

**LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS
CHIMIQUES****Biodégradabilité immédiate – dégagement de CO₂ dans des flacons hermétiquement clos
(essai de l'espace libre au-dessus du liquide)****INTRODUCTION**

1. La méthode de dépistage décrite dans cette Ligne directrice permet de classer les substances chimiques en fonction de leur biodégradabilité immédiate et fournit des informations semblables à celles exposées dans les six méthodes d'essai (A à F) de la Ligne directrice 301. Par conséquent, une substance chimique livrant un résultat positif pour cet essai de l'espace libre peut être considérée comme immédiatement biodégradable et donc rapidement dégradable dans l'environnement.

2. L'essai, désormais bien mis au point, de dégagement de CO₂ (1), basé sur l'essai original de Sturm (2), qui permet d'évaluer la biodégradabilité des produits chimiques organiques d'après la mesure du dioxyde de carbone produit par l'activité microbiologique, est normalement celui qui se prête le mieux à l'essai des substances chimiques peu solubles et celles fortement adsorbantes. Il est également choisi pour les substances solubles (mais non volatiles) puisque beaucoup considèrent que le dégagement de dioxyde de carbone constitue la seule preuve irréfutable de l'activité microbiologique. La disparition du carbone organique dissous peut faire intervenir des processus physico-chimiques (adsorption, volatilisation, précipitation, hydrolyse) ainsi que l'action microbiologique et de nombreuses réactions non-biologiques consommant de l'oxygène ; il est rare que le CO₂ soit produit à partir de produits chimiques organiques par un processus abiotique. Dans les essais original et modifié de Sturm (1)(2), le CO₂ est extrait de la phase liquide et envoyé dans des récipients absorbants par barbotage (passage bulle à bulle d'air traité à travers le milieu liquide pour enlever le CO₂), alors que dans la version de Larson (3)(4), lors de son transfert du réacteur vers l'absorbeur, le CO₂ traverse un espace libre contenant de l'air exempt de CO₂, tandis que le réacteur est agité en continu. Le réacteur n'est agité que dans la version de Larson modifiée ; l'agitation n'est prescrite que pour les substances insolubles, dans la version ISO (5) et dans la version originale des États-Unis (6), ces deux versions prescrivent le barbotage plutôt que le remplacement de l'espace libre. Dans une autre méthode officielle (7) de l'Agence des États-Unis pour la protection de l'environnement (US EPA), basée sur la méthode de Gledhill (8), le réacteur agité est fermé à l'atmosphère et le CO₂ produit est directement recueilli de la phase gazeuse dans un piège alcalin interne, comme dans les respiromètres classiques de Warburg/Barcroft.

3. Il a toutefois été démontré que le carbone inorganique s'accumule dans le milieu durant l'application de l'essai standard modifié de Sturm à plusieurs substances chimiques (9). La dégradation de l'aniline à 20 mg C/L a produit une concentration assez élevée de carbone inorganique, à savoir 8 mg/L.

Autrement dit, la collecte de CO₂ dans les pièges alcalins n'a pas reflété la quantité réelle de CO₂ produite par des processus microbiologiques à des moments intermédiaires au cours de la dégradation. Par conséquent, la prescription selon laquelle une production de CO₂ supérieure à 60% de la production maximale théorique (ThCO₂) doit être atteinte dans un intervalle de 10 jours (les dix jours suivant immédiatement le franchissement du seuil de 10% de biodégradation) pour une substance d'essai à classer comme immédiatement biodégradable, ne pourra être respectée pour certaines substances qui rentreraient dans cette classification d'après la disparition du carbone organique dissous.

4. Lorsque le pourcentage de dégradation est inférieur au niveau attendu, il est probable que du carbone inorganique se soit accumulé dans la solution expérimentale. À ce moment-là, la dégradabilité peut être évaluée avec les autres essais de biodégradabilité immédiate de l'OCDE.

5. D'autres inconvénients de la méthode de Sturm (laborieuse, longue, davantage sujette à des erreurs expérimentales et non applicable aux substances volatiles) avaient déjà incité les chercheurs à s'orienter vers une technique en flacon hermétiquement clos, autre que celle de Gledhill, plutôt que d'utiliser un écoulement gazeux continu (10)(11). Boatman et al. (12) ont réexaminé les méthodes précédentes et adopté un système d'espace libre fermé dans lequel le CO₂ est libéré dans l'espace libre à la fin de l'incubation moyennant une acidification du milieu. Le CO₂ était mesuré par chromatographie gazeuse (carbone inorganique) dans des échantillons prélevés automatiquement de l'espace libre, mais le carbone inorganique dissous dans la phase liquide n'était pas pris en compte. En outre, les récipients utilisés étaient très petits (20 ml) et ne contenaient que 10 ml de milieu, ce qui engendrait des problèmes, par exemple lorsqu'on ajoutait des quantités forcément très petites de substances d'essai insolubles, et/ou du fait que le milieu inoculé risquait de ne pas renfermer (suffisamment) de micro-organismes capables de dégrader les substances d'essai.

6. Ces problèmes ont été résolus par les études indépendantes de Struijs et Stoltenkamp (13) et de Birch et Fletcher (14), ces derniers s'étant inspirés de leur expérience avec les appareils utilisés dans l'essai de biodégradation anaérobie (15). Dans la première méthode (13), le CO₂ est mesuré dans l'espace libre après acidification et équilibrage, tandis que dans la seconde (14), le carbone inorganique dissous est mesuré dans les phases gazeuse et liquide, sans traitement ; plus de 90% du carbone inorganique formé était présent dans la phase liquide. Ces deux méthodes présentent des avantages sur l'essai de Sturm du fait que le système expérimental est plus compact et maniable, qu'elles s'appliquent aussi aux substances volatiles et que le risque de retard dans la mesure du CO₂ produit est écarté.

7. Ces deux approches ont été combinées dans la norme ISO (essai au CO₂ - espace de tête) (16) qui a fait l'objet d'un essai tournant (17) et qui forme la base de la présente Ligne directrice. Ces deux approches ont également été appliquées dans la méthode de l'US EPA (18). Deux méthodes de mesure du CO₂ ont été recommandées, à savoir le CO₂ dans l'espace libre après acidification (13) et le carbone inorganique dans la phase liquide après l'ajout d'un excès de base. Cette dernière méthode a été introduite par Peterson au cours de l'essai tournant, conduit par le CONCAWE (19), de cette méthode de l'espace libre modifiée pour mesurer la biodégradabilité intrinsèque. Les changements apportés par la révision effectuée en 1992 (20) de la Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de biodégradabilité facile ont été incorporés dans la présente Ligne directrice, si bien que les conditions (milieu, durée, etc.) sont par ailleurs identiques à celles de l'essai modifié de Sturm (20). Birch et Fletcher (14) ont montré que, sur les mêmes substances, l'essai de l'espace libre livrait des résultats très proches de ceux de l'essai tournant organisé par l'OCDE des Lignes directrices révisées (21).

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Une population mixte de micro-organismes estensemencée dans un milieu tampon composé de sels minéraux, où la substance d'essai, généralement à une concentration de 20 mg C/L, représente la seule source de carbone et d'énergie. L'essai est conduit dans des flacons hermétiquement clos comportant un espace libre d'air au-dessus du liquide, qui sert de réserve d'oxygène pour la biodégradation aérobie. On détermine le CO₂ dégagé par la biodégradation aérobie finale de la substance d'essai en mesurant l'excédent de carbone inorganique produit dans les flacons d'essai par rapport au carbone inorganique produit dans les flacons témoins à blanc ne renfermant que le milieuensemencé. Le degré de biodégradation est exprimé en pourcentage de la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI), d'après la quantité de substance d'essai (en carbone organique) ajoutée au départ.

9. La disparition de carbone organique dissous et/ou le niveau de la biodégradation primaire de la substance d'essai peuvent aussi être mesurés (20).

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

10. Il faut connaître la teneur (% poids) en carbone organique de la substance d'essai, d'après sa structure chimique ou par une mesure, de façon à pouvoir calculer le pourcentage de dégradation. Dans le cas des substances d'essai volatiles, il est utile de mesurer ou de calculer la constante de Henry afin de déterminer un rapport volumique espace libre/liquide approprié. Les informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes permettent de choisir une concentration d'essai appropriée et facilitent l'interprétation des résultats lorsque la biodégradabilité est faible : on recommande d'inclure un témoin d'inhibition, sauf si l'on sait que la substance d'essai n'inhibe pas l'activité des micro-organismes (voir paragraphe 24).

CHAMP D'APPLICATION DE LA MÉTHODE

11. Cet essai convient aux substances insolubles et solubles dans l'eau, cependant la substance d'essai doit être bien dispersée. Si l'on applique le rapport volumique espace libre/liquide recommandé de 1/2, les substances volatiles dont la constante de Henry ne dépasse pas 50.Pa.m³ mol⁻¹ peuvent être testées puisque la proportion de la substance d'essai dans l'espace libre n'excèdera pas 1% (13). Un volume plus petit d'espace libre peut être utilisé pour l'essai de substances plus volatiles, mais dont la biodisponibilité risque d'être limitante, surtout si elles sont peu solubles dans l'eau. Toutefois, les expérimentateurs doivent s'assurer que le rapport volumique espace libre/liquide et la concentration de la substance d'essai laissent suffisamment d'oxygène disponible pour permettre à la biodégradation aérobie d'être complète (en évitant, par exemple, d'utiliser un substrat très concentré et un petit espace libre). Des orientations sur ce point figurent dans les références (13) et (23).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

12. Il faut vérifier le procédé expérimental en testant en parallèle une substance de référence de biodégradabilité connue. À cet effet, l'aniline, le benzoate de sodium ou l'éthylèneglycol peuvent être utilisés pour les substances d'essai solubles dans l'eau et le 1-octanol pour les substances d'essai peu solubles (13). La biodégradation de ces substances doit être supérieure à 60% de la ThCI au bout de 14 jours.

REPRODUCTIBILITÉ

13. L'essai tournant réalisé par l'ISO de la méthode (17) a livré les résultats suivants, pour les conditions recommandées, notamment une concentration de la substance d'essai de 20 mg C/L :

LD 310

OECD/OCDE

Substance d'essai	Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours)	Coefficient de variation (%)	Nombre de laboratoires
Aniline	90	16	17
1-octanol	85	12	14

Avec l'aniline, la variabilité interne de l'essai était faible, les coefficients de variabilité ne dépassant pas 5% dans presque tous les essais. Dans les deux cas où la répétabilité a été moins bonne, la plus grande variabilité a probablement été due à une production élevée de carbone inorganique dans les témoins à blanc. Le 1-octanol a donné lieu à une moins bonne répétabilité, mais avec une variabilité néanmoins inférieure à 10% dans 79% des essais. Cette plus grande variabilité interne de l'essai pourrait résulter d'erreurs de dosage, le volume de 1-octanol à injecter dans les flacons expérimentaux hermétiquement clos étant petit (3 à 4 µl). Des concentrations plus faibles de la substance d'essai engendreraient des coefficients de variation plus élevés, en particulier aux concentrations inférieures à 10 mg C/L. Ce problème pourrait être en partie résolu par la diminution de la concentration du carbone inorganique total dans l'inoculum.

14. Un essai tournant de cinq agents tensioactifs à 10 mg C/L, organisé par l'Union européenne (24), a livré les résultats suivants :

Substance d'essai	Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours)	Coefficient de variation (%)	Nombre de laboratoires
benzènesulfonate de tétrapropylène	17	45	10
Diisooctylsulfosuccinate (anionique)	72	22	9
chlorure d'ammonium hexadécyltriméthylrique* (cationique)	75	13	10
(éthoxylate d') isononylphénol (non ionique)	41	32	10
Cocoamidepropyl-diméthylhydroxy-sulfobetaine (amphotère)	60	23	11

* le SiO₂ a été ajouté pour neutraliser la toxicité.

Les résultats montrent qu'en général, les agents tensioactifs moins bien dégradés manifestent une plus grande variabilité. La variabilité interne de l'essai, qui était inférieure à 15% dans plus de 90% des cas, n'a pas dépassé 30-40%.

NOTE : La plupart des agents tensioactifs ne se composent pas d'une seule espèce moléculaire, mais sont des mélanges d'isomères, d'homologues, etc. qui se dégradent à l'issue de différentes périodes de latence et à différentes vitesses, et qui génèrent des courbes «brouillées», atténuées, de sorte que le seuil de 60% risque de n'être pas atteint dans l'intervalle de dix jours, même si chaque espèce moléculaire atteindrait plus de 60% en l'espace de dix jours si elle avait été testée isolément. Ce phénomène peut aussi s'observer avec d'autres mélanges complexes.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

15. Appareils courants de laboratoire et :
- flacons à sérum en verre fermés avec des bouchons en caoutchouc butylique sertis de surcapsules en aluminium. La capacité recommandée est de 125 ml, soit un volume total de quelque 160 ml (dans ce cas, le volume de chaque flacon doit atteindre 160 ml avec une précision de 1 ml). Des flacons plus petits peuvent être utilisés si les résultats remplissent les conditions décrites aux paragraphes 66 et 67 ;
 - analyseur de carbone ou autre instrument (chromatographe en phase gazeuse, par exemple) pour mesurer le carbone inorganique ;
 - seringues à haute précision pour les échantillons gazeux et liquides ;
 - agitateur orbital dans un environnement thermostaté ;
 - source d'air exempt de CO₂ - on peut la préparer en faisant passer l'air à travers des granules de chaux sodée ou en utilisant un mélange gazeux à 80% de N₂ et 20% d'O₂ (facultatif)(voir paragraphe 28) ;
 - appareil à membrane filtrante à pores de 0,20 à 0,45 µm (facultatif) ;
 - analyseur de carbone organique (facultatif).

Réactifs

16. Tous les réactifs doivent être de qualité pour analyse.

Eau

17. On utilise de l'eau distillée ou désionisée dont la teneur en carbone organique total est ≤ 1 mg/L. Cela représente une quantité $\leq 5\%$ de la teneur initiale en carbone organique introduite par la dose recommandée de substance d'essai.

Solutions mères pour le milieu composé de sels minéraux

18. Les solutions mères et le milieu minéral sont similaires à ceux de la norme ISO 14593 (16) et de la Ligne directrice 301 de l'OCDE sur les essais de « biodégradabilité facile » (20). L'utilisation d'une concentration plus élevée de chlorure d'ammonium (2,0 g/L au lieu de 0,5 g/L) ne devrait être nécessaire que dans des cas très exceptionnels, par exemple lorsque la concentration de la substance d'essai est > 40 mg C/L. Les solutions mères doivent être gardées au froid et éliminées après six mois, ou avant si l'on remarque une précipitation ou une prolifération bactérienne. Préparer les solutions mères suivantes :

a) Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	8,50 g
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	21,75 g
Hydrogénophosphate de sodium dihydraté (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	33,40 g
Chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl)	0,50 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre. Le pH de la solution doit être égal à 7,4 ($\pm 0,2$). Si ce n'est pas le cas, préparer une autre solution.

b) Chlorure de calcium dihydraté (CaCl ₂ .2H ₂ O)	36,40 g
---	---------

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

c) Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ .7H ₂ O)	22,50 g
---	---------

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

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

Dissoudre dans l'eau, porter le volume à 1 litre et ajouter une goutte de concentré.

Préparation du milieu minéral

19. Mélanger 10 ml de solution (a) avec environ 800 ml d'eau (paragraphe 17), puis ajouter 1 ml des solutions (b), (c) et (d) et porter le volume à 1 litre avec de l'eau (paragraphe 17).

Autres réactifs

20. Acide phosphorique concentré (H_3PO_4) (>85% masse par volume)

Solution d'hydroxyde de sodium 7M

21. Dissoudre 280 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans 1 litre d'eau (paragraphe 17). Déterminer la teneur en carbone inorganique dissous de cette solution et tenir compte de cette valeur dans le calcul du résultat de l'essai (voir paragraphes 55 et 61), notamment à la lumière du critère de validité mentionné au paragraphe 66 (b). Préparer une nouvelle solution si la concentration en carbone inorganique dissous est trop élevée.

Substance d'essai

22. Préparer une solution mère d'une substance d'essai suffisamment hydrosoluble, dans l'eau (paragraphe 17) ou dans le milieu d'essai (paragraphe 19), à une concentration de préférence 100 fois supérieure à la concentration finale à utiliser dans l'essai ; il peut être nécessaire d'ajuster le pH de la solution mère. La solution mère doit être ajoutée au milieu minéral de telle sorte que la concentration finale de carbone organique atteigne entre 2 et 40 mg C/L, de préférence 20 mg C/L. Des concentrations plus faibles que celles mentionnées ci-dessus risquent de diminuer la précision. Les substances liquides solubles et insolubles peuvent être introduites directement dans les récipients à l'aide de seringues à haute précision. Les substances d'essai peu solubles et insolubles peuvent requérir un traitement spécial (25), à choisir parmi les suivants :

- a) ajout direct de quantités de poids connu ;
- b) dispersion aux ultrasons avant l'ajout ;
- c) dispersion à l'aide d'agents émulsifiants dont il y a lieu d'établir, avant d'ajouter la substance d'essai, s'ils exercent une action inhibitrice ou stimulante sur l'activité microbiologique ;
- d) adsorption des substances d'essai liquides, ou d'une solution de la substance d'essai dans un solvant volatil approprié, sur un milieu ou un support inerte (par exemple un filtre en fibres de verre), suivie par l'évaporation du solvant, le cas échéant, et ajout direct de quantités connues ;
- e) ajout d'un volume connu d'une solution de la substance d'essai dans un solvant suffisamment volatil pour qu'il s'évapore complètement du récipient, suivi par l'évaporation du solvant.

Il faut vérifier par un essai si les agents ou les solvants utilisés aux points c), d) et e) ont un effet stimulant ou inhibiteur sur l'activité microbiologique (voir paragraphe 42 (b)).

Substance de référence

23. Préparer une solution mère de la substance de référence (soluble) dans l'eau (paragraphe 17) à une concentration de préférence 100 fois supérieure à la concentration finale (20 mg C/L) à utiliser dans l'essai.

Vérification de l'inhibition

24. Il arrive souvent que les substances d'essai ne se dégradent pas de façon significative dans les conditions appliquées aux évaluations de la biodégradation immédiate. Cela peut résulter du fait que la substance d'essai exerce un effet inhibiteur sur l'inoculum à la concentration à laquelle elle est testée. Une vérification de l'effet inhibiteur peut être incluse dans la conception de l'essai pour faciliter l'identification (rétrospective) de l'inhibition comme l'une des causes possibles ou l'un des facteurs contributifs, soit, au contraire, pour éliminer cette possibilité d'interférences, ce qui démontrerait que la dégradation faible ou nulle n'est imputable qu'au fait que les micro-organismes n'attaquent pas la substance dans les conditions de l'essai. Afin d'obtenir des informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (aérobies), on prépare une solution contenant la substance d'essai et la substance de référence dans le milieu d'essai (paragraphe 19), chacune à la même concentration que celle à laquelle elles ont été ajoutées dans le milieu d'essai lors de l'essai (voir paragraphes 22 et 23).

Inoculum

25. L'inoculum peut provenir de différentes sources : boues activées, effluents d'eaux usées (non chlorés) ; eaux de surface et sols ; ou d'un mélange de ces milieux (20). Il convient de vérifier l'activité biodégradante de la source à l'aide d'une substance de référence. Quelle que soit la source, il ne faut pas utiliser de micro-organismes ayant déjà été exposés à la substance d'essai pour l'essai de biodégradabilité immédiate.

Attention : les boues activées, les eaux usées et les effluents d'eaux usées renferment des organismes pathogènes et doivent être manipulés avec précaution.

26. On sait empiriquement que le volume optimal de l'inoculum est celui qui :

- suffit pour fournir une activité biodégradante adéquate ;
- dégrade la substance de référence dans le pourcentage stipulé (voir paragraphe 66) ;
- fournit 10^2 à 10^5 unités formant colonie par millilitre dans le mélange final ;
- donne normalement une concentration de 4 mg/L de solides en suspension dans le mélange final lorsqu'on utilise de la boue activée ; des concentrations allant jusqu'à 30 mg/L peuvent être utilisées, mais elles risquent d'augmenter sensiblement la production de CO_2 dans les témoins à blanc (26) ;
- représente moins de 10% de la concentration initiale de carbone organique introduite par la substance d'essai ;
- équivaut généralement à 1 à 10 ml d'inoculum par litre de solution expérimentale.

Boues activées

27. Prélever un échantillon de boue activée dans le compartiment d'aération d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement des eaux usées domestiques. Éliminer, si nécessaire, les grosses particules à l'aide d'un tamis (possédant des orifices de 1 mm², par exemple) et conserver ensuite la boue en aérobiose jusqu'à son utilisation.

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

29. La boue doit provenir d'une station d'épuration ordinaire en bon état de fonctionnement. Les boues issues d'une station d'épuration dont le débit est important, ainsi que les boues susceptibles de contenir des inhibiteurs, doivent être lavées. Décanter ou centrifuger la boue remise en suspension après agitation vigoureuse, éliminer le liquide surnageant et resuspendre la boue lavée dans un volume de milieu minéral frais. Répéter cette opération jusqu'à ce que la boue puisse être considérée comme exempte de substrat en excès ou d'inhibiteur.

30. Prélever un échantillon de boue remise en suspension (lorsque la resuspension est complète) ou de boue non traitée juste avant le moment de son utilisation afin de déterminer le poids sec des matières en suspension.

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

32. Il est possible d'obtenir une réduction plus importante du dégagement de CO₂ dans le témoin à blanc en aérant la boue toute une nuit avec de l'air exempt de CO₂. Dans cet essai, la concentration de l'inoculum doit s'élever à 4 mg/L de solides de boue activée (13).

Effluent secondaire d'eaux usées

33. L'inoculum peut également provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire recevant principalement des eaux usées domestiques. Conservé en aérobiose, l'échantillon sera utilisé le jour de son prélèvement ou préconditionné si nécessaire. L'effluent doit être filtré à travers un filtre grossier et son pH est mesuré.

34. Pour réduire la teneur en carbone inorganique du filtrat, on fait barboter dans celui-ci de l'air exempt de CO₂ (paragraphe 15 e)) durant 1 heure tout en maintenant le pH à 6,5 avec de l'acide phosphorique (paragraphe 20). La valeur du pH est ramenée à sa valeur de départ avec de l'hydroxyde de sodium (paragraphe 21) et on laisse reposer le filtrat pendant environ 1 heure, avant d'y prélever un volume approprié de surnageant pour l'inoculation. Ce processus de barbotage diminue la teneur de l'inoculum en carbone inorganique. Par exemple, si on utilise le volume maximal recommandé d'effluent filtré et barboté (100 ml) par litre comme inoculum, la quantité de carbone inorganique présente dans les flacons témoins à blanc est comprise entre 0,4 et 1,3 mg/L (14), ce qui représente 2 à 6,5% du carbone de la substance d'essai à 20 mg C/L et 4 à 13% à 10 mg C/L.

Eaux de surface

35. Dans une eau de surface adéquate, on prélève un échantillon qui sera conservé en aérobiose et utilisé le jour même. Si nécessaire, l'échantillon est concentré par filtration ou centrifugation. Le volume d'inoculum à utiliser dans chaque récipient expérimental doit satisfaire aux critères énoncés au paragraphe 26.

Sols

36. Prélever un échantillon dans un sol approprié à une profondeur allant jusqu'à 20 cm en dessous de la surface du sol. Il convient d'enlever les pierres, les débris végétaux et les invertébrés de l'échantillon de sol avant de le passer au travers d'un tamis pourvu d'orifices de 2 mm (si l'échantillon est trop mouillé pour pouvoir être tamisé immédiatement, on le sèche partiellement à l'air). Il faut le garder en aérobiose et l'utiliser le jour même (si l'échantillon est transporté dans un sac noir de polythène fermé de manière non hermétique, il peut être conservé à 2 à 4 °C dans ce sac jusqu'à un mois).

Préconditionnement de l'inoculum

37. L'inoculum peut être préconditionné aux conditions expérimentales, mais non préadapté à la substance d'essai. Le préconditionnement peut diminuer le dégagement de CO₂ dans le témoin à blanc. Le préconditionnement consiste à aérer la boue activée, après l'avoir diluée dans le milieu expérimental à 30 mg/L, avec de l'air humide exempt de CO₂ durant 5 à 7 jours à la température de l'essai.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre de flacons

38. Le nombre de flacons (paragraphe 15 a)) requis pour un essai dépendra de la fréquence des analyses et de la durée de l'essai.

39. On recommande d'analyser les flacons en trois exemplaires, après un nombre suffisant d'intervalles de temps pour pouvoir identifier l'intervalle de dix jours. On analyse également au moins cinq flacons expérimentaux (paragraphe 15 a)) des séries a), b) et c) (voir paragraphe 42) à la fin de l'essai, afin de pouvoir calculer les intervalles de confiance à 95% pour le pourcentage moyen de biodégradation.

Milieuensemencé

40. L'inoculum est utilisé à une concentration de 4 mg/L en solides secs de boue activée. Juste avant l'utilisation, préparer une quantité suffisante de milieuensemencé en ajoutant, par exemple, 2 ml de boue activée traitée comme il convient (paragraphe 27 à 32) à une concentration de 2000 mg/L à 1 litre de milieu minéral (paragraphe 19). Si l'on utilise un effluent secondaire d'eaux usées, ajouter jusqu'à 100 ml d'effluent (paragraphe 33) à 900 ml de milieu minéral (paragraphe 19) et porter à 1 litre avec du milieu.

Préparation des flacons

41. Verser des aliquotes de milieuensemencé dans des flacons identiques en plusieurs exemplaires, de telle sorte que le rapport espace libre/liquide soit de 1/2 (introduire, par exemple 107 ml dans des flacons de 160 ml de capacité). D'autres rapports peuvent être appliqués, mais il faut tenir compte de l'avertissement donné au paragraphe 11. Quel que soit le type d'inoculum utilisé, on veillera à mélanger correctement le milieuensemencé pour qu'il se répartisse uniformément dans les flacons d'essai.

42. Préparer des séries de flacons (paragraphe 15 a)) destinés aux usages suivants :

- a) flacons d'essai (F_T) contenant la substance d'essai ;
- b) flacons témoins à blanc (F_B) ne contenant que le milieu expérimental et l'inoculum ; tous les produits chimiques, solvants, agents ou filtres en fibres de verre utilisés pour introduire la substance d'essai dans les récipients expérimentaux doivent aussi y être ajoutés ;
- c) flacons contenant la substance de référence (F_C) pour vérifier le procédé ;

- d) si nécessaire, flacons (F_I) pour vérifier un éventuel effet inhibiteur de la substance d'essai contenant à la fois la substance d'essai et la substance de référence aux mêmes concentrations (paragraphe 24) que dans les flacons F_T et F_C respectivement ;
- e) flacons (F_S) pour vérifier une éventuelle dégradation abiotique ; il s'agit des flacons (F_T) auxquels on a ajouté 50 mg/L de $HgCl_2$ ou qu'on a stérilisés d'une autre manière (à l'autoclave, par exemple).

43. Les substances d'essai et de référence solubles dans l'eau sont ajoutées aux flacons sous la forme de leurs solutions mères aqueuses (paragraphe 22, 23 et 24), de manière à fournir une concentration de 10 à 20 mg C/L.

44. Les substances d'essai et de référence insolubles sont ajoutées aux flacons de différentes façons (voir paragraphe 22 a) à e)) en fonction de la nature de la substance, avant ou après l'ajout du milieuensemencé, selon la méthode de traitement de la substance. Si l'on utilise l'une des procédures exposées au paragraphe 22, les flacons témoins à blanc (F_B) (paragraphe 42 b)) doivent être traités de manière identique, si ce n'est qu'ils ne contiendront ni la substance d'essai ni la substance de référence.

45. Les substances d'essai volatiles doivent être introduites dans des flacons hermétiquement clos (paragraphe 47) au moyen d'une microseringue. La dose est calculée en fonction du volume injecté et de la densité de la substance.

46. Si nécessaire, on ajoutera de l'eau aux flacons, afin que le volume de liquide soit identique dans tous les flacons. On s'assurera que le rapport espace libre/liquide (généralement de 1/2) et la concentration de la substance d'essai sont tels que l'espace libre renferme suffisamment d'oxygène pour permettre une biodégradation totale.

47. Tous les flacons sont ensuite fermés hermétiquement, par exemple au moyen de bouchons en caoutchouc butylique et de surcapsules en aluminium. Les substances d'essai volatiles doivent être ajoutées à ce stade (paragraphe 45). S'il y a lieu de mesurer en continu la baisse de concentration du carbone organique dissous dans la solution expérimentale et d'analyser au temps zéro la concentration initiale de carbone inorganique ou d'autres paramètres (témoins stériles, paragraphe 42 e)), on prélève un échantillon approprié du flacon d'essai. Le flacon d'essai et son contenu sont ensuite éliminés.

48. Les flacons hermétiquement clos sont placés sur un agitateur rotatif (paragraphe 15 d)), réglé sur une vitesse d'agitation suffisante pour que le contenu du flacon reste bien mélangé et en suspension (par exemple 150 à 200 tpm), et mis à incuber dans l'obscurité à température constante ($20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$).

Prélèvement

49. Le programme de prélèvement dépendra de la période de latence et de la vitesse de biodégradation de la substance d'essai. Des flacons sont retirés définitivement du dispositif expérimental afin d'être analysés le jour du prélèvement, lequel intervient au moins une fois par semaine ou plus fréquemment (par exemple deux fois par semaine), si une courbe de dégradation complète est requise. On retire le nombre nécessaire de flacons identiques de l'agitateur dans chaque catégorie : F_T , F_B et F_C et, le cas échéant F_I et F_S (voir paragraphe 42). L'essai dure normalement 28 jours. Si la courbe de biodégradation marque un plateau avant 28 jours, l'essai peut s'arrêter avant 28 jours. Prélever des échantillons dans les cinq flacons réservés aux analyses à effectuer le 28^{ème} jour et utiliser les résultats pour calculer les limites de confiance ou le coefficient de variation du pourcentage de biodégradation. Les flacons destinés à vérifier l'inhibition et la dégradation abiotique ne doivent pas faire l'objet de prélèvements aussi fréquents que les autres flacons ; il suffira de deux prélèvements effectués respectivement le 1^{er} jour et le 28^{ème} jour.

Analyse du carbone inorganique

50. On détermine la production de CO₂ dans les flacons en mesurant l'augmentation de la concentration de carbone inorganique durant l'incubation. Deux méthodes, décrites ci-après, sont recommandées pour mesurer la quantité de carbone inorganique produite durant l'essai. Au cours d'un même essai, il ne faudra utiliser qu'une seule méthode, car ces méthodes risquent de donner des résultats légèrement différents.

51. On recommande la méthode (a) si le milieu est susceptible de contenir des résidus, par exemple de papier filtre en verre et/ou d'une substance d'essai insoluble. Cette analyse peut être pratiquée au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse, à défaut d'un analyseur de carbone. Il est important de maintenir les flacons à une température assez proche de la température de l'essai durant l'analyse du gaz de l'espace libre. La méthode (b) peut s'avérer plus facile à appliquer par les laboratoires qui mesurent le carbone inorganique à l'aide d'un analyseur de carbone. Il importe que la solution d'hydroxyde de sodium (paragraphe 21) utilisée pour convertir le CO₂ en carbonate soit fraîchement préparée ou que sa teneur en carbone inorganique soit connue, de telle sorte que ce paramètre puisse être pris en compte lors du calcul des résultats de l'essai (voir paragraphe 66 b).

Méthode (a) : acidification à pH < 3

52. Avant chaque lot d'analyses, l'analyseur de carbone inorganique est étalonné au moyen d'un étalon de carbone inorganique approprié (par exemple une dilution 1% poids/poids de CO₂ dans du N₂). Injecter de l'acide phosphorique concentré (paragraphe 20) à travers le bouchon de chaque flacon destiné à un prélèvement, afin d'abaisser le pH du milieu à une valeur < 3 (ajouter, par exemple, 1 ml à un 107 ml de milieu expérimental). Remettre les flacons sur l'agitateur. Après avoir subi une agitation d'une heure à la température expérimentale, les flacons sont retirés de l'agitateur. On prélève des aliquotes de gaz (1 ml, par exemple) dans l'espace libre de chaque flacon et on les injecte dans l'analyseur de carbone inorganique. Les concentrations de carbone inorganique mesurées sont notées en mg C/L.

53. Cette méthode repose sur le principe suivant lequel après l'acidification à pH < 3 et l'équilibrage à 20 °C, la constante d'équilibre de la répartition du CO₂ entre les phases liquide et gazeuse des flacons d'essai est égale à 1,0 lorsqu'elle est mesurée sous forme de concentration (13). Cette relation doit être démontrée au moins une fois pour le système expérimental, de la façon suivante :

Préparer des flacons contenant 5 et 10 mg/L de carbone inorganique à l'aide d'une solution de carbonate de sodium anhydre (Na₂CO₃) dans de l'eau exempte de CO₂ (préparer cette eau en l'acidifiant à pH 6,5 avec de l'acide phosphorique concentré (paragraphe 20), en y faisant barboter de l'air exempt de CO₂ toute une nuit et en ramenant le pH à une valeur neutre avec un produit alcalin). S'assurer que le rapport volumique espace libre/liquide est le même que dans les essais (1/2, par exemple). Acidifier et équilibrer comme indiqué au paragraphe 52 et mesurer les concentrations de carbone inorganique dans l'espace libre et dans la phase liquide. Vérifier que les deux concentrations sont identiques, à l'erreur expérimentale près. Si elles ne le sont pas, l'expérimentateur devra réexaminer les procédures.

Il n'est pas nécessaire de vérifier la répartition du carbone inorganique entre les phases liquide et gazeuse à chaque essai ; cette vérification pourrait être effectuée au cours de l'étalonnage.

54. S'il y a lieu de mesurer la disparition de carbone organique dissous (substances d'essai hydrosolubles uniquement), des échantillons sont prélevés dans la phase liquide de flacons séparés (non acidifiés), filtrés sur une membrane et injectés dans l'analyseur de carbone organique dissous. Ces flacons peuvent servir à d'autres analyses, si nécessaire, permettant de mesurer la biodégradation primaire.

Méthode (b) : conversion du CO₂ en carbonate

55. Avant chaque lot d'analyses, l'analyseur de carbone inorganique est étalonné au moyen d'un étalon adéquat, par exemple une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) dans de l'eau exempte de CO₂ (voir paragraphe 53), à une concentration de 0 à 20 mg de carbone inorganique/litre. Injecter une solution d'hydroxyde de sodium (7M, paragraphe 21) (par exemple à raison d'1 ml pour 107 ml de milieu) à travers le bouchon de chaque flacon destiné à un prélèvement et agiter les flacons durant une heure à la température de l'essai. On utilise la même solution de NaOH dans tous les flacons retirés définitivement un jour donné, mais pas nécessairement pour tous les prélèvements effectués tout au long de l'essai. Si les valeurs absolues de la teneur en carbone inorganique des témoins à blanc sont requises à chaque prélèvement, il faudra déterminer la teneur en carbone inorganique de la solution de NaOH chaque fois qu'elle est utilisée. Enlever les flacons de l'agitateur et attendre que leur contenu s'immobilise. Extraire un volume approprié (50 à 1 000 µl, par exemple) de la phase liquide de chaque flacon à l'aide d'une seringue. Injecter les échantillons dans l'analyseur de carbone inorganique et enregistrer les concentrations de carbone inorganique. On s'assurera que l'analyseur employé se prête au traitement des échantillons alcalins obtenus par cette méthode.

56. Cette méthode repose sur le principe selon lequel après l'ajout d'une solution alcaline et agitation, la concentration de carbone inorganique dans l'espace libre est négligeable. Cela doit être vérifié au moins une fois pour le système expérimental. Il faut, pour ce faire, utiliser des étalons de carbone inorganique, ajouter une solution basique et équilibrer, et mesurer la concentration de carbone inorganique dans l'espace libre et dans la phase liquide (voir paragraphe 53). La concentration dans l'espace libre devrait avoisiner zéro. Il n'est pas nécessaire de vérifier cette absorption pratiquement complète de CO₂ à chaque essai.

57. Si la disparition de carbone organique dissous (substances d'essai hydrosolubles uniquement) est à mesurer, des échantillons sont prélevés dans la phase liquide de flacons séparés (ne contenant pas de produit alcalin ajouté), filtrés sur une membrane et injectés dans l'analyseur de carbone organique dissous. Ces flacons peuvent servir à d'autres analyses, si nécessaire, permettant de mesurer la biodégradation primaire.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Calcul des résultats**

58. En supposant que la substance d'essai a été minéralisée à 100% en CO₂, la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI) des flacons d'essai excédant celle des témoins à blanc est égale au carbone organique total (COT) ajouté dans chaque flacon d'essai au début de l'essai, autrement dit :

$$\text{ThCI} = \text{COT}$$

La masse totale (mg) de carbone inorganique (CIT) dans chaque flacon est :

$$\begin{aligned} \text{CIT} &= (\text{mg de C dans le liquide} + \text{mg de C dans l'espace libre}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned} \quad \text{Équation [1]}$$

où :

V_L est le volume de liquide dans le flacon (litre) ;

C_L est la concentration de carbone inorganique dans le liquide (carbone en mg/L) ;

V_H est le volume de l'espace libre (litre) ;

C_H est la concentration du carbone inorganique dans l'espace libre (carbone en mg/L).

Les calculs du CIT pour les deux méthodes analytiques utilisées pour mesurer le carbone inorganique dans cet essai sont décrits ci-dessous aux paragraphes 60 et 61. Le pourcentage de biodégradation (% D) dans chaque cas est donné par l'équation suivante :

$$\% D = \frac{(CIT_t - CIT_b)}{COT} \times 100 \quad \text{Équation [2]}$$

où :

CIT_t = mg de CIT dans le flacon d'essai au temps t ;

CIT_b = la moyenne des mg de CIT dans les flacons témoins à blanc au temps t ;

COT = mg de COT ajoutés initialement au flacon d'essai.

Le pourcentage de biodégradation (% D) est calculé pour les flacons d'essai (F_T) et de référence (F_C) et, le cas échéant, les flacons (F_I) destinés à la vérification d'un éventuel effet inhibiteur, à partir des quantités respectives de carbone inorganique total produites jusqu'à chaque heure de prélèvement.

59. Une augmentation significative de la teneur en CIT dans les témoins stériles (F_S) durant l'essai permet de conclure à une dégradation abiotique de la substance d'essai et il faut en tenir compte dans le calcul de D dans l'équation [2].

Acidification à pH < 3

60. L'acidification à pH < 3 et l'équilibrage entraînant l'égalisation de la concentration de CIT entre les phases liquide et gazeuse, seule la concentration de carbone inorganique dans la phase gazeuse doit être mesurée. Aussi, d'après l'équation [1], $CIT = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, où V_B est le volume du flacon de sérum.

Conversion du CO₂ en carbonate

61. Dans cette méthode, les calculs obéissent à l'équation [1], mais la quantité négligeable de carbone inorganique dans la phase gazeuse est ignorée, de sorte que $V_H \times C_H = 0$, et $CIT = V_L \times C_L$.

Expression des résultats

62. On trace une courbe de biodégradation en reportant le pourcentage de biodégradation, D, en fonction du temps d'incubation, courbe qui indiquera, si possible, la phase de latence, la phase de biodégradation, l'intervalle de dix jours et la phase plateau, c'est-à-dire la phase durant laquelle la dégradation a atteint son maximum et où la courbe de biodégradation marque un palier. Si des résultats comparables sont obtenus pour les flacons d'essai (F_T) testés en parallèle (< 20% de différence), on trace une courbe moyenne (voir Annexe 2, figure 1) ; dans le cas contraire, on trace une courbe pour chaque flacon d'essai. On détermine la valeur moyenne du pourcentage de biodégradation dans la phase plateau ou on évalue sa valeur maximale (par exemple si la courbe fléchit dans la phase plateau), mais il est important d'estimer si, dans ce dernier cas, la valeur n'est pas nettement divergente. Ce niveau maximal de biodégradation doit être mentionné en tant que «degré de biodégradation de la substance d'essai» dans le rapport d'essai. Si le nombre de flacons d'essai s'est avéré insuffisant pour produire une phase plateau, on utilise les données mesurées du dernier jour de l'essai pour calculer une valeur moyenne. Cette dernière valeur, la moyenne de cinq essais identiques, sert à indiquer la précision avec laquelle le pourcentage de biodégradation a été déterminé. La valeur obtenue au terme de l'intervalle de dix jours doit également figurer dans le rapport.

63. Tracer, de la même manière, une courbe pour la substance de référence, F_C , et, le cas échéant, pour la vérification de la dégradation abiotique F_S et pour le contrôle de l'inhibition, F_I .

64. Les quantités de CIT présentes dans les témoins à blanc (F_B) sont consignées, de même que celles présentes dans les flacons F_S , si ces flacons sont inclus dans le système expérimental.

65. Calculer D pour les flacons F_I , d'après le rendement théorique escompté en carbone inorganique provenant uniquement de la substance de référence du mélange. Si, au 28^{ème} jour, $[(D_{FC}^1 - D_{FI}^2)/D_{FC}] \times 100 > 25\%$, il est permis de supposer que la substance d'essai a inhibé l'activité de l'inoculum, ce qui peut expliquer les faibles valeurs de D_{FI} obtenues dans les conditions de l'essai. Dans ce cas, l'essai pourrait être répété avec une concentration d'essai plus faible, et en réduisant de préférence le carbone inorganique dissous (CID) dans l'inoculum et le CIT formé dans les témoins à blanc, car une diminution de la concentration de la substance d'essai amoindrit la précision de la méthode. Un autre inoculum peut également être utilisé. Si la quantité de CIT dans le flacon F_S (dégradation abiotique) accuse une augmentation significative ($> 10\%$), il se peut qu'une dégradation abiotique ait eu lieu.

Validité des résultats

66. Un essai est considéré comme valable si :

- a) le pourcentage moyen de dégradation dans les flacons F_C contenant la substance de référence est $>60\%$ au 14^{ème} jour de l'incubation ; et
- b) la quantité moyenne de CIT présente dans les témoins à blancs F_B à la fin de l'essai est < 3 mg C/L.

Si ces limites ne sont pas atteintes, on répétera l'essai avec un inoculum provenant d'une autre source et/ou on révisera les procédures appliquées. Par exemple, si une production élevée de carbone inorganique dans le témoin à blanc pose un problème, il convient de suivre la procédure exposée aux paragraphes 27 à 32.

67. Si la substance d'essai ne fournit pas 60% de la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI) et qu'il a été démontré qu'elle n'exerce aucun effet inhibiteur (paragraphe 65), l'essai peut être répété avec une concentration accrue d'inoculum (jusqu'à 30 mg/L de boue activée et 100 ml d'effluent/L) ou avec un inoculum provenant d'autres sources, en particulier si la dégradation a atteint une valeur comprise entre 20 et 60%.

Interprétation des résultats

68. Si une substance subit une biodégradation $>60\%$ de la ThCI dans l'intervalle de dix jours au cours de cet essai, cela démontre qu'elle est immédiatement biodégradable en aérobiose.

69. Si la valeur de seuil de 60% de la ThCI n'a pas été atteinte, on mesure le pH du milieu des flacons qui n'ont pas été acidifiés ou alcalinisés ; une valeur inférieure à 6,5 pourrait indiquer qu'une nitrification a eu lieu. Dans ce cas, on répète l'essai avec une solution tampon plus concentrée.

¹ Le pourcentage de dégradation dans les flacons F_C contenant la substance de référence

² Le pourcentage de dégradation dans les flacons F_I

Rapport d'essai

70. Dresser un tableau du pourcentage de dégradation (%D) relevé dans chaque flacon d'essai (F_T), de référence (F_C) et, le cas échéant, de vérification de l'inhibition (F_I) pour chaque jour de prélèvement. Si les flacons identiques livrent des résultats comparables, tracer une courbe du %D moyen en fonction du temps. Noter la quantité de carbone inorganique total dans les témoins à blanc (F_B) et dans les témoins stériles (F_S), de même que le carbone organique dissous et/ou d'autres paramètres, ainsi que leur pourcentage de disparition.

71. Déterminer la valeur moyenne du %D dans la phase plateau ou utiliser la valeur maximale si la courbe de biodégradation fléchit dans la phase plateau et rapporter cette valeur en tant que «degré de biodégradation de la substance d'essai». Il importe de vérifier que dans ce dernier cas, la valeur la plus élevée n'est pas nettement divergente.

72. Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes :

Substance d'essai :

- nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale et propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- pureté (impuretés) de la substance d'essai.

Conditions expérimentales

- référence à la présente Ligne directrice ;
- description du système expérimental utilisé (par exemple, volume du flacon, rapport espace libre/liquide, méthode d'agitation, etc.) ;
- ajout de la substance d'essai et de la substance de référence dans le système expérimental : concentration appliquée et quantité de carbone mesurée dans chaque flacon d'essai, et, le cas échéant, solvants utilisés ;
- détails sur l'inoculum utilisé, traitement préalable et préconditionnement éventuels ;
- température d'incubation ;
- validation du principe de l'analyse du carbone inorganique ;
- principales caractéristiques de l'analyseur de carbone inorganique employé (et de toute autre méthode d'analyse utilisée) ;
- nombre de flacons traités de manière identique.

Résultats :

- données brutes et valeurs calculées de la biodégradabilité présentées dans un tableau ;
- graphique du pourcentage de dégradation en fonction du temps pour les substances d'essai et de référence, phase de latence, phase de dégradation, intervalle de dix jours et pente ;
- pourcentage de disparition au niveau du plateau, à la fin de cet essai et après l'intervalle de dix jours ;
- justification en cas de rejet des résultats expérimentaux ;
- tout autre fait se rapportant à la procédure utilisée ;
- analyse des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (1992), *Essai n° 301B: Biodégradabilité facile - Essai de dégagement de CO₂ (Essai de Sturm modifié)* (Version originale adoptée en mai 1981), Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 3, Édition OCDE, Paris.
- (2) Sturm, R.N. (1973), Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 50/5, pp. 159-167.
- (3) Larson, R.J. (1979), Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 38/6, pp. 1153-1161.
- (4) Larson, R.J., M.A. Hansmann, E.A. Bookland (1996), Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, *Chemosphere*, Vol. 33/6, pp. 1195-1210.
- (5) Organisation internationale de normalisation (1999), norme ISO 9439 (1990, révisée en 1999) Qualité de l'eau - Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime en milieu aqueux des composés organiques - Essai de dégagement de dioxyde de carbone (Sturm). Genève.
- (6) US EPA (1996) Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (7) US EPA (1996) Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (8) Gledhill, W.E. (1975), Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 30/6, pp. 922-929.
- (9) Weytjens, D., I. Van Ginneken, H.A. Painter (1994), The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability, *Chemosphere*, Vol. 28/4, pp. 801-812.
- (10) Ennis, D.M., A. Kramer (1975), A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides, *Journal of Food Science*, Vol. 40/1, pp. 181-185.
- (11) Ennis, D.M. et al. (1978), Structural factors influencing the biodegradation of imides, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 35/1, pp. 51-53.
- (12) Boatman, R.J., S.L. Cunningham, D.A. Ziegler (1986), A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 5/3, pp. 233-243.
- (13) Struijs, J., J. Stoltenkamp (1990), Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 19/2, pp. 204-211.
- (14) Birch, R.R., R.J. Fletcher (1991), The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability, *Chemosphere*, Vol. 23/7, pp. 507-524.

- (15) Birch, R.R. et al. (1989), Screening of chemicals for anaerobic biodegradation, *Chemosphere*, Vol. 19/10-11, pp. 1527-1550.
- (16) Organisation internationale de normalisation (1999), norme 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 CO₂ - espace de tête). Genève.
- (17) Battersby, N.S. (1997), The ISO headspace CO₂ biodegradation test, *Chemosphere*, Vol. 34/8, pp. 1813-1822.
- (18) US EPA (1996) Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC
- (19) Battersby, N.S. et al. (1999), An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test, *Chemosphere*, Vol. 38/14, pp. 3219-3235.
- (20) OCDE (1992), *Essai n° 301: Biodégradabilité facile (révision)*, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 3, Édition OCDE, Paris.
<http://dx.doi.org/10.1787/20745834>.
- (21) OECD (1988), OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI), Paris.
- (22) OCDE (1984), *Essai n° 209: Boue activée, essai d'inhibition de la respiration*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Édition OCDE, Paris.
- (23) Struijs, J., M.J. Stoltenkamp-Wouterse, A.L.M. Dekkers (1995), A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests, *Biodegradation*, Vol. 6/4, pp. 319-327.
- (24) EU (1999), Ring-test of the ISO Headspace CO₂ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
- (25) Organisation internationale de normalisation (1996), norme ISO 10634. 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, Genève.

ANNEXE 1

ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

CI : Carbone inorganique.

ThCO₂ : Production théorique de CO₂ (mg), correspond à la quantité de dioxyde de carbone calculée à partir de la teneur en carbone connue ou mesurée de la substance d'essai, qui doit se dégager lors de la minéralisation complète de celle-ci ; également exprimée en mg de dioxyde de carbone dégagé par mg de substance d'essai.

COD : Le carbone organique dissous est le carbone organique présent en solution ou qui traverse un filtre à pores de 0,45 microns ou encore qui reste dans le surnageant après une centrifugation de 15 minutes à environ 4 000 g (40 000 m sec⁻²).

CID : Carbone inorganique dissous.

ThCI : Production théorique de carbone inorganique.

CIT : Carbone inorganique total

Immédiatement biodégradable : Classification arbitraire des produits chimiques qui ont répondu positivement à certains essais de dépistage spécifiques portant sur la biodégradabilité finale ; du fait de la rigueur de ces essais, on admet que de tels composés se dégraderont rapidement et complètement en milieu aquatique dans des conditions aérobies.

Intervalle de dix jours : Les dix jours qui suivent immédiatement le moment où le taux de biodégradation atteint 10%.

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

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

Minéralisation : Dégradation complète d'un composé organique en CO₂ et en H₂O dans des conditions aérobies, et en CH₄, CO₂ et H₂O dans des conditions anaérobies.

Phase de latence : Correspond à la période qui commence au début de l'essai et s'achève au moment où les micro-organismes dégradants se sont acclimatés et/ou adaptés et où le degré de biodégradation d'une substance chimique ou d'une matière organique a atteint un niveau détectable (par exemple 10% de la biodégradation maximale théorique, ou moins, suivant la précision de la technique de mesure).

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

Phase plateau : Phase au cours de laquelle la dégradation atteint sa valeur maximale et où la courbe de biodégradation marque un palier.

ANNEXE 2

Figure 1 : Biodégradation du 1-octanol au cours de l'essai de l'espace libre (dégagement de CO₂)

