

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

**Adoptée par le Conseil le 17 juillet 1992**

### **Biodégradabilité dans l'eau de mer**

#### **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

1. Quand les premières Lignes directrices de l'OCDE ont été mises au point, on ignorait dans quelle mesure on pouvait appliquer à l'environnement marin, les résultats des essais de screening pour la biodégradabilité facile utilisant de l'eau douce et des inocula constitués d'effluents secondaires de station d'épuration ou de boue activée. Il existe dans ce domaine des résultats variables (entre autres (1)).
2. De nombreuses eaux de rejet industriel contenant divers produits chimiques, atteignent la mer soit par déversement direct, soit par le chemin d'estuaires et de rivières dans lesquels les temps de séjour sont faibles comparés à la durée nécessaire à la biodégradation complète d'un grand nombre des produits chimiques présents. C'est à cause de la prise de conscience grandissante de la nécessité de protéger le milieu marin contre des charges croissantes de produits chimiques et de la nécessité d'évaluer la concentration probable des produits chimiques dans la mer, que des méthodes d'essai ont été élaborées afin d'évaluer la biodégradabilité dans l'eau de mer.
3. Les méthodes décrites ici utilisent l'eau de mer naturelle à la fois comme phase aqueuse et comme source de micro-organismes. Afin de se conformer aux méthodes de biodégradabilité facile en eau douce, on a étudié l'utilisation d'eau de mer ultra-filtrée et centrifugée, ainsi que l'utilisation de sédiments marins comme inocula. Ces recherches n'ont donné aucun résultat. Le milieu d'essai est donc constitué par de l'eau de mer naturelle prétraitée afin d'en éliminer les grosses particules.
4. Afin de déterminer la biodégradabilité ultime par la méthode du flacon agité, on doit utiliser des concentrations relativement élevées de substance d'essai à cause de la faible sensibilité de la méthode d'analyse du carbone organique dissous (COD). Ceci en retour nécessite d'ajouter à l'eau de mer des substances nutritives minérales (N et P), sinon leur faible concentration limiterait la disparition du COD. Il est également nécessaire d'ajouter des substances nutritives dans la méthode de la fiole fermée à cause de la concentration de la substance d'essai ajoutée.
5. Ces méthodes ne sont donc pas des essais de biodégradabilité facile puisqu'on ne rajoute pas d'inoculum en plus des micro-organismes déjà présents dans l'eau de mer. Ces essais ne simulent pas non plus l'environnement marin, puisqu'on y ajoute des substances nutritives et que la concentration de la substance d'essai est beaucoup plus élevée que celle qu'on trouve dans la mer. C'est pourquoi on propose de classer ces méthodes dans une nouvelle section qui s'intitule « Biodégradabilité dans l'eau de mer ».

**APPLICATION**

6. Les essais qui sont effectués parce que les conditions d'utilisation et de rejet du produit chimique en question indiquent un cheminement vers la mer, donnent une première indication de sa biodégradabilité dans l'eau de mer. Si le résultat est positif (disparition du COD > 70 % ; demande théorique en oxygène DThO > 60%), on peut conclure qu'il existe une potentialité pour que le produit subisse une biodégradation dans l'environnement marin. Cependant, un résultat négatif ne permet pas d'exclure une telle éventualité, mais indique que des études supplémentaires sont nécessaires, par exemple, en utilisant une concentration de substance d'essai aussi faible que possible.

7. Dans les deux cas, si on désire une valeur plus précise du taux ou du degré de biodégradation dans l'eau de mer, à un endroit particulier, on devra appliquer d'autres méthodes plus complexes et plus sophistiquées, et de là plus coûteuses. On pourrait par exemple effectuer un essai de simulation en utilisant une concentration de la substance d'essai plus proche de la concentration probable dans l'environnement. On pourrait également utiliser une eau de mer non fortifiée, non prétraitée, prélevée sur les lieux à étudier, et la dégradation primaire pourrait être suivie par une analyse chimique spécifique. Pour la biodégradabilité ultime, il serait nécessaire d'utiliser des produits marqués au  $^{14}\text{C}$  afin de pouvoir mesurer les taux de disparition du  $^{14}\text{C}$  organique soluble et de formation de  $^{14}\text{CO}_2$  à des concentrations proches de celles qui règnent dans l'environnement.

**CHOIX DES MÉTHODES**

8. Le choix de la méthode à utiliser dépend d'un certain nombre de facteurs ; le tableau suivant aide à faire ce choix. Alors que les produits chimiques dont la solubilité est inférieure à une valeur équivalente à environ 5 mg/l de C ne peuvent pas être testés par la méthode du flacon agité, au moins en principe, ces produits peu solubles peuvent être testés par la méthode de la fiole fermée.

**TABLEAU : AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE LA MÉTHODE DU FLACON AGITÉ ET DE LA MÉTHODE DE LA FIOLE FERMÉE**

MÉTHODE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
<b>FLACON AGITÉ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- matériel simple sauf pour l'analyseur de C</li> <li>- une durée de 60 jours n'est pas un problème</li> <li>- pas d'interférence avec la nitrification</li> <li>- peut être adaptée pour les produits volatils</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nécessite un analyseur de C</li> <li>- les utilisations de 5-40 mg/l de COD peuvent être inhibitrices</li> <li>- la détermination du COD est difficile pour de faibles concentrations dans l'eau de mer (effet chlorure)</li> <li>- le COD est parfois élevé dans l'eau de mer</li> </ul>
<b>FIOLE FERMÉE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- matériel simple</li> <li>- détermination finale simple</li> <li>- utilise de faibles concentrations de la substance (2 mg/l), ce qui réduit les chances d'inhibition</li> <li>- facilement adaptée pour les produits volatils</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- il pourrait être difficile de maintenir l'étanchéité à l'air des flacons</li> <li>- la croissance des bactéries sur les parois peut conduire à des valeurs fausses</li> <li>- les valeurs de la consommation d'O<sub>2</sub> dans le témoin peuvent être élevées, en particulier après 28 j. ; pourrait être supprimée en faisant vieillir l'eau de mer</li> <li>- interférence possible avec la consommation d'O<sub>2</sub> par la nitrification</li> </ul>

## MÉTHODE DU FLACON AGITÉ

### INTRODUCTION

1. Cette méthode est une variante pour l'eau de mer de la méthode de screening modifiée de l'OCDE (2). Elle a été mise au point à la suite d'un essai circulaire organisé pour la CEE, par l'Institut Danois de la Qualité de l'Eau (3).

2. De la même façon que pour la méthode de la fiole fermée en milieu marin, qui l'accompagne, les résultats de cet essai ne doivent pas être considérés comme des indicateurs de la biodégradabilité facile, mais ils doivent être utilisés de façon spécifique pour obtenir des informations sur la biodégradabilité des produits chimiques en milieu marin.

### PRINCIPE DE LA MÉTHODE

3. Une quantité prédéterminée de substance d'essai est dissoute dans le milieu d'essai de façon à obtenir une concentration en carbone organique dissous (COD) comprise entre 5 et 40 mg/l. Si on améliore les limites de sensibilité de l'analyse du carbone organique, il peut être avantageux d'utiliser des concentrations plus faibles de substance d'essai, en particulier dans le cas des composés inhibiteurs. La solution de la substance à étudier dans le milieu d'essai est incubée sous agitation dans l'obscurité ou en lumière diffuse, dans des conditions aérobies, à une température donnée (contrôlée à  $\pm 2^\circ\text{C}$  près) normalement comprise entre 15 et 20°C. Dans les cas où l'objectif de l'étude est de simuler des situations réelles de l'environnement, les essais peuvent être effectués en dehors de cet intervalle normal de température. La durée d'essai maximale recommandée est d'environ 60 jours. La dégradation est suivie par des mesures du COD (dégradation ultime) et, dans certains cas, par des analyses spécifiques (dégradation primaire).

### INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

4. Afin de savoir si on peut appliquer cet essai à une substance particulière, on doit connaître certaines de ses propriétés. La teneur en carbone organique de la substance doit être connue, sa volatilité doit être telle qu'il ne se produise pas de pertes importantes au cours de l'essai, enfin, sa solubilité dans l'eau doit être supérieure à une valeur équivalente à une concentration de 25 à 40 mg/l de C. La substance d'essai ne doit pas non plus s'adsorber de façon importante sur les surfaces de verre. On doit disposer d'informations sur la pureté ou les proportions relatives des principaux composants du produit d'essai afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus, en particulier quand ceux-ci se situent près du niveau « seuil ».

5. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai vis à vis des bactéries recueillies, par exemple dans des essais à court terme sur le taux de respiration (4), peuvent s'avérer utiles pour choisir les concentrations d'essai appropriées et elles peuvent être essentielles pour interpréter correctement de faibles valeurs de biodégradation. Cependant, de telles informations ne sont pas toujours suffisantes pour interpréter les résultats obtenus dans l'essai de biodégradation, et la méthode décrite dans le paragraphe 18 est plus adaptée.

### COMPOSÉS DE RÉFÉRENCE

6. On doit utiliser des composés de référence adéquats pour contrôler l'activité microbienne de

l'échantillon d'eau de mer. Le benzoate de sodium, l'acétate de sodium et l'aniline peuvent par exemple être utilisés. Les composés de référence doivent se dégrader dans un laps de temps relativement court, sinon il est recommandé de recommencer l'essai en utilisant un autre échantillon d'eau de mer.

7. Dans l'essai circulaire de la CEE où les échantillons d'eau de mer étaient prélevés à différents endroits et à différentes périodes de l'année (2), la phase de latence ( $t_L$ ) et le temps nécessaire après la phase de latence pour atteindre 50% de dégradation ( $t_{50}$ ), étaient pour le benzoate de sodium respectivement de 1 à 4 jours et de 1 à 7 jours. Pour l'aniline, les valeurs étaient comprises entre 0 et 10 jours pour la  $t_L$  et entre 1 et 10 jours pour la  $t_{50}$ .

### **REPRODUCTIBILITÉ ET SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE**

8. La reproductibilité de la méthode a été établie dans l'essai circulaire (3). La concentration la plus faible de la substance d'essai pour laquelle cette méthode peut être utilisée est déterminée dans une large mesure, par la limite de détection de l'analyse du carbone organique (à l'heure actuelle, environ 0,5 mg/l de C) et par la concentration du carbone organique dissous dans l'eau de mer utilisée (habituellement de l'ordre de 3 à 5 mg/l pour l'eau du large). La concentration de base en COD ne doit pas dépasser environ 20% de la concentration totale en COD après addition du produit d'essai. Si ceci n'est pas possible, la concentration de base en COD peut parfois être réduite en faisant vieillir l'eau de mer avant l'essai. Si la méthode est utilisée seulement avec une analyse chimique spécifique (qui mesure la dégradation primaire) l'investigateur doit rechercher à l'aide d'informations supplémentaires, si la dégradabilité ultime peut être atteinte. Ces informations additionnelles peuvent être apportées par les résultats d'autres essais de biodégradabilité facile ou intrinsèque.

### **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

#### **Appareillage**

9. Matériel courant de laboratoire et :
- (a) Dispositif d'agitation pouvant recevoir des erlenmeyers de 0,5 à 2 litres, soit équipé d'un dispositif de contrôle de la température, soit fonctionnant dans une pièce thermostatée entre 15 et 20°C à  $\pm 2^\circ\text{C}$  près ;
  - (b) Des erlenmeyers de 0,5 à 2 litres à col étroit ;
  - (c) Un appareil de filtration sur membrane ou une centrifugeuse ;
  - (d) Des membranes filtrantes d'une porosité de 0,2 à 0,45  $\mu\text{m}$  ;
  - (e) Un analyseur de carbone ;
  - (f) Un équipement pour des analyses spécifiques (facultatif).

#### **Eau de mer**

10. Prélever un échantillon d'eau de mer dans un récipient soigneusement nettoyé et le transporter au laboratoire, de préférence dans un intervalle de un à deux jours après le prélèvement. Au cours du transport, ne pas laisser la température de l'échantillon dépasser de façon importante la température qui sera utilisée dans l'essai. Identifier précisément l'endroit du prélèvement, décrire son état de pollution et indiquer les substances nutritives qu'on y trouve. En particulier pour les eaux côtières, inclure dans cette

caractérisation un comptage des colonies bactériennes hétérotrophes et la détermination des concentrations en nitrate, ammonium et phosphate dissous.

11. Pour l'échantillon d'eau de mer, fournir les informations suivantes :

- date de prélèvement ;
- profondeur de prélèvement ;
- aspect de l'échantillon - trouble, etc. ;
- température au moment du prélèvement ;
- salinité ;
- COD ;
- délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai.

12. Si l'on trouve que le taux de COD de l'échantillon d'eau de mer est élevé (paragraphe 8), il est recommandé de faire vieillir cet échantillon pendant environ une semaine avant son utilisation. Le vieillissement se fait en conservant l'échantillon dans des conditions aérobies à la température de l'essai, dans l'obscurité ou en lumière diffuse. Si nécessaire, les conditions aérobies sont maintenues par une légère agitation. Au cours du vieillissement, la teneur en matière organique facilement dégradable diminue. Dans l'essai circulaire (3), on a trouvé aucune différence entre le potentiel de dégradation d'échantillons d'eau de mer vieillis ou fraîchement recueillis. Avant son utilisation, prétraiter l'eau de mer afin d'en éliminer les grosses particules, par exemple par filtration sur un filtre de nylon ou sur du gros papier filtre (pas de membranes filtrantes ou de filtres GF-C), ou par sédimentation et décantation. On doit mentionner le procédé utilisé. Si l'échantillon est vieilli, effectuer le prétraitement après vieillissement.

### Solutions-mères des substances nutritives minérales

13. Préparer les solutions-mères suivantes en utilisant des réactifs de qualité pour analyse.

- |     |  |         |
|-----|--|---------|
| (a) | Dihydrogénophosphate monopotassique, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....                          | 8,50 g  |
|     | Hydrogénophosphate dipotassique, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....                              | 21,75 g |
|     | Hydrogénophosphate disodique dihydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ..... | 33,30 g |
|     | Chlorure d'ammonium, $\text{NH}_4\text{Cl}$ .....  | 0,50 g  |
|     | Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.                          |         |
| (b) | Chlorure de calcium anhydre, $\text{CaCl}_2$ .....   | 27,50 g |
|     | Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.                          |         |
| (c) | Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....                | 22,50 g |
|     | Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.                          |         |
| (d) | Chlorure de fer (III) hexahydraté, $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ .....                | 0,25 g  |
|     | Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.                          |         |

On peut éviter la précipitation de la solution (d) en ajoutant une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g d'acide éthylènediamine-tétraacétique (sel disodique de l'EDTA). S'il se forme un précipité dans une solution-mère, la remplacer par une solution fraîchement préparée.

### Préparation du milieu d'essai

14. Ajouter 1 ml de chacune des solutions-mères ci-dessus par litre d'eau de mer prétraitée.

### **Inoculum**

15. Ne pas ajouter d'inoculum spécifique, en plus des micro-organismes déjà présents dans l'eau de mer. Déterminer (facultativement) le nombre d'hétérotrophes formant colonies présents dans le milieu d'essai contenant l'eau de mer (et de préférence également dans les échantillons d'eau de mer du départ) par exemple par comptage sur boîte, en utilisant de l'agar marin. Ceci est particulièrement souhaitable pour les échantillons provenant de zones côtières ou polluées. Contrôler l'activité microbienne hétérotrophe dans l'eau de mer en effectuant un essai avec un composé de référence.

### **Préparation des flacons**

16. S'assurer que toute la verrerie est parfaitement nettoyée, mais pas nécessairement stérile, (par exemple en utilisant de l'acide chlorhydrique alcoolique), qu'elle est rincée et séchée avant utilisation afin d'éviter toute contamination par des résidus d'expériences précédentes. Les flacons doivent également être nettoyés avant un premier usage.

17. Travailler simultanément avec les substances d'essai dans des flacons en double et avec le composé de référence dans un seul récipient. Effectuer un essai témoin en double, sans substance d'essai ni composé de référence, afin de déterminer les blancs analytiques. Dissoudre les substances d'essai dans le milieu d'essai - il est commode de les ajouter à partir de solution mère concentrée - de façon à obtenir des concentrations de départ qui se situent normalement entre 5 et 40 mg/l de COD. Le composé de référence est normalement testé à une concentration de départ correspondant à 20 mg/l de COD. Si on utilise des solutions mères de substances d'essai et/ou de référence, s'assurer que la salinité du milieu contenant l'eau de mer n'a pas été modifiée de façon importante.

18. Si des effets toxiques sont attendus ou si l'on ne peut pas les exclure, il peut s'avérer judicieux d'inclure en double, dans la conception de l'essai, une expérience sur l'inhibition. Ajouter les substances d'essai et de référence dans le même récipient, la concentration de la substance de référence étant normalement celle utilisée dans l'essai témoin qui contrôle la procédure (c'est-à-dire 20 mg/l de COD) afin de pouvoir faire des comparaisons.

19. Verser des quantités adéquates de solutions d'essai dans les erlenmeyers (une quantité acceptable va jusqu'à environ la moitié du volume des récipients), puis recouvrir chaque récipient non hermétiquement (par exemple avec une feuille d'aluminium) de façon à permettre les échanges gazeux entre le flacon et l'air environnant. (Des tampons de coton ne sont pas indiqués si on utilise l'analyse du COD). Placer les récipients sur le dispositif d'agitation et agiter de façon continue à vitesse faible (par exemple 100 t/min) tout au long de l'essai. Maintenir la température constante (entre 15 et 20°C à  $\pm 2^\circ\text{C}$  près), et protéger les récipients de la lumière afin d'éviter la croissance d'algues. S'assurer que l'air est exempt de matières toxiques.

### **Témoin physico-chimique (facultatif)**

20. Si on s'attend à une dégradation abiotique ou à des mécanismes de perte, tels qu'une hydrolyse (problème qui se pose uniquement en cas d'analyse spécifique), une volatilisation ou une adsorption, il est judicieux de réaliser une expérience témoin physico-chimique. Celle-ci peut être effectuée en ajoutant dans les récipients contenant la substance d'essai du chlorure de mercure (II) ( $\text{HgCl}_2$ )<sup>(1)</sup> (entre 50 et 100 mg/l) afin de stopper l'activité microbienne. Une diminution importante du COD ou de la concentration d'un composé spécifique dans l'essai témoin physico-chimique, indiquent la présence de

---

<sup>(1)</sup> Le chlorure de mercure (II) ( $\text{HgCl}_2$ ) est une substance très toxique qui doit être manipulée avec certaines précautions. Les déchets aqueux contenant ce produit chimique doivent être éliminés de façon appropriée ; ils ne doivent pas être jetés à l'égout.

mécanismes de disparition abiotiques. (Si on utilise du chlorure de mercure, on doit faire attention aux interférences ou à un empoisonnement catalytique dans l'analyse du COD).

### **Nombre de flacons**

21. Dans un essai type, on utilise les récipients suivants :

- Flacons 1 et 2 - contiennent la substance d'essai (suspension d'essai) ;
- Flacons 3 et 4 - contiennent seulement l'eau de mer (témoin inoculum) ;
- Flacon 5 - contient le composé de référence (contrôle de la procédure) ;
- Flacon 6 - contient les substances d'essai et de référence (témoin de toxicité) - facultatif ;
- Flacon 7 - contient la substance d'essai et l'agent stérilisant (témoin stérile abiotique) - facultatif.

## **EXÉCUTION DE LA MÉTHODE**

### **Analyse du COD**

22. Tout au long de l'essai, à des intervalles de temps appropriés, prélever des échantillons pour l'analyse du COD (Annexe 1). Prélever systématiquement des échantillons au début (jour 0) et à la fin (jour 60) de l'essai. Afin de tracer la courbe de la dégradation en fonction du temps, il est nécessaire de disposer au total, d'au moins cinq échantillons. On ne peut pas établir de calendrier précis pour l'échantillonnage étant donné que le taux de biodégradation varie. Effectuer des déterminations du COD en double pour chaque échantillon.

### **Prélèvement**

23. Le volume requis pour les échantillons dépend de la méthode analytique (analyse spécifique), de l'analyseur de carbone utilisé et de la procédure choisie (filtration sur membrane ou centrifugation) pour le traitement de l'échantillon avant la détermination du carbone (paragraphe 26 et 27). Avant de prélever, s'assurer que le milieu d'essai est bien mélangé et que toute matière adhérant à la paroi du récipient est dissoute ou remise en suspension.

24. Immédiatement après le prélèvement, filtrer sur membrane ou centrifuger. Si nécessaire, conserver les échantillons filtrés ou centrifugés entre 2 et 4°C pendant au maximum 48 heures ou en dessous de -18°C sur de plus longues périodes (si on sait que cela n'affectera pas la substance, acidifier à pH 2 avant le stockage).

25. Des membranes filtrantes (0,2 à 0,45 µm), telles que les membranes en polycarbonate, qui ne libèrent pas de carbone ou n'adsorbent pas la substance au cours de la filtration conviennent. Certaines membranes filtrantes sont imprégnées de tensio-actifs pour l'hydrophilisation et elles peuvent libérer des quantités considérables de carbone dissous. Préparer de tels filtres en les faisant bouillir dans de l'eau désionisée pendant trois périodes consécutives d'une heure. Après cette opération, conserver les filtres dans de l'eau désionisée. Jeter les premiers 20 ml de filtrat.

26. Au lieu d'une filtration sur membrane, on peut choisir de centrifuger les échantillons. Centrifuger à 40 000 m.s<sup>-2</sup> (~ 4 000 g) pendant 15 minutes, de préférence dans une centrifugeuse réfrigérée.

Remarque : La différenciation par centrifugation entre le COT et le COD pour de très faibles concentrations semble inopérante, soit parce que toutes les bactéries ne sont pas enlevées, soit parce que du carbone faisant partie du plasma bactérien est redissous. Pour des concentrations d'essai plus élevées (> 10 mg/l de C), l'erreur due à la centrifugation semble relativement petite.

### **Fréquence de prélèvement**

27. Si les analyses sont effectuées immédiatement après le prélèvement, déterminer le moment du prélèvement suivant au vu des résultats de la détermination analytique.

28. Si les échantillons sont conservés pour des analyses ultérieures (paragraphe 24) on doit en prélever davantage que cinq. En analysant d'abord les derniers échantillons, puis des échantillons convenablement choisis en revenant par étape « à reculons » vers le début, on peut obtenir une description correcte de la courbe de biodégradation avec un nombre de dosages relativement faible. Si à la fin de l'essai il n'y a eu aucune dégradation, il n'est pas nécessaire d'analyser d'autres échantillons, et dans ce cas, la méthode « à reculons » permet d'économiser une partie considérable des coûts d'analyse.

29. Si sur la courbe de dégradation, on observe un plateau avant le 60ème jour, arrêter l'essai. Si la dégradation a démarré de façon certaine au 60ème jour mais n'a pas atteint de plateau, prolonger l'expérience.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Traitement des résultats**

30. Reporter les résultats analytiques sur la feuille de résultats jointe (Annexe 2), et calculer les valeurs de biodégradation pour les substances d'essai et de référence à partir de l'équation :

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

avec:

$D_t$  = dégradation en pourcentage de COD ou disparition d'un composé spécifique au temps t,

$C_o$  = concentration initiale de COD ou d'un composé spécifique dans le milieu d'essai,

$C_t$  = concentration de COD ou d'un composé spécifique dans le milieu d'essai au temps t,

$C_{bl(o)}$  = concentration initiale de COD ou d'un composé spécifique dans le témoin,

$C_{bl(t)}$  = concentration de COD ou d'un composé spécifique dans le témoin au temps t.

31. Exprimer la dégradation comme le pourcentage de disparition du COD (dégradation ultime) ou d'un composé spécifique (dégradation primaire) au temps t. Calculer les concentrations en COD à 0,1 mg/l près et arrondir les moyennes des valeurs de  $D_t$  à l'entier le plus proche.



32. Tracer sur un diagramme la courbe de dégradation en fonction du temps comme sur la figure du paragraphe « Validité et interprétation des résultats ». S'il existe suffisamment de données, à partir de cette courbe calculer la phase de latence ( $t_L$ ) et le temps nécessaire pour atteindre 50 % d'élimination après la fin de la phase de latence ( $t_{50}$ ).

### **Rapport d'essai**

33. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Substance d'essai :

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

Conditions d'essai :

- lieu du prélèvement et description du site ; état de la pollution et nature des substances nutritives (comptage des colonies, nitrate, ammonium, phosphate, s'il y a lieu) ;
- caractéristiques de l'échantillon (date et profondeur de prélèvement, aspect, température, salinité, COD (facultatif), délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai ;
- méthode utilisée, s'il y a lieu, pour faire vieillir l'eau de mer ;
- méthode utilisée pour le prétraitement (filtration/sédimentation) de l'eau de mer ;
- méthode utilisée pour la détermination du COD ;
- méthode utilisée pour l'analyse spécifique (facultatif) ;
- méthode utilisée pour déterminer le nombre de bactéries hétérotrophes dans l'eau de mer (méthode de comptage sur boîte ou autre méthode) (facultatif) ;
- autres méthodes (facultatif) utilisées pour caractériser l'eau de mer (mesures d'ATP, etc.) ;

Résultats :

- données analytiques reportées sur une feuille de résultats (Annexe 2) ;
- on trace la courbe de dégradation en fonction du temps sur un diagramme qui indique la phase de latence ( $t_L$ ), la pente, et le temps nécessaire (à partir de la fin de la période de latence) pour atteindre 50% d'élimination ( $t_{50}$ ). La phase de latence peut être évaluée graphiquement comme sur la figure du paragraphe « Critères de validité et interprétation des résultats » ou plus commodément elle peut être déterminée comme le temps nécessaire pour atteindre 10% de dégradation ;
- le pourcentage de dégradation mesuré après 60 jours ou à la fin de l'essai.

Discussion des résultats.

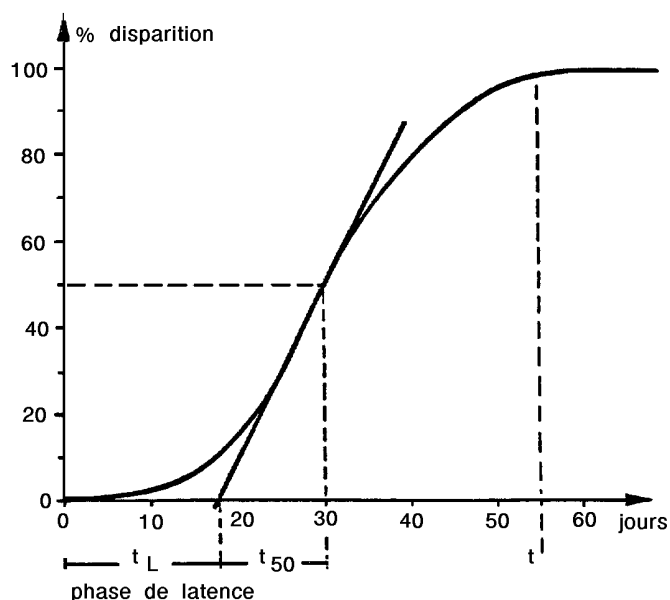
### **Critères de validité et interprétation des résultats**

34. Les résultats obtenus avec les composés de référence par exemple le benzoate de sodium, l'acétate de sodium ou l'aniline, doivent être comparables à ceux de l'essai circulaire (3) (se reporter au paragraphe 7 sur les « Composés de référence »). Si les résultats obtenus avec les composés de référence sont atypiques, l'essai doit être recommencé avec un autre échantillon d'eau de mer. Bien qu'on ne puisse pas toujours interpréter sans ambiguïté les résultats des essais d'inhibition à cause du COD apporté par le matériau d'essai, une réduction importante dans le taux de disparition du COD total par rapport à celui

du témoin, contrôlant la procédure, constitue une indication de la présence d'effets toxiques.

35. Du fait de l'utilisation de concentrations d'essai relativement élevées par rapport à celles de la plupart des systèmes naturels (et par conséquent d'un rapport défavorable entre les concentrations des substances d'essai et des autres sources de carbone), on doit considérer cette méthode comme un essai préliminaire qui peut être utilisé pour savoir si une substance est facilement biodégradable ou non. C'est pourquoi un résultat faible ne signifie pas nécessairement que la substance d'essai n'est pas biodégradable en milieu marin, mais il indique que davantage de travaux seront nécessaires pour conclure.

Un exemple d'une expérience de dégradation théorique illustrant une façon d'obtenir les valeurs de  $t_L$  (durée de la « phase de latence ») et de  $t_{50}$  (intervalle de temps, démarrant après  $t_L$ , nécessaire pour atteindre 50% de disparition), est donné ci-après.



## MÉTHODE DU FLACON FERMÉ

### INTRODUCTION

1. Cette méthode est une variante pour l'eau de mer de l'essai en fiole fermée (5) et elle a été mise au point à la suite d'un essai circulaire organisé pour la CEE par l'Institut Danois de la Qualité de l'Eau (3).

2. De la même façon que pour la méthode du flacon agité en milieu marin, qui l'accompagne, les résultats de cet essai ne doivent pas être considérés comme des indicateurs de la biodégradabilité facile, mais ils doivent être utilisés de façon spécifique pour obtenir des informations sur la biodégradabilité des produits chimiques en milieu marin.

### PRINCIPE DE LA MÉTHODE

3. Une quantité prédéterminée de substance d'essai est dissoute dans le milieu d'essai de façon à obtenir une concentration comprise habituellement entre 2 et 10 mg/l de substance (on peut utiliser une ou plusieurs concentrations). La solution est conservée dans un flacon rempli fermé, dans l'obscurité, au bain-marie ou dans une enceinte thermostatée entre 15 et 20°C à  $\pm 1^\circ\text{C}$  près. Dans les cas, où l'objectif de l'étude est de simuler des situations réelles de l'environnement, les essais peuvent être effectués en dehors de cet intervalle normal de température, pourvu qu'on dispose de moyens appropriés pour contrôler la température. La dégradation est suivie en analysant l'oxygène sur une période de 28 jours.

4. L'essai circulaire a montré que si on prolonge l'essai au-delà de 28 jours, on obtient, dans la plupart des cas, aucune information utile, à cause de graves interférences. Les valeurs du témoin pour la demande biologique en oxygène (DBO) se sont révélées extrêmement élevées, probablement à cause d'une croissance sur les parois due à un manque d'agitation et à cause de la nitrification. La durée d'essai recommandée est donc de 28 jours, mais si la valeur du témoin pour la DBO reste en dessous d'une limite de 30% (paragraphe 15 et 40) l'essai peut être prolongé.

### INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

5. Afin de savoir si on peut appliquer cet essai à une substance particulière, on doit connaître certaines de ses propriétés. Afin de calculer la demande théorique en oxygène (DThO), on doit connaître la formule générale (voir Annexe 3) ; sinon on doit déterminer la demande chimique en oxygène (DCO) de la substance afin de l'utiliser comme valeur de référence. L'utilisation de la DCO est moins satisfaisante car certains produits ne sont pas totalement oxydés lors de cet essai.

6. La solubilité de la substance doit être supérieure ou égale à 2 mg/l, bien qu'en principe, on puisse tester des composés moins solubles (par exemple en utilisant les ultra-sons) ainsi que des composés volatils. Il est nécessaire de disposer d'informations sur la pureté ou les proportions relatives des principaux composants du produit étudié afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus, en particulier quand ceux-ci se situent près du niveau « seuil ».

7. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai vis à vis des bactéries (recueillies, par exemple dans des essais à court terme sur le taux de respiration (4)), peuvent s'avérer utiles pour choisir les concentrations d'essai appropriées et elles peuvent être essentielles pour interpréter correctement de faibles valeurs de biodégradation. Cependant, de telles informations ne sont pas toujours suffisantes pour interpréter les résultats obtenus dans l'essai de biodégradation, et la méthode décrite dans le

paragraphe 27 est plus adaptée.

### **COMPOSÉS DE RÉFÉRENCE**

8. On doit utiliser des composés de référence adéquats pour contrôler l'activité microbienne de l'échantillon d'eau de mer. L'aniline, l'acétate de sodium ou le benzoate de sodium peuvent (par exemple) être utilisés. On doit observer pour ces composés une dégradation d'au moins 60% (de leur DThO) dans un laps de temps relativement court, sinon il est recommandé de recommencer l'essai en utilisant un autre échantillon d'eau de mer.

9. Dans l'essai circulaire de la CEE où les échantillons d'eau de mer étaient prélevés à différents endroits et à différentes périodes de l'année, la phase de latence ( $t_L$ ) et le temps nécessaire, après la phase de latence, pour atteindre 50% de dégradation ( $t_{50}$ ), étaient pour le benzoate de sodium respectivement de 0 à 2 jours et de 1 à 4 jours. Pour l'aniline, les valeurs étaient comprises entre de 0 et 7 jours pour la  $t_L$  et entre 2 et 12 jours pour la  $t_{50}$ .

### **REPRODUCTIBILITÉ ET SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE**

10. La reproductibilité de ces méthodes a été établie dans l'essai circulaire de la CEE (3).

### **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

#### **Appareillage**

11. Matériel courant de laboratoire et :

- (a) On peut utiliser des flacons pour l'analyse de la DBO d'une contenance de 250 à 300 ml, ou des fioles de 250 ml à col étroit, fermés dans les deux cas par des bouchons de verre ;
- (b) Plusieurs récipients de 2, 3 et 4 litres gradués en litres, pour la préparation de l'expérience et pour le remplissage des flacons à DBO ;
- (c) Un bain-marie ou une pièce thermostatée pour maintenir les récipients à température constante ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) et à l'abri de la lumière ;
- (d) Un équipement pour l'analyse de l'oxygène dissous ;
- (e) Des membranes filtrantes d'une porosité de 0,2 à 0,45  $\mu\text{m}$  (facultatif) ;
- (f) Un équipement pour des analyses spécifiques (facultatif).

#### **Eau de mer**

12. Prélever un échantillon d'eau de mer dans un récipient soigneusement nettoyé et le transporter au laboratoire, de préférence dans un intervalle de un à deux jours après le prélèvement. Au cours du transport, ne pas laisser la température de l'échantillon dépasser de façon importante la température qui sera utilisée dans l'essai.

13. Identifier précisément l'endroit du prélèvement, décrire son état de pollution et indiquer les

substances nutritives qu'on y trouve. En particulier pour les eaux côtières ou les eaux polluées, inclure dans cette caractérisation un comptage des colonies bactériennes hétérotrophes et la détermination des concentrations en nitrate, ammonium et phosphate dissous.

14. Pour l'échantillon d'eau de mer, fournir les informations suivantes:

- date de prélèvement ;
- profondeur de prélèvement ;
- aspect de l'échantillon - trouble, etc. ;
- température au moment du prélèvement ;
- salinité ;
- carbone organique dissous (COD) ;
- délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai.

15. Si l'on trouve que la teneur en COD de l'échantillon est élevé, ou si l'on pense qu'au bout de 28 jours la DBO du témoin représentera plus de 30% de celle des substances de référence, il est recommandé de faire vieillir l'échantillon pendant environ une semaine avant son utilisation.

16. Le vieillissement se fait en conservant l'échantillon dans des conditions aérobies à la température de l'essai, dans l'obscurité ou en lumière diffuse. Si nécessaire, les conditions aérobies sont maintenues par une légère agitation. Au cours du vieillissement, la teneur en matière organique facilement dégradable diminue. Dans l'essai circulaire (3), on a trouvé aucune différence entre le potentiel de dégradation d'échantillons d'eau de mer vieillis ou fraîchement recueillis.

17. Avant son utilisation, prétraiter l'eau de mer afin d'en éliminer les grosses particules, par exemple par filtration sur un filtre de nylon ou sur du gros papier filtre (pas de membranes filtrantes ou de filtres GF-C), par sédimentation et décantation. On doit mentionner le procédé utilisé. Si l'échantillon est vieilli, effectuer le prétraitement après vieillissement.

### **Solutions mères des substances nutritives minérales**

18. Préparer les solutions-mères suivantes en utilisant des réactifs de qualité pour analyse :

- (a) Dihydrogénophosphate monopotassique,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 8,50 g  
 Hydrogénophosphate dipotassique,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ..... 21,75 g  
 Hydrogénophosphate disodique dihydraté,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$  ..... 33,30 g  
 Chlorure d'ammonium,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ..... 0,50 g

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

- (b) Chlorure de calcium anhydre,  $\text{CaCl}_2$  ..... 27,50 g

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

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

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

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

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

On peut éviter la précipitation de la solution (d) en ajoutant une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g

d'acide éthylènediamine-tétraacétique (sel disodique de l'EDTA). S'il se forme un précipité dans une solution-mère, la remplacer par une solution fraîchement préparée.

### **Préparation du milieu d'essai**

19. Ajouter 1 ml de chacune des solutions mères ci-dessus par litre d'eau de mer prétraitée. Saturer le milieu avec de l'air à la température de l'essai, en y faisant barboter de l'air comprimé propre pendant environ 20 minutes. Déterminer la concentration en oxygène dissous à des fins de contrôle. On peut lire sur l'abaque incluse dans cette Ligne directrice pour les essais (Annexe 4), la concentration de saturation en oxygène dissous en fonction de la salinité et de la température.

### **Inoculum**

20. Ne pas ajouter d'inoculum spécifique, en plus des micro-organismes déjà présents dans l'eau de mer. Déterminer (facultativement) le nombre hétérotrophes formant colonies présents dans le milieu d'essai contenant l'eau de mer (et de préférence également dans les échantillons d'eau de mer du départ) par exemple par comptage sur boîte, en utilisant de l'agar marin. Ceci est particulièrement souhaitable pour les échantillons provenant de zones côtières ou polluées. Contrôler l'activité microbienne hétérotrophe dans l'eau de mer en effectuant un essai avec un composé de référence.

### **Préparation des flacons**

21. Toutes les manipulations nécessaires y compris le vieillissement et le prétraitement de l'eau de mer sont réalisées à la température d'essai choisie, comprise entre 15 et 20°C ; toute la verrerie doit être propre mais non stérile.

22. Pour la détermination de la DBO des substances d'essai et de référence préparer des groupes de flacons à DBO dans des séries expérimentales simultanées. Réaliser toutes les analyses dans des récipients en double (témoins, substances de référence et d'essai), c'est-à-dire préparer deux récipients pour chaque détermination. Effectuer au moins quatre analyses aux jours 0, 5, 15 et 28.

Pour les analyses d'oxygène, quatre déterminations exigent un total de  $3 \times 2 \times 4 = 24$  flacons (témoin, substance d'essai et de référence) et ainsi environ 8 litres de milieu d'essai (pour une seule concentration du produit d'essai).

23. Préparer les solutions séparées des substances d'essai et de référence dans de grands récipients d'un volume suffisant (paragraphe 11) en ajoutant d'abord les substances d'essai et de référence soit directement, soit à partir d'une solution mère concentrée, dans les récipients partiellement remplis. Ajouter du milieu d'essai supplémentaire jusqu'à obtenir les concentrations finales désirées. Si on utilise des solutions mères de substances d'essai et/ou de référence, s'assurer que la salinité du milieu contenant l'eau de mer n'a pas été modifiée de façon importante.

24. Choisir les concentrations des substances d'essai et de référence en tenant compte de :

- (a) la solubilité de l'oxygène dissous dans l'eau de mer pour la température et la salinité choisies pour l'essai (voir l'abaque ci-jointe de l'Annexe 4) ;
- (b) la valeur de la DBO de l'eau de mer dans le témoin ; et
- (c) la valeur attendue pour la biodégradabilité de la substance d'essai.

25. Pour une salinité de 32 pour mille (eau de l'océan), la solubilité de l'oxygène dissous est d'environ 8,1 mg/l à 15°C et 7,4 mg/l à 20°C. La consommation en oxygène de l'eau de mer elle-même

(respiration témoin) peut aller jusqu'à 2 mg O<sub>2</sub>/l ou plus, si l'eau de mer n'a pas été vieillie. C'est pourquoi, pour être sûr qu'après l'oxydation de la substance d'essai, il reste une concentration significative en oxygène, on utilise au départ une concentration d'environ 2 à 3 mg/l (selon la DThO) pour les composés qui sont susceptibles d'être complètement dégradés dans les conditions de l'essai (comme les substances de référence). Les substances moins dégradables sont testées à des concentrations supérieures, jusqu'à environ 10 mg/l, dans la mesure où cela n'entraîne pas d'effets toxiques. Il peut s'avérer intéressant d'effectuer en parallèle des essais avec une concentration faible (environ 2 mg/l) et une concentration élevée (environ 10 mg/l) de la substance d'essai.

26. On doit déterminer en parallèle les valeurs témoins pour l'oxygène, dans des récipients qui ne contiennent ni substance d'essai ni substance de référence.

27. Si l'on veut évaluer des effets inhibiteurs, préparer dans différents grands récipients, les séries de solutions suivantes (paragraphe 13) :

- (a) 2 mg/l d'un composé facilement dégradable, par exemple un des composés de référence proposés ;
- (b) x mg/l de substance d'essai (x est habituellement égal à 2) ;
- (c) 2 mg/l du composé facilement dégradable plus x mg/l de substance d'essai.

#### **Témoin physico-chimique (facultatif)**

28. Si on choisit de faire des analyses spécifiques, on peut effectuer une expérience physico-chimique afin de vérifier si la substance d'essai est éliminée par des mécanismes abiotiques tels qu'une hydrolyse ou une adsorption. Un témoin physico-chimique peut être réalisé en ajoutant du chlorure de mercure (II) (HgCl<sub>2</sub>)<sup>(2)</sup> (à raison de 50 à 100 mg/l) dans des récipients en double contenant la substance d'essai, afin de stopper l'activité microbienne. Une diminution importante de la concentration d'un composé spécifique au cours de l'essai indique l'existence de mécanismes d'élimination abiotiques.

#### **Nombre de flacons à DBO dans un essai type**

29. Dans un essai type on utilise les récipients suivants :

- au moins 8 flacons contenant la substance d'essai ;
- au moins 8 flacons contenant uniquement l'eau de mer fortifiée par des substances nutritives ;
- au moins 8 flacons contenant le composé de référence, et si nécessaire
- 6 flacons contenant les substances d'essai et de référence (témoin de toxicité).

#### **EXÉCUTION DE LA MÉTHODE**

30. Après préparation, siphonner immédiatement chaque solution à partir du quart inférieur (pas à partir du fond) du grand récipient approprié afin de remplir les séries respectives de flacons à DBO. Mesurer immédiatement l'oxygène dissous à l'instant zéro (paragraphe 33) ou conserver par précipitation avec MnCl<sub>2</sub> (chlorure de manganèse (II)) et NaOH (hydroxyde de sodium) les témoins du temps zéro en

---

<sup>(2)</sup> Le chlorure de mercure (II) (HgCl<sub>2</sub>) est une substance très toxique qui doit être manipulée avec certaines précautions. Les déchets aqueux contenant ce produit chimique doivent être éliminés de façon appropriée ; ils ne doivent pas être jetés à l'égout.

vue d'une analyse chimique ultérieure.

31. Les flacons à DBO restants menés en parallèle sont incubés à la température de l'essai (15 à 20°C), dans l'obscurité et retirés de la zone d'incubation à intervalles réguliers (par exemple au minimum après 5, 15 et 28 jours) et on mesure leur concentration en oxygène dissous (paragraphe 33).

32. Les échantillons destinés à des analyses spécifiques (facultatives) sont filtrés sur membrane (0,2 à 0,45 µm) ou centrifugés pendant 15 minutes. Si on ne les analyse pas immédiatement, les conserver entre 2 et 4°C pendant au maximum 48 heures ou à - 18°C sur de plus longues périodes (si l'on sait que cela n'affectera pas la substance d'essai, acidifier à pH 2 avant stockage).

### **Détermination de l'oxygène dissous**

33. Déterminer la concentration en oxygène dissous en utilisant une méthode chimique ou électrochimique reconnue au niveau national ou international.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Traitement des résultats**

34. Reporter les résultats analytiques sur les feuilles de résultats jointes (Annexe 5).

35. Calculer la DBO en faisant la différence entre la perte en oxygène d'une solution témoin et d'une solution contenant la substance d'essai dans les conditions de l'essai. Diviser cette perte nette en oxygène par la concentration de la substance (en poids/volume) afin d'exprimer la DBO en mg de DBO/mg de substance. La dégradation est calculée en divisant la demande biochimique en oxygène soit, de préférence, par la demande théorique en oxygène (DThO) soit par la demande chimique en oxygène (DCO) et elle est exprimée sous forme de pourcentage (voir le paragraphe 36).

36. Pour chaque temps de prélèvement, calculer les valeurs de la biodégradation à la fois pour les substances d'essai et de référence en utilisant l'une ou l'autre des équations suivantes :

$$\% \text{ biodégradation} = \frac{\text{mg } O_2 / \text{mg de substance testée}}{\text{mg DThO} / \text{mg de substance testée}} \times 100$$

$$\% \text{ biodégradation} = \frac{\text{mg } O_2 / \text{mg de substance testée}}{\text{mg DCO} / \text{mg de substance testée}} \times 100$$

avec :

DThO = demande théorique en oxygène (calculs en Annexe 3)

DCO = demande chimique en oxygène, déterminée expérimentalement.

**Remarque :** Il arrive que les deux modes de calcul (pourcentage de la DThO ou pourcentage de la DCO) ne donnent pas les mêmes résultats ; il est préférable d'utiliser la DThO, car dans l'essai de la DCO certains produits chimiques ne sont pas complètement oxydés.

37. Tracer sur un diagramme la courbe de dégradation en fonction du temps (voir l'exemple du paragraphe « Validité et interprétation des résultats »). S'il existe suffisamment de données, à partir de cette courbe calculer la phase de latence ( $t_L$ ) et le temps nécessaire pour atteindre 50% d'élimination après la fin de la phase de latence ( $t_{50}$ ).



38. Si on réalise une analyse spécifique (facultatif), le pourcentage de dégradation primaire correspond au pourcentage de disparition du composé spécifique au cours de la période d'essai (corrigé de la valeur obtenue dans les témoins).

### **Rapport d'essai**

39. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Substance d'essai :

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

Conditions d'essai :

- lieu du prélèvement et description du site : état de la pollution et nature des substances nutritives (comptage des colonies, nitrate, ammonium, phosphate, s'il y a lieu) ;
- caractéristiques de l'échantillon (date et profondeur de prélèvement, aspect, température, salinité, COD (facultatif), délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai) ;
- méthode utilisée, s'il y a lieu, pour faire vieillir l'eau de mer ;
- méthode utilisée pour le prétraitement (filtration/sédimentation) de l'eau de mer ;
- méthode utilisée pour la détermination de la DCO (si elle est effectuée) ;
- méthode utilisée pour mesurer l'oxygène ;
- procédé de dispersion des substances peu solubles dans les conditions de l'essai ;
- méthode utilisée pour déterminer le nombre de bactéries hétérotrophes dans l'eau de mer (méthode de comptage sur boîte ou autre méthode) ;
- méthode utilisée pour déterminer le COD dans l'eau de mer (facultatif) ;
- méthode utilisée pour l'analyse spécifique (facultatif) ;
- autres méthodes facultatives utilisées pour caractériser l'eau de mer (mesures d'ATP, etc.) ;

Résultats :

- données analytiques reportées sur une feuille de résultats (comme celle jointe en Annexe 5) ;
- la courbe de dégradation en fonction du temps représentée sur un diagramme qui indique la phase de latence ( $t_L$ ), la pente, et le temps nécessaire (à partir de la fin de la période de latence) pour atteindre 50% de la consommation finale en oxygène due à l'oxydation de la substance d'essai ( $t_{50}$ ). La phase de latence peut être évaluée graphiquement comme sur la figure jointe, ou plus commodément déterminée comme le temps nécessaire pour atteindre 10% de dégradation ;
- le pourcentage de dégradation mesuré après 28 jours.

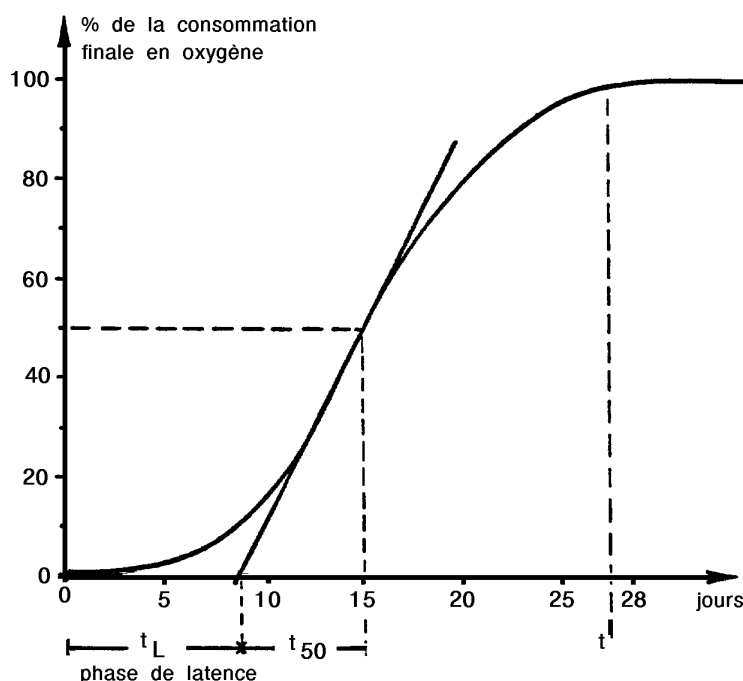
Discussion des résultats.

### **Critères de validité et interprétation des résultats**

40. La respiration du témoin ne doit pas dépasser 30% de l'oxygène consommé dans le récipient d'essai. S'il n'est pas possible de se conformer à ce critère en utilisant de l'eau de mer fraîchement prélevée, celle-ci doit être vieillie (stabilisée) avant utilisation.

41. On doit tenir compte du fait que les composés azotés peuvent modifier les résultats.
42. Les résultats obtenus avec les composés de référence par exemple le benzoate de sodium et l'aniline, doivent être comparables à ceux de l'essai circulaire (3) (paragraphe 9). Si les résultats obtenus avec les composés de référence sont atypiques, l'essai doit être recommencé avec un autre échantillon d'eau de mer.
43. On peut considérer que la substance d'essai inhibe les bactéries (à la concentration utilisée) si la DBO du mélange des substances d'essai et de référence est inférieure à la somme des DBO des solutions séparées des deux substances.
44. Du fait de l'utilisation de concentrations d'essai relativement élevées par rapport à celles de la plupart des systèmes naturels et par conséquent d'un rapport défavorable entre les concentrations de la substance d'essai et des autres sources de carbone, on doit considérer cette méthode comme un essai préliminaire qui peut être utilisé pour savoir si une substance est facilement biodégradable ou non. C'est pourquoi un résultat faible ne signifie pas nécessairement que la substance d'essai n'est pas biodégradable en milieu marin, mais il indique que davantage de travaux seront nécessaires pour conclure.

Un exemple d'une expérience de dégradation théorique illustrant une façon d'évaluer les valeurs de  $t_L$  (durée de la « phase de latence ») et de  $t_{50}$ , intervalle de temps (démarrant après  $t_L$ ), nécessaire pour atteindre 50% de la consommation finale en oxygène due à l'oxydation de la substance d'essai, est donné ci-après.



**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere* 10 (6); 561-573.
- (2) OCDE, Paris (1992). Ligne directrice pour les essais 301 E.
- (3) N. Nyholm & P. Kristensen. Screening test methods for assessment of biodegradability of chemical substances in seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities (1985).
- (4) OCDE, Paris (1984). Ligne directrice pour les essais 209.
- (5) OCDE, Paris (1992). Ligne directrice pour les essais 301 D.

**ANNEXE 1****DÉTERMINATION DU CARBONE ORGANIQUE DANS L'EAU DE MER**

Pour déterminer le carbone organique d'un échantillon aqueux on oxyde les composés organiques de cet échantillon en dioxyde de carbone en utilisant généralement l'une des trois techniques suivantes :

- oxydation-voie humide par persulfate/irradiation-UV ;
- oxydation-voie humide par persulfate/température élevée (116-130°C) ;
- combustion.

La quantité de CO<sub>2</sub> dégagé est mesurée par spectrométrie infrarouge ou par titrimétrie. Ou bien le CO<sub>2</sub> est réduit en méthane qui est dosé par un détecteur à ionisation de flamme (DIF).

La méthode persulfate/UV est communément utilisée pour analyser de l'eau « propre » avec une faible teneur en matière particulaire. Les deux autres méthodes peuvent être appliquées à la plupart des types d'échantillons d'eau, l'oxydation par le persulfate à température élevée se révélant plus adaptée pour les échantillons de faible teneur en carbone organique, tandis que la technique de la combustion s'applique aux échantillons dont la teneur en carbone organique non volatil (CONV) se situe bien au dessus de 1 mg/l de C.

**Interférences**

Ces trois méthodes dépendent de l'élimination ou de la compensation du carbone inorganique (CI) présent dans l'échantillon. Afin d'éliminer le CI, la méthode la plus fréquemment utilisée consiste à purger l'échantillon acidifié de son CO<sub>2</sub>, bien que cette manipulation entraîne également une perte des composés organiques volatils (1). L'élimination complète ou la compensation du CI doit être effectuée pour chaque type d'échantillon, et, selon les échantillons, le carbone organique volatil doit être déterminé, en plus du CONV.

Des concentrations élevées en chlorure entraînent une diminution de l'efficacité de l'oxydation quand on emploie la méthode persulfate/UV (2). Cette interférence peut cependant être éliminée en utilisant un oxydant modifié par l'addition de nitrate de mercure (II). Lors de l'étude d'échantillons contenant des chlorures, il est recommandé d'utiliser un volume d'échantillon le plus grand possible. Avec la méthode par combustion, des concentrations élevées en sel dans les échantillons analysés peuvent entraîner un dépôt de sel sur le catalyseur et une corrosion excessive du tube de combustion. On doit prendre les précautions indiquées dans le manuel du fabricant.

Quand on utilise la méthode persulfate/UV, il peut arriver que les échantillons très troubles ainsi que ceux qui contiennent des particules soient incomplètement oxydés.

**Exemple d'une méthode appropriée**

Le carbone organique non volatil est déterminé par oxydation au moyen de persulfate/irradiation UV et le CO<sub>2</sub> qui se dégage alors est dosé par spectrométrie infrarouge non dispersive.

Le réactif pour l'oxydation est modifié selon les suggestions données dans (2) et comme décrit dans le manuel du fabricant :

- a) 8,2 g de HgCl<sub>2</sub> et 9,6 g de Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O sont dissous dans quelques centaines de

millilitres d'eau de dilution contenant une faible concentration en carbone ;

- b) 20 g de  $K_2S_2O_8$  sont dissous dans la solution de sel mercurique ;
- c) 5 ml de  $HNO_3$  (concentré) sont ajoutés au mélange ;
- d) le réactif est dilué jusqu'à un volume final de 1 000 ml.

On supprime l'interférence due au chlorure en utilisant un volume d'échantillon de 40  $\mu$ l pour 10% de chlorure et un volume d'échantillon de 200  $\mu$ l pour 1.9% de chlorure. Avec cette méthode on peut analyser des échantillons de forte teneur en chlorure et/ou des volumes d'échantillon plus importants dans la mesure où on empêche le chlorure de se former dans le récipient d'oxydation. On peut ensuite, si nécessaire, déterminer le carbone organique volatil dans le type d'échantillon étudié.

### **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) ISO, Qualité de l'eau - détermination du carbone organique total. Projet de norme internationale ISO/DIS 8245, 16 janvier 1986.
- (2) American Public Health Association, Standard methods for the estimation of water and wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16ème édition (1985).

Egalement intéressant (donne une description d'un système d'autoanalyse) :

- (3) W. Schreurs (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction, Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

ANNEXE 2**BIODÉGRADATION DANS L'EAU DE MER  
MÉTHODE DU FLACON AGITÉ  
FEUILLE DE RÉSULTAT**1. LABORATOIRE :2. DATE DU DEBUT DE L'ESSAI :3. SUBSTANCE D'ESSAI :

Nom :

Concentration de la solution mère : mg/l de substance

Concentration initiale dans le milieu, t<sub>0</sub> : mg/l de substance

: mg/l de COD

4. EAU DE MER :

Origine :

Date du prélèvement :

Profondeur du prélèvement :

Aspect au moment du prélèvement

(par exemple trouble, etc.) :

Salinité au moment du prélèvement : ‰

Température au moment du prélèvement : °C

COD au moment du prélèvement : mg/l

Prétraitement avant l'essai (par exemple  
filtration, sédimentation, vieillissement, etc.) :

Comptage des colonies microbiennes :

- échantillon de départ : colonies/ml

- avant le début de l'essai : colonies/ml

Autres caractéristiques :

5. DOSAGES DU CARBONE :

Analyseur de carbone :

	Flacon n°		COD après n jours (mg/ml)				
			0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>
Essai : eau de mer fortifiée par des substances nutritives contenant la substance d'essai	1	a <sub>1</sub>					
		a <sub>2</sub>					
		moyenne, C <sub>a(t)</sub>					
	2	b <sub>1</sub>					
		b <sub>2</sub>					
		moyenne, C <sub>b(t)</sub>					
Témoin : eau de mer fortifiée par des substances nutritives ne contenant pas la substance d'essai	1	c <sub>1</sub>					
		c <sub>2</sub>					
		moyenne, C <sub>c(t)</sub>					
	2	d <sub>1</sub>					
		d <sub>2</sub>					
		moyenne, C <sub>d(t)</sub>					
	moyenne, C <sub>bl(t)</sub> = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES :

Flacon n°	Calcul des résultats	% de dégradation après n jours				
		0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_o - C_{bl(o)}} \times 100$					
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_o - C_{bl(o)}} \times 100$					
Moyenne (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$					

\* On ne doit pas faire la moyenne de D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> s'il existe une grande différence entre ces deux valeurs.

Remarque : des tableaux similaires peuvent être utilisées quand on suit la dégradation par une analyse spécifique et également pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

7. DÉGRADATION ABIOTIQUE (facultatif) :

	Temps (en jours)	
	0	t
Concentration en COD (en mg/l) dans le témoin stérile	C <sub>s(o)</sub>	C <sub>s(t)</sub>

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



ANNEXE 3CALCUL DE LA DEMANDE THÉORIQUE BIOCHIMIQUE EN OXYGÈNEMÉTHODE DU FLACON FERMÉ

La DThO de la substance  $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ , de poids moléculaire PM est calculée d'après la formule :

$$DThO_{NH_3} = \frac{16 [2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - 0]}{PM}$$

Ce calcul implique que C est minéralisé en  $CO_2$  et que H est transformé en  $H_2O$ , P en  $P_2O_5$  et Na en  $Na_2O$ . Les halogènes sont éliminés sous forme d'halogénures d'hydrogène et l'azote sous forme d'ammoniac.

**Exemple :** Le glucose  $C_6H_{12}O_6$ , de PM = 180

$$DThO = \frac{16 (2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2 / \text{mg glucose}$$

Les poids moléculaires des sels autres que ceux des métaux alcalins sont calculés en supposant qu'ils ont été hydrolysés. On considère que le soufre est oxydé à l'état +6.

**Exemple :** Le n-dodécylbenzènesulfonate de sodium  $C_{18}H_{29}SO_3Na$ , de PM = 348

$$DThO = \frac{16 (36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2 / \text{mg substance}$$

Dans le cas des substances azotées, l'azote peut être éliminé sous forme d'ammoniac, de nitrite ou de nitrate correspondant à différentes demandes théoriques en oxygène.

$$DThO_{NO_2} = \frac{16 [2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - 0]}{PM}$$

$$DThO_{NO_3} = \frac{16 [2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - 0]}{PM}$$

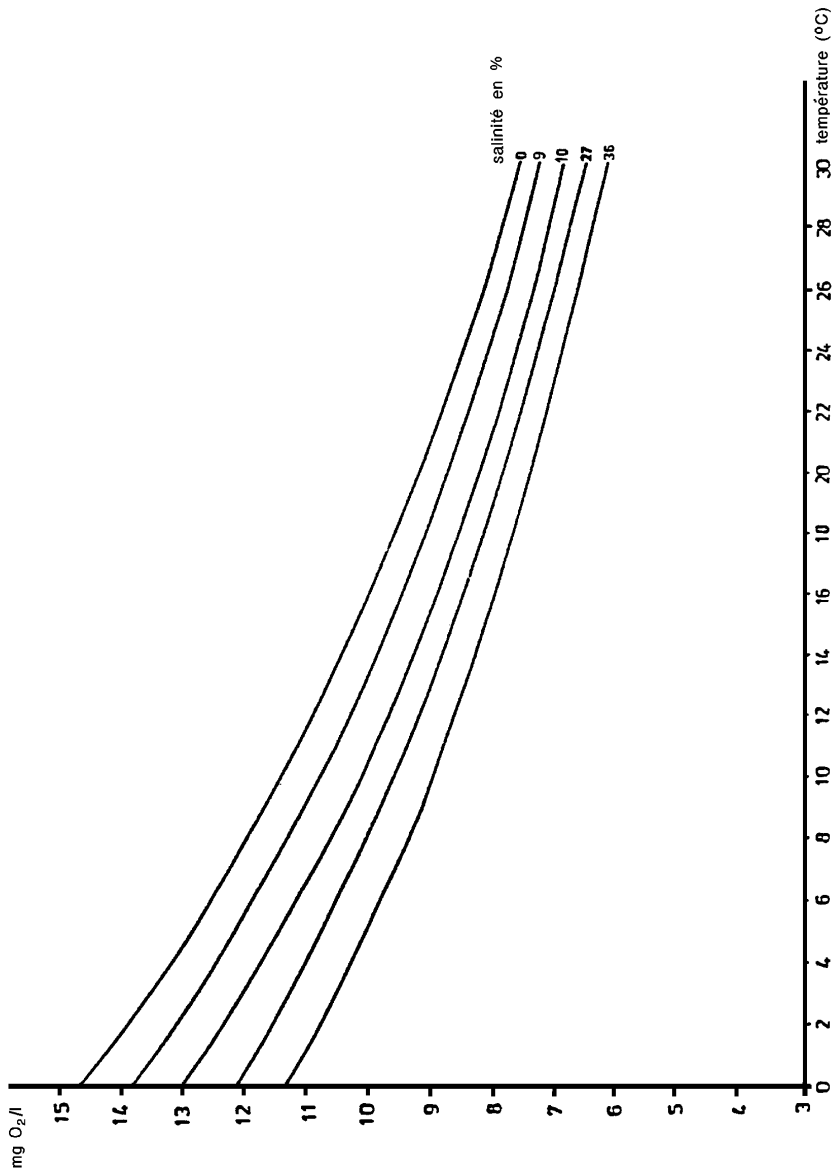
Par exemple, si dans le cas d'une amine secondaire, l'analyse a montré que l'azote était entièrement sous forme de nitrate :

$(C_{12}H_{25})_2NH$ , de  $PM = 353$

$$DThO_{NO_3} = \frac{16 (48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2})}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg substance}$$

ANNEXE 4

Abaque donnant la concentration de saturation en oxygène à différentes températures et salinités



ANNEXE 5

**BIODÉGRADATION DANS L'EAU DE MER  
MÉTHODE DE LA FIOLE FERMÉE  
FEUILLE DE RÉSULTAT**

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

Nom :  
 Concentration de la solution mère : mg /l  
 Concentration initiale dans le milieu  
 contenant l'eau de mer : mg /l  
 DThO ou DCO : mg O<sub>2</sub>/mg de substance d'essai

**4. EAU DE MER :**

Origine :  
 Date du prélèvement :  
 Profondeur du prélèvement :  
 Aspect au moment du prélèvement  
 (par exemple trouble, etc.) :  
 Salinité au moment du prélèvement : ‰  
 Température au moment du prélèvement : °C  
 COD « x » heures après le prélèvement : mg/l

Prétraitement avant l'essai (par exemple  
 filtration, sédimentation, vieillissement, etc.) :

Comptage des colonies microbiennes :

- échantillon de départ : colonies/ml  
 - avant le début de l'essai : colonies/ml

Autres caractéristiques :

**5. MILIEU D'ESSAI :**

Température après aération : °C  
 Concentration en O<sub>2</sub> après aération et  
 avant le début de l'essai : mg O<sub>2</sub>/l

**6. DOSAGE DE L'OXYGÈNE DISSOUS :**

Méthode : Winkler/électrode

	Flacon n°		mg O <sub>2</sub> /L après n jours			
			0	5	15	28
Essai : eau de mer, fortifiée par des substances nutritives, contenant la substance d'essai	1	a <sub>1</sub>				
	2	a <sub>2</sub>				
	Moyenne essai	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				
Témoin : eau de mer, fortifiée par des substances nutritives, ne contenant pas la substance d'essai	1	c <sub>1</sub>				
	2	c <sub>2</sub>				
	Moyenne essai	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

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

**7. DIMINUTION DE L'OXYGÈNE DISSOUS : % DE DÉGRADATION (% D) :**

	Diminution de l'oxygène dissous après n jours		
	5	15	28
$(m_b - m_t)^I$			
$\% D = \frac{(m_b - m_t)^I}{\text{substance d'essai (mg/l)} \times DThO} \times 100$			

1 Ceci suppose que m<sub>b(0)</sub> = m<sub>t(0)</sub>, avec  
 m<sub>b(0)</sub> = valeur du témoin au jour 0,  
 m<sub>t(0)</sub> = valeur de la substance d'essai au jour 0.

Si m<sub>b(0)</sub> n'est pas égal à m<sub>t(0)</sub>, utiliser (m<sub>t(0)</sub> - m<sub>t(x)</sub>) - (m<sub>b(0)</sub> - m<sub>b(x)</sub>), avec  
 m<sub>b(x)</sub> = valeur du témoin au jour x,  
 m<sub>t(x)</sub> = valeur de la substance d'essai au jour x.