Les substances insolubles doivent être dispersées, par exemple en utilisant des produits très finement broyés ou des ultrasons, mais on ne doit pas employer de solvants ou d'agents émulsifiants. Pour les substances volatiles, le volume gazeux « mort », dans le respiromètre automatique, doit être maintenu à un minimum.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2. La consommation d'oxygène d'une solution ou d'une suspension de la substance d'essai dans un milieu minéral, soumise à une agitation etensemencée avec des micro-organismes cultivés à cet effet sans adaptation préalable, est mesurée automatiquement pendant une période de 28 jours à une température de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, dans un respiromètre en circuit fermé maintenu à l'obscurité. Le dioxyde de carbone qui se dégage est absorbé par de la soude. La biodégradation est calculée à partir de la consommation d'oxygène (corrigée en fonction de la consommation dans l'essai témoin) exprimée en pourcentage de la consommation théorique (DThO). Le pourcentage de biodégradation primaire est également calculé à partir d'analyses chimiques spécifiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation, et la biodégradation ultime est éventuellement déterminée par l'analyse du COD.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Appareillage**

3. Matériel courant de laboratoire et :
- a) Appareil de mesure automatique de la DBO par électrolyse ou respiromètre normalement équipé de 6 flacons de 300 ml chacune, et de coupelles contenant l'absorbant de CO_2 ;
 - b) Pièce thermostatisée et/ou bain-marie à $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ maximum ;
 - c) Dispositif de filtration sur membrane (facultatif) ;
 - d) Analyseur de carbone (facultatif).

Eau

4. L'eau qui doit être utilisée est décrite dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » (paragraphe 15).

Solutions-mères pour le milieu minéral

5. Préparer les solutions-mères suivantes en utilisant des réactifs de qualité analytique.
- (a) Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 8,50 g
 Hydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4 21,75 g
 Hydrogénophosphate de sodium
 à 12 molécules d'eau, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 44,60 g
 Chlorure d'ammonium, NH_4Cl 1,70 g
- Dissoudre dans de l'eau et compléter la volume à 1 litre.
 Le pH de la solution doit être égal à 7,2.
- (b) Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g
- Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.
- (c) Chlorure de calcium anhydre, CaCl_2 27,50 g
- Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.
- (d) Chlorure de fer (III) hexahydraté, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
- Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.

Préparation du milieu minéral

6. Mélanger 3 ml de chacune des solutions (a), (b), (c) et (d) et compléter le volume à 1 litre.

Solutions-mères des substances d'essai

7. Si la solubilité de la substance dépasse 1g/l, dissoudre dans l'eau, selon les cas, de 1 à 10 g de la substance d'essai ou du produit de référence et compléter le volume à un litre. Sinon préparer les solutions mères dans du milieu minéral ou ajouter directement la substance dans le milieu minéral final. Pour la manipulation des substances peu solubles, voir le paragraphe 11.

Préparation de l'inoculum

8. Recueillir des échantillons frais dans dix sites au moins, principalement dans des zones où divers produits chimiques sont utilisés et rejetés. Prélever des échantillons d'un litre de boue, de sol superficiel, d'eau, etc., dans des endroits tels que des stations d'épuration des eaux d'égout ou des eaux usées industrielles, des rivières, des lacs, des mers et les mélanger soigneusement.

9. Après avoir enlevé les matières flottantes, laisser reposer, puis ajuster le pH du surnageant à 7 ± 1 au moyen d'hydroxyde de sodium ou d'acide phosphorique. Utiliser un volume du surnageant filtré suffisant pour remplir un récipient de traitement des boues activées et aérer le liquide pendant environ 23,5 heures. Trente minutes après avoir arrêté l'aération, retirer environ un tiers du volume total du surnageant et ajouter au milieu décanté un volume identique d'une solution (à pH 7) contenant 0,1 % de chacun des produits suivants : glucose, peptone et orthophosphate de potassium, puis reprendre l'aération. Répéter cette opération une fois par jour.

10. La fraction de boue doit être traitée conformément aux pratiques reconnues : l'effluent doit être clair ; la température doit être maintenue à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et le pH à 7 ± 1 ; la boue doit correctement décanter

; l'aération doit être suffisante pour que le mélange soit en permanence en aérobiose ; des protozoaires doivent être présents et l'activité de la boue doit être testée à l'aide d'une substance de référence au moins tous les trois mois. Ne pas utiliser la boue comme inoculum avant au moins un mois de traitement, ni après plus de quatre mois. Il convient donc d'effectuer des prélèvements d'échantillons périodiquement une fois tous les trois mois, en dix endroits différents au moins. Afin de conserver la même activité aux boues fraîches et anciennes, le liquide surnageant filtré d'une boue activée traitée doit être mélangé à un volume identique de liquide surnageant filtré d'une boue fraîchement recueillie provenant de dix sources différentes, puis le mélange est mis en culture comme décrit ci-avant. Prélever la boue pour l'utiliser comme inoculum 18 à 24 h après cette opération.

Préparation des flacons

11. Préparer les six flacons suivantes :

- | | |
|-------------------|--|
| Flacon 1 | - substance d'essai dans l'eau de dilution à 100 mg/l ; |
| Flacons 2, 3 et 4 | - substance d'essai dans le milieu minéral à 100 mg/l ; |
| Flacon 5 | - produit de référence (par ex. aniline) dans le milieu minéral à 100 mg/l ; |
| Flacon 6 | - milieu minéral seul. |

Pour les substances d'essai peu solubles, ajouter directement un poids ou un volume défini ou bien procéder comme indiqué dans l'annexe III, sans toutefois utiliser de solvant ou d'agent émulsifiant. Ajouter l'absorbant de CO₂ dans toutes les flacons, dans les coupelles spécialement prévues à cet effet. Avant l'ensemencement, ajuster si nécessaire le pH à 7 dans les flacons 2, 3 et 4.

EXÉCUTION DE LA MÉTHODE

12. Ensemencer les récipients 2, 3 et 4 (suspensions d'essai), 5 (témoin d'activité) et 6 (témoin contenant l'inoculum) avec un petit volume d'inoculum afin d'obtenir une concentration de matières en suspension de 30 mg/l. Ne pas ajouter d'inoculum dans la flacon 1 qui sert de témoin abiotique. Assembler le matériel, vérifier son étanchéité à l'air, démarrer les agitateurs et commencer à mesurer la consommation d'oxygène dans l'obscurité. Chaque jour, vérifier la température ainsi que le fonctionnement des agitateurs et de l'enregistreur coulométrique de la consommation d'oxygène et noter toute modification de couleur du contenu des récipients. Lire directement la consommation d'oxygène dans les six flacons avec une méthode appropriée, par exemple sur l'enregistreur à six points qui fournit une courbe de la DBO.

13. A la fin de l'incubation, dont la durée normale est de 28 jours, mesurer le pH du milieu contenu dans les flacons et déterminer la concentration résiduelle de la substance d'essai et de toute substance intermédiaire et, dans le cas des substances solubles dans l'eau, la concentration du COD (Annexe IV.4). Des précautions particulières doivent être prises avec les substances volatiles. Si un processus de nitrification est prévisible, déterminer, si possible, les concentrations en nitrates et nitrites.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

14. Les résultats de l'essai doivent être reportés sur la feuille de résultats jointe.

15. La quantité d'oxygène consommée (mg) par la substance d'essai (mg) après un temps donné, corrigée de la valeur correspondante dans le témoin contenant l'inoculum au bout du même laps de temps, est divisée par le poids de substance utilisé dans l'essai. Ceci donne la DBO exprimée en mg d'oxygène/mg de substance d'essai, c'est-à-dire,

$$DBO = \frac{\text{mg } O_2 \text{ consom. par la subst. d'essai} - \text{mg } O_2 \text{ consom. par le témoin}}{\text{mg de substance d'essai dans le récipient}} = \text{mg } O_2 / \text{mg de substance d'essai}$$

Le pourcentage de biodégradation est alors obtenu à partir de la formule :

$$\% \text{ biodégradation} = \% DThO = \frac{DBO (\text{mg } O_2 / \text{mg substance})}{DThO (\text{mg } O_2 / \text{mg substance})} \times 100$$

16. Pour les mélanges, calculer la DThO à partir de l'analyse élémentaire, comme pour composé simple. Choisir la DThO appropriée ($DThO_{NH_4}$ ou $DThO_{NO_3}$) selon que la nitrification est absente ou complète (Annexe IV.2). Cependant, si la nitrification se produit, mais de façon incomplète, il convient d'effectuer une correction pour tenir compte de la quantité d'oxygène consommée par nitrification calculée à partir des variations des concentrations en nitrites et en nitrates (Annexe V).

17. Calculer le pourcentage de biodégradation primaire à partir de la disparition de produit chimique spécifique (de départ) en utilisant l'équation donnée dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 7). S'il y a eu une perte de substance d'essai dans la bouteille 1, qui mesure l'élimination abiotique, le mentionner dans le rapport et utiliser pour le calcul du pourcentage de biodégradation la concentration en substance d'essai (S_b) dans cette bouteille au bout de 28 jours.

18. Si l'analyse du COD est réalisée (facultatif), calculer le pourcentage de biodégradation ultime à l'instant t, en utilisant l'équation donnée dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 27). S'il y a eu une diminution de COD dans la bouteille 1, qui mesure l'élimination abiotique, utiliser la concentration du COD dans ce récipient au bout de 28 jours pour calculer le pourcentage de biodégradation.

Validité des résultats

19. La consommation d'oxygène dans le témoin contenant l'inoculum est normalement comprise entre 20 et 30 mg O_2/l et ne doit pas dépasser 60 mg O_2/l en 28 jours. Des valeurs supérieures à 60 mg/l nécessitent un examen critique des données et des méthodes expérimentales. Si la valeur du pH se trouve en dehors de l'intervalle compris entre 6 et 8,5, et si la consommation d'oxygène par la substance à tester est inférieure à 60 %, l'essai peut être répété avec une concentration plus faible de substance d'essai.

20. Un essai est considéré comme valide si les valeurs extrêmes des mesures répétées de la disparition de la substance d'essai au niveau du plateau ou à la fin de l'essai, selon les cas, ne diffèrent pas de plus de 20 % et si le taux de dégradation de l'aniline calculé à partir de la consommation d'oxygène dépasse 40 % après sept jours et 65 % après 14 jours. Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'essai doit être recommencé. Des résultats peu élevés ne signifient pas nécessairement que la substance d'essai n'est pas biodégradable dans les conditions de l'environnement, mais ils indiquent que des études complémentaires seront nécessaires pour évaluer sa biodégradabilité.

Rapport d'essai

21. Le rapport d'essai doit contenir les informations décrites dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 7).

**ESSAI MITI MODIFIÉ (I)
FEUILLE DE RÉSULTATS****1. LABORATOIRE :****2. DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI :****3. SUBSTANCE D'ESSAI :**

Nom :
Concentration de la solution mère : mg/l de substance
Concentration initiale dans le milieu, C_0 : mg/l de substance
Volume du mélange réactionnel, V : ml
DThO : mg O₂/l

4. INOCULUM :

Lieux de prélèvement de la boue :

1.	6.
2.	7.
3.	8.
4.	9.
5.	10.

Concentration des matières en suspension dans la boue activée après acclimatation avec une eau d'égout synthétique : mg/l

Volume de boue ajouté par litre de milieu final : ml

Concentration de la boue dans le milieu final : mg/l

5. CONSOMMATION D'OXYGÈNE : BIODÉGRADABILITÉ

Type de respiromètre utilisé :

	Temps (en jours)			
	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Consommation de O ₂ par la substance d'essai (mg) : a1 a2 a3				
Consommation de O ₂ dans le témoin (mg) : b				
Consommation de O ₂ corrigée (mg) : a1-b a2-b a3-b				
DBO (mgO ₂ /mg de substance d'essai) : (a1-b)/C ₀ V (a2-b)/C ₀ V (a3-b)/C ₀ V				
% dégradation DBO/ODTh x 100 : 1 2 3 moyenne*				

Remarque : Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour le produit de référence.

* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre les répliqués.

6. ANALYSE DU CARBONE (facultatif) :

Analyseur de carbone :

Récipient	COD			%COD disparu	Moy.
	Mesuré	Corrigé			
Eau + substance d'essai	a			-	-
Boue + substance d'essai	b1		b1-c		
Boue + substance d'essai	b2		b2-c		
Boue + substance d'essai	b3		b3-c		
Témoin	c		-	-	-

$$\% \text{ COD disparu} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. ANALYSE CHIMIQUE SPÉCIFIQUE :

	Quantité résiduelle de substance d'essai à la fin de l'essai	% dégradation primaire
Témoin avec l'eau	Sb	
Milieuensemencé	Sa1 Sa2 Sa3	

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{Sb - Sa}{Sb} \times 100$$

Calculer le % de dégradation primaire pour les flacons a1, a2 et a3 respectivement.

8. REMARQUES :

La courbe de la DBO en fonction du temps doit être jointe, si elle est disponible.

301 D ESSAI EN FLACON FERMÉ**INTRODUCTION**

1. Les points d'intérêt général concernant l'évaluation de la biodégradabilité sont examinés dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » qu'il est conseillé de lire avant de commencer les expériences. Pour cette méthode, afin de calculer la DThO, on doit connaître la formule de la substance et son degré de pureté ou les proportions relatives des principaux composants. Si on ne peut pas calculer la DThO, on doit déterminer la DCO, mais dans ce cas, si la substance d'essai n'est pas complètement oxydée, il se peut qu'on obtienne des valeurs faussement élevées pour le taux de biodégradation. On peut tester les substances insolubles et volatiles à condition de prendre certaines précautions. Pour les substances insolubles, les valeurs de dégradation peuvent s'avérer faussement faibles si les flacons ne sont pas agités périodiquement durant l'incubation.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2. La solution de la substance d'essai en milieu minéral, généralement d'une concentration de 2 à 5 mg/l, estensemencée avec un nombre relativement faible de micro-organismes provenant d'une population hétérogène et est conservée dans des flacons fermés, complètement remplis, dans l'obscurité et à température constante. La dégradation est suivie grâce à l'analyse de l'oxygène dissous pendant une période de 28 jours. La quantité d'oxygène consommée par la population microbienne lors de la biodégradation de la substance d'essai, corrigée de la quantité d'oxygène consommée par le témoin contenant l'inoculum mené en parallèle est exprimée sous forme de pourcentage de la DThO ou ce qui est moins satisfaisant de la DCO.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Appareillage**

3. Matériel courant de laboratoire et :

- a) Des flacons pour l'analyse de la DBO, munis de bouchons de verre, et d'un volume de 250 à 300 ml ou de 100 à 125 ml, par exemple.

Il est important de nettoyer soigneusement les flacons avant usage. Si on utilise la méthode Winkler pour le dosage de l'oxygène dissous, il suffit de rincer plusieurs fois les récipients à l'eau du robinet puis à l'eau déminéralisée. Cependant, si c'est la méthode à l'électrode qui est utilisée, un nettoyage plus poussé sera nécessaire ; verser dans le flacon vide 5 à 10 ml d'une solution de lavage (par exemple, 2,5 g d'iode plus 12,5 g d'iodure de potassium par litre d'acide sulfurique à 1% (poids/volume) et bien secouer pour recouvrir les parois du flacon. Laisser agir 15 min, vider la solution et rincer soigneusement avec de l'eau du robinet puis avec de l'eau déminéralisée.

- b) Un bain-marie ou un incubateur pour conserver les bouteilles à température constante (à $\pm 1^\circ\text{C}$ au maximum), à l'abri de la lumière.
- c) De grands récipients en verre (2 à 5 litres) pour la préparation des milieux et pour le remplissage des flacons à DBO ;

- d) Une électrode à oxygène couplée à un appareil de mesure, ou l'équipement et les réactifs nécessaires à la méthode de titration de Winkler.

Eau

4. L'eau qui doit être utilisée est décrite dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » (paragraphe 15).

Solutions-mère pour le milieu minéral

5. Préparer les solutions-mères suivantes en utilisant des réactifs de qualité analytique :

(a)	Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4	21,75 g
	Hydrogénophosphate de sodium dihydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,40 g
	Chlorure d'ammonium, NH_4Cl	0,50 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.

Le pH de la solution doit être égale à 7,4.

(b)	Chlorure de calcium anhydre, CaCl_2	27,50 g
	<u>ou</u> chlorure de calcium dihydraté, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,40 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.

(c)	Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
-----	--	---------

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.

(d)	Chlorure de fer (III) hexahydraté, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
-----	--	--------

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre.

Remarque : Pour éviter d'avoir à préparer cette solution juste avant usage, ajouter une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g par litre d'acide éthylènediamine-tétraacétique (sel disodique de l'EDTA).

S'il se forme un précipité dans une solution-mère, la remplacer par une solution fraîchement préparée.

Préparation du milieu minéral

6. Mélanger 1 ml des solutions (a), (b), (c) et (d) avec 800ml d'eau et compléter le volume à 1 litre.

Solutions-mères des substances d'essai

7. Si la solubilité de la substance dépasse 1g/l, dissoudre dans l'eau, selon les cas, de 1 à 10 g de la substance d'essai ou du produit de référence et compléter le volume à un litre. Sinon préparer les solutions mères dans du milieu minéral ou ajouter directement la substance dans le milieu minéral final en s'assurant qu'elle se dissout bien.

Inoculum

8. Normalement, l'inoculum provient de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire recevant principalement des eaux ménagères. Prélever et manipuler cet inoculum selon les recommandations de la Ligne directrice 301 A (paragraphe 14). On utilise normalement entre une goutte (0,05 ml) et 5 ml de filtrat par litre de milieu ; des essais peuvent s'avérer nécessaires pour déterminer le volume optimum pour effluent donné.

9. L'eau de surface est une autre source d'inoculum. Dans ce cas, prélever un échantillon d'une eau de surface appropriée, par exemple eau de rivière ou de lac, et la conserver en aérobiose jusqu'au moment de son utilisation. Comme pour les effluents, il peut s'avérer nécessaire de déterminer par des essais le volume optimal d'inoculum à utiliser.

Préconditionnement de l'inoculum

10. Si nécessaire, l'inoculum peut être preconditionné par aération de l'effluent secondaire, sans autre traitement ou ajout, pendant 5 à 7 jours à la température de l'essai.

Préparation des récipients

11. Aérer fortement le milieu minéral pendant au moins 20 minutes puis le laisser reposer. Le milieu est généralement prêt à l'emploi après être resté pendant 20 h à la température de l'essai. Chaque série d'essais doit être effectuée avec du milieu minéral provenant d'un lot unique. Contrôler la concentration de l'oxygène dissous ; celle-ci doit être voisine de 9 mg/l à 20°C. Effectuer toutes les opérations de transfert et de remplissage avec le milieu saturé d'air en évitant la formation de bulles, par exemple à l'aide de siphons.

12. Préparer en parallèle des séries de flacons pour la détermination simultanée de la DBO des substances d'essai et de référence. Réunir un nombre suffisant de flacons à DBO, y compris des flacons pour les témoins contenant l'inoculum, afin de pouvoir effectuer au moins en double les mesures de la consommation d'oxygène aux intervalles de temps souhaités, par exemple après 0, 7, 14, 21 et 28 jours. Un plus grand nombre de flacons peut être nécessaire pour être sûr de pouvoir identifier l'intervalle de temps de dix jours.

13. Verser le milieu minéral parfaitement aéré dans de grands récipients de manière à les remplir à peu près au tiers. Ajouter ensuite dans de grands récipients distincts (ou par d'autres moyens, voir l'Annexe III) des quantités de solutions mères des substances d'essai et de référence telles que la concentration finale ne dépasse pas normalement 10 mg/l (voir paragraphe 14 ci-dessous). Ne pas ajouter de produits chimiques dans le milieu d'essai du témoin contenu dans un autre grand récipient.

14. Pour s'assurer que l'activité de l'inoculum n'est pas limitée, la concentration d'oxygène dissous ne doit pas descendre en dessous de 0,5 mg/l dans les flacons à DBO. Ceci limite la concentration de la substance d'essai en général à environ 2 mg/l. La DThO de la substance d'essai (en mg O₂/mg de produit) permet de se faire une idée de la concentration la plus élevée à utiliser. Pour les composés peu dégradables et pour ceux qui ont une DThO faible, on peut utiliser une concentration de 5 à 10 mg/l. Dans certains cas, il serait préférable d'effectuer des séries d'essais en parallèle avec deux concentrations différentes de la substance d'essai, par exemple, 2 et 5 mg/l. La DThO est normalement calculée à partir de la formation de sels d'ammonium, mais, si l'on suppose ou si l'on est sûr qu'une nitrification va avoir lieu, il convient de calculer la DThO_{N03} en se basant sur la formation de nitrate (voir Annexe IV.2). Toutefois, si une nitrification se produit, mais sans être complète, il faut effectuer une correction tenant compte des modifications de la concentration en nitrite et en nitrate déterminées par analyse (voir l'Annexe V).

15. Si la toxicité du produit à tester doit être recherchée (dans le cas, par exemple, où on a trouvé au préalable une valeur faible pour la biodégradabilité), une autre série de flacons est nécessaire. Préparer un autre grand récipient contenant du milieu minéral aéré (jusqu'à environ un tiers de son volume) et ajouter la substance d'essai et le composé de référence en quantités telles que leurs concentrations finales soient normalement identiques à celles des autres grands récipients.

16. Ensemencer les solutions contenues dans les grands récipients avec un effluent secondaire (une goutte, soit environ 0,05 ml, à 5 ml/l, voir le paragraphe 8) ou avec un inoculum provenant d'une autre source, comme de l'eau de rivière (voir le paragraphe 9). Enfin, compléter le volume des solutions avec du milieu minéral aéré, à l'aide d'un tuyau touchant le fond du flacon pour permettre un mélange adéquat.

Nombre de flacons

17. Dans un essai type, on utilise :

- au moins dix flacons contenant la substance d'essai et l'inoculum (suspension d'essai) ;
- au moins dix flacons contenant seulement l'inoculum (témoin avec l'inoculum) ;
- au moins dix flacons contenant le produit de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure) ; et, si nécessaire,
- 6 flacons contenant la substance d'essai, le produit de référence et l'inoculum (témoin de toxicité).

Néanmoins, pour être certain de pouvoir identifier l'intervalle de temps de dix jours, il faudrait environ deux fois plus de flacons.

EXÉCUTION DE LA MÉTHODE

18. Transférer immédiatement chacune des solutions ou suspensions préparées dans la série correspondante de flacons à DBO à l'aide d'un tuyau plongeant aux trois quarts (pas jusqu'au fond) du grand récipient approprié, de telle sorte que tous les flacons à DBO soient complètement remplis. Lors des essais avec des substances peu solubles, ajoutées selon les méthodes décrites dans l'annexe III, s'assurer que le contenu des grands flacons est parfaitement mélangé par agitation. Tapoter doucement pour éliminer toutes les bulles d'air.

19. L'oxygène dissous est dosé immédiatement dans les flacons au temps 0, à l'aide de la méthode de Winkler ou de celle à électrode. Le contenu des flacons peut être conservé en vue d'une analyse ultérieure par la méthode de Winkler, si on ajoute du sulfate de manganèse (II) et de l'hydroxyde de sodium (le premier réactif de la méthode de Winkler). Les flacons soigneusement bouchés, dont l'oxygène est fixé sous forme d'oxyde hydraté de manganèse (III) brun, sont conservés dans l'obscurité à une température de 10 à 20°C pendant une période ne dépassant pas 24 h avant que l'on ne procède aux étapes suivantes de la méthode de Winkler. Fermer les autres flacons préparés en parallèle en s'assurant qu'ils ne contiennent pas de bulles d'air et les incubent à 20°C dans l'obscurité.

20. Chaque série doit être accompagnée d'une série complète en parallèle pour le dosage du milieu témoin ensemencé. Au cours de la période d'incubation de 28 jours, retirer régulièrement (au minimum une fois par semaine) au moins deux flacons identiques dans chaque série afin d'analyser l'oxygène dissous. Des prélèvements d'échantillons hebdomadaires permettent de déterminer le pourcentage de disparition pendant un intervalle de temps de 14 jours, alors que les prélèvements effectués tous les 3 ou 4 jours, qui nécessitent environ deux fois plus de flacons, permettent d'identifier l'intervalle de dix jours.

21. Pour les substances d'essai qui contiennent de l'azote, il convient d'effectuer une correction pour

tenir compte de la consommation d'oxygène due à une éventuelle nitrification. Pour cela, déterminer la concentration d'oxygène dissous à l'aide de la méthode à l'électrode à O₂, puis analyser la teneur en nitrites et en nitrates d'un échantillon prélevé dans le flacon à DBO. A partir de l'augmentation de la concentration des nitrites et des nitrates, calculer la quantité d'oxygène utilisée (voir l'Annexe V).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

22. Les résultats de l'essai doivent être reportés sur la feuille de résultats jointe.

23. En premier lieu, calculer la DBO après chaque période, en soustrayant la perte d'oxygène (mg O₂/l) dans le témoin contenant l'inoculum, de celle que l'on observe avec la substance à tester. Diviser cette perte d'oxygène corrigée, par la concentration (mg/l) de la substance d'essai, afin d'obtenir la DBO spécifique exprimée en mg d'oxygène par mg de substance d'essai. Calculer le pourcentage de biodégradation en divisant la DBO spécifique par la DThO spécifique (calculée selon les indications données à l'Annexe IV.2) ou par la DCO (déterminée par analyse, voir l'Annexe IV.3). Ainsi :

$$DBO = \frac{O_2 \text{ cons. par la subst. d'essai (mg/l)} - O_2 \text{ cons. par le témoin (mg/l)}}{\text{substance d'essai (mg/l)}} = \text{mg } O_2 / \text{mg subst}$$

$$\% \text{ dégradation} = \frac{DBO (\text{mg } O_2 / \text{mg substance d'essai})}{DThO (\text{mg } O_2 / \text{mg substance d'essai})} \times 100$$

or

$$\% \text{ dégradation} = \frac{DBO (\text{mg } O_2 / \text{mg substance d'essai})}{DCO (\text{mg } O_2 / \text{mg substance d'essai})} \times 100$$

Il faut noter que ces deux méthodes ne donnent pas nécessairement la même valeur ; il est préférable d'utiliser la première.

24. Pour les substances d'essai qui contiennent de l'azote, il convient d'utiliser la DThO appropriée (NH₄ ou NO₃) en fonction des connaissances ou des prévisions concernant les possibilités de nitrification (Annexe IV.2). Si une nitrification se produit, mais de façon incomplète, il convient d'effectuer une correction pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à la nitrification, calculée à partir des modifications de la concentration en nitrites et en nitrates au cours des 28 jours de l'essai (Annexe V).

Validité des résultats

25. La perte d'oxygène dans le témoin contenant l'inoculum ne doit pas dépasser 1.5 mg par litre d'oxygène dissous après 28 jours. Des valeurs supérieures nécessitent une vérification des méthodes expérimentales. La concentration résiduelle d'oxygène dans les flacons d'essai ne doit à aucun moment tomber en dessous de 0,5 mg/l. Une teneur en oxygène aussi basse n'est acceptable que si la méthode utilisée pour mesurer l'oxygène dissous est capable de déterminer de telles concentrations avec précision.

26. Les autres critères de validité donnés dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 7) s'appliquent également.

Rapport d'essai

27. Le rapport d'essai doit contenir les renseignements décrits dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 8).

**ESSAI EN FLACON FERMÉ
FEUILLE DE RÉSULTATS**

1. LABORATOIRE :**2. DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI :****3. SUBSTANCE D'ESSAI :**

Nom :

Concentration de la solution mère : mg/l

Concentration initiale dans le flacon : mg/l

DThO ou DCO : mg O₂/mg substance d'essai**4. INOCULUM :**

Origine :

Traitement :

Préconditionnement éventuel :

Concentration dans le mélange réactionnel : mg/l

5. DÉTERMINATION DE L'OXYGÈNE DISSOUS (OD) :

Méthode : Winkler/électrode

	Flacon no.		mg O ₂ /l après n jours			
			0	n ₁	n ₂	n _x
Témoin - avec inoculum mais sans substance d'essai	1	c ₁				
	2	c ₂				
	Moy. blanc	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$				
Substance d'essai plus inoculum	1	a ₁				
	2	a ₂				

Remarque : Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. CORRECTION POUR LA NITRIFICATION (voir l'Annexe V)

	Temps d'incubation (j)				
	0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
(i) Concentration en nitrate (mg N/l)					
(ii) Modification de la concentration en nitrate (mg N/l)	-				
(iii) Equivalent oxygène (mg/l)	-				
(iv) Concentration en nitrite (mg N/l)					
(v) Modification de la concentration en nitrite (mg/l)	-				
(vi) Equivalent oxygène (mg/l)	-				
(iii+vi) Equivalent oxygène total (mg/l)	-				

7. PERTE D'OD : % DE DÉGRADATION (% D) :

	Perte d'OD après n jours (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
$(m_b - a_1)^t$				
$(m_b - a_2)^t$				
$\% Da_1 = \frac{(m_b - a_1)^t}{\text{substance d'essai (mg/l)} \times DThO} \times 100$				
$\% Da_2 = \frac{(m_b - a_2)^t}{\text{substance d'essai (mg/l)} \times DThO} \times 100$				
$\% D_{moy.}^* = \frac{Da_1 + Da_2}{2}$				

* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre les réplicats.

¹ Ceci suppose que $m_{b(0)} = a_{1(0)} = a_{2(0)}$, avec

$m_{b(0)}$ = valeur du témoin au jour 0

$a_{1(0)}$ = valeur dans le flacon d'essai 1 au jour 0 ;

$a_{2(0)}$ = valeur dans le flacon d'essai 2 au jour 0 ;

Si $m_{b(0)}$ n'est pas égal à $a_{1(0)}$ ou $a_{2(0)}$, utiliser

$(a_{1(0)} - a_{1(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$ et $(a_{2(0)} - a_{2(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$, avec

$m_{b(x)}$ = valeur moyenne du témoin au jour x

$a_{1(x)}$ = valeur dans le flacon d'essai 1 au jour x

$a_{2(x)}$ = valeur dans le flacon d'essai 2 au jour x

8. PERTES D'OD DANS LE BLANC :

La quantité d'oxygène consommée par le témoin (mg/l) est égale à $m_{b(0)} - m_{b(28)}$ mg/l.
Cette consommation est importante pour la validité de l'essai et elle doit être inférieure à 1,5 mg/l.

Appliquer éventuellement la correction pour la nitrification mentionnée aux points (iii+iv) de la section 5.

301 E ESSAI DE « SCREENING » MODIFIÉ DE L'OCDE**INTRODUCTION**

1. Les points d'intérêt général concernant l'évaluation de la biodégradabilité sont examinés dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » qu'il est conseillé de lire avant de commencer les expériences. Pour cette méthode, la substance d'essai doit être non volatile et sa solubilité dans l'eau doit être supérieure ou égale à 100 mg/l. On doit également connaître la teneur en carbone et, si possible, le degré de pureté ou les proportions relatives des principaux composants. Cette méthode ressemble à l'essai de diminution du COD (301 A), mais elle utilise une concentration relativement faible de micro-organismes.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2. Un volume mesuré de milieu minéral, contenant une concentration connue de substance à tester (10 à 40 mg/l de COD) comme unique source nominale de carbone organique, estensemencé avec 0,5 ml d'effluent par litre de milieu. Le mélange est aéré dans l'obscurité ou sous lumière diffuse, à $22 \pm 2^\circ\text{C}$. La dégradation est suivie en analysant le COD à des intervalles de temps fréquents pendant une durée de 28 jours. Le taux de biodégradation est calculé en exprimant la concentration de COD disparu (corrigée de la valeur observée dans le témoin contenant l'inoculum) en pourcentage de la concentration initiale. La biodégradation primaire peut également être calculée à partir de l'analyse chimique de la substance d'essai réalisé au début et à la fin de l'incubation.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Appareillage**

3. Matériel courant de laboratoire et :
- a) Des flacons coniques d'une contenance comprise, par exemple, entre 250 ml et 2 litres, selon le volume requis pour l'analyse du COD (les récipients doivent être soigneusement nettoyés avec, par exemple, de l'acide chlorhydrique alcoolique, puis rincés et séchés avant chaque essai) ;
 - b) Un dispositif d'agitation - adapté aux flacons coniques, soit muni d'un système automatique de contrôle de la température, soit placé dans une pièce à température constante, et suffisamment puissant pour maintenir des conditions aérobies dans tous les récipients ;
 - c) Un dispositif de filtration équipé des membranes adéquates ;
 - d) Un analyseur de COD ;
 - e) Un appareil de mesure de l'oxygène dissous, afin de vérifier que les contenus des flacons sont dans des conditions aérobies ;
 - f) Une centrifugeuse.

Eau

4. L'eau qui doit être utilisée est décrite dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » (paragraphe 15).

Solutions-mères pour le milieu minéral

5. Préparer les mêmes solutions mères que dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 5).

Préparation du milieu minéral

6. Préparer le milieu minéral comme décrit dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 6). L'essai de « screening » de l'OCDE utilise un volume d'inoculum de seulement 0,5 ml/l d'effluent et c'est pourquoi il peut être nécessaire de fortifier le milieu avec des oligo-éléments et des facteurs de croissance. On ajoute pour cela 1 ml de chacune des solutions ci-après par litre de milieu final :

(i) Solution d'oligo-éléments :

Sulfate de manganèse à 4 molécules d'eau, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	39,9 mg
Acide borique, H_3BO_3	57,2 mg
Sulfate de zinc à 7 molécules d'eau, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	42,8 mg
Heptamolybdate d'ammonium, $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fer chélate ($FeCl_3$ -acide éthylènediamine-tétracétique).....	100,0 mg

Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau

(ii) Solution de vitamines :

Extrait de levure	15,0 mg
-------------------------	---------

Dissoudre l'extrait de levure dans 100 ml d'eau. Stériliser par filtration sur membrane de 0,2 μm ou préparer la solution immédiatement avant utilisation.

Solutions mères des substances d'essai

7. Les préparer comme décrit dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 7).

Inoculum

8. L'inoculum provient de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire recevant principalement des eaux ménagères ; il doit être préparé de la même façon que dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 14). Utiliser 0,5 ml de filtrat par litre de milieu minéral.

Préconditionnement de l'inoculum

9. Si nécessaire, l'inoculum peut être préconditionné selon la méthode décrite dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 16).

Préparation des flacons

10. Verser par exemple 800 ml de milieu minéral dans des flacons coniques de 2 litres, puis ajouter dans des flacons différentes un volume suffisant de solutions mères de substances d'essai et de substance

référence, afin d'obtenir une concentration représentant l'équivalent chimique de 10 à 40 mg/l de COD. Vérifier la valeur du pH et l'ajuster, si besoin est, à 7,4. Ensemencer les flacons avec l'effluent à raison de 0,5 ml/l de milieu. Préparer également des témoins constitués de milieu minéral contenant l'inoculum, mais sans substance d'essai ni substance de référence (voir paragraphe 13).

11. On peut également, si nécessaire, réaliser des témoins pour la toxicité, la dégradation abiotique et l'adsorption, en suivant les méthodes décrites dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 18 à 20).

12. Dans tous les récipients, compléter le volume à 1 litre avec du milieu minéral, et après avoir mélangé, prélever un échantillon dans chaque flacon afin de déterminer en double la concentration initiale de COD (voir l'Annexe IV.4). Couvrir l'ouverture des flacons, par exemple avec un feuille d'aluminium, de telle sorte que les échanges gazeux puissent s'effectuer librement entre la flacon et l'atmosphère environnante. Pour démarrer l'essai, placer les récipients dans le dispositif d'agitation.

Nombre de récipients

13. Dans un essai type, on utilise le même nombre de flacons que dans la Ligne directrice 301 A, c'est-à-dire :

- | | | |
|----------------|---|--|
| Flacons 1 et 2 | - | contiennent la substance d'essai et l'inoculum (suspension d'essai) ; |
| Flacons 3 et 4 | - | ne contiennent que l'inoculum (témoin inoculum) ; |
| Flacon 5 | - | contient le produit de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure) ; et de préférence, si nécessaire, également ; |
| Flacon 6 | - | contient la substance d'essai et l'agent stérilisant (témoin stérile abiotique) ; |
| Flacon 7 | - | contient la substance d'essai, l'inoculum et l'agent stérilisant (témoin d'adsorption) ; |
| Flacon 8 | - | contient la substance d'essai, le composé de référence et l'inoculum (témoin de toxicité). |

EXÉCUTION DE LA MÉTHODE

Dosages du COD

14. Se reporter à la Ligne directrice 301 A (paragraphe 23).

Prélèvement

15. Se reporter à la Ligne directrice 301 A (paragraphe 24).

Fréquence des prélèvements

16. Se reporter à la Ligne directrice 301 A (paragraphe 25).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

17. Les résultats de l'essai doivent être reportés sur la feuille de résultats jointe.

18. Calculer le pourcentage de dégradation (D_t) pour chaque échantillon analysé en utilisant l'équation donnée dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 27).

19. Tracer sur un graphique la courbe d'évolution de la dégradation en fonction du temps et indiquer l'intervalle de temps de dix jours. Calculer et mentionner dans le rapport le pourcentage d'élimination atteint au niveau du plateau, à la fin de l'essai et/ou à la fin de l'intervalle de temps de dix jours, selon les cas.

20. Quand on dispose de données d'analyse chimique spécifique, on calcule la biodégradation primaire en utilisant l'équation donnée dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 7).

Validité des résultats

21. Un essai est considéré comme valide si les critères donnés dans le chapitre « Résultats et Rapport » sont respectés (p. 7).

Rapport d'essai

22. Le rapport d'essai doit comprendre les renseignements décrits dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 8).

**ESSAI DE « SCREENING » MODIFIÉ DE L'OCDE
FEUILLE DE RÉSULTATS**

1. LABORATOIRE :**2. DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI :****3. SUBSTANCE D'ESSAI :**

Nom :

Concentration de la solution mère:

mg/l de substance

Concentration initiale dans le milieu:

mg/l de substance

4. INOCULUM :

Origine de l'effluent

Traitement :

Préconditionnement éventuel :

Concentration de l'effluent dans le mélange réactionnel : mg/l

5. DOSAGES DU CARBONE :

Analyseur de carbone :

	Flacon no.		COD après n jours (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Substance d'essai plus inoculum	1	a ₁					
		a ₂					
		moyenne, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		moyenne, C _{b(t)}					
Témoin, avec inoculum sans substance d'essai	3	c ₁					
		c ₂					
		moyenne, C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		moyenne, C _{d(t)}					
	mean, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES :

Flacon no.	Calcul des résultats	% de dégradation après n jours				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left[1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}} \right] \times 100$	0				
2	$D_2 = \left[1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}} \right] \times 100$	0				
Moy. (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

* On ne doit pas faire la moyenne de D₁ et D₂ s'il existe une grande différence entre ces deux valeurs.

Remarque : Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

7. DÉGRADATION ABIOTIQUE (facultatif) :

	Temps (en jours)	
	0	t
Concentration de COD (en mg/l) dans le témoin stérile	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ dégradation abiotique} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ANALYSE CHIMIQUE SPÉCIFIQUE (facultatif) :

	Quantité résiduelle de la substance primaire étudiée, à la fin de l'essai	% de dégradation
Témoin stérile	S_b	
Milieu d'essaiensemencé	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

301 F ESSAI DE RESPIROMÉTRIE MANOMÉTRIQUE**INTRODUCTION**

1. Les points d'intérêt général concernant l'évaluation de la biodégradabilité sont examinés dans le chapitre « Procédures Générales et Préparation » qu'il est conseillé de lire avant de commencer les expériences. Pour cette méthode, afin de calculer la DThO, on doit connaître la formule de la substance d'essai ainsi que son degré de pureté ou les proportions relatives des principaux composants. Si on ne peut pas calculer la DThO, on doit déterminer la DCO, mais dans ce cas, si la substance d'essai n'est pas complètement oxydée, il se peut qu'on obtienne des valeurs faussement élevées pour le taux de biodégradation. On peut tester les substances insolubles et volatiles à condition de prendre certaines précautions.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2. Un volume mesuré de milieu minéralensemencé, contenant une concentration connue de substance d'essai (100 mg/l de substance d'essai, donnant une DThO d'au moins 50 à 100 mg/l) comme unique source nominale de carbone organique, est soumis à une agitation dans une flacon fermée à température constante ($\pm 1^{\circ}\text{C}$ au maximum) pendant une durée maximale de 28 jours. La consommation d'oxygène est déterminée soit en mesurant la quantité d'oxygène (produit par électrolyse) nécessaire pour maintenir un volume gazeux constant dans la flacon respirométrique, soit en se basant sur les modifications de volume ou de pression (ou sur une combinaison des deux) dans l'appareil. Le dioxyde de carbone qui se dégage est absorbé par une solution d'hydroxyde de potassium ou par un autre absorbant approprié. La quantité d'oxygène consommée par la population microbienne lors de la biodégradation de la substance d'essai (corrigée de la quantité d'oxygène consommée par le témoin contenant l'inoculum, mené en parallèle) est exprimée sous forme de pourcentage de la DThO ou, ce qui est moins satisfaisant, de la DCO. On peut également, de façon facultative, calculer la biodégradation primaire à partir d'analyses chimiques spécifiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation, ainsi que la biodégradation ultime par l'analyse du COD.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Appareillage**

3. Matériel courant de laboratoire et :
- a) Respiromètre approprié ;
 - b) Dispositif de régulation de la température d'une précision de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ au moins ;
 - c) Dispositif de filtration sur membrane (facultatif) ;
 - d) Analyseur de carbone (facultatif).

Eau

4. L'eau à utiliser est décrite dans le chapitre « Procédures Générales et Préparations » (paragraphe 15).

Solutions mères pour le milieu minéral

5. Préparer les mêmes solutions mères que celles qui sont décrites dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 5).

Préparation du milieu minéral

6. Se reporter à la Ligne directrice 301 A (paragraphe 6).

Solutions mères des substances d'essai

7. Les préparer et agir selon les prescriptions de la Ligne directrice 301 A (paragraphe 7). Pour la manipulation des substances peu solubles, se référer à l'Annexe III.

Inoculum

8. L'inoculum peut provenir de différentes sources : boue activée ; effluents ; eaux de surface et sols; ou un mélange de celles-ci comme décrit dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 9 à 15).

Préconditionnement des inocula

9. Les inocula peuvent être préconditionnés aux conditions expérimentales, selon la méthode décrite dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 16).

Préparation des flacons

10. A partir des solutions mères, préparer différents lots de solutions des substances d'essai et de référence dans du milieu minéral, normalement à une concentration de 100 mg/l (ce qui donne une DThO comprise entre 50 et 100 mg/l). Calculer la DThO à partir de la formation de sels d'ammonium, à moins qu'un processus de nitrification ne soit prévisible, auquel cas le calcul reposera sur la formation de nitrates (voir l'Annexe IV.2). Mesurer la valeur du pH et, si nécessaire, l'ajuster à $7,4 \pm 0,2$. Les substances peu solubles doivent être ajoutées à un stade ultérieur (paragraphe 13).

11. Si on doit déterminer la toxicité de la substance à tester, préparer une solution supplémentaire dans le milieu minéral, contenant à la fois les substances d'essai et de référence à des concentrations identiques à celles des solutions ne contenant que l'un de ces produits.

12. Si on doit mesurer une dégradation abiotique éventuelle, préparer une solution de la substance d'essai, correspondant normalement à 100 mg/l de DThO, stérilisée par ajout d'une quantité appropriée de substance toxique.

13. Introduire le volume requis des solutions d'essai et de référence, respectivement dans au moins deux flacons pour respiromètre. Dans d'autres récipients, ajouter seulement le milieu minéral (pour les témoins avec inoculum) et, si nécessaire, une solution du mélange substance d'essai/substance de référence et la solution stérile. Si la substance d'essai est peu soluble, en ajouter un poids ou un volume déterminé,

directement à ce stade, ou suivre la procédure décrite à l'Annexe III. Dans les compartiments d'absorption du CO₂, ajouter de l'hydroxyde de potassium, ou un autre absorbant.

Nombre de récipients

14. Dans un essai type, on utilise le nombre de flacons suivant:

- Flacons 1 et 2 - contiennent la substance d'essai et l'inoculum (suspension d'essai) ;
- Flacons 3 et 4 - ne contiennent que l'inoculum (témoin inoculum) ;
- Flacon 5 - contient le produit de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure) ; et de préférence, si nécessaire, également :
- Flacon 6 - contient la substance d'essai et l'agent stérilisant (témoin stérile abiotique) ;
- Flacon 7 - contient la substance d'essai, le produit de référence et l'inoculum (témoin de toxicité).

EXÉCUTION DE LA MÉTHODE

15. Laisser les récipients atteindre la température souhaitée et ensemer les récipients appropriés avec les boues activées préparées au préalable ou avec un inoculum provenant d'une autre source, afin d'obtenir une concentration de matières en suspension ne dépassant pas 30 mg/l. Assembler le matériel, mettre l'agitateur en marche, vérifier l'étanchéité à l'air et commencer à mesurer la consommation d'oxygène. Le déroulement de l'essai ne nécessite habituellement aucune attention particulière en dehors des lectures nécessaires et des vérifications quotidiennes permettant de s'assurer que la température et l'agitation appropriées sont maintenues.

16. Quand on utilise un respiromètre automatique, on obtient un enregistrement en continu de la consommation d'oxygène, ce qui permet d'identifier facilement l'intervalle de temps de dix jours. Pour les respiromètres non automatiques, on doit faire des lectures quotidiennes.

17. Calculer la consommation d'oxygène à partir des lectures effectuées à intervalles réguliers et rapprochés, en suivant les méthodes préconisées par le fabricant de l'appareil. A la fin de l'incubation, normalement de 28 jours, mesurer le pH du contenu des récipients, en particulier si les consommations d'oxygène sont faibles ou supérieures à la DTh_{ONH_4} , pour les produits azotés.

18. Si nécessaire, prélever des échantillons dans les flacons du respiromètre, au début et à la fin de l'essai, afin d'analyser le COD et/ou un produit spécifique (voir l'Annexe IV.4). Lors du premier prélèvement, déterminer le volume de suspension d'essai restant dans le flacon. Si l'oxygène est consommé par une substance d'essai azotée, déterminer l'augmentation de la concentration en nitrites et en nitrates au cours des 28 jours, et évaluer la correction à effectuer pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à la nitrification (Annexe V).

RÉSULTATS ET RAPPORT**Traitement des résultats**

19. Les résultats de l'essai doivent être reportés sur la feuille de résultats jointe.
20. En premier lieu calculer la DBO (mg O₂ / mg de substance d'essai) après une période donnée, en divisant la consommation d'oxygène de la substance d'essai corrigée de la valeur correspondante dans le témoin contenant l'inoculum, par le poids de la substance utilisé dans l'essai, c'est-à-dire :

$$DBO = \frac{\text{mg O}_2 \text{ consommé par la substance d'essai} - \text{mg O}_2 \text{ consommé par le témoin}}{\text{mg de substance d'essai dans le récipient}}$$

Calculer le pourcentage de biodégradation selon la méthode décrite dans la Ligne directrice 301 D (paragraphe 23 et 24).

21. Si les analyses facultatives d'un produit spécifique et/ou du COD, sont réalisées calculer le pourcentage de dégradation comme décrit respectivement dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 7) et dans la Ligne directrice 301 A (paragraphe 27).

Validité des résultats

22. La consommation d'oxygène dans le témoin contenant l'inoculum est normalement comprise entre 20 et 30 mg O₂/l et elle ne doit pas dépasser 60 mg/l après 28 jours. Des valeurs supérieures à 60 mg/l nécessitent un examen critique des données et des méthodes expérimentales. Si la valeur du pH se situe en dehors de l'intervalle compris entre 6 et 8.5 et si la consommation d'oxygène par la substance d'essai est inférieure à 60 %, l'essai devrait être recommencé avec une concentration plus faible de produit.

23. On applique les critères de validité donnés dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 7).

Rapport d'essai

24. Le rapport d'essai doit contenir les renseignements décrits dans le chapitre « Résultats et Rapport » (p. 8).

ESSAI DE RESPIROMETRIE MANOMETRIQUE

FEUILLE DE RESULTAT

1. LABORATOIRE :**2. DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI :****3. SUBSTANCE D'ESSAI :**

Nom :

Concentration de la solution mère : mg/L

Concentration initiale dans le milieu C_0 mg/l

Volume dans le flacon d'essai (V) : ml

DThO pou DCO : mg O₂/mg de substance d'essai (NH₄,NO₃)**4. INOCULUM**

Origine :

Traitement :

Préconditionnement éventuel :

Concentration des matières en suspension dans le mélange réactionnel : Mg/l

5. CONSOMMATION D'OXYGÈNE, BIODEGRADABILITE :

Type de respiromètre :

	Temps (en jours)				
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n _x
Consommation d'O ₂ par la substance d'essai testée (mg) a ₁ a ₂					
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg) b ₁ b ₂ b _m moy.					
Consommation d'O ₂ corrigée (mg) (a ₁ -b _m) (a ₂ -b _m)					
DBO (mg O ₂ /mg de substance d'essai) $\frac{a_1 - b_m}{C_o V}$ $\frac{a_2 - b_m}{C_o V}$					
% dégradation D $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D _{1(a1)} D _{2(a2)} moy.*				

* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D1 et D2.

Remarque : des tableaux similaires peuvent être utilisés pour le produit de référence et le témoin de toxicité.

6. CORRECTION RELATIVE A LA NITRIFICATION (Voir Annexe V) :

	Temps d'incubation (j)		
	0	28	différence
(i) Concentration en nitrate (mgN/l)			(N)
(ii) Equivalent oxygène (4,57 x N x V) (mg)	-	-	
(iii) Concentration en nitrite (mgN/l)			(N)
(iv) Equivalent d'oxygène (3,43 x N x V) (mg)	-	-	
(ii+iv) Total d'équivalent oxygène	-	-	

7. ANALYSE DU CARBONE (facultatif) :

Analyseur de carbone :

Temps (en jours)	Substance d'essai (mg/l)	Témoin (mg/l)
0	(C _o)	(C _{bl(o)})
28*	(C _t)	(C _{bl(t)})

* ou à la fin de l'incubation

$$\% \text{ DOC éliminé} = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_o - C_{bl(o)}} \right] \times 100$$

8. ANALYSE CHIMIQUE SPÉCIFIQUE

	Quantité résiduelle de substance d'essai à la fin de l'essai	% dégradation primaire
Témoin stérile	S _b	
Milieu d'essaiensemencé	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

9. DÉGRADATION ABIOTIQUE

a= consommation de O₂ dans les flacons stériles à la fin de l'essai (mg)

$$\text{Consommation d'O}_2 \text{ par mg de substance l'essai} = \frac{a}{C_o V}$$

$$\% \text{ dégradation abiotique} = \frac{a}{C_o V \times ThOD} \times 100$$

ANNEXE IABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

OD : Oxygène dissous (mg/l), c'est-à-dire la concentration d'oxygène dissous dans un échantillon

DBO : Demande biochimique en oxygène (mg), c'est-à-dire la quantité d'oxygène consommée par des micro-organismes lorsqu'ils métabolisent une substance d'essai ; la DBO est également exprimée en mg d'oxygène consommé par mg de substance d'essai.

DCO : Demande chimique en oxygène (mg), c'est-à-dire la quantité d'oxygène consommée au cours de l'oxydation d'une substance d'essai par du bichromate acide chaud ; la DCO fournit une mesure de la quantité de matière oxydable présente ; la DCO est également exprimée en mg d'oxygène consommé par mg de substance d'essai.

COD : Carbone organique dissous. Il s'agit du carbone organique présent dans une solution ou qui traverse un filtre d'une porosité de 0,45 micromètre ou encore qui reste dans le surnageant après une centrifugation de 15 min à environ 4 000 g (40 000 m.s⁻²).

DThO : Demande théorique en oxygène (mg), c'est-à-dire la quantité totale d'oxygène nécessaire pour parvenir à l'oxydation complète d'un produit chimique ; elle est calculée à partir de la formule moléculaire (voir l'Annexe IV 2) et est également exprimée en mg d'oxygène nécessaires par mg de substance d'essai.

CO₂Th : Dioxyde de carbone théorique (mg). Il s'agit de la quantité de dioxyde de carbone, calculée à partir de la teneur en carbone connue ou mesurée de la substance d'essai, qui doit se dégager lors de la minéralisation complète de celle-ci ; le CO₂Th est également exprimé en mg de dioxyde de carbone qui se dégage par mg de substance d'essai.

COT : Carbone organique total. Le COT d'un échantillon est égal à la somme du carbone organique en solution et en suspension.

CI : Carbone inorganique.

CT : Carbone total. Le CT est égal à la somme du carbone organique et du carbone inorganique présents dans l'échantillon.

Biodégradation primaire : Altération de la structure chimique d'une substance, résultant d'une action biologique et entraînant la perte de propriétés spécifiques de cette substance.

Biodégradation ultime (en aérobiose) : Niveau de dégradation atteint lorsque la totalité de la substance d'essai a été utilisée par des micro-organismes pour produire du dioxyde de carbone, de l'eau, des sels minéraux et de nouveaux constituants cellulaires microbiens (biomasse).

Facilement biodégradable : Classification arbitraire des produits chimiques qui ont répondu positivement à certains essais de « screening » spécifiques portant sur la biodégradabilité ultime ; du fait de la rigueur de ces essais, on admet que de tels composés se dégraderont rapidement et complètement en milieu aquatique dans des conditions d'aérobiose.

Intrinsèquement biodégradable : Classification des produits chimiques pour lesquels une biodégradation (primaire ou ultime) se manifeste sans ambiguïté au cours d'un quelconque essai de biodégradabilité.

Traitabilité : Aptitude des composés à être éliminés au cours du traitement biologique des eaux d'égout sans effet indésirable sur le déroulement normal du traitement. D'une manière générale, les composés facilement biodégradables sont traitables, ce qui n'est pas le cas de tous les composés intrinsèquement biodégradables. Des processus abiotiques peuvent également se produire.

Phase de latence : Correspond à la période qui, au cours d'un essai de disparition, sépare le moment de l'ensemencement de celui où le pourcentage de dégradation a atteint environ 10 %. La durée de la phase de latence est souvent variable et peu reproductible.

Phase de dégradation : Correspond à la période qui commence à la fin de la phase de latence et se termine au moment où on atteint 90 % du taux maximal de dégradation.

Intervalle de temps de 10 jours : Il s'agit des 10 jours qui suivent immédiatement le moment où le taux de biodégradation atteint 10 %.

ANNEXE IIÉVALUATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ DES PRODUITS CHIMIQUES
SUSPECTES DE TOXICITÉ VIS-A-VIS DE L'INOCULUM

Lorsqu'un produit soumis à des essais de biodégradabilité facile semble ne pas être biodégradable, il est conseillé de suivre la procédure suivante si l'on souhaite effectuer une distinction entre inhibition et inertie (Reynolds *et al.*, 1987).

1. Il convient de procéder aux essais de toxicité et de biodégradation avec des inocula semblables ou identiques.
2. Pour estimer la toxicité des produits soumis aux essais de biodégradabilité facile, il semble approprié d'appliquer soit l'une des méthodes suivantes, soit une combinaison de ces méthodes : inhibition du taux de respiration de la boue (Ligne directrice de l'OCDE 209 ; Norme ISO 8192), DBO et/ou inhibition de la croissance.
3. Si on veut éviter l'inhibition due à la toxicité, il est suggéré d'utiliser pour les essais de biodégradabilité facile des concentrations de substance d'essai inférieures au 1/10 de la valeur de la CE₅₀ obtenue lors des essais de toxicité (ou inférieures à la valeur de la CE₂₀). Il est peu vraisemblable que les composés dont la CE₅₀ a une valeur supérieure à 300 mg/l produisent un effet toxique lors des essais de biodégradabilité facile.
4. Il est vraisemblable que les valeurs de CE₅₀ inférieures à 20 mg/l poseront de sérieux problèmes lors des essais ultérieurs. Il convient dans ce cas d'employer de faibles concentrations en substance d'essai, nécessitant l'utilisation de l'essai en flacon fermée, qui est rigoureux et sensible, ou de matériel marqué au ¹⁴C. Une autre manière de procéder consiste à utiliser un inoculum acclimaté à la substance d'essai permettant d'utiliser des concentrations plus élevées de substance d'essai. Toutefois, dans ce cas, on perd le critère spécifique de l'essai de biodégradabilité facile.

BIBLIOGRAPHIE

Reynolds L., *et al.*, (1987) Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere*, 16, 2259

ANNEXE IIIÉVALUATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ DES SUBSTANCES FAIBLEMENT SOLUBLES

Lors des essais de biodégradabilité sur des substances faiblement solubles, il faut prêter une attention particulière aux éléments énoncés ci-après.

1. Alors que les liquides homogènes posent rarement des problèmes de prélèvement d'échantillons, il est conseillé d'homogénéiser les matières solides par des moyens appropriés afin d'éviter les erreurs inhérentes au manque d'homogénéité. Il convient de prendre des précautions particulières pour prélever à partir de mélanges de produits chimiques ou de substances riches en impuretés des échantillons de quelques milligrammes qui soient représentatifs.
2. Plusieurs types d'agitation peuvent être utilisés au cours de l'essai. Il faut veiller à ce que l'agitation soit juste suffisante pour maintenir en dispersion le produit et éviter une surchauffe, une formation excessive de mousse ou des forces de cisaillement excessives.
3. Il est possible d'utiliser un agent émulsifiant qui donne une dispersion stable du produit. Cet émulsifiant ne devra pas être toxique pour les bactéries, ni être biodégradé, ni former de la mousse dans les conditions d'essai.
4. Les mêmes critères s'appliquent aux solvants et aux émulsifiants.
5. Il n'est pas conseillé d'utiliser des supports solides pour les produits solides ; leur utilisation peut, par contre, être appropriée dans le cas des substances huileuses.
6. Lorsqu'une substance auxiliaire, telle qu'un émulsifiant, un solvant ou un support, est utilisée, il convient d'effectuer un témoin avec cette substance.
7. Les quatre essais de respirométrie (301 B, 301 C, 301 D, 301 F) conviennent pour étudier la biodégradabilité des composés faiblement solubles.

BIBLIOGRAPHIE

- de Morsier A., et al., (1987) Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. *Chemosphere*, 16, 833
- Gerike P., (1984) The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere* 13, 169
- Projet de Norme ISO 10634, Water quality Evaluation in an aqueous medium of the « ultimate » biodegradability of low-soluble organic compounds (1990)

ANNEXE IVCALCUL ET DÉTERMINATION DE PARAMÈTRES APPROPRIÉS

Certains paramètres spécifiques seront requis en fonction de la méthode choisie. La présente annexe décrit les méthodes de calcul. L'utilisation de ces paramètres est décrite dans le cadre des différentes méthodes.

1. Teneur en carbone

La teneur en carbone est calculée à partir de la composition élémentaire commune de la substance à tester, ou déterminée par analyse élémentaire de cette substance.

2. Demande théorique en oxygène (DThO)

La demande théorique en oxygène (DThO) peut être calculée si la composition élémentaire est connue ou déterminée par analyse élémentaire. Pour le composé suivant :



la DThO, en l'absence de nitrification, sera égale à :

$$DThO_{NH_3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]mg/mg}{PM}$$

et, si une nitrification a lieu, elle sera égale à :

$$DThO_{NO_3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]mg/mg}{PM}$$

où PM = poids moléculaire

3. Demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène de substances organiques solubles est déterminée avec les méthodes conventionnelles comme par exemple la méthode ISO 6060. La demande chimique en oxygène est souvent mieux mesurée, en particulier dans le cas des substances peu solubles, avec une variante de la méthode d'analyse indiquée ci-dessus, c'est à dire en système fermé avec un régulateur de pression (Kelkenberg, 1975). Avec cette modification, les substances qui ne sont que difficilement évaluées pour la méthode conventionnelle (par exemple l'acide acétique), peuvent souvent être dosées avec succès. Cette méthode ne s'applique cependant pas dans le cas de la pyridine. Si la concentration en dichromate de potassium est augmentée, comme décrit par Kelkenberg, de 0,016N (0,0026M) à 0,25N (0,0416M), la pesée directe de 5 à 10 mg de substance est facilitée, ce qui est essentiel pour la détermination de la DCO des substances peu solubles (Gerike, 1984).

4. Carbone organique dissous (COD)

Le carbone organique dissous (COD) est, par définition, le carbone organique présent dans la solution aqueuse d'un produit chimique ou d'un mélange, qui traverse un filtre d'une porosité de 0,45 micromètre.

Prélever des échantillons dans les récipients d'essai et les filtrer immédiatement à l'aide d'un dispositif de filtration en utilisant une membrane filtrante appropriée. Les 20 premiers ml de filtrat (la quantité peut être réduite si on utilise des filtres de petite taille) sont éliminés. Un volume de filtrat compris entre 10 et 20 ml, ou moins s'il doit être injecté (le volume dépend de la quantité requise pour l'analyseur de carbone), est retenu afin d'en analyser la teneur en carbone. La concentration du COD est déterminée à l'aide d'un analyseur de carbone organique capable de mesurer avec précision une concentration de carbone égale ou inférieure à 10% de la concentration initiale de COD utilisée pour l'essai.

Les échantillons filtrés qui ne sont pas analysés le jour même peuvent être conservés pendant 48 heures dans un réfrigérateur entre 2 et 4°C ou en-dessous de -18°C pour des périodes plus longues.

Remarques :

Les membranes filtrantes sont souvent imprégnées d'agents tensio-actifs pour l'hydrophilisation, elles sont susceptibles de contenir plusieurs milligrammes de carbone organique soluble qui faussent les déterminations de la biodégradabilité. Pour débarrasser les filtres des agents tensio-actifs ainsi que d'autres composés organiques solubles, il convient de les faire bouillir à trois reprises pendant une heure dans de l'eau déminéralisée. Ils peuvent ensuite être conservés dans de l'eau pendant une semaine. Si l'on utilise des cartouches filtrantes à usage unique, chaque lot doit être vérifié afin de s'assurer qu'il ne libère pas de carbone organique soluble. La substance à tester peut être retenue par adsorption sur certains types de filtres à membrane. C'est pourquoi il est conseillé de s'assurer que le produit à tester n'est pas retenu par le filtre. Une centrifugation à 4 000 g (environ 40 000 m.sec⁻²) pendant 15 min peut remplacer la filtration pour distinguer le COT du COD. Cette méthode n'est pas fiable si la concentration initiale en COD est inférieure à 10 mg/l, soit parce que toutes les bactéries ne sont pas éliminées, soit parce que du carbone faisant partie intégrante du plasma bactérien est remis en solution.

BIBLIOGRAPHIE

Standard methods for the examination of water and wastewater, 12th ed, Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, p 65 (1965)

Wagner R., (1976) Vom Wasser, 46, 139

DIN 38 409 Teil 41 - Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser, Abwasser und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuss Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

Kelkenberg H., (1975) Wasser Z. und Abwasserforschung, 8, 146

Gerike P., (1984) The biodegradability testing of poorly water soluble compounds Chemosphere, 13 (1), 169.

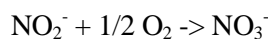
ANNEXE VCORRECTION DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE POUR TENIR
COMPTE DE L'INTERFÉRENCE DUE A LA NITRIFICATION

Les méthodes respirométriques qui utilisent comme mesure analytique la consommation d'oxygène peuvent voir leurs résultats influencés de façon importante par la consommation d'oxygène due à l'oxydation des ions ammonium.

Les erreurs que l'on commet en ne tenant pas compte de la nitrification lors de la détermination de la biodégradabilité par mesure de la consommation d'oxygène sont mineures (inférieures à 5 %) lorsque les substances à tester ne contiennent pas d'azote, même si l'oxydation de l'azote ammoniacal dans le milieu se produit occasionnellement dans les récipients d'essai ainsi que dans les témoins. Par contre, pour les substances azotées, des erreurs importantes peuvent se produire si la consommation d'oxygène observée n'est pas corrigée de la quantité d'oxygène utilisée pour oxyder l'ammonium en nitrite et en nitrate. Dans le cas d'une nitrification complète, ou d'une transformation de l'ammonium en nitrate, on applique l'équation suivante :



14 g d'azote consomment 64 g d'oxygène et l'oxygène consommé lors de la formation de nitrate est donc 4,57 fois l'augmentation de la concentration de nitrate. S'il se produit une nitrification incomplète, on applique les équations suivantes :



Au cours de l'oxydation en nitrite, 14 g d'azote consomment 48 g d'oxygène ; le facteur est donc de 3,43.

Puisque les réactions sont séquentielles, et effectuées par des espèces bactériennes distinctes et différentes, la concentration en nitrite peut augmenter ou diminuer ; dans ce dernier cas, il se formera une concentration équivalente en nitrate. Ainsi, l'oxygène consommé lors de la formation de nitrate est égal à 4,57 multiplié par l'augmentation de la concentration de nitrate, tandis que l'oxygène associé à la formation de nitrite est égal à 3,43 multiplié par l'augmentation de la concentration de nitrite ou lors de la diminution de la concentration en nitrite, la « perte » d'oxygène est égale à 3,43 multiplié par la diminution de concentration.

D'une autre façon, si on ne détermine que « l'azote total oxydé », on peut, en première approximation, considérer que l'oxygène consommé par la nitrification est égal à 4,57 fois l'augmentation de l'azote oxydé.

La valeur corrigée de la consommation d'oxygène due à l'oxydation du carbone est ensuite comparée à la DThONH₃ calculée selon les équations fournies à l'Annexe IV.