

**LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE  
PRODUITS CHIMIQUES****Essai de simulation – Traitement aérobie des eaux usées :  
303 A : Unités de traitement par boues activées - 303 B : Biofilms****303 A : Unités de traitement par boues activées****INTRODUCTION**

1. Dans les années 50, on s'est rendu compte que les nouveaux tensioactifs provoquaient un gonflement excessif de la mousse dans les stations de traitement des eaux usées et les cours d'eau. Ils n'étaient pas complètement éliminés par le traitement aérobie et limitaient dans certains cas l'élimination d'autres matières organiques. Ce constat a été à l'origine de nombreuses études sur les moyens d'éliminer les tensioactifs des eaux usées et sur les possibilités d'application des nouveaux composés produits par l'industrie au traitement des eaux usées. Des modèles d'unités représentant les deux principaux types de traitement biologique aérobie des eaux usées (boues activées et lits à ruissellement, ou lits bactériens) ont été utilisés à cette fin. Il aurait en effet été peu commode et très coûteux de répartir chaque nouvelle substance entre différentes stations de traitement à grande échelle et d'assurer un suivi des essais, même au niveau local.

**CONSIDÉRATIONS INITIALES****Unités de traitement par boues activées**

2. Les descriptions de modèles d'unités à boues activées mentionnent des dimensions comprises entre 300 ml et environ 2 000 l. Certaines unités, répliques assez fidèles de stations en vraie grandeur, comportaient des bassins de décantation où les boues séjournaient avant d'être renvoyées par pompage dans le bassin d'aération, tandis que d'autres n'étaient pas équipées pour cette opération, par exemple le modèle de Swisher (1). La dimension de l'appareil résulte d'un compromis : il doit être assez grand pour fonctionner correctement sur le plan mécanique et traiter un volume d'échantillons suffisant sans que son fonctionnement en soit altéré et, d'autre part, il ne doit pas occuper trop d'espace ni demander une quantité de matériel excessive.

3. Deux types d'appareils, appliqués au départ à l'étude des tensioactifs, ont été abondamment utilisés avec des résultats satisfaisants : les unités d'Husmann (2) et les unités à vase poreux (3)(4), qui sont décrites dans la présente Ligne directrice. D'autres unités ont également fait leurs preuves, par exemple celle d'Eckenfelder (5). Compte tenu du coût relativement élevé et des efforts exigés par la conduite de cet essai de simulation, des essais de sélection plus simples et moins onéreux, qui figurent à présent dans la

Ligne directrice 301 A-F, ont été étudiés en parallèle. L'expérience acquise avec de nombreux tensioactifs et d'autres produits chimiques a montré que ceux qui donnaient un résultat positif aux essais de sélection (facilement biodégradables) se dégradèrent aussi au cours de l'essai de simulation. Certaines des substances rejetées par les essais de sélection étaient acceptées d'après les essais de biodégradabilité intrinsèque (302 A, B), mais une partie seulement des substances formant ce dernier groupe se dégradait au cours de l'essai de simulation, tandis que les substances écartées par les essais de biodégradabilité intrinsèque n'étaient pas dégradées au cours des essais de simulation (6)(7)(8).

4. Les essais de simulation conduits sous une seule combinaison de conditions expérimentales suffisent à remplir certains objectifs ; les résultats sont exprimés en pourcentage d'élimination de la substance d'essai ou du carbone organique dissous (COD). Ce type d'essai est décrit dans la Ligne directrice 303 A. Toutefois, contrairement à la précédente Ligne directrice 303 A (9), qui n'abordait qu'un seul type d'appareil traitant des eaux usées synthétiques en mode couplé suivant une méthode relativement grossière d'épuisement des boues, le présent texte propose plusieurs variations. Il présente plusieurs options concernant les types d'appareil, les modes de fonctionnement, les eaux usées et l'évacuation des boues épuisées. Il s'aligne étroitement sur la norme ISO 11733 (10), qui a été examinée très attentivement durant sa préparation, bien que la méthode n'ait pas fait l'objet d'un essai tournant.

5. Pour d'autres objectifs, il est nécessaire de connaître la concentration de la substance d'essai dans l'effluent avec plus de précision, ce qui demande une méthode plus élaborée. Le débit des boues épuisées, par exemple, doit subir un contrôle plus précis durant chaque journée d'essai et sur toute la période de l'essai, et il faut faire tourner les unités à plusieurs débits de boues épuisées. Pour que l'étude soit plus complète, les essais doivent aussi être menés à deux ou trois températures différentes : le mode opératoire est exposé par Birch (11)(12) et résumé à l'annexe 6. Toutefois, les connaissances actuelles ne permettent pas de décréter quels modèles cinétiques sont applicables à la biodégradation des produits chimiques lors du traitement des eaux usées et dans le milieu aquatique en général. La cinétique de Monod, donnée à titre d'exemple à l'annexe 6, est limitée aux substances dont la concentration atteint au moins 1 mg/l, mais de l'avis de certains, même sous cette condition, cela reste à démontrer. Des essais réalisés à des concentrations plus proches de celles trouvées dans les eaux usées sont présentés à l'annexe 7, mais ces essais et ceux de l'annexe 6 ne figurent qu'en annexe et ne font pas l'objet d'une Ligne directrice.

### Lits

6. Les modèles de lits percolateurs ont beaucoup moins retenu l'attention, sans doute parce qu'ils sont plus encombrants et moins compacts que les modèles de stations à boues activées. Gerike *et al* (13) ont mis au point des unités à lits percolateurs qu'ils ont fait fonctionner en mode couplé (9)(13). Ces lits étaient relativement grands (hauteur 2 m ; volume 60 l) et demandaient pas moins de 2 l/h d'eaux usées chacun. Baumann *et al* (14) ont simulé des lits percolateurs en insérant dans des tubes de 1 m (14 mm de diamètre interne) des bandes de polyester "velues" préalablement plongées dans des boues activées concentrées pendant 30 minutes. La substance d'essai, qui constituait la seule source de carbone dans une solution de sels minéraux, était introduite par le haut du tube vertical et la biodégradation était évaluée d'après les mesures du COD dans l'effluent et du CO<sub>2</sub> dans les dégagements gazeux.

7. Les filtres biologiques ont été simulés d'une autre manière (15) : on a alimenté les surfaces internes de tubes rotatifs légèrement inclinés par rapport à l'horizontale d'eaux usées (environ 250 ml/h) avec et sans la substance d'essai, puis recueilli les effluents pour analyse du COD et/ou de la substance étudiée. Cette méthode est décrite dans la Ligne directrice 303 B.

### **PRINCIPE DE L'ESSAI**

8. Cette méthode a été conçue pour déterminer l'élimination et la biodégradation primaire et/ou finale de composés organiques solubles dans l'eau par des micro-organismes aérobies dans un système d'essai à fonctionnement continu et simulant l'action des boues activées. Un milieu organique facilement biodégradable et la substance d'essai organique forment la source de carbone et d'énergie des micro-organismes.

9. Deux unités d'essai à fonctionnement continu (stations à boues activées ou vases poreux) tournent en parallèle dans des conditions identiques choisies en fonction de la finalité de l'essai. Normalement, le temps de rétention hydraulique moyen est de 6 h et l'âge moyen des boues (temps de rétention des boues) est de 6 à 10 jours. Les boues sont épuisées par application de l'une des deux méthodes et la substance d'essai est habituellement ajoutée à une concentration comprise entre 10 et 20 mg/l de carbone organique dissous (COD) aux eaux à traiter (milieu organique) d'une seule des unités. La deuxième unité sert de témoin pour déterminer la biodégradation dans le milieu organique.

10. Le COD, de préférence, ou la demande chimique en oxygène (DCO), ainsi que la concentration de la substance d'essai (si nécessaire), sont déterminés par une analyse spécifique conduite sur des échantillons d'effluents fréquemment prélevés de l'unité qui reçoit la substance d'essai. On suppose que la différence de concentration du COD ou de la DCO dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin est due à la substance d'essai ou à ses métabolites organiques. On la compare ensuite à la concentration du COD ou de la DCO dans les eaux à traiter attribuable à la substance d'essai, afin de déterminer les quantités de substance d'essai éliminées.

11. On parvient normalement à distinguer la biodégradation de la bioadsorption en étudiant attentivement la courbe d'élimination en fonction du temps, et elle peut ordinairement être confirmée par un essai de biodégradabilité immédiate conduit à l'aide d'un inoculum acclimaté provenant de l'unité qui reçoit la substance d'essai.

### **INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI**

12. Il est nécessaire de connaître la pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai pour être en mesure d'interpréter les résultats correctement. Les substances volatiles et insolubles ne peuvent normalement être testées sans précautions particulières (voir annexe 5). Il faudrait connaître également la formule chimique développée ou, au moins, empirique, pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la demande théorique en oxygène (DthO), le carbone organique dissous (COD) et la demande chimique en oxygène (DCO).

13. Des données sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (voir annexe 4) peuvent aussi être utiles à la sélection des concentrations d'essai appropriées, et essentielles pour l'interprétation correcte de faibles valeurs de biodégradation.

### **NIVEAUX DE SEUIL**

14. Dans l'application initiale de cet essai de simulation (de confirmation) à la biodégradation primaire des tensioactifs, la mise sur le marché du tensioactif était subordonnée à un taux d'élimination supérieur à 80 pour cent. À défaut d'atteindre un taux de 80 pour cent, on peut mener cet essai de simulation (de confirmation) à l'issue duquel le tensioactif ne sera mis sur le marché que s'il est éliminé à

plus de 90 pour cent. En général, avec les produits chimiques, la question d'un résultat d'essai positif ou négatif n'entre pas en jeu, et le pourcentage d'élimination obtenu peut servir à calculer en gros la concentration probable dans l'environnement à introduire dans l'évaluation des risques dus aux substances chimiques. Les résultats ont tendance à être de type tout ou rien. Le pourcentage d'élimination du COD atteint dans plusieurs études sur des substances chimiques pures était supérieur à 90 pour cent pour plus des trois quarts des produits chimiques présentant un degré de biodégradabilité significatif et supérieur à 80 pour cent pour plus de 90 pour cent d'entre eux.

15. Relativement peu de substances chimiques, par exemple des tensioactifs, sont présentes dans les eaux usées aux concentrations (environ 10 mg C/l) appliquées dans cet essai. Certains produits chimiques peuvent être inhibiteurs à de telles concentrations, tandis que la cinétique d'élimination d'autres substances risque d'être différente aux faibles concentrations. Il est possible d'évaluer la dégradation avec plus de précision en recourant à des méthodes modifiées et en choisissant des concentrations de la substance d'essai réalistement faibles ; les résultats obtenus pourraient servir à calculer les constantes cinétiques. Cependant, non seulement les techniques expérimentales ne sont pas encore entièrement validées, mais les modèles cinétiques, qui reproduisent les réactions de biodégradation, n'ont pas été établis (voir annexe 7).

### **SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE**

16. Pour s'assurer que le mode opératoire est correctement suivi, il est quelquefois utile de tester des substances dont le comportement est connu, parallèlement aux substances d'essai étudiées. Il s'agit notamment de l'acide adipique, du 2-phénylphénol, du 1-naphthol, de l'acide diphénique, de l'acide 1-naphthoïque, etc. (6)(7)(8).

### **REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS DES ESSAIS**

17. Il existe beaucoup moins de rapports d'essais de simulation que de rapports d'essais de biodégradabilité immédiate. La reproductibilité entre essais conduits simultanément est bonne (de 10 à 15 pour cent) pour des substances d'essai dégradées à 80 pour cent ou plus, mais la variabilité augmente pour les substances moins bien dégradées. Certaines substances limites ont donné des résultats très disparates (par exemple 10 pour cent, 90 pour cent) à différentes reprises au cours des neuf semaines de l'essai.

18. Les résultats obtenus à l'aide des deux types d'appareils ne différaient guère, mais certaines substances ont subi une dégradation plus poussée et plus constante avec les eaux usées domestiques qu'avec les eaux usées synthétiques reconstituées selon la formule de l'OCDE.

### **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI**

#### **Appareils**

#### **Système d'essai**

19. Le système d'essai d'une seule substance comprend une unité d'essai et une unité témoin, mais les analyses spécifiques (biodégradation primaire) ne demandent qu'une unité d'essai. Une unité témoin peut servir à plusieurs unités d'essai recevant des substances d'essai identiques ou différentes. En cas de couplage (annexe 3), chaque unité d'essai doit avoir sa propre unité témoin. Le système d'essai peut consister en un modèle de station à boues activées : unité d'Husmann (annexe 1, figure 1) ou vase poreux (annexe 1, figure 2). Dans les deux cas, il faut employer des récipients de stockage de capacité suffisante

pour accueillir les eaux à traiter et les effluents ainsi que des pompes pour doser les eaux à traiter, mélangés ou non à la solution contenant la substance d'essai.

20. Chaque unité à boues activées se compose d'un récipient d'aération d'une capacité connue de quelque trois litres de boues activées et d'un décanteur secondaire qui contient environ un litre et demi ; il est possible de modifier les volumes dans une certaine mesure en ajustant la hauteur du décanteur. L'utilisation de récipients de dimensions différentes est permise à condition de leur faire supporter des charges hydrauliques comparables. S'il n'y a pas moyen de maintenir la température de l'enceinte d'essai dans la gamme souhaitée, on recommande d'employer des récipients à chemise d'eau thermostatée. Les boues activées du décanteur sont ramenées dans le récipient d'aération, en continu ou à intervalles réguliers, à l'aide d'un émulseur à air ou d'une pompe doseuse, pour y être recyclée.

21. Le système du vase poreux consiste en un cylindre poreux à fond conique placé à l'intérieur d'un récipient légèrement plus grand de la même forme, mais fabriqué en matière plastique imperméable. Le matériau qui convient au cylindre poreux est du polyéthylène de 2 mm d'épaisseur dont les pores n'excèdent pas 90  $\mu\text{m}$ . La séparation des boues et du milieu organique traité est opérée par un passage différentiel à travers la paroi poreuse. Les effluents se déversent dans l'espace annulaire d'où ils débordent dans le récipient collecteur. Aucune décantation n'a lieu, si bien qu'il n'y a pas de retour de boues. L'ensemble du système peut être monté dans un bain-marie thermostaté. Les vases poreux s'obstruent et risquent de déborder au début. Si cela se produit, il faut remplacer le revêtement poreux interne par un revêtement propre en commençant par siphonner les boues du vase dans un seau propre avant d'enlever le revêtement obstrué. Après avoir essuyé le cylindre imperméable extérieur, on place un revêtement propre et on remet la boue dans le vase. Si des boues adhèrent sur les côtés du revêtement obstrué, celles-ci doivent être soigneusement grattées et transférées. Le nettoyage des vases obstrués s'effectue d'abord à l'aide d'un mince jet d'eau pour enlever les boues restantes, ensuite par trempage dans une solution diluée d'hypochlorite de sodium, puis dans l'eau, et s'achève par un rinçage complet à l'eau.

22. Il convient d'appliquer des techniques appropriées à l'aération des boues dans les récipients d'aération des deux systèmes, par exemple des cubes frittés (pierres diffuseuses) et de l'air comprimé. Si nécessaire, l'air sera épuré par passage à travers un filtre convenable, et lavé. Une quantité d'air suffisante doit être insufflée dans le système pour maintenir l'aérobiose et conserver les boues à l'état de floc pendant toute la durée de l'essai.

### **Appareil de filtration ou centrifugeuse**

23. Les échantillons seront filtrés à travers une membrane possédant une porosité adéquate (diamètre d'ouverture nominal de 0,45  $\mu\text{m}$ ) qui adsorbe les composés organiques solubles et libère le moins possible de carbone organique. Si les lits utilisés libèrent du carbone organique, il faut les laver soigneusement à l'eau chaude afin d'évacuer le carbone organique lixiviable. Une centrifugeuse tournant à 40 000  $\text{m/s}^2$  peut remplacer l'appareil de filtration.

### **Matériel d'analyse**

24. Appareils permettant de déterminer :

- le COD (carbone organique dissous) et le COT (carbone organique total), ou la DCO (demande chimique en oxygène) ;
- la substance donnée, s'il y a lieu ;
- les solides en suspension, le pH, la concentration d'oxygène dans l'eau ;
- la température, l'acidité, l'alcalinité ;
- l'ammonium, les nitrites et les nitrates, si l'essai est réalisé dans des conditions nitrifiantes.

**Eau**

25. Eau du robinet renfermant moins de 3 mg/l de COD. Mesurer l'alcalinité si elle est inconnue.
26. Eau désionisée contenant moins de 2 mg/l de COD.

**Milieu organique**

27. Les eaux usées synthétiques, les eaux usées domestiques ou un mélange des deux sont acceptés comme milieu organique. Il a été démontré (8)(12) que les eaux usées domestiques employées seules augmentaient souvent le pourcentage d'élimination du COD et entraînaient même l'élimination et la biodégradation de certaines substances chimiques non biodégradées par les eaux usées synthétiques formulées selon l'OCDE. En outre, l'addition constante ou intermittente d'eaux usées domestiques stabilise souvent les boues activées, y compris sa capacité à décanter convenablement, laquelle est déterminante. Aussi préconise-t-on l'utilisation d'eaux usées domestiques. On mesure la concentration du COD ou de la DCO. L'acidité ou l'alcalinité du milieu organique doivent être connues. Il peut être nécessaire de tamponner le milieu organique par un composé approprié (hydrogénocarbonate de sodium ou dihydrogénophosphate de potassium) s'il est faiblement acide ou alcalin, pour maintenir le pH à environ  $7,5 \pm 0,5$  dans le récipient d'aération durant l'essai. La quantité de tampon à ajouter et le moment de cette addition seront décidés au cas par cas. Lorsqu'on utilise des mélanges de façon continue ou intermittente, le COD (ou la DCO) de ces mélanges doivent être maintenus à une valeur à peu près constante, par exemple par dilution dans l'eau.

**Eaux usées synthétiques**

28. Dans chaque litre d'eau du robinet, dissoudre 160 mg de peptone, 110 mg d'extrait de viande, 30 mg d'urée, 28 mg d'hydrogénophosphate de potassium anhydre ( $K_2HPO_4$ ), 7 mg de chlorure de sodium (NaCl), 4 mg de chlorure de calcium dihydraté ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) et 2 mg de sulfate de magnésium heptahydraté ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ). Cette eau usée synthétique formulée selon l'OCDE offre un exemple où la concentration moyenne de COD dans les eaux à traiter atteint quelque 100 mg/l. Utiliser en alternance d'autres compositions donnant à peu près la même concentration de COD, plus proches des eaux usées domestiques. Si les eaux à traiter doivent être moins concentrées, diluer les eaux usées synthétiques, à 1/1 par exemple, dans de l'eau du robinet afin d'obtenir une concentration d'environ 50 mg/l. Ces eaux à traiter "allégées" favoriseront la croissance des organismes nitrifiants ; cette modification devra être mise à profit au cas où s'avère nécessaire l'étude de la simulation de stations d'épuration des eaux usées en régime nitrifiant. Ces eaux usées synthétiques, à base d'eau distillée, peuvent être confectionnées sous une forme concentrée et stockées à environ 1 °C pendant une semaine au maximum. Selon les besoins, diluer avec de l'eau du robinet (ce milieu n'est pas satisfaisant, notamment parce qu'il présente une concentration en azote très élevée et une teneur en carbone relativement faible, mais rien de mieux n'a été suggéré, en dehors d'un apport supplémentaire de tampon phosphate et de peptone).

**Eaux usées domestiques**

29. Utiliser des eaux usées qui viennent d'être décantées, recueillies quotidiennement dans une station d'épuration qui reçoit principalement des eaux usées domestiques. Elles doivent être prélevées avant la sédimentation primaire, au niveau du déversoir de la cuve de sédimentation primaire ou dans les eaux brutes de la station de traitement par boues activées. Les eaux usées peuvent être utilisées après plusieurs jours de stockage (généralement pas plus de sept) à environ 4 °C, s'il est prouvé que le COD (ou la DCO) n'ont pas diminué de manière significative (c'est-à-dire de moins de 20 pour cent) durant le stockage. Afin

de limiter la perturbation du système, il conviendrait d'ajuster le COD (ou la DCO) de chaque nouveau lot avant son utilisation à une valeur constante adéquate, par exemple en le diluant avec de l'eau du robinet.

### **Boues activées**

30. Prélever les boues activées destinées à l'inoculation dans la cuve d'aération d'une station d'épuration des eaux usées correctement exploitée ou d'une unité à boues activées conçue à l'échelle expérimentale traitant principalement des eaux usées domestiques.

### **Solutions mères de la substance d'essai**

31. Pour les substances présentant une solubilité convenable, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées (par exemple, 1 à 5 g/l) dans de l'eau désionisée, ou dans la fraction minérale de l'eau usée synthétique. En ce qui concerne les substances insolubles et volatiles, se reporter à l'annexe 5. Déterminer le COD et le carbone organique total (COT) de la solution mère et répéter les mesures à chaque nouveau lot. Si la différence entre le COD et le COT excède 20 pour cent, il faut vérifier l'hydrosolubilité de la substance d'essai. Comparer le COD ou la concentration de la substance d'essai mesurée par une analyse spécifique de la solution mère à la valeur nominale, pour s'assurer que la récupération est suffisante (elle doit normalement dépasser 90 pour cent). Vérifier, en particulier pour les dispersions, si le COD peut être utilisé comme paramètre d'analyse ou si seule une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai est applicable. Les dispersions imposent la centrifugation des échantillons. Pour chaque nouveau lot, mesurer le COD, la DCO, ou la substance d'essai par une analyse spécifique.

32. Déterminer le pH de la solution mère. Les valeurs extrêmes indiquent que l'addition de la substance est susceptible d'influencer le pH des boues activées dans le système d'essai. Dans ce cas, il faut neutraliser la solution mère à  $\text{pH } 7 \pm 0,5$  avec de faibles quantités d'un acide ou d'une base inorganiques, tout en évitant la précipitation de la substance d'essai.

### **MODE OPÉRATOIRE**

33. Le mode opératoire est décrit pour les unités à boues activées ; pour le système du vase poreux, il doit être légèrement adapté.

### **Préparation de l'inoculum**

34. Au début de l'essai, inoculer le système d'essai avec des boues activées ou un inoculum contenant une faible concentration de micro-organismes. L'inoculum est conservé dans un endroit aéré à température ambiante avant d'être utilisé dans les 24 heures. Dans le premier cas, on prélève un échantillon de boues activées de la cuve d'aération d'une station d'épuration biologique des eaux usées exploitée avec efficacité ou d'une installation de traitement de laboratoire qui soit essentiellement alimentée par des eaux usées domestiques. S'il y a lieu de simuler des conditions nitrifiantes, collecter les boues d'une station de traitement des eaux usées en régime nitrifiant. Déterminer la concentration des solides en suspension et, si nécessaire, concentrer les boues par décantation pour que le volume ajouté au système d'essai soit minimal. Vérifier que la teneur en matière sèche de départ tourne autour de 2,5 g/l.

35. Dans le deuxième cas, 2 ml/l à 10 ml/l d'un effluent d'une station d'épuration biologique des eaux usées constitueront l'inoculum. Afin de réunir autant d'espèces bactériennes que possible, il peut être utile d'ajouter des inoculum de diverses autres sources, par exemple les eaux de surface. Dans ces conditions, les boues activées vont se former et se développer dans le système d'essai.

**Dosage du milieu organique**

36. Nettoyer méticuleusement les récipients destinés à recevoir les eaux à traiter et les effluents ainsi que les tuyaux reliant ces deux récipients, afin de prévenir toute prolifération de micro-organismes, au début de l'essai et tout au long de celui-ci. Assembler les systèmes d'essai dans une pièce thermostatée (normalement entre 20 et 25°C) ou utiliser des unités d'essai à chemise d'eau. Préparer un volume suffisant du milieu organique requis (paragraphe 27-29). Commencer par remplir le récipient d'aération et le décanteur avant d'introduire l'inoculum (paragraphe 34, 35). Actionner le dispositif d'aération de telle sorte que les boues soient maintenues en suspension et en aérobiose, et entamer le dosage des eaux à traiter et le recyclage des boues décantées. Doser le milieu organique des récipients de stockage et introduire ce dernier dans les récipients d'aération (paragraphe 20, 21) des unités d'essai et témoin et recueillir leurs effluents respectifs dans des récipients de stockage similaires. Le temps de rétention hydraulique normal de 6 heures sera assuré par un pompage du milieu organique à raison de 0,5 l/h. Pour confirmer ce débit, mesurer la quantité quotidienne de milieu organique dosé en enregistrant la diminution de volume du milieu dans les récipients de stockage. Il faudrait faire appel à d'autres méthodes de dosage pour déterminer les effets du déversement intermittent et du traitement de "choc" par des produits chimiques.

37. Si le milieu organique est préparé en vue d'une utilisation dont la durée dépasse un jour, il y a lieu de le réfrigérer à environ 4°C ou de le conserver par une autre méthode adéquate, afin de prévenir la croissance des micro-organismes et la biodégradation en dehors des unités d'essai (paragraphe 29). Si l'on emploie une eau usée synthétique, il est possible de préparer et d'entreposer à environ 4°C une solution mère concentrée (par exemple dix fois la concentration normale, voir paragraphe 28). Cette solution mère peut être convenablement mélangée à un volume adéquat d'eau du robinet avant usage, ou être pompée directement, tandis que le volume adéquat d'eau du robinet est pompé séparément.

**Dosage de la substance d'essai**

38. Un volume approprié de la solution mère de la substance d'essai (paragraphe 31) est introduit dans le récipient de stockage des eaux à traiter ou dosé directement, à l'aide d'une autre pompe, dans le récipient d'aération. La concentration d'essai moyenne normale dans les eaux à traiter doit se situer entre 10 mg/l et 20 mg/l de COD, et la concentration maximale à 50 mg/l. Si l'hydrosolubilité de la substance d'essai est faible ou si des effets toxiques risquent de se produire, abaisser la concentration à 5 mg/l de COD ou même moins, mais seulement si une méthode d'analyse spécifique est applicable (les substances d'essai dispersées peu solubles dans l'eau peuvent être ajoutées par le biais de techniques de dosage spéciales, voir annexe 5).

39. Une fois que le système est stabilisé et élimine le COD du milieu organique avec efficacité (environ 80 pour cent), commencer à ajouter la substance d'essai. Il est important de vérifier que toutes les unités travaillent avec le même rendement avant d'ajouter la substance d'essai ; si ce n'est pas le cas, il est souvent utile de mélanger les différentes boues et de redistribuer des volumes égaux aux unités. Lorsqu'on utilise un inoculum de quelque 2,5 g/l (poids sec) de boues activées, la substance d'essai peut être ajoutée dès le début de l'essai, car l'addition directe de quantités croissantes dès le départ offre l'avantage de pouvoir rendre les boues activées mieux adaptables à la substance d'essai. Quelles que soient les modalités de l'adjonction de la substance d'essai, il est recommandé de mesurer les débits et/ou les volumes correspondants dans le(s) récipient(s) de stockage à intervalles réguliers.

**Manipulation des boues activées**

40. La concentration des solides des boues activées se stabilise normalement durant l'essai, quel que soit l'inoculum utilisé, entre 1 et 3 g/l (poids sec) suivant la qualité et la concentration du milieu organique,



les conditions expérimentales, la nature des micro-organismes présents et l'influence de la substance d'essai.

41. Déterminer les solides en suspension dans les récipients d'aération au moins une fois par semaine en jetant les boues excédentaires, afin de maintenir la concentration entre 1 g/l et 3 g/l (poids sec), ou veiller à la constance de l'âge moyen des boues, qui doit généralement se situer entre 6 et 10 jours. Si l'on choisit, par exemple, un temps de rétention des boues de 8 jours, on enlèvera chaque jour 1/8 du volume des boues activées dans le récipient d'aération et on le jettera. Effectuer cette opération quotidiennement ou, de préférence, utiliser une pompe automatique intermittente. Le maintien de la concentration des solides en suspension à une valeur constante ou entre des limites étroites ne fige pas le temps de rétention des boues, qui est la variable permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai dans l'effluent.

42. Tout au long de l'essai, ôter au moins une fois par jour la boue qui adhère aux parois du récipient d'aération et du décanteur et remettre cette dernière en suspension. Inspecter et nettoyer régulièrement tous les tuyaux afin de prévenir la croissance d'un biofilm. Recycler les boues décantées du décanteur en la renvoyant dans le récipient d'aération, de préférence par pompage intermittent. Le système des vases poreux ne comporte pas de recyclage, mais il faut veiller à placer des cylindres internes propres avant que le volume n'atteigne une croissance significative dans le récipient (paragraphe 21).

43. Une mauvaise décantation et des pertes de boues peuvent se produire dans les unités d'Husmann. On peut y remédier en effectuant en parallèle dans les unités d'essai et les unités témoin une ou plusieurs des opérations énumérées ci-dessous :

- ajouter des boues fraîches ou un flocculant (2 ml par récipient d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  à 50 g/l, par exemple) à intervalles réguliers, par exemple hebdomadaires, en s'assurant que le  $\text{FeCl}_3$  ne réagit pas avec la substance d'essai et ne la fasse pas précipiter ;
- remplacer l'émulseur à air par une pompe péristaltique, afin d'instaurer un flux de recirculation des boues à peu près égal au débit entrant à appliquer et de permettre la formation d'une zone anaérobie dans les boues décantées (la géométrie du dispositif airlift limite le débit minimum du retour des boues à environ douze fois celui des eaux à traiter) ;
- pomper les boues, par intermittence, du décanteur vers le récipient d'aération (par exemple pendant 5 minutes toutes les 2,5 heures afin de recycler 1 l/h à 1,5 l/h ;
- utiliser un agent anti-mousse non toxique à une concentration minimale pour empêcher les pertes dues à la formation de mousse (de l'huile de silicone, par exemple) ;
- insuffler de l'air à travers les boues dans le décanteur par puissantes saccades (par exemple pendant 10 secondes toutes les heures) ;
- doser le milieu organique par intervalles dans le récipient d'aération (par exemple pendant 3 à 10 minutes toutes les heures).

### **Échantillonnage et analyse**

44. À intervalles réguliers, mesurer la concentration d'oxygène dissous, la température et le pH des boues activées dans les récipients d'aération. Faire en sorte qu'il y ait toujours suffisamment d'oxygène disponible (>2 mg/l) et que la température demeure dans la gamme requise (normalement de 20°C à 25°C). Maintenir le pH à  $7,5 \pm 0,5$  en dosant de petites quantités d'une base ou d'un acide inorganiques que l'on introduit dans le récipient d'aération ou dans les eaux à traiter, ou en augmentant le pouvoir tampon du milieu organique (voir paragraphe 27). Si une nitrification a lieu, elle génère de l'acide, l'oxydation de 1 mg d'azote produisant l'équivalent de quelque 7 mg de  $\text{CO}_3^{--}$ . La fréquence des mesures dépend du paramètre à mesurer et de la stabilité du système, et peut varier entre une cadence journalière et hebdomadaire.

45. Déterminer le COD ou la DCO dans les eaux à traiter des récipients d'essai et témoins. Mesurer la concentration de la substance d'essai dans les eaux brutes par une analyse spécifique ou estimer cette variable d'après la concentration dans la solution mère (paragraphe 31), le volume utilisé et la quantité d'eaux usées dosées dans l'unité d'essai. Il est recommandé de calculer la concentration de la substance d'essai afin de réduire la variabilité des données relatives à la concentration.

46. Prélever des échantillons appropriés dans l'effluent recueilli (par exemple des échantillons composites sur 24 heures) qui seront filtrés à travers une membrane à pores de 0,45 µm ou centrifugés à environ 40 000 m/s<sup>2</sup> pendant près d'un quart d'heure. Il convient de recourir à la centrifugation si la filtration pose des difficultés. Déterminer le COD ou la DCO au moins deux fois, afin de mesurer par une analyse spécifique de la substance d'essai la biodégradation finale et, selon les besoins, la biodégradation primaire.

47. L'utilisation de la DCO peut donner lieu à des problèmes analytiques aux faibles concentrations et n'est donc recommandée que si la concentration d'essai est suffisante (environ 30 mg/l). S'agissant de substances très adsorbantes, on préconise de mesurer la quantité de substance adsorbée dans les boues par une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai.

48. La fréquence de l'échantillonnage dépend de la durée supposée de l'essai. Un rythme de trois fois par semaine est recommandé. Une fois que les unités fonctionnent de manière efficace, on leur laisse une période d'adaptation de une à six semaines maximum après l'introduction de la substance d'essai, afin de leur permettre d'atteindre un état stationnaire. Il faut, de préférence, obtenir au moins 15 valeurs valables pendant la phase plateau (paragraphe 59), qui dure normalement trois semaines, pour évaluer le résultat de l'essai. L'essai peut s'arrêter là si l'on a atteint un degré d'élimination suffisant (par exemple supérieur à 90 pour cent) et si l'on possède ces 15 valeurs issues d'analyses conduites chaque jour de semaine pendant trois semaines. L'essai ne doit normalement pas se prolonger au-delà de 12 semaines après l'addition de la substance d'essai.

49. Si les boues sont nitrifiantes et que les effets de la substance d'essai sur la nitrification sont à étudier, analyser des échantillons prélevés dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin, au moins une fois par semaine pour l'ammonium et/ou les nitrites et nitrates.

50. Toutes les analyses doivent être exécutées le plus vite possible, en particulier celles qui portent sur l'azote. Au cas où les analyses doivent être différées, conserver les échantillons à environ 4°C à l'obscurité dans des bouteilles pleines et bouchées hermétiquement. S'il y a lieu de stocker les échantillons pendant plus de 48 heures, on les conservera par congélation, acidification (par exemple 10 ml/l d'une solution d'acide sulfurique à 400 g/l) ou par adjonction d'un toxique approprié (par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure (II) à 10 g/l). S'assurer que la technique de conservation n'influence pas les résultats de l'analyse.

### **Couplage des unités d'essai**

51. Si l'on effectue un couplage (annexe 3), échanger quotidiennement la même quantité de boues activées (de 150 ml à 1500 ml pour les récipients d'aération contenant trois litres de liquide) entre les récipients d'aération de l'unité d'essai et de l'unité témoin. Si la substance d'essai s'adsorbe fortement sur les boues, n'échanger que le surnageant des décanteurs. Introduire dans les deux cas un facteur de correction dans le calcul des résultats de l'essai (paragraphe 55).

**RÉSULTATS ET RAPPORT****Traitement des résultats**

52. Calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai en termes de COD ou de DCO pour chaque évaluation programmée dans le temps à l'aide de l'équation suivante :

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

où  $D_t$  = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO à l'instant t ;  
 $C_s$  = COD ou DCO dans les eaux à traiter, induits par la substance d'essai, estimés de préférence à partir de la solution mère (mg/l) ;  
 $E$  = valeur mesurée du COD ou de la DCO dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l) ;  
 $E_o$  = valeur mesurée du COD ou de la DCO dans les effluents témoins à l'instant t (mg/l).

53. Le degré d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique de l'unité témoin est utile pour évaluer l'activité de biodégradation des boues activées pendant l'essai. Calculer le pourcentage d'élimination selon l'équation suivante :

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

où  $D_B$  = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique de l'unité témoin à l'instant t ;  
 $C_M$  = COD ou DCO du milieu organique des eaux brutes témoins (mg/l).

Calculer, facultativement, le pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO engendrés par le milieu organique et la substance d'essai dans l'unité d'essai, à partir de l'équation suivante :

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

où  $D_T$  = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO dans la totalité des eaux brutes d'essai ;  
 $C_T$  = COD ou DCO de la totalité des eaux brutes d'essai ou calculés à partir des solutions mères (mg/l).

54. Calculer l'élimination de la substance d'essai si elle a été mesurée par une méthode d'analyse spécifique à chaque instant d'évaluation, selon l'équation suivante :

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

où  $D_{ST}$  = pourcentage d'élimination primaire de la substance d'essai à l'instant t ;  
 $S_i$  = concentration mesurée ou estimée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai (mg/l) ;

$S_e$  = concentration mesurée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai à l'instant  $t$  (mg/l).

55. En mode couplé, compenser la dilution de la substance d'essai dans le récipient d'aération, occasionnée par l'échange de boues, par un facteur de correction (voir annexe 3). Si on a appliqué un temps de rétention hydraulique moyen de six heures et échangé la moitié du volume de boues activées contenu dans le récipient d'aération, il faut corriger les valeurs déterminées de l'élimination quotidienne ( $D_t$ , paragraphe 52) afin d'obtenir le degré réel d'élimination,  $D_{tc}$ , de la substance d'essai, à partir de l'équation suivante :

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

### Expression des résultats de l'essai

56. Tracer une courbe des pourcentages d'élimination  $D_t$  (ou  $D_{tc}$ ) et  $D_{st}$ , le cas échéant, en fonction du temps (voir annexe 2). Certaines conclusions peuvent être tirées de l'allure de la courbe d'élimination de la substance d'essai (proprement dite ou à travers le COD) sur le processus d'élimination.

### **Adsorption**

57. Si l'on observe une élimination élevée de la substance d'essai en termes de COD dès le début de l'essai, cette substance est probablement évacuée par adsorption sur les solides des boues activées. Il est possible de prouver ce phénomène en mesurant la substance d'essai adsorbée au moyen d'une analyse spécifique. Il est rare que l'élimination du COD de substances adsorbables demeure élevée tout au long de l'essai ; normalement, le degré d'élimination est élevé au départ puis décline progressivement jusqu'à une valeur d'équilibre. Si toutefois la substance d'essai était de nature à acclimater la population de micro-organismes d'une façon ou d'une autre, l'élimination du COD de la substance d'essai augmenterait pour atteindre une valeur plateau élevée.

### **Phase de latence**

58. Beaucoup de substances d'essai, comme cela se produit dans les essais de sélection statiques, traversent une phase de latence avant que la biodégradation n'opère à plein régime. Durant la phase de latence, les bactéries qui dégradent s'acclimatent ou s'adaptent et n'éliminent presque pas la substance d'essai, ensuite elles commencent à croître. Cette phase s'achève et la phase de dégradation est censée débiter lorsque environ 10 pour cent de la quantité initiale de la substance d'essai est éliminée (y compris par adsorption, le cas échéant). La phase de latence est souvent très variable et peu reproductible.

### **Phase plateau**

59. Le plateau de la courbe d'élimination d'un essai conduit en continu est défini comme la phase au cours de laquelle la dégradation est maximale. La phase plateau doit durer au moins trois semaines et être déterminée par une quinzaine de valeurs mesurées valables.

### **Degré moyen d'élimination de la substance d'essai**

60. Calculer la moyenne des valeurs d'élimination ( $D_t$ ) de la substance d'essai durant la phase plateau. Arrondie au nombre entier le plus proche (1%), elle représente le degré d'élimination de la substance d'essai. On recommande également de calculer l'intervalle de confiance à 95% de la valeur moyenne.

### **Élimination du milieu organique**

61. Porter sur un graphique le pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique dans l'unité témoin ( $D_B$ ) en fonction du temps. Indiquer le degré d'élimination moyen comme pour la substance d'essai (paragraphe 60).

### **Indication de la biodégradation**

62. Si la substance d'essai n'est pas adsorbée de façon significative sur les boues activées et que la courbe d'élimination présente le profil typique d'une courbe de biodégradation avec phase de latence, dégradation et plateau (paragraphe 58, 59), l'élimination mesurée est attribuable à coup sûr à la biodégradation. Si l'élimination est élevée au début, l'essai de simulation ne permet pas de faire la distinction entre les processus d'élimination biologiques et non biologiques. Dans ces cas-là, comme dans d'autres où la biodégradation suscite des doutes, (par exemple si on observe une séparation), analyser les substances d'essai adsorbées ou effectuer des essais de biodégradation statiques supplémentaires fondés sur des paramètres qui attestent clairement des processus biologiques. Il s'agit d'essais basés sur la consommation d'oxygène (301 C, 301 D et 301 F) ou sur la mesure de la production de dioxyde de carbone (301 B) ou de l'Essai au  $CO_2$  dans l'espace de tête de l'ISO (16), à conduire sur un inoculum préexposé provenant de l'essai de simulation. Si l'élimination du COD et de la substance proprement dite ont été mesurées, des différences significatives (le premier étant inférieur à la seconde) entre les pourcentages indiquent que les effluents renferment des produits organiques intermédiaires susceptibles d'être plus difficiles à dégrader que le composé parent.

### **Validité des résultats de l'essai**

63. L'obtention d'informations sur l'activité de biodégradation normale de l'inoculum est subordonnée à la détermination du degré d'élimination du milieu organique (paragraphe 53) dans l'unité témoin. L'essai est considéré comme valable si le degré d'élimination du COD ou de la DCO dans la ou les unités témoins est supérieur à 80 pour cent après deux semaines et qu'aucun phénomène inhabituel n'a été observé.

64. Si on a utilisé une substance de référence immédiatement biodégradable, le degré de biodégradation ( $D_t$ , paragraphe 52) doit être supérieur à 90 pour cent.

65. Si l'essai est mené dans des conditions nitrifiantes, la concentration moyenne dans les effluents doit être  $<1$  mg/l d'azote ammoniacal et  $<2$  mg/l d'azote sous forme de nitrites.

66. Faute de remplir ces critères (paragraphe 63-65), recommencer l'essai en prélevant l'inoculum à une source différente, mettre une substance de référence à l'essai et réexaminer tout le mode opératoire.

### **Rapport d'essai**

67. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes :

Substance d'essai :

- nature chimique ;
- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques.

## Conditions d'essai :

- type de système d'essai ; toute modification imposée par l'essai de substances insolubles et volatiles ;
- type de milieu organique ;
- proportion et nature des effluents industriels dans les eaux usées, s'ils sont connus ;
- inoculum, nature et site(s) de prélèvement, concentration et prétraitement éventuel ;
- solution mère de la substance d'essai : teneur en COD et en COT ; mode de préparation, s'il s'agit d'une suspension ; concentration d'essai appliquée ; justifier pourquoi, le cas échéant, on s'écarte de l'intervalle 10 à 20 mg de COD/l ; méthode d'addition ; date de la première addition ; toute modification ;
- âge moyen des boues et temps de rétention hydraulique moyen ; méthode d'épuisement des boues ; méthodes pour vaincre le foisonnement, pertes de boue, etc. ;
- techniques d'analyse employées ;
- température d'essai ;
- qualités du foisonnement des boues, indice des boues, matières en suspension de la liqueur mixte ;
- tout écart du mode opératoire normal et toute circonstance susceptibles d'avoir affecté les résultats.

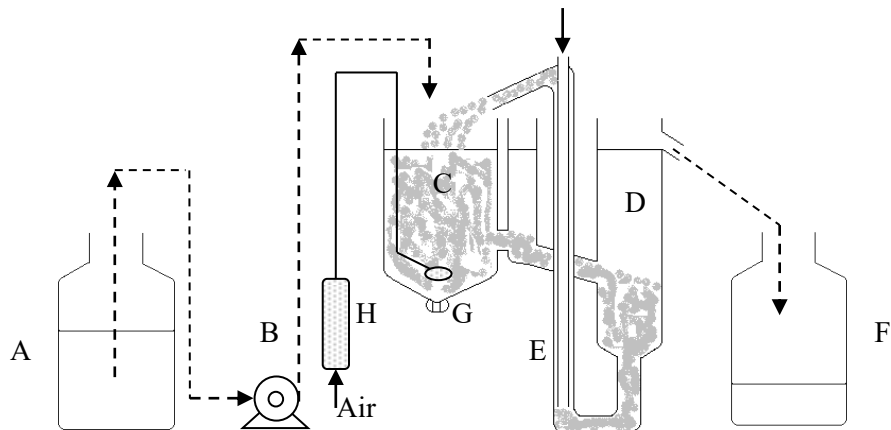
## Résultats de l'essai :

- toutes les données mesurées (COD, DCO, analyses spécifiques, pH, température, concentration d'oxygène, solides en suspension, substances azotées, le cas échéant ;
- toutes les valeurs calculées de  $D_t$  (ou  $D_{tc}$ ),  $D_B$ ,  $D_{St}$  présentées sous forme de tableau et de courbes d'élimination ;
- informations sur les phases de latence et de plateau, durée de l'essai, degré d'élimination de la substance d'essai et du milieu organique dans l'unité témoin, données statistiques, conclusions sur la biodégradabilité et validité de l'essai ;
- examen des résultats.

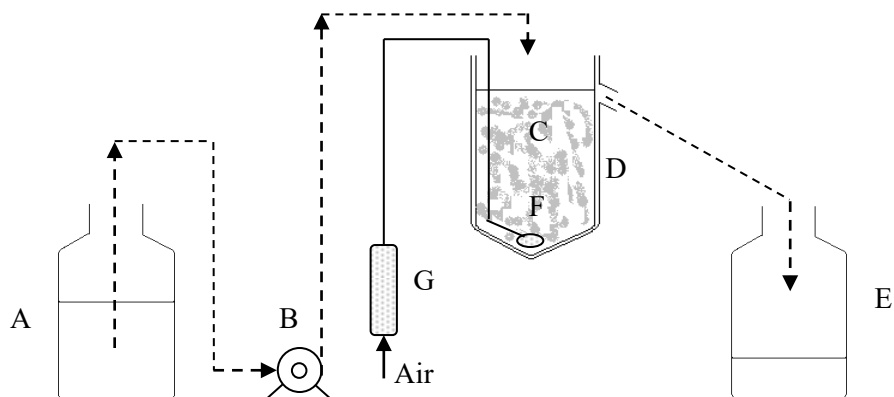
**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Swisher RD "Tensioactif Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp (1987).
- (2) German Government (1962) Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49:698-706.
- (3) Painter H A and King E F (1978,a) WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Eau Research Centre, Medmenham, UK.
- (4) Painter H A and King E F (1978,b) The effect of phosphate and temperature on growth of activated boue and on biodegradation of tensioactifs. Wat. Res., 12,909-915.
- (5) Eckenfelder, W.W (19) [to come from USEPA].
- (6) Gerike, P and Fischer, W K (1979) A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf., 3,157-173.

- (7) Gerike, P and Fischer, W K (1981), as (6), II Additional results and conclusions. *Ecotox. Env. Saf.*, 5, 45-55.
- (8) Painter, H A and Bealing, D (1989) Experience and data from the OECD activated boue simulation test. pp 113-138, In: *Laboratory tests for simulation of eau treatment processes*. CEC Eau Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau, H, Angeletti, G.
- (9) Ligne directrice 303A de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris (1981).
- (10) Organisation internationale de normalisation (ISO), ISO 11 733:1995 Qualité de l'eau – Évaluation de l'élimination et de la biodégradabilité des composés organiques en milieu aqueux – Essai de simulation des boues activées.
- (11) Birch, R R (1982) The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Español. *Deterg.*, 33-48.
- (12) Birch, R R (1984) Biodegradation of nonionic tensioactifs. *J.A.O.C.S.*, 61 (2) 340-343.
- (13) Gerike P, Fischer W K and Holtmann W (1980) Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. *Wat.Res.*, 14, 753-758.
- (14) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.*, 10, 214-220.
- (15) Her Majesty's Stationery Office (1982) Assessment of biodegradability. Methods for the examination of eaus and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.
- (16) Organisation internationale de normalisation (ISO), ISO 14 593:1999 Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (Essai au CO<sub>2</sub> dans l'espace de tête).

ANNEXE 1Figure 1 : Matériel utilisé pour évaluer la biodégradabilitéUnité d'Husmann

- |                                    |                     |
|------------------------------------|---------------------|
| A. Récipient de stockage           | E. Emulseur à air   |
| B. Pompe doseuse                   | F. Collecteur       |
| C. Récipient d'aération (3 litres) | G. Cube d'aération  |
| D. Décanteur                       | H. Débitmètre d'air |

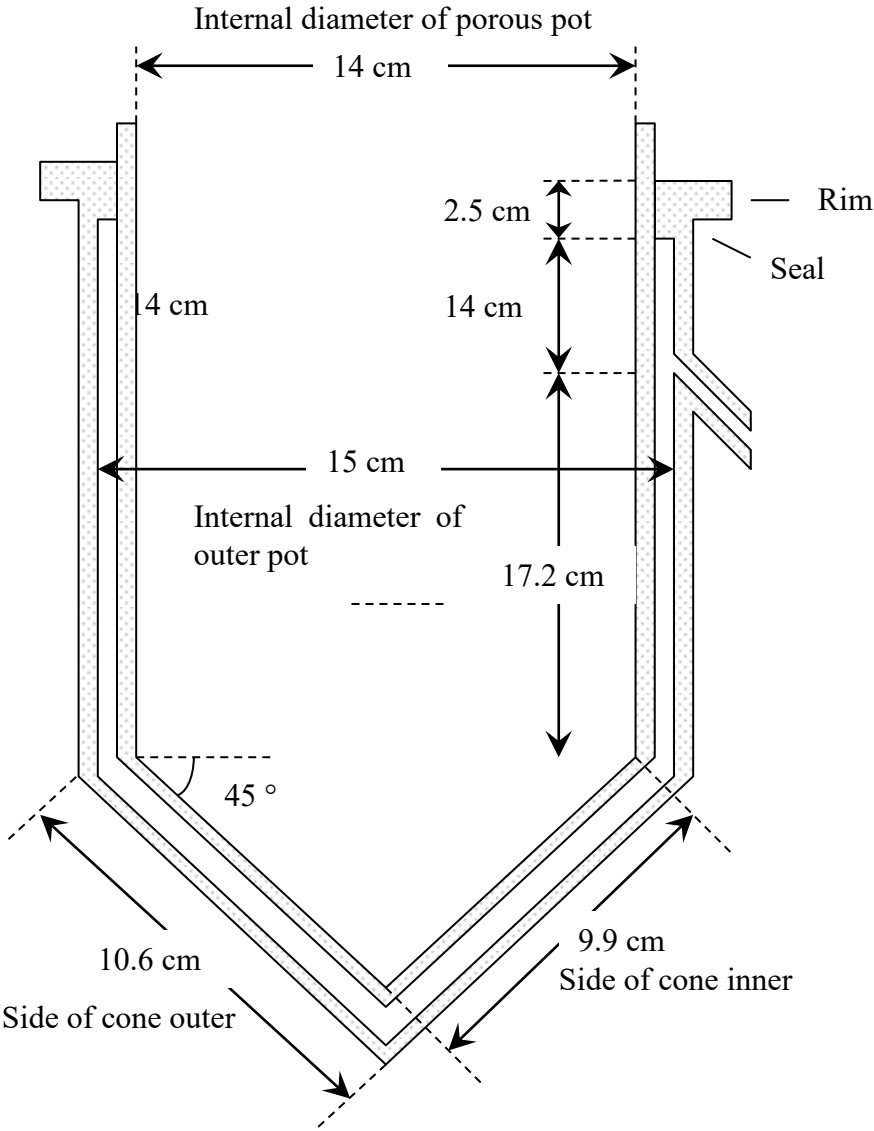
Figure 1 : Matériel utilisé pour évaluer la biodégradabilitéVase poreux

- |                           |                     |
|---------------------------|---------------------|
| A. Récipient de stockage  | E. Collecteur       |
| B. Pompe doseuse          | F. Diffuseur        |
| C. Vase d'aération poreux | G. Débitmètre d'air |
| D. Enveloppe imperméable  |                     |



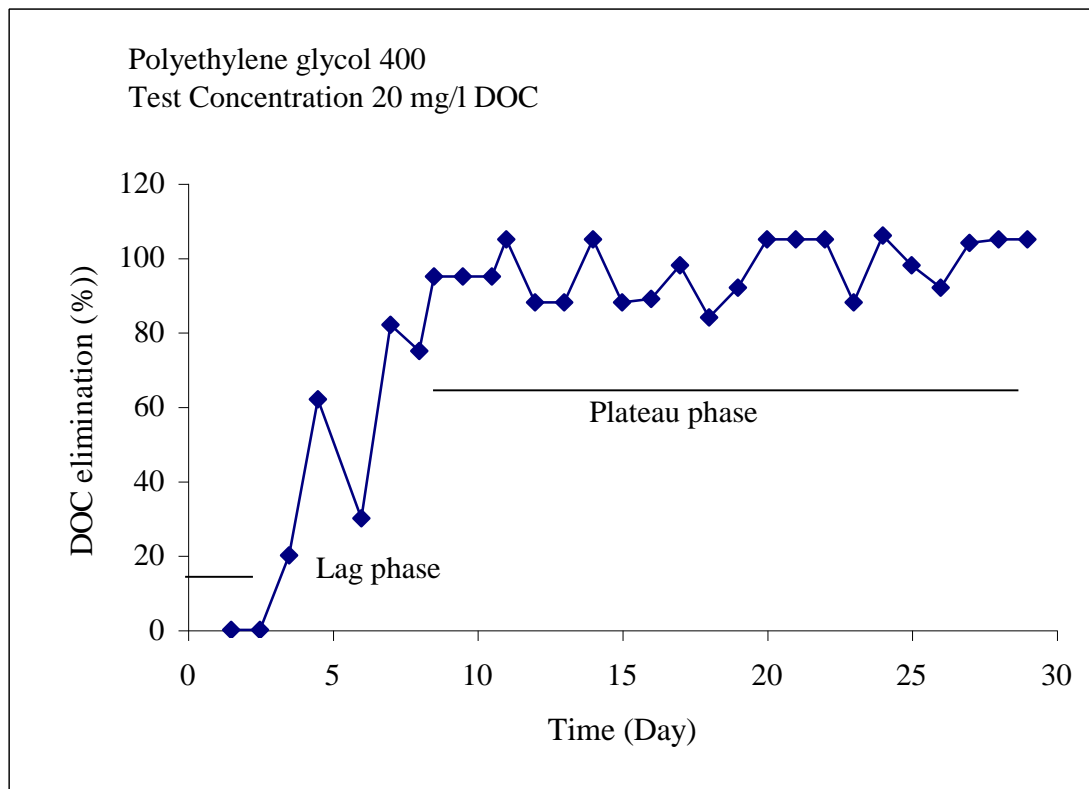
ANNEXE 1 (suite)

Figure 3 : Agrandissement du vase d'aération poreux de 3 litres



ANNEXE 2

## EXEMPLE D'UNE COURBE D'ÉLIMINATION



ANNEXE 3

## [COMPLÉMENT D'INFORMATION]

## COUPLAGE DES UNITÉS D'ESSAI

Pour tenter d'égaliser les populations de micro-organismes dans les boues de l'unité d'essai, qui reçoit les eaux usées et une substance d'essai, et de l'unité témoin, qui ne reçoit que les eaux usées, on a instauré un échange de boue quotidien entre ces deux unités (1). Ce procédé dit "de couplage" a donné lieu à la méthode des unités couplées. Le couplage, réalisé au départ sur des unités à boues activées de Husmann, a aussi été appliqué à des unités à vase poreux (2)(3). Les résultats obtenus avec les unités couplées et non couplées, qu'il s'agisse des unités d'Husmann ou des unités à vase poreux, ne donnent lieu à aucune différence significative, si bien qu'il n'y a aucun avantage à investir plus de temps et d'énergie dans le couplage.

Les échanges de boue peuvent laisser croire à une élimination assez considérable, puisqu'une partie de la substance d'essai est transférée et que l'écart entre la concentration de la substance d'essai dans les effluents d'essai et dans les effluents témoins se comble. Il faut donc appliquer des facteurs de correction qui dépendent de la fraction échangée et du temps de rétention hydraulique moyen. Une méthode de calcul plus détaillée a été publiée (1).

Calculer le degré d'élimination corrigé du COD ou de la DCO selon la formule générale suivante :

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12) \%$$

où

- $D_{tc}$  = pourcentage d'élimination corrigé du COD ou de la DCO ;
- $D_t$  = pourcentage d'élimination déterminé du COD ou de la DCO ;
- $a$  = fraction volumique échangée entre les unités à boues activées ;
- $r$  = temps de rétention hydraulique moyen (h).

Si, par exemple, la moitié du volume du récipient d'aération est échangée ( $a = 0,5$ ) et que le temps de rétention hydraulique moyen est de 6h, la formule de correction devient :

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

**Bibliographie**

- (1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W. (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. *Wat. Res.*, 9, 1131-1135.
- (2) Painter H.A., Bealing D.J. (1989). Experience and Data from the OECD Activated Boue Simulation Test. pp. 113-138. In: *Laboratory Tests for Simulation of Eau Treatment Processes CEC Eau Pollution Report 18*. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (3) Painter H.A., King E.F. (1978). *Eau Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability*. Technical Report TR70, Eau Research Centre, Stevenage, UK.

ANNEXE 4**ÉVALUATION DE L'INHIBITION DES BOUES ACTIVÉES PAR LES SUBSTANCES D'ESSAI**

1. Il se peut qu'une substance chimique (ou des eaux usées) ne soient ni dégradées ni éliminées au cours de l'essai de simulation et qu'elles inhibent de surcroît les micro-organismes des boues. D'autres composés chimiques sont biodégradés à faible concentration, mais ont une action inhibitrice à des concentrations supérieures (hormèse). Les effets inhibiteurs peuvent avoir été révélés à un stade précédent ou être déterminés par un essai de toxicité, conduit sur un inoculum semblable ou identique à celui utilisé au cours de l'essai de simulation. Ces méthodes ont trait à l'inhibition de la fixation d'oxygène - Ligne directrice 209 de l'OCDE et norme ISO 8192 - et à l'inhibition de la croissance des organismes des boues - norme ISO 15522 (à paraître).

2. Une inhibition survenant au cours d'un essai de simulation se manifestera par une différence de COD ou de DCO entre les effluents du récipient d'essai et ceux du récipient témoin supérieure au COD ajouté par la substance d'essai. En d'autres termes, la présence de la substance d'essai abaissera le pourcentage d'élimination du COD (et de la demande biochimique en oxygène DBO, de la demande chimique en oxygène DCO, et/ou de l'ion  $\text{NH}_4^+$ ) du milieu organique traité. Si cela se produit, il faudrait recommencer l'essai en ramenant la concentration de la substance d'essai jusqu'à un niveau où elle n'est pas inhibitrice et éventuellement aussi en diminuant davantage sa concentration jusqu'à une valeur où elle est biodégradée. Néanmoins, si la substance d'essai (ou les eaux usées) altèrent le processus à toutes les concentrations testées, il est vraisemblable que la substance est difficile, voire impossible, à traiter par voie biologique, mais il peut être pertinent de répéter l'essai avec des boues activées prélevées à une autre source et/ou en soumettant les boues à une acclimatation plus progressive.

3. Par contre, si la substance d'essai est éliminée par voie biologique du premier coup dans l'essai de simulation, il convient d'accroître sa concentration si l'on cherche à savoir si elle a un pouvoir inhibiteur.

4. N'oublions pas, lorsqu'on tente de déterminer les degrés d'inhibition, que la population d'une boue activée est susceptible d'évoluer, si bien qu'avec le temps, les micro-organismes peuvent devenir résistants vis-à-vis d'une substance inhibitrice.

5. Calcul du degré d'inhibition :

Les pourcentages d'élimination globaux  $R_o$  de la DBO, du COD, de la DCO etc., dans les unités d'essai et témoins peuvent être calculés comme suit :

$$R_o = 100 (I - E) / I \%$$

où : I = concentration de la DBO, du COD, de la DCO etc., dans les eaux à traiter des récipients d'essai ou témoins (mg/l)  
E = concentrations respectives dans les effluents (mg/l)

I et E doivent être corrigés pour tenir compte du COD provenant de la substance d'essai dans les unités d'essai, sinon le calcul du pourcentage d'inhibition sera incorrect.

Le degré d'inhibition découlant de la présence de la substance d'essai peut être calculé selon cette formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 (R_c - R_t) / R_c$$

où :  $R_c$  = pourcentage d'élimination dans les récipients témoins  
 $R_t$  = pourcentage d'élimination dans les récipients d'essai

### **Bibliographie**

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

ANNEXE 5**SUBSTANCES D'ESSAI PEU SOLUBLES DANS L'EAU – SUBSTANCES VOLATILES****Substances peu solubles dans l'eau**

Il semble qu'il y ait peu de publications rapportant des essais de simulation de traitement des eaux usées conduits sur des substances peu solubles dans l'eau et insolubles (1)(2)(3).

Il n'existe pas de méthode de dispersion universelle applicable à toutes les substances d'essai insolubles. Sur les quatre catégories de méthodes décrites dans la norme ISO 10 634 (4), les deux qui paraissent convenir à la dispersion des substances destinées à un essai de simulation font appel à des agents émulsifiants et/ou à des ultrasons. La stabilité de la dispersion obtenue doit être établie pour une période d'au moins 24 heures. Des dispersions convenablement stabilisées contenues dans des réservoirs agités en permanence (paragraphe 38), seront ensuite dosées dans le récipient d'aération séparément des eaux usées domestiques ou synthétiques.

Si les dispersions sont stables, étudier comment déterminer la substance d'essai sous sa forme dispersée. Comme le COD risque fort d'être inapproprié, il faudrait mettre au point une méthode d'analyse spécifique de la substance d'essai applicable aux effluents, aux solides des effluents et à la boue activée. Le devenir de la substance d'essai dans la simulation du traitement par boues activées serait alors déterminé dans les phases solides et liquides. On établirait ainsi un bilan massique pour savoir si la substance d'essai a été biodégradée. Mais ce dernier n'indique que la biodégradation primaire. Il faudrait tâcher de démontrer la biodégradation finale par le biais d'un essai de biodégradabilité immédiate au respiromètre (301 B, C ou F) en utilisant comme inoculum une boue exposée à la substance d'essai au cours de l'essai de simulation.

**Substances volatiles**

L'application d'un essai de simulation du traitement des eaux usées aux substances volatiles est discutable et problématique. Comme pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau, les rapports décrivant des essais de simulation sur des substances volatiles semblent très rares. On adapte un appareil classique de mélange intégral en bouchant hermétiquement le récipient d'aération et le décanteur, en mesurant et contrôlant le flux d'air par des débitmètres et en faisant passer les gaz sortants par des pièges afin de recueillir les matières organiques volatiles. Dans certains cas, une pompe à vide dirige les gaz sortants vers un piège froid ou un piège purgeur contenant du Tenax ou un gel de silice pour analyse par chromatographie en phase gazeuse. La substance d'essai retenue par le piège peut être déterminée par analyse.

L'essai est réalisé en deux parties. Les unités fonctionnent d'abord sans boue, mais en pompant les eaux usées synthétiques additionnées de la substance d'essai dans le récipient d'aération. On analyse la substance d'essai dans des échantillons d'eaux à traiter, d'effluents et de gaz sortants pendant quelques jours. À partir des données recueillies, il est possible de calculer le pourcentage ( $R_{vs}$ ) de substance d'essai extraite du système.

Ensuite l'essai biologique normal (avec boue) est mené dans des conditions expérimentales identiques à celles de l'étude d'extraction. On mesure aussi le COD ou la DCO pour s'assurer que les unités fonctionnent efficacement. La substance d'essai est mesurée de temps à autre dans les eaux à traiter, les effluents et les gaz sortants au cours de la première partie de l'essai, et plus fréquemment après

l'acclimatation. Les données tirées de la phase stationnaire permettent à nouveau de calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai dans la phase liquide par les processus physiques et biologiques ( $R_T$ ) ainsi que la proportion ( $R_V$ ) extraite du système.

Calcul :

- (a) Dans l'essai non biologique, le pourcentage ( $R_{VP}$ ) de substance d'essai extraite du système peut être calculé à partir de la formule suivante :

$$\% R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

- où
- $R_{VP}$  = élimination de la substance d'essai par volatilisation (%),
  - $S_{VP}$  = substance d'essai collectée par le piège, exprimée en équivalent de concentration dans la phase liquide (mg/l),
  - $S_{IP}$  = concentration de la substance d'essai dans les eaux à traiter (mg/l).

- (b) Dans l'essai biologique, le pourcentage ( $R_V$ ) de substance d'essai extraite du système peut être calculé à partir de la formule suivante :

$$\% R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

- où
- $R_V$  = élimination de la substance d'essai par volatilisation au cours de l'essai biologique (%)
  - $S_V$  = substance d'essai collectée par le piège au cours de l'essai biologique, exprimée en équivalent de concentration dans les flux liquides entrants (mg/l)
  - $S_I$  = concentration de la substance d'essai dans les eaux brutes (mg/l)

- (c) Dans l'essai biologique, le pourcentage ( $R_T$ ) de substance d'essai éliminée par tous les processus est régi par l'équation suivante :

$$R_T \% = 1 \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

- où  $S_E$  = concentration de la substance d'essai dans les effluents (liquides) (mg/l).

- (d) Aussi, le pourcentage ( $R_{BA}$ ) enlevé par biodégradation et par adsorption peut-il être calculé comme suit :

$$\% R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Il conviendrait de réaliser d'autres essais pour déterminer si la substance d'essai est adsorbée, auquel cas une correction supplémentaire pourrait être apportée.

- (e) Une comparaison entre la proportion de substance d'essai extraite lors de l'essai biologique ( $R_V$ ) et de l'essai non biologique ( $R_{VP}$ ) montre l'effet global du traitement biologique sur l'émission de la substance d'essai dans l'atmosphère.

Exemple : Benzène

Temps de rétention des boues = 4 jours

Eaux usées synthétiques : temps de rétention = 8 heures

$$\begin{aligned}S_{IP} &= S_I = 150 \text{ mg/l} \\S_{VP} &= 150 \text{ mg/l} (S_{EP} = 0) \\S_V &= 22.5 \text{ mg/l} \\S_E &= 50 \text{ }\mu\text{g/l}\end{aligned}$$

Donc,  $R_{VP} = 100\%$ ,  $R_V = 15\%$   
 $R_T = 100\%$  et  $R_{BA} = 85\%$ .

On a supposé qu'il n'y avait pas adsorption du benzène sur la boue.

### **Bibliographie**

- (1) Horn J.A., Moyer J.E., Hale J.H. (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ., 939-854.
- (2) Pitter P., Chudoba J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
- (3) Stover E.L, Kincannon D.F. (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste eaus. J. Wat. Pollut. Control Fed., 55, 97.
- (4) ISO 10634. (1995). Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.



ANNEXE 6**EFFETS DU TEMPS DE RÉTENTION DES BOUES (TRB) SUR LES POSSIBILITÉS DE TRAITEMENT DES SUBSTANCES CHIMIQUES**INTRODUCTION

1. La méthode décrite dans le corps de texte a été conçue pour vérifier si les substances chimiques testées (généralement celles connues comme étant intrinsèquement, mais pas immédiatement biodégradables) pouvaient être biodégradées dans les limites imposées par les stations d'épuration des eaux usées. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'élimination et de biodégradation. Les conditions de fonctionnement des unités à boues activées et le choix des eaux à traiter autorisent une variation assez marquée de la concentration de la substance d'essai dans les effluents. Les essais ne portent que sur une seule concentration nominale de solides des boues ou sur un seul temps de rétention nominal des boues (TRB), et les régimes d'épuisement des boues décrits sont susceptibles de faire varier considérablement le TRB durant l'essai, d'un jour à l'autre et sur une journée.

2. Dans cette variante (1)(2), le TRB est régulé dans des limites beaucoup plus étroites tout au long de chaque période de 24 heures (comme à grande échelle), si bien que la concentration des effluents est plus constante. On recommande les eaux usées domestiques, qui donnent des pourcentages d'élimination plus réguliers et plus élevés. Les effets de plusieurs valeurs du TRB sont aussi examinés et l'incidence d'une gamme de températures sur la concentration dans les effluents peut être déterminée dans une étude plus détaillée.

3. Il n'existe pas encore de consensus général sur les modèles cinétiques qui reproduisent la biodégradation des substances chimiques dans les conditions d'une station de traitement des eaux usées. S'agissant des données collectées, le modèle de croissance bactérienne et d'utilisation du substrat de Monod a été choisi (1)(2) dans la mesure où la méthode était destinée à ne s'appliquer qu'aux substances chimiques produites par tonnes et donc présentes à des concentrations supérieures à 1 mg/l dans les eaux usées. La validité du modèle simplifié et des hypothèses émises a été établie à l'aide d'une série d'alcooléthoxylates (2)(3) manifestant des degrés variables de biodégradabilité primaire.

Note. Cette variante reprend en grande partie le texte de la Ligne directrice 303 A, seuls les détails qui s'en écartent étant mentionnés ci-après.

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Des unités à boues activées comportant un vase poreux, conçues pour faciliter l'épuisement (presque) continu de la liqueur mixte grâce à un réglage très précis du temps de rétention des boues (TRB, ou  $\theta_s$ ), fonctionnent en mode non couplé et couvrent une gamme de temps de rétention et, facultativement, de températures. Le temps de rétention varie généralement entre 2 et 10 jours et la température entre 5 et 20°C. Les eaux usées, de préférence domestiques, et une solution de la substance d'essai sont dosées séparément dans les unités à des fréquences induisant le temps de rétention des eaux usées requis (3 à 6 heures) et la concentration voulue de la substance d'essai dans les eaux à traiter. Les unités témoins qui ne reçoivent pas la substance d'essai tournent en parallèle, à des fins de comparaison.

5. D'autres types d'appareils peuvent être utilisés, mais il faut être très attentif à bien maîtriser le TRB. Lorsqu'on utilise, par exemple, des installations qui comprennent un décanteur, il peut être nécessaire de tenir compte de la perte de solides via les effluents de l'installation. En outre, les erreurs dues à la variation de la quantité de boue dans le décanteur doivent être évitées par des précautions particulières.

6. Les unités fonctionnent sous chaque combinaison de conditions choisie et, une fois l'équilibre atteint, on mesure les concentrations moyennes de la substance d'essai dans les effluents à l'état stationnaire et, facultativement, le COD, sur une période d'environ trois semaines. L'évaluation du pourcentage d'élimination de la substance d'essai et, facultativement, du COD, sera complétée par une représentation graphique de la relation entre les conditions de fonctionnement de l'installation et la concentration dans les effluents. À partir de là, il est possible de calculer des constantes cinétiques expérimentales et de prévoir les conditions dans lesquelles la substance d'essai peut être traitée.

#### **INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI**

7. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphes 12 et 13.

#### **NIVEAUX DE SEUIL**

8. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphes 14 et 15.

#### **SUBSTANCE DE REFERENCE**

9. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphe 16.

#### **REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS D'ESSAI**

10. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphes 17 et 18.

#### **DESCRIPTION DE LA METHODE**

##### **Appareils**

11. Une unité qui convient ici est une adaptation du système du vase poreux (appendice 1). Elle consiste en un vase interne (ou revêtement) en polypropylène poreux de 3,2 mm d'épaisseur dont les pores mesurent environ 90 µm ; l'assemblage est soudé bout à bout, ce qui rend l'unité plus robuste que celle décrite au paragraphe 21 (303 A). Le revêtement est entouré d'une enveloppe en polyéthylène imperméable qui comprend deux parties : une base circulaire perforée pour laisser passer deux tuyaux à air et un tuyau transportant la boue épuisée, et un cylindre vissé sur le dessus de la base et doté d'une sortie placée de manière à ce qu'il déverse un volume connu (3 l) dans le vase poreux. L'un des deux tuyaux à air est équipé d'une pierre diffuseuse et l'autre est ouvert aux extrémités et disposé à angle droit de la pierre dans le vase. Ce système crée suffisamment de turbulences pour assurer un mélange intégral des composants du vase et engendrer des concentrations en oxygène dissous supérieures à 2 mg/l.

12. Les unités, en nombre adéquat, sont placées dans un bain-marie ou dans des locaux à température constante et thermostatées entre 5 et 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). On emploie deux pompes pour doser la solution de la substance d'essai et les boues décantées dans les récipients d'aération aux débits requis (respectivement 0-1,0 ml/min et 0-25 ml/min) et une troisième pompe pour évacuer la boue épuisée des récipients d'aération. Le débit nécessairement très lent des boues épuisées est imprimé par une pompe qui fonctionne à une vitesse supérieure et par intermittences, au moyen d'un minuteur qui l'actionne, par exemple, pendant 10 secondes par minute avec un débit de 3ml/min, ce qui donne un débit de boue épuisée de 0,5 ml/min.

##### **Appareil de filtration ou centrifugeuse**

13. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphe 23.

**Matériel d'analyse**

14. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphe 24.

**Eau**

15. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphes 25 et 26.

**Milieu organique**

16. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphe 27.

**Eaux usées synthétiques**

17. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphe 28.

**Eaux usées domestiques**

18. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphe 29.

**Boues activées**

19. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphe 30.

**Solutions mères de la substance d'essai**

20. Appliquer la Ligne directrice 303 A, paragraphes 31 et 32.

**MODE OPÉRATOIRE****Préparation de l'inoculum**

21. Voir Ligne directrice 303A, paragraphe 34 uniquement – utiliser des boues activées (environ 2,5 g/l).

**Nombre d'unités d'essai**

22. S'agissant d'un essai simple, qui ne vise qu'à mesurer le pourcentage d'élimination, un seul TRB suffit, mais si on veut réunir les données nécessaires pour calculer les constantes cinétiques expérimentales, on aura besoin de 4 ou 5 valeurs de TRB. Les valeurs choisies sont généralement comprises entre 2 et 10 jours. Il est plus pratique de réaliser un essai en appliquant 4 ou 5 valeurs de TRB simultanément à la même température ; les études plus poussées portent sur les mêmes valeurs de TRB, ou éventuellement sur une gamme de valeurs différentes, à d'autres températures fixées entre 5 et 20°C. La biodégradation primaire (utilisation principale) ne requiert normalement qu'une seule unité par combinaison de conditions. Il faut ajouter une unité témoin par combinaison de conditions, qui reçoit les eaux usées mais pas la substance d'essai, pour la biodégradation finale. Si on suppose que les eaux usées employées renferment la substance d'essai, il y a lieu d'incorporer des unités témoins lorsqu'on évalue la biodégradation primaire, et d'apporter les corrections nécessaires aux calculs.

**Dosage du milieu organique et de la substance d'essai**

23. Voir la Ligne directrice 303A, paragraphes 36-39, mais remarquer que la solution de la substance d'essai est dosée séparément et différents débits de boues épuisées sont appliqués. Surveiller fréquemment, par exemple deux fois par jour et ajuster si nécessaire à  $\pm 10$  pour cent, les débits des eaux à traiter, des effluents et des boues épuisées. Si les méthodes d'analyse posent des difficultés avec les eaux usées domestiques, mener l'essai avec de l'eau usée synthétique, en s'assurant que différents milieux donnent des résultats cinétiques comparables.

**Manipulation des boues activées**

24. S'aligner sur la Ligne directrice 303 A, paragraphes 40-43, mais ne réguler le TRB que par un débit "constant" de boues épuisées.

**Échantillonnage et analyse**

25. Se référer à la Ligne directrice 303 A, paragraphes 44-50, à cette exception près qu'on déterminera la concentration de la substance d'essai et, facultativement, le COD, mais la DOC ne doit pas être utilisée.

**RÉSULTATS ET RAPPORT****Traitement des résultats**

26. Suivre la Ligne directrice 303A, paragraphes 52-54.

**Expression des résultats de l'essai**

27. Suivre la Ligne directrice 303A, paragraphes 56-62.

**Calcul des constantes cinétiques**

28. Il est plus réaliste de mentionner la concentration moyenne de la substance d'essai à l'état stationnaire dans l'effluent et de décrire comment elle varie en fonction des conditions de fonctionnement de l'installation que de citer le pourcentage de biodégradation primaire. L'équation (6) de l'appendice 2 est utile à cet égard, qui livre des valeurs de  $K_S$ ,  $\mu_m$  et  $\theta_{SC}$ , le temps de rétention critique des boues.

[Des valeurs approximatives de  $K_S$  et de  $\mu_m$  peuvent aussi être déduites à l'aide d'un programme informatique simple qui ajuste la courbe théorique calculée à partir de l'équation (2) (appendice 2) aux valeurs expérimentales. Bien qu'une solution donnée ne constitue pas une réponse absolue, on peut parvenir à une approximation raisonnable de  $K_S$  et de  $\mu_m$ ]

**Variabilité des résultats**

29. Il est fréquent de trouver des paramètres cinétiques variables pour une même substance. On pense que les conditions de croissance des boues et les conditions dans lesquelles s'est déroulé l'essai (comme au paragraphe 5 et dans d'autres essais) ont une incidence marquée sur les résultats. Un aspect de cette variabilité a été examiné par Grady et al (4), qui ont proposé que les termes "effectif" et "intrinsèque" s'appliquent à deux états extrêmes représentant les limites de l'état physiologique qu'une culture peut atteindre au cours d'une expérience cinétique. Si l'état est maintenu durant l'essai, les valeurs du paramètre cinétique reflètent les conditions du milieu dans lequel les micro-organismes ont été prélevés ; ces valeurs

sont dites "effectives". À l'autre extrême, si les conditions de l'essai autorisent le plein développement du système de synthèse des protéines et donc un taux de croissance maximum, les paramètres cinétiques résultants sont dits "intrinsèques" et ne dépendent que de la nature du substrat et des types de bactéries qui composent la culture. À titre indicatif, on obtiendra des valeurs effectives en appliquant un rapport de la concentration du substrat sur les micro-organismes qui dégradent ( $S_0/X_0$ ) faible, par exemple de 0,025, et les valeurs intrinsèques apparaîtront avec un rapport élevé, par exemple d'au moins 20. Dans les deux cas,  $S_0$  doit être supérieur ou égal à la valeur applicable de  $K_s$ , la constante de demi-saturation.

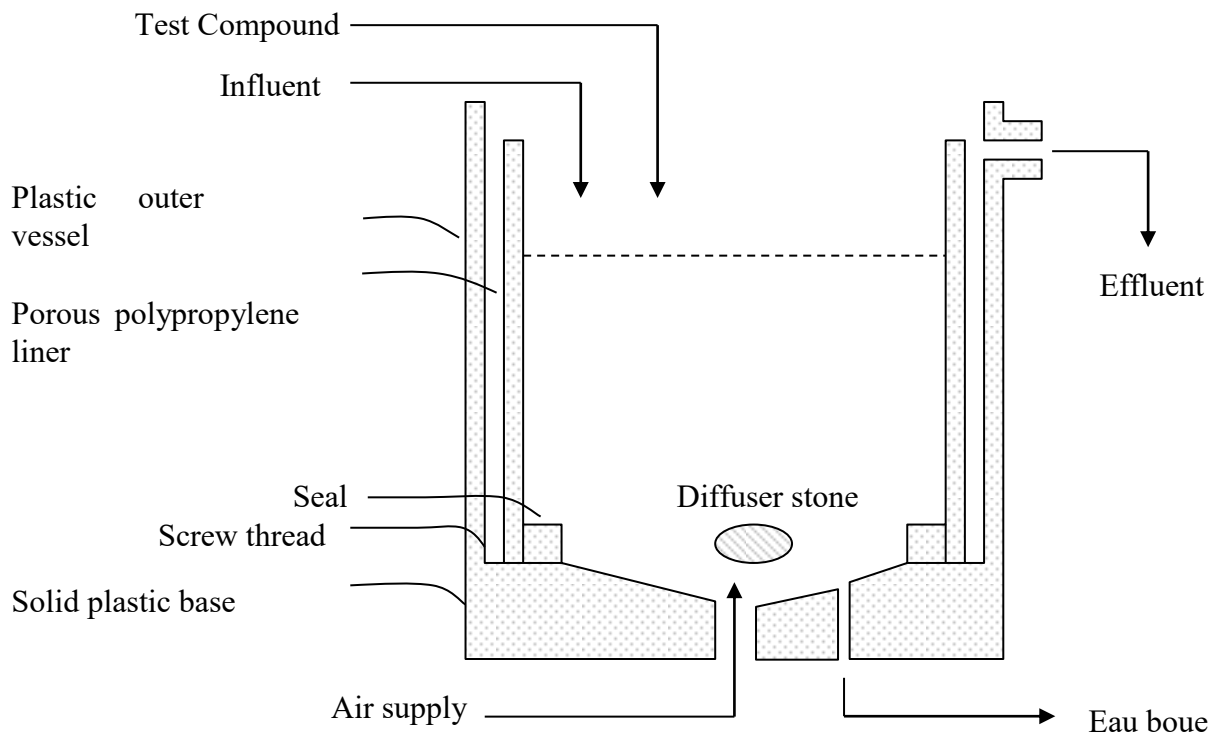
30. La variabilité et d'autres aspects de la cinétique de biodégradation ont été examinés lors d'une réunion récente du SETAC (5). Qu'elles aient fait l'objet de publications ou qu'il s'agisse de projets, ces études devraient bientôt livrer une image plus claire de la cinétique qui gouverne le traitement des eaux usées dans les stations et permettre ainsi de mieux interpréter les données existantes et d'avancer des conceptions plus pertinentes concernant de futures lignes directrices pour les essais.

### **Bibliographie**

- (1) Birch R R (1982) The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg., 33-48.
- (2) Birch R R (1984) Biodegradation of nonionic tensioactifs. J.A.O.C.S., 61(2) 340-343.
- (3) Birch R R (1991) Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50, 411-422.
- (4) Grady, CPL. Smets, BF. and Barbeau DS. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3) 742-748
- (5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6<sup>th</sup> Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

Appendice 1

Vase poreux avec régulation du TRB



Appendice 2

Calcul des constantes cinétiques

1. En supposant que la cinétique de Monod s'applique et compte tenu d'un bilan massique de solides actifs et de substrat dans le système à boues activées (1), les expressions suivantes décrivent l'état stationnaire :

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

ou

$$S_1 = \frac{K_s (1 + K_d \theta_s)}{\theta_s (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

- où
- $S_1$  = concentration de substrat dans les effluents, (mg/l)
  - $K_s$  = constante de demi-saturation, concentration à laquelle  $\mu = \mu_m/2$  (mg/l)
  - $\mu$  = taux de croissance spécifique ( $d^{-1}$ )
  - $\mu_m$  = valeur maximale de  $\mu$  ( $d^{-1}$ )
  - $K_d$  = vitesse de dégradation spécifique des solides actifs ( $d^{-1}$ )
  - $\theta_s$  = temps de rétention moyen des boues, SRT (d)

L'étude de cette équation amène les conclusions suivantes :

- (i) La concentration dans les effluents est indépendante de celle qui règne dans les eaux à traiter ( $S_0$ ) ; aussi le pourcentage de biodégradation varie-t-il en fonction de la concentration dans les eaux à traiter  $S_0$ .
- (ii) Le seul paramètre réglé de l'installation qui affecte  $S_1$  est le temps de rétention des boues,  $\theta_s$ .
- (iii) Une concentration donnée dans les eaux à traiter,  $S_0$ , correspondra à un temps de rétention critique des boues selon la relation :

$$\frac{1}{\theta_{sc}} = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

où  $\theta_{sc}$  = temps de rétention critique des boues, en dessous duquel les micro-organismes qui dégradent seront expulsés de l'installation.

- (iv) Comme les autres paramètres de l'équation (2) sont liés à la cinétique de croissance, la température est susceptible d'affecter la teneur en substrat dans les effluents et l'âge critique des boues, en d'autres termes, le temps de rétention des boues nécessaire pour obtenir un certain degré de traitement augmenterait à mesure que la température diminuerait.

2. Soit un bilan massique de solides dans le système à vase poreux, et en supposant que la concentration des solides dans les effluents de la station,  $X_2$ , est faible comparée à celle du récipient d'aération,  $X_1$ , le temps de rétention des boues s'exprime comme suit :

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

et

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

où  $V$  = volume du récipient d'aération (l)

$X_1$  = concentration des solides dans le récipient d'aération (mg/l)

$X_2$  = concentration des solides dans l'effluent (mg/l)

$Q_0$  = débit des eaux à traiter (l/d)

$Q_1$  = débit des boues épuisées (l/d)

Il est donc possible de régler le temps de rétention des boues sur n'importe quelle valeur présélectionnée en régulant le débit des boues épuisées,  $Q_1$ .

### Conclusions

3. Cet essai vise principalement à permettre de prédire la concentration dans les effluents et, à partir de là, la concentration de la substance d'essai dans les eaux réceptrices.

4. La courbe de  $S_1$ , en fonction de  $\theta_s$ , autorise parfois une évaluation immédiate de  $\theta_{SC}$ , le temps de rétention critique des boues, voir par exemple la courbe 3 à la figure 1. Si c'est impossible, on peut calculer  $\theta_{SC}$  en même temps que des valeurs approximatives de  $\mu_m$  et de  $K_s$ , en portant sur un graphique  $S_1$  en fonction de  $S_1 \cdot \theta_s$ .

L'équation (1) est reformulée en ces termes :

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

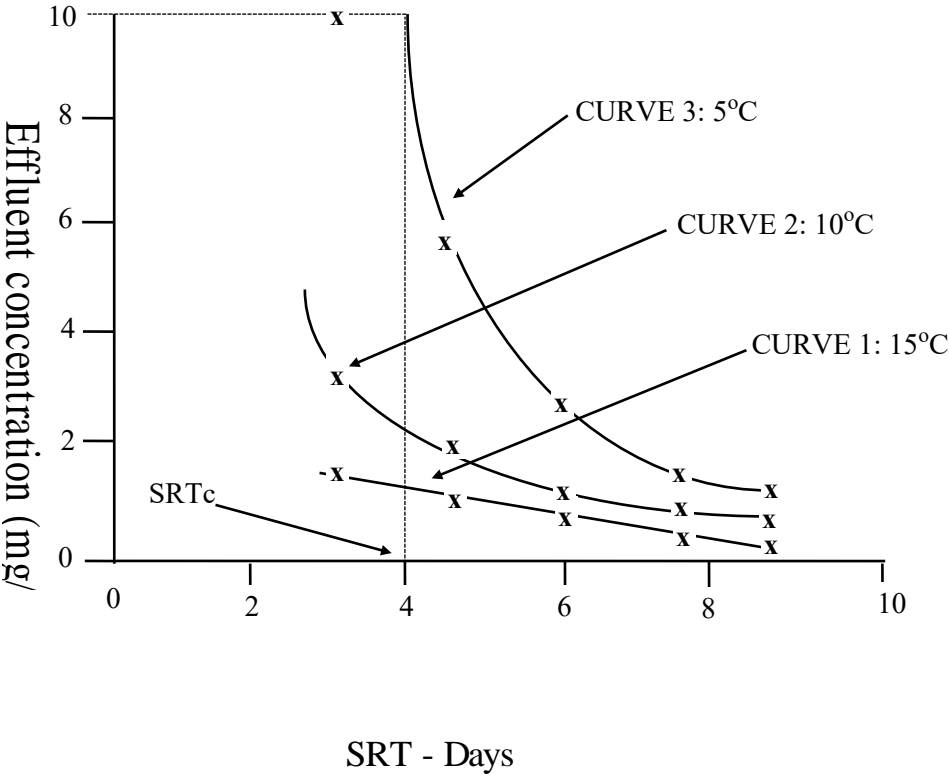
Si  $K_d$  est petit, alors  $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$  et [5] devient :

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

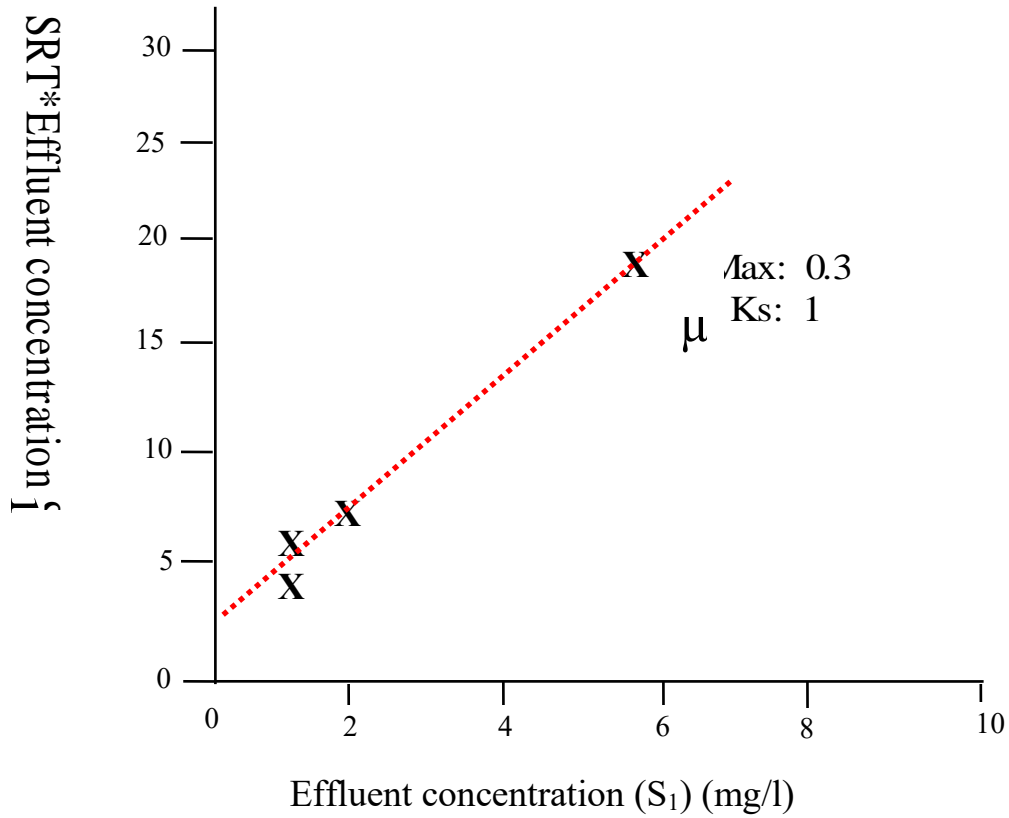
Par suite, la courbe devrait prendre l'allure d'une droite (voir figure 2) de pente  $1/\mu_m$  et intercepter  $K_s/\mu_m$  ; et  $\theta_s \sim 1/\mu_m$ .



Figure 1 : Trois températures ; cinq TRB



**Figure 2 :** Droite de régression TRB · S<sub>1</sub> en fonction de S<sub>1</sub> à T = 5° C



ANNEXE 7**ESSAIS RÉALISÉS À FAIBLES CONCENTRATIONS ( $\mu\text{g/l}$ )**

1. De nombreuses substances chimiques sont normalement présentes dans le milieu aquatique, même dans les eaux usées, à de très faibles concentrations ( $\mu\text{g/l}$ ). À de telles teneurs, elles ne servent probablement pas de substrats primaires pour la croissance, et il est plus vraisemblable qu'elles subissent une dégradation en tant que substrats secondaires sans intervenir dans la croissance, parallèlement à divers composés carbonés naturels. Par conséquent, les dégradations de ces substances chimiques ne correspondront pas au modèle décrit à l'annexe 6. De nombreux modèles pourraient les représenter et, dans les conditions qui régissent les systèmes de traitement des eaux usées, celles-ci peuvent probablement se refléter simultanément dans plusieurs modèles. Il faudra entreprendre des recherches bien plus poussées pour élucider ce problème.

2. En attendant, le mode opératoire exposé dans le corps de texte (303A) peut être suivi, mais il ne s'applique qu'à la biodégradabilité primaire, à des concentrations suffisamment basses ( $<100 \mu\text{g/l}$ ), et requiert une méthode d'analyse validée. Le pourcentage de biodégradation peut être calculé (voir au paragraphe 54 de la Ligne directrice), mais à condition de tenir compte des processus non biologiques (adsorption, volatilité, etc.). L'étude conduite par Nyholm et son équipe (1)(2) sur un cycle de quatre heures dans un système à lit de contact en est un exemple. Ils ont opposé des pseudo-constantes de premier ordre pour cinq substances chimiques ajoutées à des eaux usées synthétiques à raison de 5 à  $100 \mu\text{g/l}$  (s'agissant de la biodégradabilité finale, des substances d'essai marquées au  $^{14}\text{C}$  peuvent être utilisées). La description d'un procédé n'entre pas dans le cadre de la présente Ligne directrice dans la mesure où aucun ne fait encore l'unanimité, bien qu'une méthode proposée pour la norme ISO 14592 (3) contienne des indications concernant l'emploi de substances marquées au  $^{14}\text{C}$ .

**Essai de biodégradation en semi-continu à l'aide de boues activées**

3. Un essai plus simple en deux étapes a été présenté ultérieurement (4)(5)(6) ; la méthode en semi-continu à l'aide de boues activées (SCBA) est suivie par des essais cinétiques à court terme pratiqués sur des échantillons prélevés dans les unités SCBA. Les débits de boues épuisées sont connus dans le système SCBA (contrairement à la méthode originale 302 A), qui est alimenté par des eaux usées synthétiques (formule de l'OCDE modifiée) ou par des eaux usées domestiques. Les eaux usées synthétiques ont été modifiées (à cause de la fluctuation du pH et de la mauvaise décantabilité des boues) par addition d'un tampon phosphate, d'un extrait de levure, de chlorure de fer (III) et de sels d'oligo-éléments, et leur DCO a été relevée jusqu'à environ  $750 \text{ mg/l}$  moyennant une augmentation de la concentration de peptone et d'extrait de viande. Les unités tournaient en cycles de 24 heures : aération pendant 23 heures, épuisement des boues, décantation, enlèvement du surnageant (effluent), suivis par l'adjonction des eaux usées synthétiques et de la substance d'essai jusqu'à  $100 \mu\text{g/l}$  (c'est-à-dire à peu près la même concentration que celle appliquée dans l'essai à court terme). Une fois par semaine, on remplace 10 pour cent de la totalité des boues par des boues fraîches, afin de maintenir l'équilibre de la population de micro-organismes.

4. Les concentrations de la substance d'essai sont mesurées au début et à la fin de l'aération, et l'essai est poursuivi jusqu'à ce que l'élimination de la substance d'essai devienne constante, ce qui peut prendre une semaine à plusieurs mois.

**Essai à court terme**

5. Pratiquer un essai à court terme (8 heures, par exemple), afin de déterminer la pseudo-constante cinétique de premier ordre relative à la dégradation de la substance d'essai dans des boues activées ayant des origines et des évolutions différentes, mais connues. En particulier, prélever des échantillons de boues des réacteurs SCBA – à la fin d'une période d'aération lorsque la concentration de substrat organique est basse – au cours d'un essai d'acclimatation (paragraphe 3, 4). On peut aussi prélever des boues d'une unité SCBA tournant en parallèle et non exposée à la substance d'essai, pour comparaison. Aérer des mélanges de boue et de substance d'essai incorporée à deux ou plusieurs concentrations comprises entre 1 et 50 µg/l, sans ajouter d'eaux usées synthétiques ni d'autre substrat organique. La substance d'essai restant en solution est mesurée à intervalles réguliers, par exemple toutes les heures, suivant la dégradabilité de la substance, durant une période qui n'excède pas 24 heures. Centrifuger les échantillons avant de les soumettre à une analyse appropriée.

**Calculs**

6. Les données provenant des unités SCBA servent à calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai (paragraphe 54). Une constante de vitesse moyenne,  $K_1$ , (établie en fonction de la concentration des solides en suspension) peut aussi être calculée à partir de la formule suivante :

$$K_1 = (1/t \ln \frac{C_e}{C_i}) / SS \text{ (l/g h)},$$

où

- t = durée d'aération (23h)
- $C_e$  = concentration à la fin de la période d'aération (µg/l)
- $C_i$  = concentration au début de l'aération (µg/l)
- SS = concentration des solides des boues activées (g/l)

7. Dans l'essai à court terme, tracer la courbe du logarithme de la concentration (%) restante en fonction du temps ; la pente de la partie initiale (10-50 pour cent de dégradation) de la courbe est équivalente à  $K_1$ , la pseudo-constante de premier ordre. Établir la constante en fonction de la concentration des solides des boues en divisant la pente par la concentration de ces solides. Le résultat indiqué doit préciser les concentrations initiales de la substance d'essai et des solides en suspension, le temps de rétention des boues, la charge et la source des boues ainsi que, le cas échéant, la préexposition à la substance d'essai.

**Variabilité des résultats**

8. La variabilité et d'autres aspects de la cinétique de biodégradation ont été examinés lors d'une réunion récente du SETAC (5). Qu'elles aient fait l'objet de publications ou qu'il s'agisse de projets, ces études devraient bientôt livrer une image plus claire de la cinétique qui gouverne le traitement des eaux usées dans les stations et permettre ainsi de mieux interpréter les données existantes et d'avancer des conceptions plus pertinentes concernant de futures lignes directrices pour les essais.

**Bibliographie**

- (1) Nyholm, N. Jacobsen, BN. Pedersen, BM. Poulsen, O. Dambourg, A. and Schultz, B. (1992) Removal of micropollutants in laboratory activated boue reactors. Biodegradability. Wat. Res., 26, 339-353.

- (2) Jacobsen, BN. Nyholm, N. Pedersen, BM. Poulsen O, and Ostfeldt, P. (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated boue reactors under various operating conditions : Sorption. *Wat. Res.*, 27, 1505-1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/ SC5/ WG4, N264) (1998). Eau Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in eau.
- (4) Nyholm, N. Ingerslev, F. Berg, UT. Pedersen, JP and Frimer-Larsen H. (1996) Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated boue waste eau treatment plants using short-term batch experiments and  $\mu\text{g/l}$  range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5) 851-864.
- (5) Berg U.T. and Nyholm, N. (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated boue reactors with low ( $\mu\text{g/l}$  range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4) 711-735.
- (6) Agence danoise pour la protection de l'environnement (1996). Essai de simulation de la biodégradation par boues activées. Projet environnemental, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Ministère de l'Environnement et de l'Énergie, Copenhague.
- (7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6<sup>th</sup> Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

**303 B : Biofilms****INTRODUCTION**

1. Les essais de simulation s'appliquent normalement aux substances chimiques qui ont donné un résultat négatif à l'essai de biodégradabilité immédiate (301 A à F), mais un résultat positif à l'essai de biodégradabilité intrinsèque. Exceptionnellement, les essais de simulation se pratiquent aussi en vue d'obtenir des informations supplémentaires sur une substance, en particulier les composés chimiques produits en grandes quantités, et l'on recourt normalement à l'essai de traitement par boues activées (303 A). Toutefois, dans certaines circonstances, il y a lieu de connaître certaines données particulières concernant la réaction d'une substance chimique à des méthodes de traitement des eaux usées comportant des biofilms, à savoir des lits à ruissellement ou lits bactériens, des disques biologiques et des lits fluidisés. Différents dispositifs ont été créés à cette fin.

2. Gerike et al (1) ont utilisé de grands lits bactériens en mode couplé à l'échelle pilote. Ces lits occupaient beaucoup d'espace et exigeaient des volumes relativement élevés d'eaux usées domestiques ou synthétiques. Truesdale et al (2) ont décrit des lits plus petits (1,83 m x 0,15 m de diamètre) alimentés par des eaux usées naturelles dépourvues de tensioactifs, mais qui demandaient encore des volumes assez importants. Il ne fallait pas moins de 14 semaines pour qu'un biofilm arrive à "maturité" et 4 à 8 semaines supplémentaires après la première introduction du tensioactif d'essai pour l'acclimatation.

3. Baumann et al (3) ont mis au point un lit beaucoup plus petit à base de polyester "velu" préalablement plongé dans des boues activées, servant de substrat inerte pour le biofilm. La substance d'essai constituait la seule source de carbone et la biodégradabilité était évaluée d'après la mesure du carbone organique dissous (COD) dans les eaux à traiter et les effluents, et la quantité de CO<sub>2</sub> dans les dégagements gazeux.

4. Une approche assez différente a été tentée par Gloyna et al (4), qui ont inventé le réacteur tubulaire rotatif. Ils ont cultivé un biofilm sur la surface interne d'un tube rotatif, sur la superficie connue, en y faisant passer des eaux à traiter qu'ils déversaient au sommet du tube légèrement incliné par rapport à l'horizontale. Le réacteur a servi à étudier la biodégradabilité des tensioactifs (5) ainsi que l'épaisseur optimale du biofilm et la diffusion à travers le film (6). Ces auteurs ont perfectionné le réacteur, notamment pour pouvoir déterminer le CO<sub>2</sub> dans les dégagements gazeux.

5. Le réacteur tubulaire rotatif a été adopté par le Standing Committee of Analysts (Royaume-Uni) comme méthode de référence pour évaluer la biodégradabilité des substances chimiques (7) ainsi que les possibilités de traitement des eaux usées et leur toxicité (8). La méthode décrite ici est simple, concise et reproductible et, de surcroît, ne nécessite que des volumes relativement petits de milieu organique.

**PRINCIPE DE L'ESSAI**

6. Des eaux usées synthétiques ou domestiques et la substance d'essai sont appliquées, séparément ou incorporées, sur la surface interne d'un tube incliné en rotation lente. Une couche de micro-organismes, semblables à ceux présents dans le milieu du biofiltre, se développe sur la surface interne. Le fonctionnement du réacteur est régulé de telle sorte qu'il entraîne une élimination adéquate de la matière organique et, si nécessaire, l'oxydation de l'ammonium.

7. Les effluents du tube sont collectés et décantés et/ou filtrés avant l'analyse du carbone organique dissous (COD) et/ou de la substance d'essai par une méthode spécifique. Les unités témoins, qui ne reçoivent pas la substance d'essai, tournent en parallèle dans les mêmes conditions, à des fins de comparaison. La différence entre les concentrations de COD dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin est imputée par hypothèse à la substance d'essai et à ses métabolites organiques. On compare cette différence à la concentration de la substance d'essai ajoutée (en termes de COD) pour calculer l'élimination de la substance d'essai.

8. Il est normalement possible de distinguer la biodégradation de la bioadsorption par un examen attentif de la courbe d'élimination en fonction du temps. L'observation peut généralement être confirmée par un essai de biodégradabilité immédiate (consommation d'oxygène ou production de dioxyde de carbone) réalisé à l'aide d'un inoculum acclimaté prélevé à la fin de l'essai dans les réacteurs qui reçoivent la substance d'essai.

### **INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI**

9. La pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai doivent être connues pour que l'interprétation des résultats soit correcte.

10. Normalement les substances volatiles et peu solubles ne peuvent être mises à l'essai sans précautions particulières (voir annexe 5, 303 A). Il faudrait connaître également la formule chimique développée ou, au moins, empirique, pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la demande théorique en oxygène (DthO) et le carbone organique dissous (COD).

11. Des données sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (voir annexe 4, 303 A) peuvent aussi être utiles à la sélection des concentrations d'essai appropriées et essentielles pour l'interprétation correcte de faibles valeurs de biodégradation.

### **NIVEAUX DE SEUIL**

12. À l'origine, la mise sur le marché des tensioactifs était subordonnée à un taux de biodégradation primaire supérieur ou égal à 80 pour cent. Faute d'atteindre un taux de 80 pour cent, on peut mener cet essai de simulation (de confirmation) à l'issue duquel le tensioactif ne sera mis sur le marché que s'il est éliminé à plus de 90 pour cent. En général, avec les produits chimiques, la question d'un résultat d'essai positif ou négatif n'entre pas en jeu, et le pourcentage d'élimination obtenu peut servir à calculer en gros la concentration probable dans l'environnement à introduire dans l'évaluation des risques dus aux substances chimiques. Le pourcentage d'élimination du COD atteint dans plusieurs études sur des substances chimiques pures était supérieur à 90 pour cent pour plus des trois quarts des produits chimiques présentant un degré de biodégradabilité significatif et supérieur à 80 pour cent pour plus de 90 pour cent d'entre eux.

### **SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE**

13. Pour s'assurer que le mode opératoire est correctement suivi, il est quelquefois utile de tester des substances dont le comportement est connu. Il s'agit notamment de l'acide adipique, du 2-phénylphénol, du 1-naphthol, de l'acide diphénique, de l'acide 1-naphthoïque.

**REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS D'ESSAI**

14. L'écart-type obtenu par un laboratoire britannique s'élevait à 3,5% au moment des essais et à 5% entre les essais (7).

**DESCRIPTION DE LA MÉTHODE****Appareils****Réacteurs tubulaires rotatifs**

15. L'appareil (voir figures 1 et 2 en annexe) consiste en une batterie de tubes en acrylique de 30,5 cm de long et 5 cm de diamètre interne, supportés par des roulettes entourées de caoutchouc, fixées sur un cadre métallique. Chaque tube s'accroche aux roulettes par un bourrelet extérieur de 0,5 cm d'épaisseur environ, et possède un bourrelet interne de la même épaisseur à l'extrémité supérieure (d'alimentation) pour retenir le liquide ; la surface interne a été rendue rugueuse par un tampon de laine à poils épais. Les tubes sont inclinés à un angle d'environ un degré par rapport à l'horizontale pour que le milieu d'essai appliqué sur un tube propre reste en contact avec celui-ci le temps nécessaire. Les roulettes revêtues de caoutchouc sont actionnées par un moteur lent à vitesse variable. La température des tubes est régie par leur installation dans un local à température constante.

16. En enfermant chaque réacteur tubulaire dans un tube légèrement plus grand et fermé par un capuchon en veillant à ce que les connexions soient étanches aux gaz, on peut collecter les dégagements de CO<sub>2</sub> dans une solution alcaline en vue de mesures ultérieures (6).

17. Chaque tube est alimenté en milieu organique et en substance d'essai, le cas échéant, par un réservoir de 20 litres (A)(voir figure 2) pour une période de 24 heures. Si nécessaire, la solution de la substance d'essai peut être dosée séparément. Il existe un orifice de sortie situé près du fond de chaque réservoir connecté par un tuyau fait d'une matière appropriée, par exemple du caoutchouc de silicone, via une pompe péristaltique (B) à un tube en verre ou en acrylique qui s'enfonce sur 2 à 4 cm à l'intérieur de l'extrémité supérieure (d'alimentation) du tube incliné (C). L'effluent s'égoutte ainsi de l'extrémité inférieure du tube incliné dans un autre récipient de stockage (D). L'effluent est décanté ou filtré avant analyse.

**Appareil de filtration - centrifugeuse**

18. Les échantillons seront filtrés à travers une membrane possédant une porosité adéquate (diamètre d'ouverture nominale de 0,45 µm) qui adsorbe les composés organiques solubles et libère le moins possible de carbone organique. Si les lits utilisés libèrent du carbone organique, il faut les laver soigneusement à l'eau chaude afin d'évacuer le carbone organique lixiviable. Une centrifugeuse tournant à 40 000 m/s<sup>2</sup> peut remplacer l'appareil de filtration.

19. Matériel d'analyse permettant de déterminer :

- le carbone organique dissous (COD), le carbone organique total (COT), ou la demande chimique en oxygène (DCO) ;
- la substance donnée (CLHP, CG etc.) s'il y a lieu ;
- le pH, la température, l'acidité, l'alcalinité ;
- l'ammonium, les nitrites et les nitrates, si les essais sont réalisés dans des conditions nitrifiantes.



**Eau**

20. Eau du robinet renfermant moins de 3 mg/l de COD.
21. Eau distillée ou désionisée contenant moins de 2 mg/l de COD.

**Milieu organique**

22. Les eaux usées synthétiques, les eaux usées domestiques ou un mélange des deux sont acceptés comme milieu organique. Comme il a été démontré (8)(12) que les eaux usées domestiques employées seules augmentaient souvent le pourcentage d'élimination du COD (dans les unités à boues activées) et entraînaient même la biodégradation de certaines substances chimiques non biodégradées par les eaux usées synthétiques formulées selon l'OCDE, on préconise l'utilisation d'eaux usées domestiques. On mesure la concentration du COD ou de la DCO dans chaque nouveau lot de milieu organique. L'acidité ou l'alcalinité du milieu organique doivent être connues. Il peut être nécessaire de tamponner le milieu organique par un composé approprié (hydrogénocarbonate de sodium ou hydrogénophosphate de potassium) s'il est faiblement acide ou alcalin, pour maintenir le pH à environ  $7,5 \pm 0,5$  dans le réacteur durant l'essai. La quantité de tampon à ajouter et le moment de cette addition seront décidés au cas par cas.

**Eaux usées synthétiques**

23. Dans chaque litre d'eau du robinet, dissoudre 160 mg de peptone, 110 mg d'extrait de viande, 30 mg d'urée, 28 mg d'hydrogénophosphate de potassium anhydre ( $K_2HPO_4$ ), 7 mg de chlorure de sodium (NaCl), 4 mg de chlorure de calcium dihydraté ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) et 2 mg de sulfate de magnésium heptahydraté ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ). Cette eau usée synthétique formulée selon l'OCDE offre un exemple où la concentration moyenne de COD dans les eaux à traiter atteint quelque 100 mg/l. On utilisera en alternance d'autres compositions donnant à peu près la même concentration de COD, plus proches des eaux usées domestiques. Ces eaux usées synthétiques peuvent être confectionnées à base d'eau distillée, sous une forme concentrée, et stockées à environ 1 °C pendant une semaine au maximum. Selon les besoins, diluer avec de l'eau du robinet (ce milieu n'est pas satisfaisant, notamment parce qu'il présente une concentration en azote très élevée et une teneur en carbone relativement faible, mais rien de mieux n'a été suggéré, en dehors d'un supplément de tampon phosphate et de peptone).

**Eaux usées domestiques**

24. Utiliser des eaux usées qui viennent d'être décantées, recueillies quotidiennement dans une station d'épuration qui reçoit principalement des eaux usées domestiques. Elles doivent être prélevées au niveau du déversoir de la cuve de sédimentation primaire ou dans les eaux à traiter de la station de traitement par boues activées et renfermer très peu de grosses particules. Les eaux usées peuvent être utilisées après plusieurs jours de stockage à environ 4 °C, s'il est prouvé que le COD (ou la DCO) n'a pas diminué de manière significative (c'est-à-dire de moins de 20 pour cent) durant le stockage. Afin de limiter la perturbation du système, il conviendrait d'ajuster le COD (ou la DCO) de chaque nouveau lot avant son utilisation à une valeur constante adéquate, par exemple en le diluant avec de l'eau du robinet.

**Lubrifiant**

25. Les roulettes de la pompe péristaltique peuvent être lubrifiées avec du glycérol ou de l'huile d'olive : les deux conviennent aux tubes en caoutchouc de silicone.

**Solutions mères de la substance d'essai**

26. Pour les substances présentant une solubilité convenable, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées (par exemple, 1 à 5 g/l) dans de l'eau désionisée, ou dans la fraction minérale de l'eau usée synthétique. En ce qui concerne les substances insolubles, se reporter à l'annexe 5 de la Ligne directrice 303 A). Cette méthode n'est pas applicable aux substances volatiles sans modification préalable des réacteurs tubulaires (paragraphe 16). Déterminer le COD et le carbone organique total (COT) de la solution mère et répéter les mesures à chaque nouveau lot. Si la différence entre le COD et le COT excède 20 pour cent, il faut vérifier l'hydrosolubilité de la substance d'essai. Comparer le COD ou la concentration de la substance d'essai mesurée par une analyse spécifique dans la solution mère à la valeur nominale, pour s'assurer que la récupération est suffisante (elle dépasse normalement 90 pour cent). Vérifier, en particulier pour les dispersions, si le COD peut être utilisé comme paramètre d'analyse ou si seule une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai est praticable. Les dispersions imposent la centrifugation des échantillons. Pour chaque nouveau lot, mesurer le COD, la DCO, ou la substance d'essai par une analyse spécifique.

27. Déterminer le pH de la solution mère. Les valeurs extrêmes indiquent que l'addition de la substance est susceptible d'influencer le pH des boues activées dans le système d'essai. Dans ce cas, il faut neutraliser la solution mère à  $\text{pH } 7 \pm 0,5$  avec de faibles quantités d'un acide ou d'une base inorganiques, tout en évitant la précipitation de la substance d'essai.

**MODE OPÉRATOIRE****Préparation du milieu organique à doser**

28 Nettoyer à fond les récipients destinés à recevoir les eaux à traiter et les effluents ainsi que les tuyaux reliant ces deux récipients, afin de prévenir toute prolifération de micro-organismes, au début de l'essai et tout au long de celui-ci.

29. Utiliser des eaux usées synthétiques (paragraphe 23) préparées le jour même, en diluant dans les proportions requises les solides ou la solution mère concentrée avec de l'eau du robinet. La quantité nécessaire est mesurée dans un cylindre et versée dans un récipient propre destiné à recevoir les eaux à traiter. S'il y a lieu, ajouter la quantité voulue de solution mère de la substance d'essai ou de substance de référence aux eaux usées synthétiques avant la dilution. Si cela est plus approprié, ou nécessaire afin d'éviter des pertes de substance d'essai, préparer à part une solution diluée de la substance d'essai dans un autre récipient et répartir cette dernière dans les tubes inclinés au moyen d'une autre pompe doseuse.

30. En alternance (et de préférence), utiliser des eaux usées domestiques décantées (paragraphe 24) récoltées le jour même si possible.

**Fonctionnement des réacteurs tubulaires rotatifs**

31. L'évaluation de la substance d'essai demande deux réacteurs tubulaires identiques assemblés dans un local à température constante, normalement à  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

32. Ajuster les pompes péristaltiques de façon à répartir  $250 \pm 25$  ml/h de milieu organique (sans substance d'essai) dans les tubes inclinés, qui tournent à  $18 \pm 2$  tr/min. Lubrifier (paragraphe 25) les tuyaux de la pompe au début de l'essai et régulièrement au cours de celui-ci afin de lui assurer un bon fonctionnement et de prolonger la vie des tuyaux.

33. Régler l'angle d'inclinaison des tubes par rapport à l'horizontale de façon à produire un temps de séjour de l'eau d'alimentation de  $125 \pm 12,5$  secondes dans un tube propre. Estimer le temps de rétention en ajoutant un marqueur non biologique (par exemple : NaCl, un colorant inerte) à l'eau d'alimentation : le temps requis pour atteindre la concentration maximale dans l'effluent est censé être le temps de rétention moyen (quand le développement du film est à son maximum, le temps de rétention peut s'accroître jusqu'à environ 30 minutes).

34. On a constaté que ces débits, vitesses et temps donnaient des pourcentages d'élimination adéquats (supérieurs à 80 pour cent) de COD (ou DCO) et engendraient des effluents nitrifiés. Le débit doit être modifié si l'élimination est insuffisante ou s'il y a lieu de simuler le fonctionnement d'une station d'épuration donnée. Dans ce cas, ajuster le débit de dose du milieu organique jusqu'à ce que le fonctionnement du réacteur s'aligne sur celui de la station d'épuration.

### **Inoculation**

35. L'inoculation par exposition à l'air peut suffire à déclencher la croissance des micro-organismes lorsqu'on utilise des eaux usées synthétiques, sinon on ajoutera 1 ml/l d'eaux usées décantées à l'alimentation pendant trois jours.

### **Mesures**

36. Vérifier à intervalles réguliers que les débits de dose et les vitesses de rotation restent dans les limites requises. Mesurer aussi le pH de l'effluent, en particulier s'il devrait y avoir une nitrification.

### **Échantillonnage et analyse**

37. La méthode, la répartition et la fréquence de l'échantillonnage sont choisies en fonction de la finalité de l'essai. Prélever au hasard des échantillons d'eaux à traiter et d'effluents, par exemple, ou récolter des échantillons sur une période plus longue, comprise entre trois et six heures, par exemple. Durant la première période, à savoir en l'absence de substance d'essai, prélever des échantillons deux fois par semaine. Les échantillons sont filtrés à travers des membranes ou centrifugés à quelque  $40\,000$  m/sec<sup>2</sup> pendant environ 15 minutes (paragraphe 18). Il peut être nécessaire de décanter et/ou de filtrer grossièrement les échantillons avant leur filtration à travers la membrane. Déterminer le COD (ou la DCO) au moins deux fois et, selon les besoins, la DBO, l'ammonium, les nitrites et les nitrates.

38. Toutes les analyses doivent être exécutées le plus vite possible après la collecte et la préparation des échantillons. Au cas où les analyses doivent être différées, conserver les échantillons à environ 4°C à l'obscurité dans des bouteilles pleines et bouchées hermétiquement. S'il y a lieu de stocker les échantillons pendant plus de 48 heures, les conserver par congélation, acidification ou adjonction d'un toxique approprié (par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure (II) à 10 g/l). S'assurer que la technique de conservation n'influence pas les résultats de l'analyse.

### **Période de mise en route**

39. Durant cette période, le biofilm superficiel se développe jusqu'à atteindre une épaisseur optimale, ce qui prend normalement environ deux semaines et ne doit pas en dépasser six. L'élimination

(paragraphe 44) du COD (ou de la DCO) s'accroît et atteint un plateau. Lorsque le plateau présente la même valeur dans les deux tubes, sélectionner le tube qui servira de témoin pour le restant de l'essai, au cours duquel leur fonctionnement devra conserver les mêmes caractéristiques.

#### **Introduction de la substance d'essai**

40. À ce stade, ajouter la substance d'essai dans l'autre réacteur à la concentration requise, ordinairement 10 à 20 mg C/l. Le témoin continue de ne recevoir que le milieu organique.

#### **Période d'acclimatation**

41. Poursuivre les analyses bi-hebdomadaires du COD (ou de la DCO) et, s'il faut évaluer la biodégradabilité primaire, mesurer aussi la concentration de la substance d'essai par une analyse spécifique. Appliquer une période d'acclimatation d'une à six semaines (ou davantage dans des conditions spéciales) après la première adjonction de la substance d'essai. Lorsque le pourcentage d'élimination (paragraphe 43-45) atteint son maximum, déterminer 12 à 15 valeurs valables au cours de la phase plateau sur environ trois semaines, afin d'évaluer le pourcentage d'élimination moyen. L'essai est considéré comme terminé si un degré d'élimination suffisamment élevé a été obtenu. L'essai ne doit normalement pas se prolonger au-delà de 12 semaines après la première introduction de la substance d'essai.

#### **Détachement du film**

42. Le brusque détachement de grandes quantités de film excédentaire des tubes (« sloughing ») se produit assez régulièrement. On veillera à ce que ce processus n'altère pas la comparabilité des résultats, en laissant les essais couvrir au moins deux cycles complets de croissance et de détachement.

### **RÉSULTATS ET RAPPORT**

#### **Traitement des résultats**

43. Calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai en termes de COD (ou de DCO) pour chaque évaluation programmée dans le temps à l'aide de la formule suivante :

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_o)] / C_s \%$$

où

- $D_t$  = pourcentage d'élimination du COD (ou de la DCO) à l'instant t ;
- $C_s$  = concentration de COD (ou de DCO) dans les eaux à traiter due à la substance d'essai, estimée de préférence d'après la concentration dans la solution mère et le volume de cette solution ajouté (mg/l) ;
- $E$  = COD (ou DCO) mesurés dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l) ;
- $E_o$  = COD (ou DCO) mesurés dans les effluents témoins à l'instant t (mg/l).

Répéter le calcul pour la substance de référence, le cas échéant.

#### **Résultats du réacteur témoin**

44. Le degré d'élimination du COD ou de la DCO ( $D_B$ ) du milieu organique dans les réacteurs témoins est utile pour évaluer l'activité de biodégradation du biofilm durant l'essai. Calculer le pourcentage d'élimination selon l'équation suivante :

$$D_B = 100 (1 - E_o/C_m) \%$$

où  $C_m =$  COD (ou DCO) du milieu organique dans les eaux à traiter témoins (mg/l).

45. Calculer l'élimination ( $D_{ST}$ ) de la substance d'essai, si elle a été mesurée par une méthode d'analyse spécifique, à chaque instant d'évaluation à partir de l'équation suivante :

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

où  $S_i =$  concentration mesurée ou, de préférence, estimée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai (mg/l)

$S_e =$  concentration mesurée de la substance d'essai dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l)

Si la méthode d'analyse donne une valeur positive dans les eaux usées non améliorées équivalente à  $S_e$  (mg/l), calculer le pourcentage d'élimination ( $D_{SC}$ ) selon la formule suivante :

$$D_{SC} = 100 (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c) \%$$

### **Expression des résultats de l'essai**

46. Porter sur un graphique les pourcentages d'élimination  $D_t$  et  $D_{ST}$  (ou  $D_{SC}$ ), s'ils sont disponibles, en fonction du temps (voir annexe 2 de la Ligne directrice 303 A). Prendre la moyenne (arrondie au nombre entier le plus proche) et l'écart-type des 12 à 15 valeurs de  $D_T$  (et de  $D_{ST}$ , le cas échéant) obtenue au cours de la phase plateau comme pourcentage d'élimination de la substance d'essai. L'allure de la courbe d'élimination permet de tirer certaines conclusions sur les processus d'élimination.

### **Adsorption**

47. Si on observe une élimination substantielle de la substance d'essai en termes de COD au début de l'essai, c'est probablement à cause de l'adsorption de cette substance sur le biofilm. Il devrait être possible de prouver ce phénomène en mesurant la substance d'essai adsorbée sur les solides qui se détachent du film. Il est rare que l'élimination du COD de substances adsorbables demeure élevée tout au long de l'essai ; le degré d'élimination est normalement élevé au début, puis décline progressivement jusqu'à une valeur d'équilibre. Si, toutefois, la substance d'essai adsorbée est de nature à acclimater la population de micro-organismes, l'élimination de la substance d'essai en termes de COD augmenterait pour atteindre une valeur de plateau élevée.

### **Phase de latence**

48. Beaucoup de substances d'essai, comme cela se produit dans les essais de sélection statiques, traversent une phase de latence avant que la biodégradation n'opère à plein régime. Durant la phase de latence, les bactéries responsables de la dégradation s'acclimatent ou s'adaptent et n'éliminent presque pas la substance d'essai ; ensuite elles commencent à croître. Après l'achèvement de cette phase, on considère de manière arbitraire que la phase de dégradation débute lorsque 10 pour cent environ de la quantité initiale de la substance d'essai est éliminée (après avoir laissé l'adsorption se produire, le cas échéant). La phase de latence est souvent très variable et peu reproductible.

**Phase plateau**

49. Le plateau de la courbe d'élimination d'un essai conduit en continu est défini comme la phase au cours de laquelle la dégradation est maximale. La phase plateau doit durer au moins trois semaines et être déterminée grosso modo par 12 à 15 valeurs mesurées valables.

**Degré d'élimination moyen de la substance d'essai**

50. Calculer la moyenne des valeurs d'élimination  $D_t$  (et  $D_{st}$  le cas échéant) de la substance d'essai durant la phase plateau. Arrondie au nombre entier le plus proche (1 pour cent), elle représente le degré d'élimination de la substance d'essai. On recommande également de calculer l'intervalle de confiance à 95 pour cent de la valeur moyenne. Calculer de la même manière le degré moyen ( $D_B$ ) d'élimination du milieu organique dans le récipient témoin.

**Indication de la biodégradation**

51. Si la substance d'essai n'est pas adsorbée de façon significative sur le biofilm et que la courbe d'élimination présente le profil typique d'une courbe de biodégradation avec phase de latence, dégradation et plateau (paragraphe 58, 59), l'élimination mesurée est avec certitude attribuable à la biodégradation. Si l'élimination est élevée au début, l'essai de simulation ne permet pas de faire la distinction entre les processus d'élimination biologiques et non biologiques. Dans ces cas-là, comme dans d'autres où la biodégradation suscite des doutes (par exemple si on observe une séparation), analyser les substances d'essai adsorbées sur des échantillons du film ou effectuer des essais de biodégradation statiques (de sélection) supplémentaires fondés sur des paramètres qui attestent clairement des processus biologiques. Il s'agit d'essais reposant sur la consommation d'oxygène (301 C, 301 D et 301 F) (9) ou sur la mesure de la production de dioxyde de carbone (301 B ou méthode de l'espace libre – ou de l'espace tête -) (10) ; il convient d'utiliser comme inoculum un biofilm préexposé issu du bioréacteur approprié.

52. Si l'élimination du COD et de la substance proprement dite ont été mesurées, des différences significatives entre les pourcentages observés (le premier étant inférieur au second) indiquent que les effluents renferment des produits organiques intermédiaires susceptibles d'être plus difficiles à dégrader ; ceux-ci doivent être examinés.

**Validité des résultats de l'essai**

53. Considérer l'essai comme valable si le degré d'élimination ( $D_B$ ) du COD ou de la DCO dans les unités témoins est supérieur à 80 pour cent après deux semaines de fonctionnement et qu'aucun phénomène inhabituel n'a été observé.

54. Si une substance de référence facilement biodégradable a été mise à l'essai, le degré de biodégradation doit être supérieur à 90 pour cent et la différence entre des valeurs mesurées en parallèle ne doit pas excéder 5 pour cent. Faute de satisfaire à ces deux critères, réexaminer les méthodes expérimentales et/ou prélever des eaux usées domestiques à une autre source.

55. De même, les différences de valeurs de biodégradation entre deux unités identiques (le cas échéant) traitant une substance d'essai ne doivent pas s'écarter de plus de cinq pour cent. Si ce critère n'est pas rempli, mais que l'élimination est élevée, poursuivre l'analyse pendant trois semaines supplémentaires. Si l'élimination est faible, étudier les effets inhibiteurs de la substance d'essai, s'ils ne sont pas connus, et recommencer l'essai à une concentration plus basse de la substance d'essai, si c'est possible.

**Rapport d'essai**

56. Le rapport d'essai doit livrer les informations suivantes :

Substance d'essai :

- nature chimique ;
- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques.

Conditions d'essai :

- toute modification du système d'essai, notamment si des substances volatiles ou insolubles ont été testées ;
- type de milieu organique ;
- proportion et nature des déchets industriels dans les eaux usées, si cette information est pertinente et connue ;
- méthode d'inoculation ;
- solution mère de la substance d'essai – teneurs en COD (carbone organique dissous) et COT (carbone organique total) ; mode de préparation, dans le cas d'une suspension ; concentration(s) d'essai utilisée(s), justification des concentrations de COD qui sortiraient de l'intervalle 10-20 mg/l ; méthode d'addition ; date de la première adjonction ; toute variation de concentration ;
- temps de rétention hydraulique moyen (sans croissance) ; vitesse de rotation du tube ; angle d'inclinaison approximatif, si possible ;
- détails du détachement du biofilm ; moment et intensité ;
- température d'essai et gamme de températures ;
- techniques d'analyse employées.

Résultats de l'essai :

- toutes les valeurs mesurées : COD, DCO, analyses spécifiques, pH, température, composés azotés, le cas échéant ;
- toutes les valeurs calculées de  $D_t$  (ou  $D_{tc}$ ),  $D_B$ ,  $D_s$  présentées sous forme de tableaux et de courbes d'élimination ;
- informations sur les phases de latence et de plateau, durée de l'essai, degré d'élimination de la substance d'essai, de la substance de référence (si testée) et du milieu organique (dans l'unité témoin), données statistiques, conclusions sur la biodégradabilité et validité de l'essai ;
- examen des résultats.

**BIBLIOGRAPHIE**

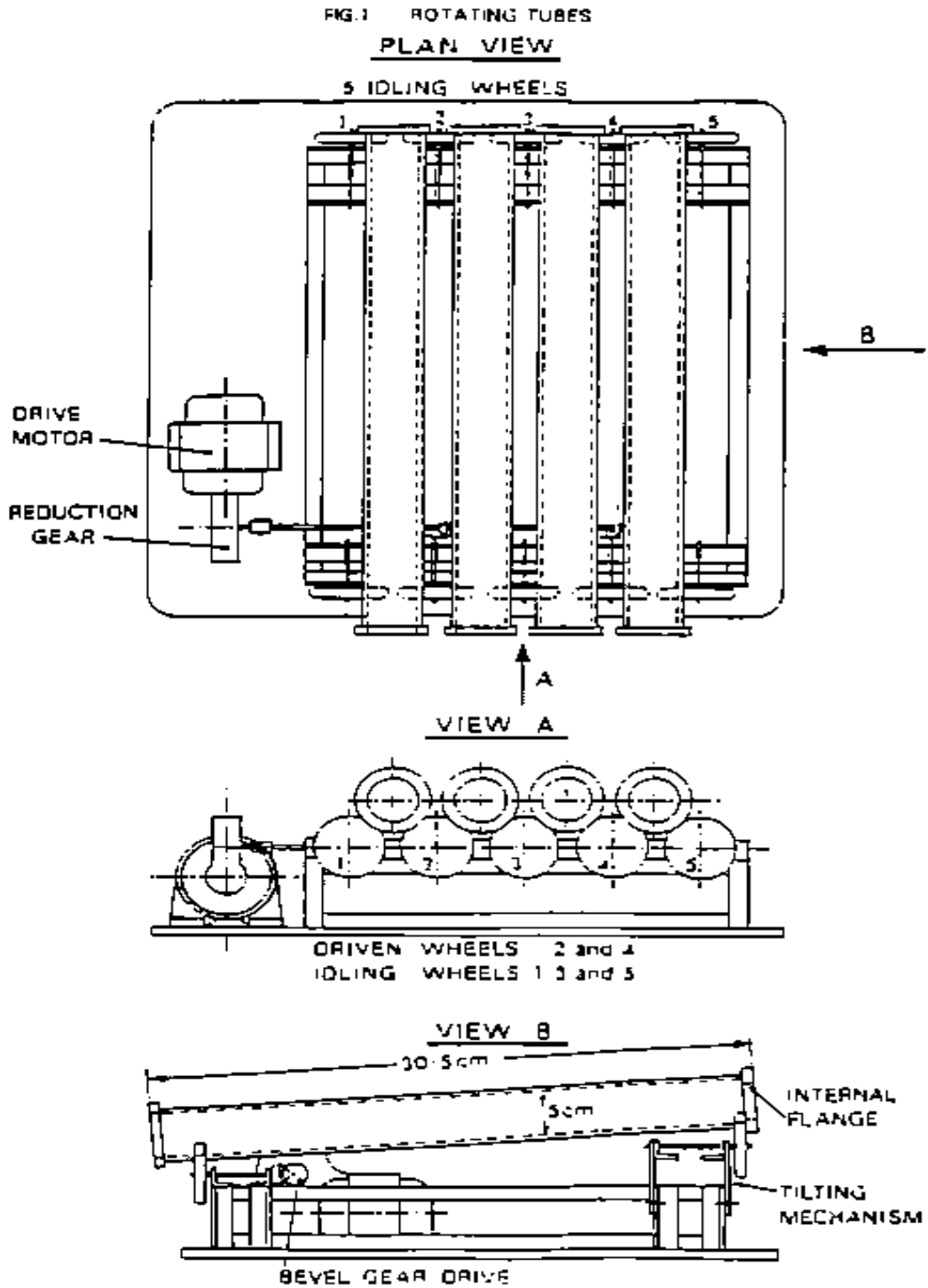
- (1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.*, 14, 753-758.
- (2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.*, 7, 441-444.
- (3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.*, 10, 214-220.

- (4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste*, 24, 1355-1357.
- (5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCS*, 43, 92-94.
- (6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut.*, 10, 865-881.
- (7) Her Majesty's Stationery Office (1982). *Methods for the examination of eaus and associated materials. Assessment of biodegradability*, 1981, London.
- (8) Her Majesty's Stationery Office (1984). *Methods for the examination of eaus and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste eaus and their toxicity to sewage treatment processes*, 1982, London.
- (9) Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (1993). *Biodégradabilité immédiate : 301 A-F*.
- (10) ISO 14593 : 1999 *Qualité de l'eau - Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques. Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (Essai au CO<sub>2</sub> dans l'espace de tête)*. 14 p.



ANNEXE

Figure 1: Tubes rotatifs



**Figure 2 : Schéma de déroulement**