

LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Essai de biodégradabilité anaérobie des composés organiques dans une boue digérée : mesure du dégagement gazeux

INTRODUCTION

1. Il existe plusieurs essais de dépistage permettant de classer les substances organiques en fonction de leur biodégradabilité aérobie (Lignes directrices de l'OCDE 301 A-F ; 302 A-C ; 303 A) (1)(2) et les résultats de ces essais ont permis de prédire de manière très satisfaisante le devenir de substances chimiques en milieu aérobie, en particulier aux stades aérobies du traitement des eaux usées. Des proportions diverses de substances insolubles dans l'eau et de substances s'adsorbant sur les particules solides des eaux usées sont également soumises à un traitement aérobie, puisqu'elles sont présentes dans les eaux usées décantées. Néanmoins, la majeure partie de ces substances est associée aux boues de décantation primaire, qui sont séparées des eaux usées non traitées dans des cuves de décantation avant que la partie surnageante des eaux usées subisse un traitement aérobie. La boue, qui renferme une partie des substances solubles dans le liquide interstitiel, est ensuite déversée dans un digesteur chauffé où elle subit un traitement anaérobie. À ce jour, il n'existe aucun essai dans cette série destiné à évaluer la biodégradabilité anaérobie dans les digesteurs anaérobies, d'où cette proposition de nouvelle Ligne directrice. Cet essai n'est pas nécessairement applicable à d'autres milieux anoxiques de l'environnement.

2. Des techniques respirométriques permettant de mesurer les quantités de gaz produites en anaérobiose, essentiellement du méthane (CH₄) et du dioxyde de carbone (CO₂), ont été utilisées avec succès pour évaluer la biodégradabilité anaérobie. Birch et al. (3) ont passé ces procédés en revue et conclu que les travaux de Shelton et Tiedje (4), fondés sur des études antérieures (5)(6)(7), étaient les plus complets. Cette méthode (4), qui a été mise au point par d'autres (8) et est devenue des normes américaines (9)(10), ne résout pas les problèmes liés à la différence de solubilité entre le CO₂ et le CH₄ dans le milieu expérimental et au calcul de la production gazeuse théorique d'une substance d'essai. En recommandant de mesurer également la teneur en carbone inorganique dissous du liquide surnageant, le rapport de l'ECETOC (3) a étendu le champ d'application de la technique. La méthode de l'ECETOC, qui a fait l'objet d'un étalonnage international (ou essai circulaire), est devenue la norme ISO 11734 (11).

3. Cette Ligne directrice, basée sur la norme ISO 11734 (11), décrit une méthode d'essai préliminaire destinée à évaluer la biodégradabilité anaérobie potentielle des substances organiques dans des conditions spécifiques (dans un digesteur anaérobie, sur une période définie et avec une gamme de concentrations de micro-organismes déterminée). Étant donné qu'on utilise une boue diluée et une concentration relativement élevée de substance d'essai et que la durée de l'essai est supérieure au temps de rétention appliqué dans les digesteurs anaérobies, les conditions de cet essai ne correspondent pas nécessairement aux conditions régnant dans les digesteurs anaérobies et ne s'appliquent pas forcément à l'évaluation de la biodégradabilité anaérobie de substances organiques dans d'autres conditions environnementales. La boue est exposée à la substance d'essai durant une période allant jusqu'à 60 jours, donc supérieure au temps de rétention normal des boues (25 à 30 jours) dans les digesteurs anaérobies, bien que ce temps de rétention puisse être bien plus long sur des sites industriels. Les résultats de cet essai ne permettent pas de formuler des prédictions aussi convaincantes que pour les essais de biodégradation aérobie. En effet, grâce aux essais de biodégradabilité aérobie facile et aux essais de simulation ainsi qu'en anaérobiose, on a accumulé

suffisamment de données sur le comportement des substances d'essai pour démontrer qu'il existe une connexion. Tandis que les données dont on dispose en ce qui concerne les milieux anaérobies sont beaucoup plus fragmentaires. On peut supposer que la biodégradation est complète si on atteint 75 à 80% de la production gazeuse théorique. Les quotients élevés de quantité de substance chimique par biomasse appliqués dans cet essai impliquent que si une substance s'avère biodégradable à l'issue de cet essai, elle a encore plus de chances d'être dégradée dans un digesteur anaérobie. De plus, une substance qui ne se transforme pas en gaz au cours de cet essai ne sera pas nécessairement persistante dans des conditions où le quotient quantité de substance par biomasse est plus proche de celui qui règne dans la nature. Interviennent également d'autres réactions anaérobies susceptibles de dégrader, au moins partiellement, les substances, par exemple la déchloration, mais cet essai ne détecte pas ces réactions. Toutefois, certaines méthodes analytiques spécifiques permettent de suivre la disparition de la substance d'essai (voir les paragraphes 6, 30, 44 et 53).

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Une boue digérée¹ et lavée, à faible concentration (< 10 mg/L) de carbone inorganique (CI), est diluée environ dix fois, de telle sorte que la concentration des solides totaux atteigne 1 à 3 g/L, et est incubée à 35 °C ± 2 °C dans des récipients hermétiquement fermés, en présence de la substance d'essai à raison de 20 à 100 mg de C/L, durant une période allant jusqu'à 60 jours. L'activité de la boue est mesurée dans des récipients témoins à blanc contenant l'inoculum boueux mais pas la substance d'essai et incubés parallèlement aux récipients expérimentaux.

5. L'augmentation de la pression dans l'espace libre (situé au dessus du liquide dans les récipients) provoquée par la production de dioxyde de carbone et de méthane est mesurée. Dans les conditions de l'essai, une proportion appréciable du CO₂ produit est dissoute dans la phase liquide ou transformée en carbonate ou en carbonate d'hydrogène. Ce carbone inorganique est mesuré à la fin de l'essai.

6. La quantité de carbone (inorganique et méthane) dégagée par la biodégradation de la substance d'essai est calculée d'après la production nette de gaz et la formation nette de carbone inorganique dans la phase liquide excédant celles relevées dans les récipients témoins. L'ampleur de la biodégradation est calculée d'après la production de carbone inorganique total et de carbone méthanique et exprimée en pourcentage de la quantité mesurée ou calculée de carbone ajouté par la substance d'essai. Le déroulement de la biodégradation peut être suivi par des mesures intermédiaires de la seule production gazeuse. De plus, la biodégradation primaire peut être déterminée par des analyses spécifiques au début et à la fin de l'essai.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Afin de pouvoir interpréter correctement les résultats, il est nécessaire de connaître la pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai. La teneur en carbone organique de la substance d'essai (% poids/poids) doit être établie d'après sa structure chimique ou par une mesure. Pour des substances d'essai volatiles, il est utile de disposer d'une constante de Henry mesurée ou calculée pour savoir si cet essai est applicable à ces substances. Les informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des bactéries anaérobies permettent de sélectionner une concentration expérimentale appropriée et facilitent l'interprétation des résultats lorsque la biodégradabilité est faible. Il est recommandé d'inclure un témoin destiné à vérifier le pouvoir d'inhibition de la substance, sauf s'il est

¹ La boue digérée est un mélange des phases décantées des eaux usées et de boue activée, qui a été mis à incuber dans un digesteur anaérobie à environ 35°C afin de réduire sa biomasse et les problèmes d'odeur et d'améliorer l'aptitude de la boue au séchage. Elle consiste en une association de bactéries méthanogènes et fermentaires anaérobies produisant du dioxyde de carbone et du méthane (11).

établi que la substance d'essai n'inhibe pas l'activité des micro-organismes anaérobies (voir le paragraphe 21 et la norme ISO 13641-1 (12)).

CHAMP D'APPLICATION DE LA MÉTHODE

8. Cet essai s'applique à des substances solubles dans l'eau, et peut aussi être conduit sur des substances peu solubles et insolubles, à condition d'utiliser une méthode de dosage exacte, (voir, par exemple, ISO 10634 (13)). Il faut généralement prendre une décision au cas par cas pour les substances volatiles. Des précautions particulières s'imposent, par exemple empêcher tout dégagement gazeux durant l'essai.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Pour vérifier le mode opératoire, on teste une substance de référence parallèlement à la substance d'essai dans des récipients appropriés. Le phénol, le benzoate de sodium et le polyéthylène glycol 400 sont des exemples de substances de référence dont la dégradation devrait dépasser 60% de la production gazeuse théorique (c'est-à-dire méthane et carbone inorganique) en l'espace de 60 jours (3)(14).

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS

10. Dans un essai tournant international (14), une bonne reproductibilité a été relevée entre les mesures de la production gazeuse effectuées dans des récipients représentés en trois exemplaires. L'écart-type relatif (coefficient de variation) était presque toujours inférieur à 20%, bien qu'il dépassait souvent les 20% en présence de substances toxiques ou vers la fin de la période d'incubation de 60 jours. Des écarts plus importants ont également été observés dans des récipients ayant un volume inférieur à 150 ml. Les valeurs finales du pH dans le milieu d'essai étaient comprises entre 6,5 et 7,0.

11. Les résultats suivants ont été obtenus dans l'essai tournant

Substance d'essai	Nombre total de résultats n_1	Dégradation moyenne (sur l'ensemble des résultats) (%)	Écart-type relatif (sur l'ensemble des résultats) (%)	Résultats valables n_2	Dégradation moyenne (sur les résultats valables) (%)	Écart-type relatif (sur les résultats valables) (%)	Résultats affichant >60% dégradation dans les essais valables n_3
Acide palmitique	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70%*
Polyéthylène glycol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 %*

* Proportion de n_2

12. Les coefficients de variation autour de la moyenne de tous les résultats obtenus avec l'acide palmitique et le polyéthylène glycol 400 ont atteint respectivement 45% ($n = 36$) et 35% ($n = 38$). En écartant les valeurs < 40% et > 100% (attribuées à des conditions sous-optimales dans le premier cas et à des causes inconnues dans le second), on ramène leurs coefficients de variation respectifs à 26% et 23%. Les proportions de valeurs "valables" atteignant au moins 60% de dégradation étaient de 70% pour l'acide palmitique et de 83% pour le polyéthylène glycol 400. Les proportions du pourcentage de biodégradation calculées à partir des mesures du carbone inorganique dissous étaient relativement faibles, mais variables. Ces proportions s'échelonnent entre 0 et 35% (moyenne de 12% et coefficient de variation de 92%), s'agissant de l'acide palmitique, et entre 0 et 40% (moyenne de 24% et coefficient de variation de 54%), dans le cas du polyéthylène glycol 400.

DESCRIPTION DU PROCÉDÉ EXPÉRIMENTAL**Appareillage**

13. Matériel courant de laboratoire et :

- a) Incubateur anti-étincelles et thermostaté à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- b) récipients expérimentaux en verre résistant à la pression et d'une capacité nominale appropriée², munis d'un septum étanche aux gaz, capable de supporter une pression d'environ 2 bars. Le volume de l'espace libre occupe environ 10 à 30% du volume total. Si le dégagement de biogaz est régulier, un volume de 10% convient, mais si le dégagement gazeux ne se produit qu'à la fin de l'essai, ce volume doit s'élever à 30%. On recommande d'utiliser des flacons à sérum en verre d'un volume nominal de 125 ml et d'un volume total d'environ 160 ml, obturés par des septums³ adaptés aux flacons à sérum et fixés par des surcapsules en aluminium, lorsqu'il y a un dégagement de pression à chaque prélèvement ;
- c) manomètre capable de mesurer⁴ et de laisser s'échapper le gaz produit, par exemple un manomètre manuel de précision connecté à une aiguille de seringue appropriée ; un robinet à trois voies étanche aux gaz facilite la libération de la pression excédentaire (ANNEXE 1). Le volume interne des tuyaux et du robinet du transducteur de pression doit être aussi petit que possible, de telle sorte que les erreurs introduites du fait de négliger le volume de l'appareillage ne soient pas significatives.

Note : Les pressions relevées sont utilisées directement pour calculer la quantité de carbone produite dans l'espace libre (paragraphes 42 à 44). Sinon, les pressions relevées peuvent également être converties en volumes (à 35 °C , à la pression atmosphérique) de gaz produit au moyen d'un graphique de conversion. Ce graphique est dressé à partir des données obtenues en injectant des volumes connus d'azote gazeux dans une série de récipients d'essai (par exemple des flacons à sérum) à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et en notant les valeurs résultantes de la pression stabilisée (voir ANNEXE 2). Le calcul est exposé dans la note du paragraphe 44.

Avertissement : Prendre garde de ne pas se blesser avec les aiguilles des microseringues.

- d) Analyseur de carbone, capable de déterminer directement le carbone inorganique dans la gamme comprise entre 1 mg/L et 200 mg/L.
- e) Seringues à haute précision pour les échantillons gazeux et liquides.

² La capacité préconisée est comprise entre 0,1 et 1 litre.

³ Il est recommandé d'utiliser des septums en silicone étanches aux gaz et de vérifier leur étanchéité aux gaz, surtout dans le cas des septums en caoutchouc butylique, étant donné que plusieurs septums vendus dans le commerce ne sont pas suffisamment étanches au méthane et que certains septums ne sont plus étanches une fois qu'ils ont été percés par une aiguille dans les conditions de l'essai.

⁴ Cet instrument devrait être utilisé et étalonné régulièrement, conformément aux instructions du fabricant. Si on utilise un manomètre de la qualité prescrite, par exemple encapsulé avec une membrane en acier, il n'est pas nécessaire de l'étalonner au laboratoire. L'exactitude de l'étalonnage peut être vérifiée au laboratoire par une mesure unique effectuée à $1 \times 10^5\text{ Pa}$ et comparée à la même mesure réalisée avec un manomètre à affichage mécanique. Si ce point est mesuré correctement, la linéarité ne sera pas altérée. Si on utilise d'autres instruments de mesure (dont l'étalonnage n'est pas garanti par le fabricant), il est recommandé de les étalonner sur la totalité de la gamme des valeurs, à intervalles réguliers.

- f) Agitateurs magnétiques (facultatif).
- g) Boîte à gants (recommandé).

Réactifs

14. Utiliser des réactifs de qualité pour analyse tout au long de l'essai.

Eau

15. Eau distillée ou désionisée (désoxygénée par barbotage avec de l'azote gazeux renfermant moins de 5 µl/L d'oxygène), contenant moins de 2 mg/L de carbone organique dissous.

Milieu d'essai

16. Préparer un milieu de dilution contenant les ingrédients suivants dans les quantités spécifiées :

Dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH ₂ PO ₄)	0,27 g
Hydrogénophosphate de sodium dodécahydraté (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	1,12 g
Chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl)	0,53 g
Chlorure de calcium dihydraté (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,075 g
Chlorure de magnésium hexahydraté (MgCl ₂ .6H ₂ O)	0,10 g
Chlorure de fer (II) tétrahydraté (FeCl ₂ .4H ₂ O)	0,02 g
Résazurine (indicateur d'oxygène)	0,001 g
Sulfure de sodium nonahydraté (Na ₂ S.9H ₂ O)	0,10 g
Solution mère d'oligo-éléments (facultatif, paragraphe 18)	10 ml
Porter le volume à 1 litre avec de l'eau désoxygénée (paragraphe 15).	

Note : S'il est impossible d'utiliser du sulfure de sodium fraîchement préparé, il faut le laver et le sécher avant l'emploi, afin qu'il soit suffisamment réducteur. Cet essai peut être conduit sans boîte à gants (voir paragraphe 26). Dans ce cas, la concentration finale de sulfure de sodium dans le milieu peut être portée à 0,20 g de Na₂S.9H₂O par litre. Le sulfure de sodium peut aussi être ajouté à partir d'une solution mère anaérobie appropriée à travers le septum des récipients d'essai fermés, ce mode opératoire diminuant le risque d'oxydation. Le sulfure de sodium peut être remplacé par du citrate de titane (III). Ce dernier est introduit à travers le septum des récipients d'essai fermés de telle sorte que sa concentration finale y atteigne 0,8 à 1,0 mmol/L. Le citrate de titane (III) est un agent réducteur très efficace et peu toxique que l'on prépare comme suit : dissoudre 2,94 g de citrate de sodium dihydraté dans 50 ml d'eau désoxygénée (afin d'obtenir une solution à 200 mmol/L) et ajouter 5 ml d'une solution de chlorure de titane (III) à 15% (poids/volume). Neutraliser à pH 7±0,2 avec une base minérale et verser dans un récipient approprié sous un jet d'azote. La concentration de citrate de titane (III) dans cette solution mère est de 164 mmol/L.

17. Mélanger les ingrédients du milieu expérimental à l'exception de l'agent réducteur (sulfure de sodium, citrate de titane) et faire barboter de l'azote gazeux dans la solution durant environ 20 minutes, juste avant son utilisation, pour enlever l'oxygène. Ajouter ensuite le volume qui convient de la solution fraîchement préparée (dans de l'eau désoxygénée) de l'agent réducteur, juste avant d'utiliser le milieu. Ajuster le pH du milieu, si nécessaire, avec un acide ou une base minéraux dilués à 7±0,2.

Solution mère d'oligo-éléments (facultatif)

18. Il est recommandé d'utiliser un milieu d'essai contenant les oligo-éléments suivants, afin d'améliorer les processus de dégradation anaérobie, surtout si les concentrations d'inoculum sont faibles (par exemple 1 g/L) (11).

Chlorure de manganèse tétrahydraté ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	50 mg
Acide borique (H_3BO_3)	5 mg
Chlorure de zinc (ZnCl_2)	5 mg
Chlorure de cuivre (II) (CuCl_2)	3 mg
Molybdate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 mg
Chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	100 mg
Chlorure de nickel hexahydraté ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	10 mg
Sélénite de sodium (Na_2SeO_3)	5 mg

Porter le volume à 1 litre avec de l'eau désoxygénée (paragraphe 15).

Substance d'essai

19. Ajouter la substance d'essai véhiculée dans une solution, suspension ou émulsion mère ou directement, à l'état solide ou liquide, ou adsorbée sur un filtre en fibres de verre, de façon à obtenir une concentration ne dépassant pas 100 mg/L de carbone organique. Si l'on emploie une solution mère, préparer une solution appropriée avec de l'eau (paragraphe 15) préalablement désoxygénée par barbotage avec de l'azote gazeux, d'une concentration telle que le volume ajouté soit inférieur à 5% du volume total du mélange réactionnel. Ajuster le pH de la solution mère à $7 \pm 0,2$, si nécessaire. Pour les substances d'essai insuffisamment solubles dans l'eau, se reporter à la norme ISO 10634 (13). Si l'on utilise un solvant, préparer un témoin supplémentaire dans lequel seul le solvant est ajouté au milieu inoculé. Les solvants organiques dont on sait qu'ils inhibent la production de méthane, tels que le chloroforme et le tétrachlorure de carbone, sont à éviter.

Avertissement – Les substances d'essai toxiques et celles dont les propriétés sont inconnues sont à manipuler avec précaution.

Substances de référence

20. Des substances de référence, telles que le benzoate de sodium, le phénol et le polyéthylène glycol 400, ont déjà permis de vérifier correctement le mode opératoire, puisqu'elles sont biodégradées à plus de 60% en l'espace de 60 jours. Préparer une solution mère (dans de l'eau désoxygénée) de la substance de référence choisie, de la même manière que la solution de substance d'essai, et ajuster le pH à $7 \pm 0,2$, si nécessaire.

Témoin de l'inhibition (facultatif)

21. Pour obtenir des informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes anaérobies, afin de trouver la concentration expérimentale la plus appropriée, ajouter la substance d'essai et la substance de référence dans un récipient contenant le milieu expérimental (voir paragraphe 16), chacune à la même concentration que celle à laquelle elles ont été ajoutées dans le milieu d'essai lors de l'essai (voir les paragraphes 19 et 20, ainsi que la norme ISO 13641-1 (12)).

Boue digérée

22. Prélever de la boue digérée dans le digesteur d'une station d'épuration qui traite principalement des eaux usées domestiques. Cette boue doit être caractérisée de façon exhaustive et les informations de

référence doivent être incluses dans le rapport (voir paragraphe 54). Si l'on projette d'employer un inoculum adapté, on pourra peut-être recueillir la boue digérée dans une station d'épuration d'effluents industriels. Utiliser des bouteilles à large ouverture en polyéthylène à haute densité ou d'une matière semblable, capables de se dilater, pour collecter la boue digérée. Remplir ces bouteilles de boue jusqu'à environ 1 cm de leur embouchure et les fermer hermétiquement, de préférence avec une soupape de sécurité. Après son arrivée au laboratoire, la boue récoltée peut être utilisée directement ou placée dans un digesteur à l'échelle du laboratoire. Libérer l'excès de biogaz en ouvrant les bouteilles de boue avec précaution. Sinon, une boue anaérobie cultivée en laboratoire peut également être utilisée comme source d'inoculum, mais son spectre d'activité risque d'avoir été altéré.

Avertissement – Les boues digérées comportent des risques d'incendie et d'explosion à cause des gaz inflammables qu'elles dégagent, elles renferment également des organismes potentiellement pathogènes, de sorte que ces boues sont à manipuler avec prudence. Pour des raisons de sécurité, il ne faut pas recueillir les boues dans des récipients en verre.

23. Pour réduire la production gazeuse de fond et diminuer l'influence des témoins à blanc, on peut envisager de prédigérer la boue. Si une prédigestion s'avère nécessaire, on laisse la boue subir une digestion sans l'additionner d'éléments nutritifs ou de substrats à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant sept jours au maximum. On a constaté, pour quelques substances testées, qu'une prédigestion d'environ 5 jours entraîne habituellement une diminution optimale de la production gazeuse dans le témoin à blanc, qui ne s'accompagne pas d'une prolongation inacceptable de la phase de latence ou des périodes d'incubation durant la phase d'essai, ni d'une perte d'activité.

24. Pour les substances d'essai qui sont, ou risquent d'être, peu biodégradables, on envisagera de préexposer la boue à la substance d'essai, afin d'obtenir un inoculum mieux adapté. Dans ce cas, ajouter la substance d'essai à raison de 5 mg/L à 20 mg/L de carbone organique à la boue digérée et incuber ce mélange durant deux semaines au maximum. Laver soigneusement la boue préexposée avant de l'utiliser (voir paragraphe 25) et stipuler les conditions de la préexposition dans le rapport d'essai.

Inoculum

25. Laver la boue juste avant son emploi (paragraphe 22 à 24), afin d'abaisser la concentration de carbone inorganique à moins de 10 mg/L dans la suspension expérimentale finale. Centrifuger la boue dans des tubes hermétiquement clos (par exemple pendant 5 minutes à 3 000 g) et jeter le surnageant. Suspendre le culot dans un milieu désoxygéné (paragraphe 16 et 17), centrifuger à nouveau la suspension et éliminer le liquide surnageant. Si la teneur en carbone inorganique n'a pas été suffisamment réduite, le lavage de la boue peut encore être répété deux fois au maximum. Ce traitement ne semble pas nuire aux micro-organismes. Enfin, suspendre le culot dans le volume requis de milieu expérimental et déterminer la concentration des solides totaux [voir, par exemple, ISO 11923 (15)]. La concentration finale des solides totaux dans les récipients d'essai doit être comprise entre 1 g/L et 3 g/L (ou environ 10% de la concentration dans la boue digérée non diluée). Mener les opérations ci-dessus en s'efforçant de préserver autant que possible la boue de tout contact avec l'oxygène (par exemple dans une atmosphère azotée).

MODE OPÉRATOIRE

26. Conduire les étapes initiales suivantes en appliquant des techniques permettant de limiter au maximum le contact entre la boue digérée et l'oxygène ; il peut par exemple être nécessaire de travailler dans une boîte à gants sous atmosphère azotée et/ou de purger les flacons avec de l'azote (4).

Préparation des récipients d'essai et des récipients témoins

27. Préparer des récipients en au moins trois exemplaires (voir paragraphe 13-b) pour la substance d'essai, les témoins à blanc, la substance de référence, les témoins d'inhibition (le cas échéant) ainsi que des enceintes manostatées (option facultative) (voir paragraphes 7 et 19 à 21). On peut également préparer des récipients supplémentaires pour évaluer la biodégradation primaire par des procédés analytiques spécifiques de la substance d'essai. Le même ensemble de récipients témoins à blanc peut être utilisé pour plusieurs substances soumises au même essai, à condition que les volumes de l'espace libre soient homogènes.

28. Préparer l'inoculum dilué avant de l'ajouter aux récipients, par exemple au moyen d'une pipette à large embouchure. Ajouter des aliquotes de l'inoculum bien mélangé (paragraphe 25), de telle sorte que la concentration des solides totaux soit identique dans tous les récipients (entre 1 g/L et 3 g/L). Ajouter les solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence, après avoir ajusté le pH à $7 \pm 0,2$, si nécessaire. Il convient d'ajouter les substances d'essai et de référence dans le véhicule le plus approprié (voir paragraphe 19).

29. La concentration expérimentale en carbone organique doit normalement se situer entre 20 et 100 mg/L (paragraphe 4). Si la substance d'essai est toxique, la concentration expérimentale doit être réduite à 20 mg de C/L, ou même moins si seule la biodégradation primaire est à mesurer (par des analyses spécifiques). Il est à noter que la variabilité des résultats de l'essai augmente aux basses concentrations expérimentales.

30. Dans les récipients témoins à blanc, ajouter une quantité équivalente du véhicule utilisé pour ajouter la substance d'essai, à la place de la solution, suspension ou émulsion mère. Si la substance d'essai a été introduite sur un support en fibres de verre (filtre) ou à l'aide de solvants organiques, ajouter un filtre dans les témoins à blanc ou un volume de solvant équivalent à celui qui a été évaporé. Inclure un récipient d'essai supplémentaire contenant la substance d'essai pour y mesurer le pH. Ajuster le pH à $7 \pm 0,2$, si nécessaire, avec de petites quantités de base ou d'acide minéraux dilués. On ajoute la même quantité d'agent neutralisant à tous les récipients d'essai. Ces ajouts ne devraient pas être nécessaires étant donné que le pH des solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence a déjà été ajusté (voir paragraphes 19 et 20). S'il faut mesurer la biodégradation primaire, on prélève un échantillon approprié dans le récipient destiné à l'analyse du pH ou dans un récipient d'essai supplémentaire et on mesure la concentration de la substance d'essai par une analyse spécifique. Si le mélange réactionnel requiert une agitation, des aimants enrobés peuvent être déposés dans tous les récipients (facultatif).

31. S'assurer que le volume total du liquide V_1 et le volume de l'espace libre V_h sont identiques dans tous les récipients ; relever et consigner les valeurs de V_1 et V_h . Chaque récipient doit être fermé hermétiquement au moyen d'un septum étanche aux gaz et transféré de la boîte à gants (paragraphe 26) dans l'incubateur (voir paragraphe 13-a))

Substances d'essai insolubles

32. Les quantités pesées de substances peu solubles dans l'eau sont versées directement dans les récipients préparés. Si le recours à un solvant s'avère nécessaire (voir paragraphe 19), transférer la solution ou la suspension de substance d'essai dans les récipients vides. Si possible, évaporer le solvant en faisant circuler de l'azote gazeux dans les récipients, avant d'ajouter les autres ingrédients, à savoir la boue diluée (paragraphe 25) et l'eau désoxygénée, comme indiqué. Un témoin supplémentaire au solvant doit également être préparé (paragraphe 19). La norme ISO 10634 (13) présente d'autres méthodes d'ajout de substances insolubles. Les substances d'essai liquides peuvent être introduites avec une seringue dans les récipients complètement préparés et hermétiquement fermés, si l'on s'attend à ce que le pH initial ne dépasse pas 7 ± 1 , sinon ajouter la substance d'essai comme indiqué plus haut (paragraphe 19).

Incubation et mesures de la pression gazeuse

33. Incuber les récipients préparés à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durant environ une heure, afin que leur contenu s'équilibre, et évacuer l'excès de gaz dans l'atmosphère, par exemple en secouant chaque récipient, l'un après l'autre, et en y insérant l'aiguille du manomètre (paragraphe 13-c) à travers le septum, puis en ouvrant le robinet jusqu'à ce que le manomètre indique zéro. Si à ce stade, ou lorsqu'on pratique des mesures intermédiaires, la pression de l'espace libre est inférieure à la pression atmosphérique, il faut rajouter de l'azote gazeux afin de rétablir la pression atmosphérique. Fermer le robinet (voir paragraphe 13-c) et incuber les récipients à l'obscurité, en s'assurant que toutes les parties des récipients sont maintenues à la température de la digestion. Observer les récipients après 24 à 48 heures d'incubation. Écarter les récipients dont le liquide surnageant présente une coloration rose bien nette, autrement dit, où la résazurine (voir paragraphe 16) a viré, révélant la présence d'oxygène (voir paragraphe 50). Bien que le système puisse tolérer de petites quantités d'oxygène, des concentrations plus importantes risquent d'inhiber fortement la biodégradation anaérobie. Le rejet occasionnel d'un seul récipient sur un ensemble de trois récipients identiques est acceptable, mais des rejets plus fréquents doivent amener l'expérimentateur à vérifier le mode opératoire et à recommencer l'essai.

34. Mélanger soigneusement le contenu de chaque récipient en le remuant ou en agitant le récipient pendant quelques minutes, au moins 2 ou 3 fois par semaine et peu avant chaque mesure de la pression. L'agitation resuspend l'inoculum et permet d'équilibrer les gaz. Toutes les pressions sont à mesurer rapidement, les récipients d'essai pouvant subir une baisse de température induisant un affichage de valeurs erronées. Lorsqu'on mesure la pression, la totalité du récipient d'essai, y compris l'espace libre, doit être maintenue à la température de la digestion. Mesurer la pression gazeuse, par exemple en insérant l'aiguille à seringue connectée au manomètre à travers le septum (paragraphe 13-c). Veiller à ne pas laisser entrer d'eau dans l'aiguille ; si cela se produit, sécher les parties humides et placer une nouvelle aiguille. La pression est à mesurer en millibars (voir paragraphe 42). La pression gazeuse régnant dans les récipients peut être mesurée périodiquement, par exemple une fois par semaine, et éventuellement l'excès de gaz peut être évacué dans l'atmosphère. Sinon, on peut aussi ne mesurer la pression qu'à la fin de l'essai, afin de déterminer la quantité de biogaz produite.

35. On préconise de relever les pressions gazeuses intermédiaires, parce que l'augmentation de la pression indique à quel moment l'essai peut être achevé et permet de suivre la cinétique (voir paragraphe 6).

36. Normalement, l'essai prend fin après une période d'incubation de 60 jours, à moins que la courbe de biodégradation obtenue à partir des mesures de la pression ait atteint un plateau avant ; cette phase de plateau, où la courbe marque un pallier, correspond à la biodégradation maximale. Si le plateau atteint moins de 60%, l'interprétation est délicate parce que cela signifie qu'une partie seulement de la molécule a été minéralisée ou qu'une erreur a été commise. Si, à l'issue de la période d'incubation normale, du gaz se dégage alors que la phase plateau n'a manifestement pas été atteinte, on envisagera de prolonger l'essai pour vérifier si la courbe parvient finalement au plateau (> 60%).

Mesure du carbone inorganique

37. À la fin de l'essai, après la dernière mesure de la pression gazeuse, laisser la boue au repos. Ouvrir chaque récipient, l'un après l'autre, et prélever immédiatement un échantillon en vue de déterminer la concentration (mg/L) du carbone inorganique dans le liquide surnageant. Le liquide surnageant ne peut être ni centrifugé ni filtré, car ces traitements entraîneraient une perte inacceptable de dioxyde de carbone dissous. Si le surnageant ne peut être analysé juste après avoir été prélevé, stocker ce dernier dans une fiole hermétiquement fermée, sans espace libre, et refroidie à environ 4 °C , pendant deux jours au maximum. Après avoir mesuré le carbone inorganique, mesurer et enregistrer la valeur du pH.

38. Sinon, le carbone inorganique présent dans le surnageant peut être déterminé indirectement, d'après le rejet de carbone inorganique dissous sous la forme de dioxyde de carbone mesurable dans l'espace libre. Après la dernière mesure de pression gazeuse, ramener la pression régnant dans chaque récipient d'essai à la pression atmosphérique. Acidifier le contenu de chaque récipient d'essai à environ pH 1 en ajoutant un acide minéral concentré (par exemple H_2SO_4), à travers le septum des récipients hermétiquement fermés. Incuber les récipients secoués à $35^\circ C \pm 2^\circ C$ durant environ 24 heures et mesurer au manomètre la pression gazeuse résultant du dioxyde de carbone dégagé.

39. Effectuer les mêmes relevés pour le témoin à blanc, le témoin contenant la substance de référence et, le cas échéant, les témoins d'inhibition (voir paragraphe 21).

40. Dans certains cas, en particulier si les mêmes récipients témoins sont utilisés pour plusieurs substances d'essai, on envisagera de mesurer, si nécessaire, les concentrations intermédiaires de carbone inorganique dans les récipients d'essai et les récipients témoins. Dans ce cas, il faut prévoir un nombre suffisant de récipients pour toutes les mesures intermédiaires. Il est préférable de procéder de cette manière plutôt que de prélever tous les échantillons dans le même récipient. Cette dernière option ne peut être retenue que si le volume nécessaire à l'analyse du carbone inorganique dissous ne semble pas trop important. Le carbone inorganique dissous est mesuré après la mesure de la pression gazeuse, mais sans que le gaz excédentaire ait été évacué, comme décrit ci-dessous :

- prélever des échantillons de surnageant d'un volume aussi petit que possible, en introduisant une seringue à travers le septum, sans ouvrir les récipients, et déterminer la teneur en carbone inorganique de l'échantillon ;
- après avoir prélevé l'échantillon, évacuer éventuellement le gaz excédentaire ;
- il faut tenir compte du fait qu'une diminution, même minime, du volume du surnageant (par exemple de 1%) peut entraîner une augmentation sensible du volume du gaz occupant l'espace libre (V_h) ;
- si nécessaire, les équations (voir paragraphe 44) sont corrigées par une augmentation de la valeur de V_h dans l'équation 3.

Analyses spécifiques

41. S'il y a lieu de déterminer la dégradation anaérobie primaire (voir paragraphe 30), prélever un échantillon d'un volume suffisant pour les analyses spécifiques, au début et à la fin de l'essai, dans les récipients contenant la substance d'essai. Il est à noter que, si ce prélèvement est effectué, les volumes de l'espace libre (V_h) et du liquide (V_l) sont modifiés et il faut en tenir compte dans le calcul de la production gazeuse. Sinon, il est également possible de prélever des échantillons destinés aux analyses spécifiques dans des mélanges d'essai supplémentaires, prévus à cette fin (paragraphe 30).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Pour des raisons pratiques, la pression du gaz est mesurée en millibars ($1 \text{ mbar} = 1 \text{ hPa} = 10^2 \text{ Pa}$; $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$), le volume en litres et la température en degrés Celsius.

Carbone dans l'espace libre

43. Sachant qu'une mole de méthane et une mole de dioxyde de carbone contiennent chacune 12 g de carbone, la masse de carbone dans un volume donné de gaz dégagé peut être exprimée par l'équation suivante :

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Équation [1]}$$

où :

m = masse de carbone (mg) dans un volume donné de gaz dégagé ;
 12 = masse atomique relative du carbone ;
 n = nombre de moles de gaz dans le volume donné.

Si un gaz autre que le méthane ou le dioxyde de carbone (par exemple du N_2O) se dégage en quantité considérable, il convient de modifier la formule [1], de façon à décrire la possibilité d'effets engendrés par les gaz dégagés.

44. D'après les lois sur les gaz, n peut s'exprimer par :

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Équation [2]}$$

où :

p = pression du gaz (Pascals) ;
 V = volume du gaz (m^3) ;
 R = constante molaire des gaz [8.314J/(mol K)] ;
 T = température d'incubation (Kelvins).

En combinant les équations [1] et [2] et en adaptant la formule pour tenir compte de la production de gaz dans le témoin à blanc, on obtient cette équation :

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1 (\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Équation [3]}$$

où :

m_h = masse de carbone net produit sous forme de gaz dans l'espace libre (mg) ;
 Δp = moyenne de la différence entre les pressions initiale et finale dans les récipients d'essai moins la moyenne correspondante dans les récipients témoins à blanc (millibars) ;
 V_h = volume de l'espace libre dans le récipient (litres) ;
 $0,1$ = facteur permettant de convertir à la fois les newtons/ m^2 en millibars et les m^3 en litres.

L'équation [4] devrait être utilisée pour la température normale d'incubation, à savoir 35°C (308 K) :

$$m_h = 0,468 (\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Équation [4]}$$

Note : Autre mode de calcul du volume : les pressions lues sur le manomètre sont converties en ml de gaz produit à l'aide de la courbe de référence tracée en portant le volume injecté (ml) en

fonction des valeurs relevées sur le manomètre (ANNEXE 2). On calcule le nombre de moles (n) de gaz dans l'espace libre de chaque récipient en divisant la production de gaz cumulée (ml) par 25 286 ml/mole, valeur qui correspond au volume occupé par une mole de gaz à 35°C à pression atmosphérique normale. Étant donné qu'une mole de CH₄ et une mole de CO₂ contiennent chacune 12 g de carbone, la quantité de carbone (m , mg) dans l'espace libre (m_h) est donnée par l'équation [5] :

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Équation [5]}$$

En adaptant la formule pour tenir compte de la production de gaz dans le témoin à blanc, on obtient l'équation suivante :

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475\Delta V \quad \text{Équation [6]}$$

où :

m_h = masse de carbone net produite sous forme de gaz dans l'espace libre (mg) ;
 ΔV = moyenne de la différence entre le volume de gaz produit dans l'espace libre du récipient d'essai et le volume de gaz produit dans l'espace libre du récipient témoin à blanc ;
 25 286 = volume occupé par une mole de gaz à 35°C et sous 1 atmosphère.

45. Il est possible de suivre le déroulement de la biodégradation en portant sur un graphique l'accroissement de pression cumulé Δp (millibars) en fonction du temps, s'il y a lieu. À partir de cette courbe, mettre en évidence et noter la phase de latence (jours). La phase de latence correspond au temps écoulé entre le début de l'essai et le moment où la dégradation commence à être sensible (l'ANNEXE 3 en donne un exemple). Si des échantillons intermédiaires de surnageant sont prélevés et analysés (paragraphe 40, 46 et 47), alors le carbone total produit (dans le gaz et dans le liquide) peut être porté sur le graphique à la place de la seule pression cumulée.

Carbone dans le liquide

46. On néglige la quantité de méthane dans le liquide, sachant que sa solubilité dans l'eau est très faible. Calculer la masse de carbone inorganique dans le liquide des récipients d'essai à l'aide de l'équation [7] :

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Équation [7]}$$

où :

m_l = masse de carbone inorganique dans le liquide (mg) ;
 C_{net} = concentration de carbone inorganique dans les récipients d'essai moins cette même concentration dans les récipients témoins à la fin de l'essai (mg/L) ;
 V_l = volume de liquide dans le récipient (litres).

Carbone gazéifié total

47. Calculer la masse totale de carbone gazéifié dans le récipient au moyen de l'équation [8] :

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Équation [8]}$$

où :

m_t = masse totale de carbone gazéifié (mg) ;
 m_h + m_l sont comme définis plus haut.

Carbone de la substance d'essai

48. Calculer la masse de carbone (provenant de la substance d'essai ajoutée) dans les récipients d'essai à l'aide de l'équation [9] :

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Équation [9]}$$

où :

m_v = masse de carbone de la substance d'essai (mg) ;
 C_c = concentration du carbone de la substance d'essai dans le récipient d'essai (mg/L) ;
 V_l = volume de liquide dans le récipient d'essai (litres).

Ampleur de la biodégradation

49. Calculer le pourcentage de biodégradation d'après le gaz présent dans l'espace libre à l'aide de l'équation [10] et le pourcentage total de biodégradation avec l'équation [11] :

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad \text{Équation [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad \text{Équation [11]}$$

où :

D_h = biodégradation d'après le gaz présent dans l'espace libre (%) ;
 D_t = biodégradation totale (%) ;
 m_h , m_v et m_t sont définis comme plus haut.

Le degré de biodégradation primaire est calculé d'après les mesures (facultatives) de la concentration de la substance d'essai au début et à la fin de l'incubation, à l'aide de l'équation [12] :

$$D_p = (1 - S_e / S_i) \times 100 \quad \text{Équation [12]}$$

où :

D_p = dégradation primaire de la substance d'essai (%) ;
 S_i = concentration initiale de la substance d'essai (mg/L) ;
 S_e = concentration finale de la substance d'essai (mg/L).

Si la méthode d'analyse fait apparaître des concentrations significatives de substance d'essai dans l'inoculum de boue anaérobie non traité, utiliser l'équation [13] :

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Équation [13]}$$

où :

D_p^1 = dégradation primaire corrigée de la substance d'essai (%) ;
 S_{ib} = concentration initiale « apparente » de la substance d'essai dans les témoins à blanc (mg/L) ;

S_{eb} = concentration finale « apparente » de la substance d'essai dans le témoin à blanc (mg/L).

Validité des résultats

50. Seules les pressions relevées dans les récipients ne présentant pas de coloration rose (voir paragraphe 33) peuvent être utilisées. La contamination par l'oxygène est réduite au minimum par des techniques adéquates de manipulation en anaérobiose.

51. Il faut considérer que l'essai est valable si la substance de référence atteint un plateau qui représente plus de 60% de biodégradation⁵.

52. Si, à la fin de l'essai, le pH sort de l'intervalle 7 ± 1 et que la biodégradation est insuffisante, recommencer l'essai en augmentant le pouvoir tampon du milieu.

Inhibition de la dégradation

53. La production de gaz dans les récipients contenant à la fois la substance d'essai et la substance de référence doit être au moins égale à celle enregistrée dans les récipients ne contenant que la substance de référence ; sinon cela révèle une inhibition de la production de gaz. Dans certains cas, la production gazeuse dans les récipients renfermant la substance d'essai, mais pas la substance de référence est inférieure à celle régnant dans les récipients témoins à blanc : cela indique que la substance d'essai est inhibante.

Rapport d'essai

54. Le rapport d'essai doit inclure 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 :

- volumes du liquide dilué du digesteur (V_l) et de l'espace libre (V_h) dans le récipient ;
- description des récipients d'essai, des principales caractéristiques de la mesure du biogaz (par exemple, type de manomètre) et de l'analyseur de carbone inorganique ;
- ajout des substances d'essai et de référence au système expérimental : concentration expérimentale employée et recours à un solvant, le cas échéant ;
- détails sur l'inoculum utilisé : nom de la station d'épuration des eaux usées, description de la source des eaux usées traitées (par exemple, température des opérations, temps de rétention de la boue, origine principalement domestique, etc.), concentration, toutes les informations permettant d'étayer ce qui précède et renseignements sur le prétraitement éventuel de l'inoculum (par exemple prédigestion, préexposition)
- température d'incubation ;
- nombre de récipients traités de manière identique.

Résultats :

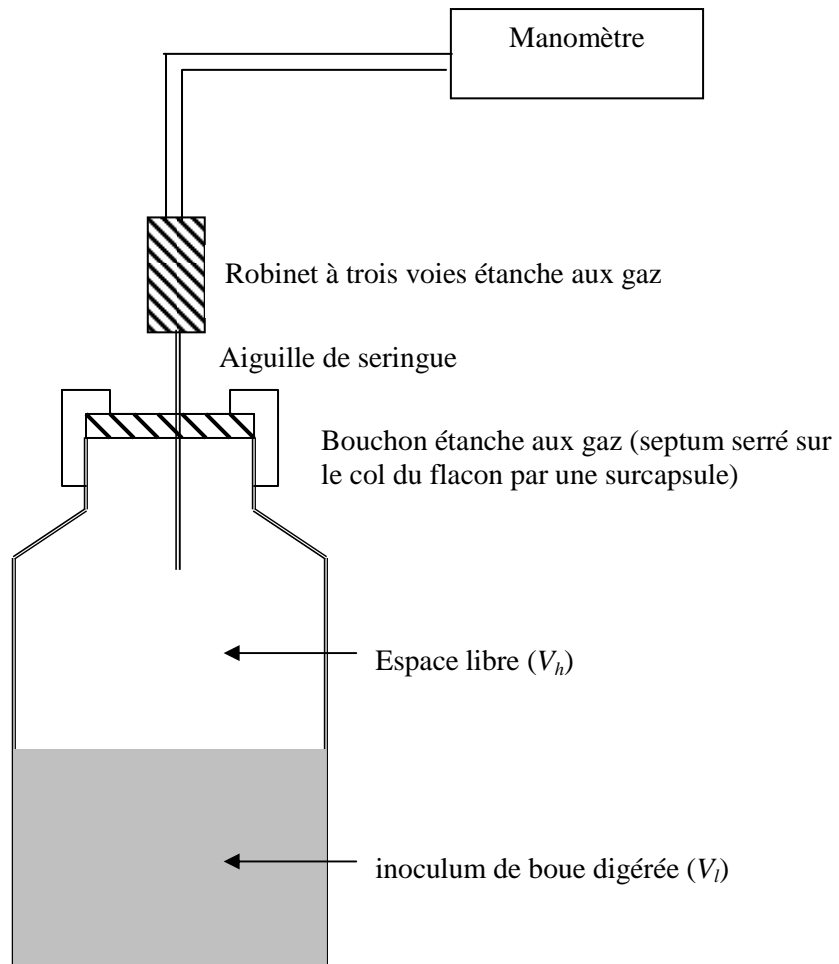
⁵ Ce point est à réévaluer si des substances de référence adsorbantes et insolubles sont incluses.

- valeurs du pH et du carbone inorganique à la fin de l'essai ;
- concentration de la substance d'essai au début et à la fin de l'essai, si une mesure spécifique a été effectuée ;
- toutes les valeurs mesurées dans les récipients d'essai, les témoins à blanc, les témoins contenant la substance de référence et les témoins d'inhibition, comme il convient (par exemple la pression en millibars, la concentration du carbone inorganique (mg/L)) sont présentées sous forme de tableau (les valeurs mesurées dans l'espace libre et le liquide doivent être rapportées séparément) ;
- traitement statistique des données, durée de l'essai et diagramme de la biodégradation de la substance d'essai, de la substance de référence et du témoin de toxicité ;
- pourcentage de biodégradation de la substance d'essai et de la substance de référence ;
- motifs du rejet éventuel des résultats ;
- analyse des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (1981). 302A-C: Biodégradabilité dite intrinsèque et 303A-B: Essai de simulation – Traitement aérobie des eaux usées. Organisation de Coopération et de Développement Economiques. Paris.
- (2) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (1992) Biodégradabilité facile 301(A-F) Organisation de Coopération et de Développement Economiques. Paris.
- (3) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).
- (4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, 47, 850-857.
- (5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
- (6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 84-89.
- (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
- (8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, 17, 2441-2460.

- (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.
- (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
- (11) Organisation internationale de normalisation (1995) ISO 11 734 Qualité de l'eau - Évaluation de la biodégradabilité anaérobie "ultime" des composés organiques dans les boues de digesteurs - Méthode par mesurage de la production de biogaz.
- (12) Organisation internationale de normalisation (2003) ISO 13 641-1 Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la production de gaz des bactéries anaérobies - Partie 1 Essai général.
- (13) Organisation internationale de normalisation (1995) ISO 10 634 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.
- (14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.
- (15) Organisation internationale de normalisation (1997) ISO 11 923 Qualité de l'eau - Dosage des matières en suspension par filtration sur filtre en fibres de verre.

ANNEXE 1**EXEMPLE D'APPAREIL PERMETTANT DE MESURER LA PRODUCTION DE BIOGAZ D'APRÈS LA PRESSION GAZEUSE**

Réipients d'essai maintenus à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

ANNEXE 2**CONVERSION DES MESURES MANOMÉTRIQUES**

Les pressions relevées peuvent être rapportées à des volumes gazeux à l'aide d'une courbe de référence obtenue en injectant des volumes d'air connus à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans des flacons à sérum contenant un volume d'eau égal à celui du mélange réactionnel, V_R :

- Verser des aliquotes de V_R ml d'eau, maintenues à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans cinq flacons à sérum. Fermer les flacons hermétiquement et les plonger dans un bain d'eau à 35 °C durant 1 heure pour les laisser s'équilibrer.
- Enclencher le manomètre, attendre qu'il se stabilise et le mettre à zéro.
- Insérer l'aiguille de la seringue à travers le bouchon de l'un des flacons, ouvrir le robinet jusqu'à ce que le manomètre indique zéro et fermer le robinet.
- Répéter ce processus avec les autres flacons.
- Injecter 1 ml d'air à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans chaque flacon. Insérer l'aiguille (montée sur le manomètre) à travers le bouchon de l'un des flacons et attendre que la valeur affichée sur le manomètre se stabilise. Noter la pression, ouvrir le robinet jusqu'à ce que la pression retombe à zéro puis fermer le robinet.
- Répéter ce processus avec les autres flacons.
- Répéter la totalité du processus en appliquant des volumes d'air de 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml et 50 ml.
- Tracer une courbe de conversion de la pression (Pa) en fonction du volume de gaz injecté V_b (ml). La réponse de l'instrument est linéaire sur la gamme comprise entre 0 Pa et 70 000 Pa et entre 0 ml et 50 ml de gaz produit.

ANNEXE 3**EXEMPLE D'UNE COURBE DE DÉGRADATION (ACCROISSEMENT NET CUMULÉ DE LA
PRESSION EN FONCTION DE LA DURÉE EXPRIMÉE EN JOURS)**

Pression gazeuse (mbars)

