

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

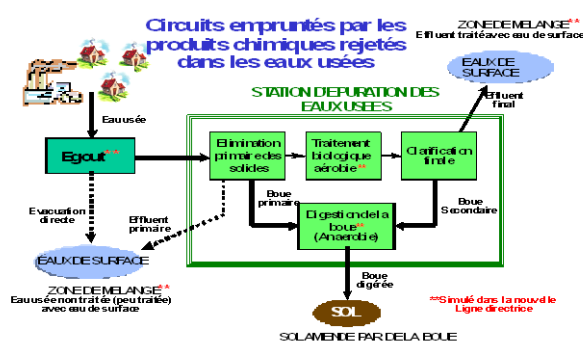
### Essais de simulation pour évaluer la biodégradabilité de produits chimiques rejetés dans les eaux usées

#### INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice décrit des méthodes de détermination de l'ampleur et de la cinétique des biodégradations primaire et finale de produits chimiques organiques qui pénètrent initialement dans l'environnement par le biais du rejet d'eaux usées. Les produits de toilette, les produits ménagers et les produits chimiques de blanchisserie sont généralement rejetés par les conduites d'évacuation dans le cadre de leur utilisation normale pour devenir des composants habituels des eaux usées domestiques. De même, les produits pharmaceutiques sont excrétés ou dans certains cas jetés dans les évacuations. Le rejet épisodique ou continu d'autres produits chimiques dans les eaux usées fait partie intégrante de certains procédés de fabrication.

2. Cette Ligne directrice comprend cinq essais de simulation de même nature mais distincts, visant à évaluer les biodégradations primaire et finale de produits chimiques dans les eaux usées au cours de leur transit dans les égouts, pendant le traitement secondaire dans un système d'épuration sur boue activée, pendant la digestion anaérobie des boues, dans l'effluent traité présent dans la zone de mélange avec l'eau de surface et dans les eaux usées non traitées qui sont directement rejetées vers l'eau de surface. Dans chaque compartiment, la biodégradation peut jouer un rôle important lors de la détermination de l'exposition aux produits chimiques dans les habitats aquatiques et terrestres interconnectés.

3. La figure de droite recense les circuits de transport les plus courants des produits chimiques rejetés dans les eaux usées. Les eaux usées pénètrent tout d'abord dans un égout, où elles peuvent séjourner pendant quelques heures à quelques jours, durant leur transport vers une station d'épuration des eaux usées ou un site d'évacuation dans l'environnement. Dans la plupart des cas, les eaux usées sont traitées avant leur rejet, mais elles sont parfois évacuées dans l'eau de surface telles quelles ou après un simple traitement primaire minimal. Dans une station d'épuration type, une partie des matières solides (40-60 %) est éliminée au cours du traitement primaire. L'effluent ainsi



© OCDE, (2008).

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

obtenu est ensuite soumis à un traitement biologique et les matières solides sont retirées dans un clarificateur final. L'effluent ultime est alors rejeté dans l'eau de surface. Les matières solides des boues éliminées au cours du traitement primaire et de la clarification finale sont le plus souvent digérées en conditions anaérobies lorsqu'elles sont destinées à l'épandage (23).

4. La fraction de produit chimique rejetée dans l'environnement dans l'effluent final ou associée aux matières solides d'une boue dépend de son mode de répartition, de sa vitesse de biodégradation et d'autres processus (par exemple volatilisation, hydrolyse, photolyse, séquestration). Le temps de séjour du produit chimique et le niveau d'activité biologique des milieux favorisent particulièrement l'élimination significative par biodégradation 1) dans l'égout, 2) pendant le traitement aérobie secondaire et 3) pendant la digestion anaérobie de la boue. Par conséquent, il est essentiel de simuler ces trois systèmes pour quantifier les pertes par biodégradation pendant le transport et le traitement des eaux usées. De surcroît, les effets des procédés de traitement se prolongent dans l'environnement au moment de l'évacuation. Ainsi, pour apprécier la concentration et l'exposition en aval, il est fondamental d'étudier aussi la biodégradation dans les zones de mélange, dans l'eau et dans les biosolides, qui s'éloignent du point de rejet.

5. Les cinq méthodes d'essai de simulation décrites font intervenir un système discontinu ouvert ou un système discontinu clos avec écoulement de gaz qui intègre des éléments des Lignes directrices de l'OCDE 301 (1), 303A (2), 309 (3), 310 (4) et 311 (5). Les principaux objectifs des méthodes sont les suivantes : 1) mesurer la vitesse de biodégradation primaire, 2) mesurer la vitesse de minéralisation et 3) suivre la formation et la dégradation des principaux produits de transformation, s'il y a lieu. En outre, lorsque des méthodes analytiques appropriées sont disponibles, il est possible de caractériser et de quantifier des produits de transformation majeurs.

6. Les essais peuvent être conçus en vue d'une évaluation précise de la biodégradation de produits chimiques tant nouveaux qu'existants (6, 7, 8, 9, 10, 11) rejetés en continu ou par intermittence dans les eaux usées. Dans certains cas, les constantes cinétiques ainsi obtenues peuvent être intégrées dans les modèles d'exposition utilisés en évaluation des risques. Il s'agit de d'essais de niveau supérieur visant à évaluer la biodégradation des produits chimiques qui ne sont pas biodégradés dans les essais préliminaires de l'OCDE ou à préciser les vitesses de dégradation utilisées lors de l'évaluation d'une exposition.

### **PRINCIPES GENERAUX DES ESSAIS**

7. Habituellement, un produit chimique d'essai, portant un isotope radioactif en une position appropriée, est incubé avec un échantillon environnemental, qui a été récemment récolté sur un site représentatif ou maintenu au laboratoire dans des conditions simulant avec réalisme une condition environnementale prévisible. Des traitements abiotiques et biotiques sont préparés pour chaque produit chimique de l'essai et chaque condition. L'activité biologique est inhibée dans le témoin abiotique, dont la fonction est d'estimer la minéralisation par différence, d'établir l'efficacité d'extraction et la récupération de la molécule parent et de quantifier d'autres processus de perte, comme l'hydrolyse, l'oxydation, la volatilisation ou la sorption sur l'appareil de l'essai.

8. Lorsqu'une méthode analytique dotée de la sensibilité requise est connue, il est possible de déterminer la vitesse de dégradation ou de transformation de la molécule parent en utilisant une substance d'essai non radiomarkée ou en suivant la disparition d'un produit chimique initialement présent dans un échantillon. Toutefois, lorsque la voie de biodégradation n'est pas parfaitement élucidée et en l'absence de méthodes analytiques dotées de la sensibilité requise pour analyser les éventuels produits de dégradation, il est impossible de déterminer la biodégradation finale de substances non radiomarkées.

9. La substance d'essai est introduite à une concentration pertinente au plan environnemental dans les systèmes expérimentaux abiotiques et biotiques. Les milieux de traitement préparés sont incubés à une

température adéquate avec un mélange continu s'il y a lieu. Des échantillons sont périodiquement prélevés afin de d'analyser la minéralisation et la biodégradation primaire. La durée des essais dépend du temps requis pour déterminer s'il y a eu dégradation totale et à quelle vitesse elle s'est déroulée. Celle-ci ne représente pas nécessairement le temps de séjour réel caractéristique d'un produit chimique dans un compartiment spécifique de l'environnement. Lorsque les résultats des essais sont utilisés dans une évaluation des risques environnementaux, le temps de séjour approprié dans les compartiments considérés par les essais est déterminé en fonction des scénarios adoptés dans l'évaluation des risques spécifique.

10. Les essais peuvent se dérouler dans un système discontinu ouvert ou dans un système discontinu clos à écoulement de gaz, muni de pièges de capture du  $^{14}\text{CO}_2$  et du  $^{14}\text{CH}_4$  dégagés. Le système clos à écoulement continu est absolument obligatoire pour les substances d'essai volatiles. Généralement, il est aussi préférentiellement utilisé pour les produits chimiques d'essai marqués au  $^{14}\text{C}$ . Les systèmes ouverts conviennent aux produits chimiques d'essai non volatils marqués au  $^3\text{H}$  et permettent de préciser la cinétique de biodégradation des substances d'essai non volatiles marquées au  $^{14}\text{C}$ , dont l'aptitude à la minéralisation a été préalablement établie. Dans le système ouvert, la minéralisation en  $^{14}\text{CO}_2$  ( $^{14}\text{CH}_4$ ) peut être déterminée indirectement par mesure de la différence de radioactivité résiduelle entre les échantillons des traitements biotiques et abiotiques après acidification. De manière analogue, la minéralisation en  $^3\text{H}_2\text{O}$  peut être indirectement déterminée par mesure de la différence de radioactivité résiduelle d'un échantillon avant et après séchage. Le système ouvert ne convient pas à l'analyse des substances d'essai volatiles. Dans les systèmes à écoulement continu, on mesure directement le  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé dans les pièges basiques. En outre, le  $^{14}\text{CO}_2$  dissous est analysé par acidification des échantillons dans un récipient hermétiquement clos et mesure de la radioactivité dans un piège basique contenu dans le récipient. En conditions anaérobies, le  $^{14}\text{CO}_2$  et le  $^{14}\text{CH}_4$  dégagés sont recueillis en parallèle. Le  $^{14}\text{CO}_2$  est piégé dans la base, et le  $^{14}\text{CH}_4$  est brûlé et converti en  $^{14}\text{CO}_2$ , qui est ensuite piégé de manière analogue. On peut également utiliser des sacs d'échantillonnage de gaz pour piéger les gaz issus d'une boue de digesteur anaérobie. Le choix du modèle d'essai dépend du type de marqueur radioactif ( $^{14}\text{C}$  ou  $^3\text{H}$ ), du compartiment environnemental et des propriétés de la substance d'essai.

11. La radioactivité totale, le parent extractible et les produits de dégradation ainsi que la radioactivité associée aux solides extraits sont analysés dans des échantillons prélevés dans les deux traitements. Les quantités de parent et de produits de dégradation sont déterminées par des méthodes de séparation chromatographique et de détection radioanalytique. Les solides résiduels à l'issue du procédé d'extraction sont brûlés pour estimer par différence l'incorporation dans la biomasse ou peuvent être encore fractionnés afin de déterminer leur absorption dans les divers composants de la biomasse. La somme totale de toutes les fractions de chaque échantillon prélevé permet de calculer le bilan massique complet du système expérimental.

12. La quantité résiduelle de parent en fonction du temps peut être analysée à l'aide de divers modèles de décomposition afin d'estimer les vitesses de biodégradation primaire. On peut de même analyser le niveau de minéralisation cumulée en utilisant divers modèles de production pour évaluer les taux de minéralisation. (On se référera au chapitre sur les analyses cinétiques : paragraphes 31-33).

### **APPLICABILITE ET LIMITES DES ESSAIS**

13. Les divers essais sont conçus pour évaluer la biodégradation au cours des principales phases du transit des eaux usées et pendant leur traitement et leur rejet dans l'environnement. Le choix des essais doit s'appuyer sur les scénarii de rejet et les propriétés anticipées du produit chimique sujet. Dans le cas de substances d'essai volatiles, il convient d'apporter les modifications adéquates permettant de quantifier les pertes dues à la volatilisation.

14. Aucun des essais n'inclut l'élimination de l'azote et du phosphore.

**314 A Biodégradation dans un essai sur réseau d'égout.**

15. Cet essai a pour objectif d'évaluer la biodégradation dans les eaux usées brutes dans des conditions qui règnent habituellement dans les réseaux d'égout. Cet essai se justifie lorsque le séjour du produit chimique dans l'égout est suffisamment long pour aboutir à une biodégradation et une perte significatives. Il est par conséquent particulièrement adapté aux produits chimiques relativement labiles évacués dans les grands réseaux d'égouts municipaux. De surcroît, l'essai fournit des données susceptibles d'être utilisées pour déterminer la concentration d'un produit chimique sorbé sur la boue primaire. Dans les conditions de cet essai, la concentration du produit chimique dans l'essai est celle attendue dans les eaux usées qui contiennent une quantité de biomasse normalement présente dans un échantillon d'eau usée représentatif. Malgré la présence d'oxygène, le système est soumis à une aération minimale visant à simuler les conditions de concentration d'oxygène dissous dans les égouts.

**314 B Biodégradation dans un essai sur boue activée**

16. Cet essai sur boue activée a pour objectif d'évaluer la biodégradation dans un mode de traitement biologique des eaux usées largement répandu. Il est applicable à tous les produits chimiques soumis à ce type de traitement, et est essentiel à l'estimation des concentrations dans l'effluent final. Il s'agit généralement du premier et plus important essai de la série. Il se caractérise par une concentration élevée de biomasse et une teneur relativement faible en produit chimique d'essai dans des conditions de bonne aération. Cet essai sur boue activée peut compléter ou se substituer à moindre coût à l'essai 303A de l'OCDE, simulation dynamique d'une station d'épuration des eaux usées permettant de déterminer l'élimination d'un produit chimique d'essai dans un ensemble spécifique de conditions opératoires (à savoir, temps de séjour hydraulique, temps de séjour des matières solides, quantité de matière solide, etc.). L'essai 303A de l'OCDE peut aboutir à une simple valeur d'élimination ou à une représentation détaillée de la biodégradation et de la sorption à l'état stationnaire pendant le traitement. Toutefois, il est possible de substituer cet essai à la mise en œuvre du système intégral, qui est coûteuse et complexe, et d'obtenir ainsi une constante de vitesse de premier ordre caractérisant la disparition de la substance parent et la minéralisation, pour les utiliser comme données à intégrer dans divers modèles de simulation d'eaux usées visant à estimer l'élimination dans un ensemble donné de conditions opératoires.

**314 C Biodégradation dans un essai sur boue de digesteur anaérobie**

17. L'essai sur boue de digesteur anaérobie a pour objectif d'évaluer la biodégradation pendant la digestion anaérobie de boues. Il convient particulièrement aux produits chimiques sorbants qui se répartissent dans la boue primaire et dans la boue secondaire. Cet essai permet de préciser la concentration d'un produit chimique présent dans la boue à l'issue d'une station d'épuration, et de démontrer son potentiel de biodégradation anaérobie. Il se caractérise par des conditions réductrices, une quantité importante de biomasse anaérobie et une concentration de produit chimique d'essai fondée sur les concentrations attendues dans les eaux usées et le comportement de dissociation.

**314 D Biodégradation dans un essai sur zone de mélange effluent traité – eau de surface**

18. L'essai sur zone de mélange d'effluent a pour objectif d'évaluer la biodégradation de la fraction de produit chimique soumise au traitement et évacuée dans l'effluent vers l'eau de surface et il peut être utilisé pour démontrer que la biodégradation subie dans la station d'épuration se poursuit dans l'environnement cible. Son principe de base suppose que le produit chimique et les microbes qui le dégradent sont évacués ensemble dans l'effluent. Les résultats de cet essai peuvent être utilisés pour estimer la réduction de la concentration d'un produit chimique attribuable à la biodégradation lors du déplacement d'un volume d'eau vers l'aval d'une station d'épuration des eaux usées. Cet essai se caractérise par de très faibles quantités de produit chimique d'essai et de biomasse dans des conditions de

bonne aération. À la différence de l'essai 309 de l'OCDE, l'eau de surface est amendée par l'effluent traité et ce système expérimental peut être utilisé pour évaluer des matières volatiles. De surcroît, alors que la Ligne directrice 309 de l'OCDE est essentiellement axée sur la minéralisation, cet essai est conçu pour évaluer les biodégradations primaire et finale ainsi que la formation de métabolites et la disparition des produits chimiques évacués dans les eaux usées.

### ***314E Biodégradation dans un essai sur zone de mélange eau usée non traitée – eau de surface***

19. L'objectif de ce système expérimental est d'évaluer la biodégradation dans des eaux usées non traitées directement rejetées dans l'eau de surface. Il permet de déterminer la vitesse relative de biodégradation d'un produit chimique par rapport à d'autres composants organiques des eaux usées. Dans les conditions de cet essai, les quantités de produits chimiques d'essai et de biomasse dépendent de leur concentration attendue dans les zones de mélange eau usée – eau de surface. L'oxygène reste présent mais en proportions réduites, car la charge organique est élevée.

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

20. Dans la plupart des cas, il est nécessaire d'utiliser dans cet essai des substances d'essai marquées par l'isotope radioactif  $^{14}\text{C}$  ou  $^3\text{H}$ . Il faut parfois ajouter au composé radiomarqué le composé non radiomarqué pour atteindre la concentration expérimentale requise. Si les activités spécifiques des substances sont faibles, l'augmentation du volume des échantillons analytiques permet d'améliorer en partie la sensibilité de la méthode.

21. Le marqueur radioactif  $^{14}\text{C}$  doit être situé dans la partie la plus stable de la molécule afin de suivre intégralement la formation et la dégradation des métabolites. Il est parfois préférable de répéter l'étude en choisissant des positions différentes de marquage lorsque les molécules sont grandes ou complexes et comportent plusieurs sites d'activité. Dans d'autres cas, il vaut parfois mieux placer le marqueur dans une partie de la molécule dont on connaît mal le devenir. Quel que soit le cas, il faut tenir compte de la position du marqueur dans l'interprétation des résultats, car elle est corrélée à la minéralisation et aux produits de dégradation.

22. Des composés tritiés peuvent remplacer les composés marqués au  $^{14}\text{C}$  quand les substances ne sont pas volatiles si leur coût est moindre ou leur synthèse plus facile. Un marquage au tritium se traduit fréquemment par une distribution aléatoire ou uniforme des atomes de tritium dans la molécule. Les échanges éventuels du tritium isotopique avec l'hydrogène de l'eau sont également à considérer (26). Ces deux phénomènes doivent être pris en compte lors de l'interprétation des modèles de minéralisation et des profils de métabolites.

23. On peut utiliser des substances d'essai non marquées pour déterminer le taux de dégradation ou de transformation du parent dès lors qu'une méthode analytique de sensibilité appropriée est identifiée.

24. La conception d'un essai s'appuiera avec profit sur les informations suivantes sur la substance d'essai :

- solubilité dans l'eau [Ligne directrice 105 de l'OCDE] (12) ;
- solubilité dans les solvants organiques (substances appliquées dans un solvant ou dont la solubilité dans l'eau est faible) ;
- constante de dissociation (pKa) si la substance est sujette à la protonation ou à la déprotonation [Ligne directrice 112 de l'OCDE] (13) ;
- pression de vapeur [Ligne directrice 104 de l'OCDE] (14) et/ou constante de Henry ;
- stabilité chimique dans l'eau et à l'obscurité (hydrolyse) [Ligne directrice 111 de l'OCDE] (15) ;
- concentration dans la nature, si elle est connue ou estimée ;

- toxicité de la substance d'essai à l'égard des microorganismes [Ligne directrice 209 de l'OCDE] (16) ;
- biodégradabilité facile [Ligne directrice 301 de l'OCDE] (1), [Ligne directrice 310 de l'OCDE] (4) et/ou intrinsèque [Ligne directrice 302 de l'OCDE] (17, 18, 19)
- photolyse
- comportement de dissociation

### **SUBSTANCE DE REFERENCE**

25. Une substance qui se dégrade normalement facilement dans les conditions de l'essai peut servir de substance de référence. Cette substance de référence a pour rôle de vérifier l'activité de la population microbienne dans le système expérimental. On peut également inclure comme témoin une substance dont on connaît parfaitement le devenir dans l'environnement et comparer les résultats du composé de l'essai aux siens. L'utilisation d'une substance de référence n'est pas obligatoire, mais peut donner des informations utiles pour interpréter les résultats de l'essai.

### **CRITERES DE QUALITE**

#### **Validité des essais**

26. Le bilan massique du traitement abiotique permet de confirmer la récupération du parent dans le système expérimental. Il est recommandé de mener une étude pilote simplifiée de disparition avant l'essai définitif pour décider du système d'extraction approprié au parent et aux produits de dégradation. Les récupérations visées dans la matrice expérimentale doivent se situer entre 85 % et 110 % ; ces intervalles ne doivent toutefois pas être utilisés comme critères d'acceptation de l'essai. Si les récupérations des parents dans les échantillons initiaux prélevés dans le témoin abiotique sont comprises dans l'intervalle voulu, les protocoles de préparation des échantillons sont adaptés à la récupération du composé parent dans la matrice expérimentale. Des récupérations à partir du traitement abiotique inférieures aux valeurs visées peuvent s'expliquer par une médiocre efficacité d'extraction, une sorption sur la verrerie ou une dégradation chimique (voir ci-dessous).

27. La récupération totale de la radioactivité en conditions abiotiques et biotiques doit normalement se situer entre 75 et 115 % dans chaque échantillon individuel et la récupération totale moyenne calculée pour tous les échantillons d'un traitement doit se situer dans l'intervalle de 85 à 110 %. Ces intervalles ne doivent toutefois pas servir de critères d'acceptation de l'essai. Si les bilans massiques calculés pour le traitement abiotique sont compris dans l'intervalle visé, mais que ceux du système d'essai biotique sont significativement inférieurs à ces valeurs, la récupération insuffisante est probablement due à un piégeage inefficace du  $^{14}\text{CO}_2$ , à une récupération insuffisante des produits de dégradation ou à la perte des produits de dégradation sur l'équipement en verre ou par volatilisation.

28. Lorsque l'analyse chimique des échantillons de témoin abiotique révèle que le parent est resté intact tout au long de l'expérience, la biodégradation dans le traitement biotique peut être attribuée à une activité microbienne. Lorsque le traitement abiotique indique une dégradation du parent au cours du temps, l'interprétation des résultats peut inclure une description ou une explication du probable processus abiotique à l'œuvre. La comparaison entre les deux traitements de l'avancement de la dégradation du parent et de la formation de métabolites donne une estimation de leurs proportions attribuables aux dégradations biologique et chimique dans le traitement biotique, en supposant qu'il n'y a pas de perte lors de la préparation de l'échantillon.

#### **Sensibilité des méthodes analytiques**

29. La limite de détection de la méthode analytique pour la substance d'essai et pour les produits de transformation doit être, dans la mesure du possible, inférieure ou égale à 1 % de la concentration initiale ajoutée au système expérimental. La limite de quantification sera, si possible, inférieure ou égale à 3 % de la concentration ajoutée.

### **Résultats obtenus avec la substance de référence**

30. Les résultats de la substance de référence, lorsque celle-ci est incluse, doivent avoisiner les résultats anticipés qui ont justifié son choix.

## **RESULTATS ET RAPPORT**

### **Représentation graphique des données**

31. La durée exacte d'incubation, y compris, s'il y a lieu, la durée nécessaire pour arrêter l'activité biologique, est notée pour chaque échantillon. De plus, à chaque point de prélèvement, les pourcentages de la radioactivité mesurée correspondant au parent, aux produits de dégradation et associés aux matières solides, ainsi que la quantité cumulée de minéralisation et le bilan massique total sont consignés. Le cas échéant, des courbes reportant ces pourcentages en fonction du temps sont tracées pour les traitements biotiques et abiotiques.

### **Analyses cinétiques (facultatif)**

32. Dans certains cas, il peut être intéressant d'ajuster les résultats de ces essais à des modèles cinétiques, en particulier des modèles de dégradation de la substance parent et des modèles de production pour la minéralisation (par exemple,  $^{14}\text{CO}_2$  ou  $^3\text{H}_2\text{O}$ ). À cette fin, les modèles les plus courants et les plus utiles sont des modèles de premier ordre. La plupart des modèles d'exposition (par exemple EUSES, SimpleTreat) emploient des vitesses de premier ordre comme paramètres entrants déterminants.

33. Un modèle de premier ordre suppose que la constante de vitesse d'une réaction dépend uniquement de la concentration de la substance d'essai. Les conditions sont réellement de premier ordre lorsque la concentration de substance d'essai est inférieure à la valeur de saturation de la capacité de biodégradation d'un système. Lorsque la concentration de la substance d'essai excède la saturation, les données peuvent toutefois être ajustées à une fonction de premier ordre, mais ces vitesses de quasi premier ordre seront plus lentes qu'une vitesse de premier ordre vraie. Une cinétique de quasi premier ordre peut apparaître lorsqu'il est nécessaire, pour des raisons analytiques ou tout simplement pour représenter une situation *in situ* spécifique, de tester une concentration plus élevée que la concentration *in situ* habituelle.

34. Lorsque la dégradation suit une courbe exponentielle sans période de latence préalable à son initiation, pendant laquelle il n'y a que peu ou pas de dégradation, il est possible d'ajuster les données de dégradation ou de production à un modèle de premier ordre. Dans ce cas, le pourcentage de parent restant en fonction du temps peut être ajusté à une fonction de perte de premier ordre à un ou deux compartiments en utilisant des méthodes de régression non linéaire. Ces équations ont la forme suivante :

$$y = Ae^{-k_1t}$$

$$y = (Ae^{-k_1t}) + (Be^{-k_2t})$$

dans lesquelles  $y$  représente le pourcentage de parent encore présent au temps ( $t$ ),  $A$  représente le pourcentage de substance dégradée à la constante de vitesse de premier ordre  $k_1$ , et  $B$  représente le pourcentage dégradé à la constante de vitesse de premier ordre  $k_2$ . Ces courbes peuvent être ajustées en utilisant des méthodes non linéaires incorporées dans les logiciels statistiques ou d'ajustement de courbes

du commerce. Le modèle à deux compartiments est intéressant lorsque la biodégradation est biphasique, susceptible de représenter deux pools différents de substance d'essai (par exemple dissoute et sorbée) présents dans le système expérimental et dont les vitesses de biodégradation sont différentes.

35. De manière analogue, on peut ajuster les données de minéralisation à un modèle de production de premier ordre à un ou deux compartiments sous la forme suivante :

$$y = A(1 - e^{-k_1 t})$$

$$y = A(1 - e^{-k_1 t}) + B(1 - e^{-k_2 t})$$

dans laquelle  $y$  représente le pourcentage de matériau minéralisé au temps ( $t$ ),  $A$  représente le pourcentage de composés minéralisés à la constante de vitesse de premier ordre  $k_1$ , et  $B$  représente le pourcentage de composés minéralisés à la constante de vitesse de premier ordre  $k_2$ .

36. Dans certains cas, la biodégradation, notamment la perte du parent, peut être si rapide qu'il est impossible de mesurer un temps zéro réel dans le traitement biotique. On peut alors utiliser les résultats du traitement abiotique pour représenter ce point nécessaire dans les analyses cinétiques.

37. Lorsqu'on observe des cinétiques de premier ordre, on peut calculer les demi-vies ( $T_{1/2}$ ) à partir des vitesses de premier ordre estimées ( $k_1$  ou  $k_2$ ) de chaque pool ( $A$  ou  $B$ ) en utilisant l'équation suivante :

$$T_{1/2} = -\ln 2/k$$

38. Dans certains cas, il est possible d'ajuster les données observées à divers autres modèles, par exemple le modèle de Monod ou d'autres modèles de croissance, qui sortent du cadre de la présente Ligne directrice. D'autres détails sur les cinétiques de biodégradation sont inclus dans un rapport du FOCUS Work Group on Degradation Kinetics (20). La demi-vie n'a d'intérêt que pour les substances dont la dégradation se conforme à des modèles de premier ordre. Si la cinétique n'est pas de premier ordre, la mesure du temps nécessaire à une dégradation de 50 % ( $TD_{50}$ ) et de 90 % ( $TD_{90}$ ) de la substance d'essai peut présenter une utilité si ces niveaux de dégradation sont observés pendant le déroulement de l'étude. On peut déterminer ces valeurs directement, ou bien les estimer en utilisant des protocoles d'interpolation standard.

39. Si les données sont ajustées à un modèle, l'équation du modèle et le logiciel utilisé pour ajuster le modèle doivent être indiqués. Le coefficient de corrélation ( $r^2$ ), le cas échéant la valeur  $F$ , et un tracé de la courbe ajustée portant également les résultats réels doivent être fournis. Il convient de reporter les constantes de vitesses estimées ( $k_1$  ou  $k_2$ ) et d'autres paramètres ( $A$ ,  $B$ ) avec leurs écarts types.

### **Rapport d'essai**

40. Le type d'essai, à savoir sur eau usée, sur boue activée, sur zone de mélange ou sur boue de digesteur anaérobie doit être stipulé clairement dans le rapport d'essai, qui contiendra également, s'il y a lieu les informations suivantes :

Substances de l'essai :

- noms courants, noms chimiques, numéros CAS, formules structurales et propriétés physico-chimiques pertinentes des substances d'essai et des substances de référence ;
- noms chimiques, numéros CAS, formules structurales et propriétés physico-chimiques pertinentes des substances servant d'étalon pour l'identification des produits de dégradation ;



- pureté des substances d'essai et de référence et nature des impuretés connues qu'elles contiennent ;
- pureté radiochimiques et activité spécifique des produits chimiques radiomarqués ;
- position dans la molécule des atomes radiomarqués.

#### Échantillons environnementaux :

- source des échantillons environnementaux, notamment site géographique de collecte et données pertinentes concernant une exposition antérieure ou existante connue à la substance d'essai et à des substances apparentées ;
- raisonnement utilisé pour estimer la concentration adéquate dans la nature ;
- moment, date et conditions de terrain liés à la récolte ;
- température, pH, oxygène dissous (OD) et potentiel redox, si besoin est ;
- la concentration de solides en suspension, demande biologique en oxygène, demande chimique en oxygène et carbone organique total ou carbone organique dissous, si besoin est ;
- durée écoulée entre la récolte et l'utilisation dans l'essai au laboratoire, conditions de stockage de l'échantillon et tous les prétraitements subis par l'échantillon avant le début de l'essai ;

#### Conditions expérimentales :

- dates auxquelles l'étude a été menée ;
- quantité de substance d'essai appliquée, concentration expérimentale et substance de référence ;
- méthode d'application de la substance d'essai et raisonnement justifiant son choix ;
- conditions d'incubation, notamment éclairage, type d'aération, température ;
- information sur les techniques analytiques et méthode(s) employées pour les mesures radiochimiques ;
- nombre d'expériences identiques ;

#### Résultats :

- précisions et sensibilité des méthodes analytiques, notamment limite de détection et limite de quantification ;
- méthode de récupération de chaque analyse et traitement de la radioactivité mesurée à chaque point de prélèvement et analyse sous forme de tableau.
- bilan massique moyen avec l'écart-type à tous les points temporels pour chaque traitement ;
- modes opératoires et modèles utilisés pour estimer les vitesses de biodégradation à partir des résultats ;
- vitesses de biodégradation et paramètres connexes avec les écarts types pertinents ainsi que les coefficients de corrélation de détermination ( $R^2$ ) et statistiques F pour les modèles choisis ;
- caractérisation ou identification complémentaires de tous les produits de dégradation principaux, s'il y a lieu et dans la mesure du possible ;
- proposition d'une voie de transformation ;
- discussion des résultats.

**314 A BIODEGRADATION DANS UN RESEAU D'EGOUT****INTRODUCTION**

1. Cet essai est conçu pour établir les vitesses de biodégradations primaire et finale d'un produit chimique dans des eaux usées brutes durant leur séjour dans un réseau d'égout. Il s'appuie sur un protocole initialement publié dans Matthijs et al (6). Les eaux usées contiennent de grandes quantités de microorganismes, capables de dégrader diverses substances. La durée de l'essai est généralement courte (< 96 h) de manière à simuler le temps de séjour dans un égout, mais elle peut être prolongée pour évaluer le degré de dégradation du produit chimique susceptible d'être atteint grâce aux microbes contenus dans les eaux usées. Il est utile de procéder à cet essai lorsque le produit chimique reste suffisamment longtemps dans un égout pour subir une biodégradation et une perte significatives. Par conséquent, il est particulièrement intéressant pour les produits chimiques relativement labiles évacués dans de grands réseaux d'égouts municipaux. L'aération dans un égout est très irrégulière en termes quantitatifs. Afin de limiter la variabilité et de simuler les conditions qui règnent habituellement dans un égout, l'essai est mené sous faible teneur en oxygène dissous (< 1 mg/l). Pour atteindre ces valeurs sans toutefois imposer des conditions anoxiques (par exemple, concentration d'oxygène dissous < 0.2 mg/l), la concentration d'oxygène dissous ou la concentration d'oxygène correspondante dans l'espace vide du récipient expérimental doivent être mesurées périodiquement. On peut ajouter de temps à autre de l'air, de l'oxygène ou de l'azote dans les récipients expérimentaux pour maintenir la concentration d'oxygène dissous dans cet intervalle.

2. Dans le cas de produits chimiques existants régulièrement présents dans les eaux usées, une eau usée récemment collectée et incubée avec une quantité de produit chimique d'essai radiomarké faisant office de traceur permettra d'obtenir les paramètres cinétiques les plus réalistes en termes de charge chimique normale. Dans le cas de produits chimiques qui ne sont pas présents en permanence dans les eaux usées, il faudra ajouter une quantité de produit chimique d'essai (radiomarké et non radiomarké) suffisante pour avoisiner la concentration attendue dans les eaux usées lors d'un rejet épisodique ou après commercialisation d'un nouveau produit chimique. Cette concentration doit être représentative de la masse totale rejetée et du volume d'eau usée dans laquelle le produit rejeté est dilué. Des approches permettant d'estimer la concentration dans les eaux usées sont proposées dans Holman (21) et le European Technical Guidance Document (22). Dans la plupart des cas, le produit chimique et les populations d'agents de dégradation ne se trouveront pas à l'état stationnaire et la cinétique observée sera de quasi premier ordre ou de second ordre de Monod.

**MODE OPERATOIRE GENERAL DE L'ESSAI**

3. Le produit chimique de l'essai est incubé avec des eaux usées abiotiques et biotiques pendant une certaine durée dans des conditions de faible concentration d'oxygène dissous. L'activité biologique est inhibée dans le témoin abiotique, qui est utilisé pour estimer la minéralisation par différence, en déterminant l'efficacité d'extraction et de récupération de la molécule parent et en quantifiant les autres processus de perte, comme l'hydrolyse, l'oxydation, la volatilisation ou la sorption sur l'appareil utilisé dans l'expérimentation.

4. Lorsqu'une méthode analytique dotée de la sensibilité requise est connue, il est possible de déterminer la vitesse de dégradation ou de transformation de la molécule parent en utilisant une substance d'essai non radiomarkée ou en suivant la disparition d'un produit chimique initialement présent dans l'eau usée. Toutefois, lorsque la voie de biodégradation n'est pas parfaitement élucidée et en l'absence de méthodes analytiques dotées de la sensibilité requise pour analyser les éventuels produits de dégradation il est impossible de déterminer la biodégradation finale.

5. La substance d'essai est introduite dans les systèmes expérimentaux abiotiques et biotiques à une concentration pertinente au plan environnemental, et ils sont incubés sous agitation lente continue. L'incubation des échantillons biotiques permet de maintenir les concentrations d'oxygène dissous à une valeur inférieure ou égale à 1 mg/l, habituelle dans les égouts. Des échantillons sont périodiquement prélevés afin d'analyser la minéralisation et la biodégradation primaire.

6. Les essais peuvent se dérouler dans un système discontinu ouvert ou dans un système discontinu clos à écoulement continu, muni de pièges de capture du  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé. Le système clos à écoulement continu est obligatoire pour les substances d'essai volatiles et préférentiellement utilisé pour les produits chimiques d'essai marqués au  $^{14}\text{C}$ . Les systèmes ouverts conviennent aux produits chimiques d'essai non volatiles marqués au  $^3\text{H}$  et pour préciser la cinétique de biodégradation des substances d'essai non volatiles marquées au  $^{14}\text{C}$ , dont l'aptitude à la minéralisation a été préalablement établie. Dans le système ouvert, la minéralisation en  $^{14}\text{CO}_2$  peut être déterminée indirectement par mesure de la différence de radioactivité résiduelle entre les échantillons des traitements biotiques et abiotiques après acidification. De manière analogue, la minéralisation en  $^3\text{H}_2\text{O}$  peut être déterminée indirectement par mesure de la différence de radioactivité dans un échantillon avant et après séchage. Dans les systèmes à écoulement continu, on mesure directement le  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé dans les pièges basiques. De surcroît, la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  dissous est déterminée après acidification des échantillons dans un récipient hermétiquement fermé et mesure de la radioactivité dans un piège basique contenu dans le récipient.

7. La radioactivité totale, la substance parent extractible et les produits de dégradation ainsi que la radioactivité associée aux matières solides extraites sont analysés dans les échantillons issus des deux types de traitement. Les quantités de substance parent et de produits de dégradation sont déterminées par séparation chromatographique, et, s'il y a lieu, par des méthodes de détection radioanalytiques. Les solides résiduels à l'issue du processus d'extraction sont brûlés afin d'estimer l'incorporation dans la biomasse par différence ou ils peuvent être à nouveau fractionnés pour déterminer l'absorption dans divers composants de la biomasse. La somme totale de toutes les fractions de chaque échantillon prélevé permet de calculer le bilan massique complet du système expérimental.

### **APPLICABILITE DE L'ESSAI**

8. La méthode s'applique facilement aux substances hydrosolubles ou médiocrement hydrosolubles qui ne sont pas volatiles. Elle peut être adaptée aux substances volatiles. Habituellement, le radiomarquage des composés au  $^{14}\text{C}$  ou au  $^3\text{H}$  est nécessaire pour évaluer la minéralisation. On peut utiliser aussi bien le composé radiomarqué que le composé non radiomarqué pour analyser la biodégradation primaire.

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

#### **Appareils de l'essai**

9. Le volume d'eau usée dans les traitements expérimentaux est déterminé en fonction du nombre et du volume des échantillons nécessaires à l'évaluation. On introduit habituellement 1 ou 2 litres d'eau usée dans des flacons de 2 ou 4 litres. Dans l'idéal, l'eau usée est incubée avec une concentration d'oxygène dissous contrôlée (généralement, 0.2-1.0 mg/l). La régulation est obtenue grâce à une sonde à oxygène immergée dans l'eau usée et reliée à un dispositif régulant l'oxygène connecté à une vanne de commande, qui suit et contrôle l'aération de l'eau usée (voir Annexe 1). Cette aération équilibre le barbotage continu d'azote et permet d'obtenir la concentration d'oxygène dissous souhaitée. L'eau usée peut également être incubée sous agitation, mais avec une aération minimale et addition périodique d'azote ou d'air pour maintenir de faibles concentrations d'oxygène dissous. Il est nécessaire dans ce cas de noter les mesures de concentration d'oxygène dissous à intervalles réguliers.

10. Un système expérimental ouvert est directement en contact avec l'atmosphère mais dans des conditions d'incubation qui maintiennent la concentration désirée d'oxygène dissous. Les systèmes à écoulement continu sont hermétiquement fermés par un dispositif approprié muni d'un orifice d'échantillonnage équipé d'une vanne pour prélever des échantillons d'eau usée, et de connexions reliant les lignes de gaz entrant et sortant. Il peut s'agir d'un bouchon de caoutchouc, mais l'étude d'une substance d'essai hydrophobe volatile peut imposer un autre type de fermeture. Lors d'essais sur composés volatils, il est recommandé d'utiliser des lignes de gaz et des tubes d'échantillonnage constitués de matériaux inertes (par exemple polytétrafluoroéthylène (PTFE), acier inoxydable, verre).

11. L'espace libre dans le récipient expérimental est en permanence purgé par un gaz dont le débit permet de maintenir l'eau usée à la concentration d'oxygène dissous désirée, mais est suffisamment bas pour un piégeage efficace du CO<sub>2</sub>. Le récipient expérimental est connecté à une série de pièges contenant de l'hydroxyde de potassium (par exemple 1.5 N) ou une autre substance absorbant le CO<sub>2</sub> appropriée. Habituellement, la chaîne de pièges comprend un piège vide qui prévient l'écoulement à rebours ou la condensation.

### Matériel

12. Le matériel de laboratoire standard suivant est utilisé :

- verrerie et pipettes diverses ;
- agitateurs magnétiques ou mélangeur pour le mélange continu des flacons expérimentaux ;
- centrifugeuse ;
- pH-mètre ;
- CO<sub>2</sub> solide (glace sèche)/acétone ou bain d'azote liquide ;
- cryodessicateur (lyophilisateur) ;
- four ou four à micro-ondes pour les déterminations de poids secs ;
- appareil de filtration sur membrane ;
- autoclave ;
- équipement de manipulation des substances radiomarquées ;
- appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H dans les échantillons liquides et dans les échantillons solides (par exemple compteur à scintillation liquide) ;
- appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H dans les échantillons solides (par exemple appareil pour oxyder les échantillons) ;
- dispositif de piégeage du <sup>14</sup>C et du <sup>3</sup>H volatilisés dans le système de piégeage des gaz (piège à charbon actif en ligne ou dispositif équivalent) ;
- équipement de chromatographie sur couche mince (CCM) ou de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ;
- appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H en CCM (analyseur à balayage) ou en CLHP (détecteur en ligne) ;
- équipement analytique pour déterminer la substance d'essai (et la substance de référence) lorsqu'on utilise une analyse chimique spécifique (par exemple chromatographe gazeux, chromatographe liquide à haute performance, spectromètre de masse).

13. Le matériel de laboratoire suivant n'est pas indispensable, mais il est utile :

- oxygénomètre
- appareil de régulation de l'oxygène muni d'une sonde et d'une vanne de commande
- flacon de digestion pour la demande chimique en oxygène
- ensemble de réactifs pour l'azote ammoniacal
- spectrophotomètre

### **Sélection de l'eau usée**

14. La source d'eau usée doit répondre à l'objectif de l'essai de simulation. Si l'évaluation est spécifique d'un site, il faut obtenir l'eau usée dans le réseau d'égout spécifique concerné. Une évaluation générique emploiera des échantillons d'eau usée essentiellement dérivés de sources domestiques. Selon le mode opératoire du European Technical Guidance Document, toutefois difficile à reproduire en pratique, les valeurs par défaut de concentration de matières solides en suspension et de demande biologique en oxygène (DBO) atteignent respectivement 450 mg/l et 270 mg/l dans l'eau usée (22). En Amérique du Nord, les eaux usées contiennent habituellement de 100 à 350 mg/l de solides en suspension et sont caractérisées par une demande biologique en oxygène de 100 à 400 mg/l de selon leur force (23).

### **Collecte, transport et stockage de l'eau usée**

15. L'eau usée doit être collectée au niveau d'un point d'accès à l'égout ou à l'entrée d'une station d'épuration des eaux usées. Il faut noter la température de l'échantillon au moment de la collecte. Les récipients de collecte doivent permettre une ventilation adéquate, et il faut s'assurer que la température de l'eau usée ne dépasse jamais significativement la température utilisée dans l'essai. L'eau usée est habituellement stockée à la température de l'essai sous agitation lente continue. Les échantillons ne doivent pas être congelés.

### **Préparation des traitements expérimentaux**

16. L'eau usée récemment collectée doit être pratiquement exempt de grosses particules. La quantité totale de solides en suspension, la demande chimique en oxygène (DCO), le pH et la quantité de  $\text{NH}_3$  (facultatif) doivent être déterminés dans l'eau usée.

17. Le milieu de traitement abiotique est habituellement préparé à l'aide d'une combinaison de stérilisations chimique et thermique. Une méthode reconnue consiste à ajouter du chlorure mercurique (1 g/l) à l'eau usée, qui est ensuite autoclavée pendant au moins 90 minutes à une température d'environ 121 °C et à une pression d'environ 15 psi. Le volume de milieu est généralement inférieur ou égal à la moitié du volume du récipient qui est autoclavé (par exemple 500 ml d'eau usée dans un récipient de 1 l). Après refroidissement, le pH du milieu abiotique est mesuré et ajusté à la même valeur que celui du milieu biologiquement actif. D'autres méthodes de désactivation du milieu de traitement peuvent également être envisagées pour réduire la production de déchets particuliers.

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

18. De préférence, il faut utiliser de l'eau distillée pour préparer les solutions mères des substances d'essai et de référence. S'il y a lieu, on peut employer une méthode différente pour solubiliser ou disperser le produit chimique d'essai de façon à simuler son entrée normale dans le compartiment environnemental concerné. Il est possible d'utiliser des solvants miscibles à l'eau et non toxiques s'il s'agit là du seul moyen de mener l'essai, mais il conviendra alors de tenir compte de la charge organique introduite par l'addition de solvants organiques. L'échantillon peut également être ajouté sous forme pure (c'est-à-dire sans eau) au système expérimental selon un mode d'application qui optimise sa distribution uniforme et rapide dans la boue. L'adsorption de la substance d'essai sur un support solide inerte, qui est ensuite introduit dans le système expérimental, peut convenir à des composés de médiocre solubilité et généralement associés dans l'eau usée à des matières solides en suspension. S'il est impossible de distribuer uniformément la substance d'essai dans le système expérimental avant le premier prélèvement, on peut préparer des systèmes individuels destinés à un échantillonnage destructif à chaque point de prélèvement.

19. Le volume de solution mère ajouté doit permettre d'assurer une distribution rapide et uniforme de la substance d'essai dans le milieu de traitement et l'application d'une dose précise dans les expériences identiques. Dans l'idéal, lorsqu'on introduit des solutions aqueuses, le volume ajouté doit être supérieur ou égal à 2 ml et inférieur à 10 ml ; et s'il s'agit de solvants non toxiques, le volume est inférieur à 0.1 ml/l. Si besoin est, les solutions appliquées peuvent être préparées à l'avance et réfrigérées. L'activité de la solution mère doit être vérifiée par comptage à scintillation liquide.

### **Conditions expérimentales**

#### **Température expérimentale**

20. L'incubation se déroule de préférence à l'obscurité ou sous une lumière diffuse à une température contrôlée, qui peut être la température in situ ou une température de laboratoire standard de 20-25 °C. Selon le site, la température moyenne annuelle de l'eau usée est comprise entre 10 et 20.1 °C, et la valeur de 15.6 °C est représentative (23).

#### **Agitation**

21. Pour maintenir les solides en suspension, les récipients expérimentaux sont soumis à une agitation minimale au moyen d'un mélange ou d'une agitation continu.

### **Durée de l'essai**

22. La durée de l'essai doit permettre d'évaluer l'ampleur et la vitesse de biodégradation du produit chimique d'essai pendant son temps de séjour normal dans le réseau d'égout. Elle peut être prolongée pour obtenir des données supplémentaires permettant de calculer des constantes cinétiques ou de déterminer si la dégradation est intégrale dans les conditions de l'essai. Inversement, elle peut être interrompue avant le temps imparti si la dégradation a atteint un plateau.

### **Nombre de récipients expérimentaux**

23. Il doit y avoir au minimum un récipient expérimental en conditions abiotiques et un récipient expérimental en conditions biotiques pour chaque concentration de substance d'essai. Chaque traitement peut être représenté par des expériences identiques pour la mesure de variance (par exemple 3 expériences identiques). Toutefois, l'amélioration de la qualité des données cinétiques obtenues dépend davantage de l'augmentation du nombre d'échantillons prélevé au cours d'un même traitement que de l'augmentation du nombre d'expériences identiques.

## **MODE OPERATOIRE**

### **Application de la substance**

24. Au début de l'essai, le dispositif de fermeture du récipient expérimental est retiré et la substance d'essai est quantitativement ajoutée directement dans le milieu de traitement avec agitation constante. Il est recommandé d'administrer la dose progressivement en dessous de l'interface air-eau afin d'assurer une distribution uniforme de la substance d'essai dans l'eau usée. L'application est identique dans les traitements biotiques et abiotiques. Généralement, les systèmes biotiques reçoivent la substance en premier, et ensuite les systèmes abiotiques. Un respect scrupuleux de la chronologie est généralement plus critique pour les traitements biotiques que pour les traitements abiotiques à des fins d'analyses cinétiques.

### **Calendrier de l'échantillonnage**

25. Les intervalles entre les prélèvements d'échantillons sont définis en s'appuyant sur les données de biodégradation disponibles ou les résultats d'une étude pilote, car il n'y a pas de calendrier d'échantillonnage établi universellement applicable. Un programme d'échantillonnage recommandé pour un produit chimique rapidement dégradé pourrait inclure des points à 15, 30 et 60 minutes, et des prélèvements supplémentaires à 2, 5, 8, 12 et 24 heures et aux jours 2, 3 et 4. Le nombre de points de prélèvements doit être d'au moins six (y compris le temps zéro), en s'aidant de l'étude préliminaire facultative pour établir un programme d'échantillonnage approprié. Pour un produit chimique à dégradation lente, le calendrier doit être ajusté de façon à obtenir un nombre de mesures suffisant pendant la phase de dégradation.

### Mesure de la minéralisation

26. La minéralisation peut être mesurée par des méthodes directes ou indirectes.

### Mesure indirecte du $^{14}\text{CO}_2$

27. Des échantillons issus d'expériences identiques individuelles (par exemple 1 ml) sont recueillis dans chaque milieu de traitement et introduits dans des flacons séparés contenant une quantité suffisante d'acide (par exemple 1 ml de HCl 0,1 N) pour abaisser le pH de l'échantillon à une valeur inférieure à 2 et ils sont placés dans une hotte.

28. Les échantillons sont soumis à un barbotage d'air pendant plusieurs heures, ou bien laissés au repos une nuit pour permettre le dégagement du  $^{14}\text{CO}_2$  dissous dans les échantillons. Ils sont combinés avec un cocktail de scintillation approprié à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide. Le pourcentage de  $^{14}\text{CO}_2$  est calculé par la différence entre le nombre total de coups dans les échantillons biotiques et le nombre total dans les échantillons abiotiques.

### Mesure directe du $^{14}\text{CO}_2$

29.  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé : le premier piège basique de la série est retiré et hermétiquement fermé pour empêcher l'introduction de  $\text{CO}_2$  atmosphérique. Les autres pièges sont déplacés vers l'avant dans le même ordre, un piège neuf est posé derrière les pièges déjà en place et le système de piégeage est reconnecté aussi rapidement que possible. Des fractions d'échantillons identiques (par exemple 1 ml) sont prélevées dans le piège basique et transférées dans des flacons à scintillation, puis combinées avec un cocktail de scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide.

30.  $^{14}\text{CO}_2$  dissous : des échantillons (par exemple de 10 à 25 ml) sont prélevés par l'orifice d'échantillonnage du flacon expérimental. Ils sont ensuite placés dans des récipients (par exemple Bellco Glass Biometer 2556-10250) contenant un compartiment rempli d'une substance absorbant le  $\text{CO}_2$  appropriée (par exemple KOH 1.5 N). Les récipients sont hermétiquement fermés et on ajoute suffisamment d'acide (par exemple HCl 6 N) pour abaisser le pH des échantillons en dessous de 2 sans ouvrir les récipients à l'atmosphère (voir Annexe 1). On laisse reposer les échantillons pendant une durée suffisante (par exemple une nuit) pour permettre le dégagement du  $\text{CO}_2$  contenu dans la solution et son piégeage dans l'espace libre par le sorbant. Des échantillons de sorbant sont combinés avec un cocktail à scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et ils sont analysés par comptage à scintillation liquide.

### Mesure indirecte de $^3\text{H}_2\text{O}$

31. Des échantillons issus d'expériences individuelles (par exemple 1 ml) sont recueillis dans chaque milieu de traitement et introduits dans des flacons séparés qui contiennent une quantité suffisante d'acide

(par exemple 1 ml de HCl 0,1 N) pour abaisser le pH de l'échantillon à une valeur inférieure à 2 et ils sont placés dans une hotte.

32. La moitié des échantillons est immédiatement analysée directement par comptage à scintillation liquide pour obtenir une « mesure en conditions humides ». On laisse les autres échantillons sécher complètement pour éliminer le  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Les échantillons sont combinés avec un cocktail à scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide. Le pourcentage de  $^3\text{H}_2\text{O}$  est calculé d'après la différence entre le nombre total de coups dans les échantillons humides et le nombre de coups dans les échantillons secs et la quantité initiale de radioactivité introduite dans les échantillons.

### **Mesure de la radioactivité totale dans l'eau usée**

33. Des échantillons de petit volume (par exemple 1 ml) issus d'expériences individuelles sont directement analysés par comptage à scintillation liquide pour quantifier la radioactivité résiduelle dans chaque milieu de traitement au cours du temps. Ces mesures sont utilisées pour confirmer que la récupération de radioactivité à partir des échantillons extraits est acceptable et pour contrôler la volatilisation. La quantité totale de solides dans ces échantillons ne doit pas dépasser 30 mg de poids sec car le comptage perdrait alors de son efficacité.

### **Mesure de la substance parent et des produits de dégradation**

#### **Extraction**

34. On prélève un échantillon dans le milieu de traitement abiotique et un dans le milieu biotique. Le volume de ces échantillons est généralement inférieur ou égal à 10 ml. Toutefois, il dépend de la concentration expérimentale, de l'activité spécifique et de la sensibilité des méthodes analytiques.

35. Plusieurs approches peuvent être envisagées pour concentrer et extraire les échantillons. Par exemple, une méthode reconnue adaptée à l'analyse des produits chimiques d'essai non volatils implique la congélation éclair des échantillons, puis la lyophilisation et l'extraction du résidu séché dans un ou plusieurs solvants appropriés au composé parent et aux produits de dégradation. La congélation éclair arrête soudainement l'activité biologique sans hydrolyse ni autre altération des substances d'essai labiles. Il s'agit d'un processus rapide lorsque la profondeur du bain de glace sèche/acétone ou d'azote liquide permet de submerger le tube d'échantillon. Le niveau du bain doit être situé au-dessus du niveau de l'échantillon dans le tube. Les solides lyophilisés sont extraits. Les solides extraits peuvent être récupérés par centrifugation ou filtration. Si les solides sont récupérés par filtration, le filtre doit être compatible avec le type de solvant (par exemple aqueux ou non aqueux). Les extraits obtenus peuvent être concentrés par évaporation préalablement à l'analyse et à la détermination de la radioactivité totale par comptage à scintillation liquide.

36. Lorsque les substances d'essai sont volatiles, les échantillons peuvent être successivement soumis à une filtration et à une extraction en phase solide sur colonne ou sur disque, avec une élution consécutive par des solvants appropriés pour récupérer la substance parent et les produits de dégradation. Il est également possible de centrifuger les échantillons et d'extraire du liquide la substance parent et les produits de dégradation par extraction en phase solide ou extraction liquide/liquide. Les matières solides peuvent ensuite être extraites directement ou mélangées avec un agent de séchage (sulfate de sodium) et séchées avant extraction dans un système de solvant approprié. Il est également possible d'extraire les solides et de sécher l'extrait en faisant passer le solvant sur une colonne contenant un agent de séchage. Dans certains cas, la totalité de l'échantillon aqueux peut être directement extraite par un système de solvant approprié, puis filtrée pour récupérer les solides de la biomasse. La radioactivité totale dans tous les extraits est



déterminée par comptage à scintillation liquide. La concentration des extraits contenant des substances d'essai ou des produits de dégradation volatils demande certaines précautions.

37. Il est possible d'utiliser encore d'autres approches, mais quelle que soit la méthode choisie, il est important décrire en détail les récupérations et de tenir compte de la durée nécessaire à l'arrêt de l'activité biologique et de l'intégrer dans les durées expérimentales utilisées pour les analyses cinétiques.

#### **Analyse de la substance parent et des produits de dégradation**

38. L'abondance relative de la substance parent et des produits de dégradation dans les extraits peut être déterminée par le biais de la chromatographie sur couche mince (CCM), de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ou d'autres techniques de séparation associées à une détection de la radioactivité.

39. Lorsqu'il existe des méthodes analytiques spécifiques sensibles, la biodégradation primaire peut être évaluée en substituant une mesure de la concentration résiduelle totale des substances d'essai et des produits de dégradation aux techniques radio-isotopiques. Généralement, dans les études de produits non marqués, seule la disparition de la substance parent depuis la phase aqueuse peut être suivie.

#### **Caractérisation des produits de dégradation**

40. Dans la mesure du possible, il faut comparer le comportement chromatographique des pics inconnus à celui des produits de dégradation prédits, dès lors qu'il existe des étalons authentiques. Habituellement, la quantité et la pureté des produits de dégradation issus de cet essai ne permettent pas une identification concluante par d'autres moyens directs. En fonction du comportement chromatographique, il est généralement possible de déterminer si un métabolite est plus polaire ou moins polaire que son parent. Cette information, associée la mise en œuvre de réactions biochimiques connues et à la chronologie d'apparition et de disparition d'un métabolite dans la séquence de biodégradation peut donner des indices supplémentaires pour l'identifier. Si nécessaire, le  $P_{oe}$  des produits de dégradation principaux peut être estimé par CLHP (par exemple [Ligne directrice 117 de l'OCDE 117] (24)) en utilisant un détecteur de radioactivité en ligne.

#### **Mesure des solides extraits et incorporation dans la biomasse**

41. Les solides extraits sont brûlés afin de déterminer le niveau d'activité résiduelle dans les solides. Une quantité de radioactivité dans les solides biotiques plus élevée que celle mesurée dans les solides du témoin abiotique indique habituellement une incorporation de la radioactivité dans la biomasse. La distribution de cette radioactivité entre les différents composants de la biomasse (à savoir acide nucléique, protéines, paroi cellulaire, etc.) peut être estimée grâce à la méthode de Sutherland et Wilkinson modifiée (7, 25).

#### **Mesure de la radioactivité volatilisée**

42. Dans le cas de substances d'essai volatiles, les pièges à matières volatiles sont extraits dans des solvants appropriés et la radioactivité dans l'extrait est analysée par comptage à scintillation liquide. L'abondance relative de la substance parente et des produits de dégradation dans le ou les extraits peut être déterminée comme dans les paragraphes précédents.

**314 B BIODEGRADATION DANS UNE BOUE ACTIVEE****INTRODUCTION**

1. Cet essai a pour objectif d'évaluer le degré auquel un produit chimique peut être dégradé dans une boue activée et de mesurer les vitesses de biodégradations primaire et finale dans les conditions de l'essai. Il est fondé sur un protocole publié à l'origine par Federle & Itrich (7). La boue activée, sous ses diverses formes, est le procédé de traitement secondaire des eaux usées le plus couramment employé. Les vitesses mesurées seront d'autant plus utiles pour prédire avec précision l'élimination durant un traitement réel en utilisant des modèles de traitement des eaux usées (par exemple SimpleTreat) que la simulation sera fidèle aux conditions réelles qui règnent dans une station d'épuration des eaux usées employant une boue activée.

2. La concentration de la substance d'essai est déterminée dans cette Ligne directrice par quatre facteurs : 1) le type de rejet, continu ou épisodique, de la substance, 2) sa présence réelle dans l'environnement, 3) sa présence prévue dans l'environnement lorsqu'il s'agit d'un nouveau produit chimique et 4) la sensibilité de la méthode analytique.

3. Les cinétiques les plus précises relatives à un produit chimique présent dans l'environnement en permanence sont déterminées par addition du composé radiomarqué en une quantité faisant fonction de traceur à des échantillons récemment prélevés dans l'environnement. Dans ces circonstances, le rapport normal du produit chimique aux agents de dégradation n'est pas perturbé et les vitesses mesurées correspondent aux valeurs observées *in situ*.

4. Lorsque le rejet continu d'un nouveau produit chimique est prévu à une date future, les vitesses les plus précises sont obtenues à l'équilibre stationnaire entre le produit chimique et les populations d'agents de dégradation. Cette état peut être instauré par addition du produit chimique d'essai en une quantité faisant office de traceur à une boue activée, qui a été exposée au produit chimique dans les conditions de charge et de fonctionnement prévues dans un système continu sur boue activée au laboratoire (par exemple, Ligne directrice 303 A de l'OCDE).

5. Lorsqu'un produit chimique existant ou nouveau pénètre dans l'environnement par intermittence, il n'existe pas de rapport normal de la biomasse au produit chimique d'essai à l'état stationnaire et il ne peut donc être perturbé, et par conséquent le produit chimique d'essai est introduit dans des échantillons récemment prélevés en une quantité prévisible lors d'un événement de rejet dans des eaux usées. Cette concentration doit correspondre à la masse totale rejetée et au volume d'eau usée dans lequel le rejet est dilué. Des approches permettant d'estimer de la concentration dans l'eau usée sont présentées dans Holman (21) et dans le European Technical Guidance Document (22).

6. La sensibilité analytique prévaut sur les considérations précédentes. Lorsqu'il n'est pas possible d'utiliser des quantités idéales (par exemple comme traceur) du produit chimique d'essai pour des raisons analytiques, on emploie la concentration la plus basse possible. Lorsque les concentrations de la substance d'essai sont élevées, la biodégradation peut être marquée par des périodes de latence liées à des processus de second ordre (par exemple une croissance) qui compliquent l'analyse cinétique. Si cette règle n'est pas respectée dans la simulation, les vitesses de biodégradation observées risquent de n'être pas strictement représentatives, et cette éventualité doit être prise en compte dans l'interprétation des résultats. Ce facteur est de toute première importance dans le cas de produits chimiques rejetés en continu, qui atteignent souvent un état stationnaire dans les réseaux d'eaux usées.

**MODE OPERATOIRE GENERAL DE L'ESSAI**

7. Le produit chimique de l'essai est incubé avec des boues activées abiotiques et biotiques pendant une certaine durée. L'activité biologique est inhibée dans le témoin abiotique, qui est utilisé pour estimer la minéralisation par différence, en déterminant l'efficacité d'extraction et la récupération de la molécule parent et en quantifiant d'autres processus de perte, comme l'hydrolyse, l'oxydation, la volatilisation ou la sorption sur l'appareil utilisé dans l'expérimentation.

8. Lorsqu'une méthode analytique dotée de la sensibilité requise est connue, il est possible de déterminer la vitesse de dégradation ou de transformation de la molécule parent en utilisant une substance d'essai non radiomarquée ou en suivant la disparition d'un produit chimique initialement présent dans l'eau usée. Toutefois, lorsque la voie de biodégradation n'est pas parfaitement élucidée et en l'absence de méthodes analytiques dotées de la sensibilité requise pour analyser les éventuels produits de dégradation, il est impossible de déterminer la biodégradation finale.

9. La substance d'essai est introduite à une concentration pertinente au plan environnemental dans les systèmes expérimentaux abiotiques et biotiques, qui sont incubés sous agitation continue si besoin est. Des échantillons sont périodiquement prélevés afin de déterminer la minéralisation et la biodégradation primaire.

10. Les essais peuvent se dérouler dans un système discontinu ouvert ou à un système discontinu clos à écoulement continu, muni de pièges de capture du  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé. Le système clos à écoulement continu est obligatoire pour les substances d'essai volatiles et préférentiellement utilisé pour les produits chimiques d'essai marqués au  $^{14}\text{C}$ . Les systèmes ouverts conviennent aux produits chimiques d'essai non volatils marqués au  $^3\text{H}$  et permettent de préciser la cinétique de biodégradation des substances d'essai non volatiles marquées au  $^{14}\text{C}$ , dont l'aptitude à la minéralisation a été préalablement établie. Dans le système ouvert, la minéralisation en  $^{14}\text{CO}_2$  peut être déterminée indirectement par mesure de la différence de radioactivité résiduelle entre des échantillons prélevés dans les traitements biotiques et abiotiques après acidification. De manière analogue, la minéralisation en  $^3\text{H}_2\text{O}$  peut être déterminée indirectement par mesure de la différence de radioactivité d'un échantillon avant et après séchage. Dans les systèmes à écoulement continu, on mesure directement le  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé dans les pièges basiques. De surcroît, la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  dissous est également déterminée après acidification des échantillons dans un récipient hermétiquement fermé et mesure de la radioactivité dans un piège basique contenu dans le récipient.

11. La radioactivité totale, la substance parent extractible et les produits de dégradation ainsi que la radioactivité associée aux matières solides extraites sont analysés dans les échantillons issus des deux types de traitement. Les quantités de substance parent et de produits de dégradation sont déterminées en utilisant une séparation chromatographique, et s'il y a lieu, des méthodes de détection radioanalytiques. Les solides résiduels à l'issue du processus d'extraction sont brûlés afin d'estimer l'incorporation dans la biomasse par différence ou peuvent être à nouveau fractionnés par une méthode de Sutherland et Wilkinson modifiée (7, 25), afin de déterminer l'absorption dans divers composants de la biomasse. La somme totale de toutes les fractions de chaque prélèvement permet de calculer le bilan massique complet du système expérimental.

**APPLICABILITE DE L'ESSAI**

12. La méthode s'applique facilement aux substances hydrosolubles ou médiocrement hydrosolubles qui ne sont pas volatiles. Elle peut être adaptée aux substances volatiles. Habituellement, le radiomarquage des composés au  $^{14}\text{C}$  ou au  $^3\text{H}$  est nécessaire pour évaluer la minéralisation. On peut utiliser aussi bien le composé radiomarqué que le composé non radiomarqué pour analyser la biodégradation primaire.

**DESCRIPTION DE LA METHODE EXPERIMENTALE****Appareils de l'essai**

13. Le volume de boue activée dans les traitements expérimentaux est déterminé en fonction du nombre et du volume des échantillons nécessaires à l'évaluation. On introduit habituellement 1 ou 2 litres de boue dans des flacons de 2 ou 4 litres. Dans les essais discontinus ouverts, les récipients sont généralement fermés par un bouchon en mousse ou en coton pour minimiser la perte d'eau par évaporation. Les systèmes à écoulement continu sont hermétiquement fermés par un système approprié muni d'un orifice de prélèvement des échantillons équipé d'une vanne d'échantillonnage pour prélever des échantillons de solides en suspension dans le liquide mixte et de connexions reliant les lignes de gaz entrant et sortant (voir Annexe 1). Il peut s'agir d'un bouchon de caoutchouc, mais le verre est recommandé pour l'étude d'une substance d'essai hydrophobe volatile. Lors d'essais sur composés volatils, il est conseillé d'utiliser des lignes de gaz et des tubes d'échantillonnage constitués de matériaux inertes (par exemple polytétrafluoroéthylène (PTFE), acier inoxydable, verre).

14. L'espace libre dans le récipient expérimental est en permanence purgé par un gaz dépourvu de CO<sub>2</sub> dont le débit permet de maintenir la boue activée en conditions aérobies, mais est suffisamment bas pour un piégeage efficace du CO<sub>2</sub>. Le récipient expérimental est connecté à une série de pièges contenant de l'hydroxyde de potassium (par exemple 1.5 N) ou une autre substance absorbant le CO<sub>2</sub> appropriée. Habituellement, la chaîne de pièges comprend un piège vide qui prévient l'écoulement à rebours ou la condensation.

**Matériel**

15. Le matériel de laboratoire standard suivant est utilisé :
- verrerie et pipettes diverses ;
  - agitateurs magnétiques ou mélangeur pour le mélange continu des flacons expérimentaux ;
  - centrifugeuse ;
  - pH-mètre ;
  - CO<sub>2</sub> solide (glace sèche)/acétone ou bain d'azote liquide ;
  - cryodessicateur (lyophilisateur) ;
  - four ou four à micro-ondes pour les déterminations de poids secs ;
  - appareil de filtration sur membrane ;
  - autoclave ;
  - équipement de manipulation des substances radiomarquées ;
  - appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H dans les échantillons liquides et dans les échantillons solides (par exemple compteur à scintillation liquide) ;
  - appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H dans le système de piégeage des gaz (piège à charbon actif en ligne ou dispositif équivalent) ;
  - équipement de chromatographie sur couche mince (CCM) ou de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ;
  - appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H en CCM (analyseur à balayage) ou en CLHP (détecteur en ligne) ;
  - équipement analytique pour déterminer la substance d'essai (et la substance de référence) lorsqu'on utilise une analyse chimique spécifique (par exemple chromatographe gazeux, chromatographe liquide à haute performance, spectromètre de masse).

**Sélection de la source de boue activée**

16. La source de boue activée doit répondre à l'objectif de l'essai de simulation. Si l'évaluation est spécifique d'un site, il faut obtenir la boue dans la station d'épuration des eaux usées spécifique concernée. Une évaluation générique emploiera une boue activée prélevée dans une station d'épuration type recevant essentiellement des eaux usées domestiques. Si le produit chimique est déjà un composant de l'eau usée qui entre dans la station d'épuration ou est rejeté par intermittence dans les eaux usées, une boue activée récemment recueillie constitue un milieu idéal pour l'essai.

17. Pour l'analyse d'un nouveau produit chimique destiné à être rejeté en continu dans les eaux usées, la boue activée provient de préférence d'un système de traitement de laboratoire [Ligne directrice 303A de l'OCDE] (2), alimenté par une eau usée additionnée de substance d'essai non marquée. La source de la boue initiale, l'eau usée (flux entrant) et les conditions opératoires (concentration de l'eau usée, temps de rétention hydraulique, temps de rétention des solides) de l'unité de laboratoire doivent représenter fidèlement les conditions spécifiques du site ou les conditions génériques. Dans ce dernier cas, la Ligne directrice 303 A de l'OCDE spécifie un temps de rétention hydraulique moyen de 6 heures et un temps de rétention moyen des boues de 6 à 10 jours. Le European Technical Guidance Document contient des directives sur l'estimation de la concentration d'eaux usées en fonction des volumes d'usage prévus (22). En général, la durée nécessaire pour atteindre l'état stationnaire vaut 2 à 3 fois le temps de rétention de la boue après lequel la boue peut être utilisée pour l'essai.

#### **Collecte, transport et stockage de la boue activée**

18. La boue activée doit être collectée dans une zone bien mélangée du bassin d'aération. Il convient de noter la température de l'échantillon au moment de la collecte. Les récipients de collecte doivent permettre une ventilation adéquate, et il faut s'assurer que la température de la boue ne dépasse jamais significativement la température utilisée dans l'essai. La boue activée est habituellement stockée à la température de l'essai sous agitation lente continue. Les échantillons ne doivent pas être congelés.

#### **Préparation des traitements expérimentaux**

##### **Boue activée**

19. La boue activée doit être filtrée sur un tamis de 2 mm avant utilisation. La concentration totale des solides en suspension doit être mesurée et, s'il y a lieu, ajustée à la concentration cible. Le European Technical Guidance Document utilise une proportion par défaut de 4000 mg/l dans son scénario générique (22). Toutefois, une concentration de 2500 – 3000 mg/l est plus habituelle en Amérique du Nord (23). Si la concentration des solides est trop élevée, on peut diluer la boue avec un liquide ou de l'eau du robinet. Si elle est trop basse, on peut laisser les solides sédimenter et décanter une partie du liquide. Il convient alors de déterminer la concentration totale des solides en suspension finale et le pH.

20. La boue abiotique est habituellement préparée à l'aide d'une combinaison de stérilisations chimique et thermique. Une méthode reconnue consiste à ajouter du chlorure mercurique (1 g/l) à la boue activée, qui est ensuite autoclavée pendant au moins 90 minutes à une température d'environ 121 °C et à une pression d'environ 15 psi. Le volume de milieu est généralement inférieur ou égal à la moitié du volume du récipient autoclavé (par exemple 500 ml de boue activée dans un récipient de 1 l). Après refroidissement, le pH de la boue abiotique est mesuré et ajusté à la même valeur que celui de la boue biologiquement active. D'autres méthodes de désactivation de la boue peuvent également être envisagées pour réduire la production de déchets particuliers.

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

21. De préférence, il faut utiliser de l'eau distillée pour préparer les solutions mères des substances d'essai et de référence. S'il y a lieu, on peut employer une méthode différente pour solubiliser ou disperser le produit chimique d'essai afin de simuler son entrée normale dans le compartiment environnemental concerné. Il est possible d'utiliser des solvants miscibles à l'eau et non toxiques s'il s'agit là du seul moyen de mener l'essai, mais il conviendra alors de tenir compte de la charge organique associée introduite par l'addition de solvants organiques. L'échantillon peut également être ajouté sous forme pure au système expérimental selon un mode d'application qui optimise sa distribution uniforme et rapide dans la boue. L'adsorption de la substance d'essai sur un support solide inerte, qui est ensuite introduit dans le système expérimental, peut convenir à des composés de médiocre solubilité et généralement associés dans l'eau usée à des solides en suspension. S'il est impossible de distribuer uniformément la substance d'essai dans le système expérimental préalablement au premier prélèvement, on peut préparer des systèmes expérimentaux individuels destinés à un échantillonnage destructif à chaque point de prélèvement.

22. Le volume de solution mère ajouté doit permettre d'assurer une distribution rapide et uniforme de la substance d'essai dans le milieu de traitement et l'application d'une dose précise dans des milieux similaires. Dans l'idéal, lorsqu'on introduit des solutions aqueuses, le volume ajouté doit être supérieur ou égal à 2 ml et inférieur à 10 ml ; et s'il s'agit de solvants non toxiques, le volume est inférieur à 0.1 ml/N. Si besoin est, les solutions appliquées peuvent être préparées à l'avance et réfrigérées. L'activité de la solution mère doit être vérifiée par comptage à scintillation liquide.

### **Conditions expérimentales**

#### **Température expérimentale**

23. De préférence, l'incubation se déroule à l'obscurité, ou bien sous une lumière diffuse à une température contrôlée, qui peut être la température in situ ou une température de laboratoire standard de 20-25 °C.

#### **Agitation**

24. Pour que la boue reste bien mélangée et en suspension, les récipients expérimentaux sont soumis à une agitation minimale au moyen d'un mélange ou d'une agitation continue. L'agitation facilite également le transfert d'oxygène entre l'espace libre et le liquide et maintient ainsi des conditions aérobies adéquates.

### **Durée de l'essai**

25. La durée de l'essai doit permettre d'évaluer l'ampleur et la vitesse de biodégradation du produit chimique d'essai pendant son temps de séjour normal dans une station activée. La période de l'essai s'étend habituellement sur 28 jours. Elle peut être prolongée pour obtenir des points de données supplémentaires permettant le calcul des constantes cinétiques ou de déterminer si la dégradation est intégrale dans les conditions de l'essai. Inversement, elle peut être interrompue avant que cette durée soit écoulée si la dégradation a atteint un plateau.

### **Nombre de récipients expérimentaux**

26. Il doit y avoir au minimum un récipient expérimental en conditions abiotiques et un récipient expérimental en conditions biotiques pour chaque concentration de substance d'essai. Chaque traitement peut être répété par des expériences identiques pour la mesure de variance (par exemple 3 expériences identiques). Toutefois, l'amélioration de la qualité des données cinétiques obtenues dépend davantage de l'augmentation du nombre d'échantillons prélevés au cours d'un même traitement que de l'augmentation du nombre d'expériences identiques.

## **MODE OPERATOIRE**

### **Application de la substance**

27. Au début de l'essai, le dispositif de fermeture du récipient expérimental est retiré et la substance d'essai est quantitativement ajoutée directement dans la boue activée avec agitation constante. Il est recommandé d'administrer la dose progressivement en dessous de l'interface air-eau afin d'assurer une distribution uniforme de la substance d'essai dans la boue. L'application est identique dans les milieux de traitements biotiques et abiotiques. Généralement, les systèmes biotiques reçoivent la substance en premier, et ensuite les systèmes abiotiques. Un respect scrupuleux de la chronologie est généralement plus critique pour les traitements biotiques que pour les traitements abiotiques à des fins d'analyses cinétiques.

### **Calendrier de l'échantillonnage**

28. Les intervalles entre les prélèvements sont définis en s'appuyant sur les données de biodégradation disponibles ou les résultats d'une étude préliminaire, car il n'existe pas de calendrier d'échantillonnage établi universellement applicable. Un programme recommandé pour un produit chimique rapidement dégradé pourrait inclure des points à 5, 15, 45, 30, 60 et 90 minutes, et des prélèvements supplémentaires à 2, 5, 8, 12 et 24 heures. D'autres échantillons peuvent être prélevés aux jours 2, 3, 4, 5, 6 et 7 et une fois par semaine jusqu'au 28<sup>ème</sup> jour. Pour un produit chimique à dégradation lente, le calendrier doit être adapté afin d'obtenir un nombre de mesures suffisant pendant la phase de dégradation.

### **Mesure de la minéralisation**

29. La minéralisation peut être mesurée par des méthodes directes ou indirectes.

#### **Mesure indirecte du $^{14}\text{CO}_2$**

30. Des échantillons issus d'expériences individuelles (par exemple 1 ml) sont prélevés dans chaque milieu de traitement et introduits dans des flacons séparés qui contiennent une quantité suffisante d'acide (par exemple 1 ml de HCl 0,1 N) pour abaisser le pH de l'échantillon à une valeur inférieure à 2 et ils sont placés dans une hotte. La quantité totale de solides dans les échantillons ne doit pas dépasser 30 mg de poids sec.

31. Les échantillons sont soumis à un barbotage d'air pendant plusieurs heures, ou bien laissés au repos une nuit pour permettre le dégagement du  $^{14}\text{CO}_2$  dissous dans les échantillons. Ils sont combinés avec un cocktail de scintillation approprié à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide. Le pourcentage de  $^{14}\text{CO}_2$  est calculé par la différence entre le nombre total de coups dans les échantillons biotiques et le nombre total dans les échantillons abiotiques.

#### **Mesure directe du $^{14}\text{CO}_2$**

32. Dans le cas des produits chimiques à dégradation rapide, il est parfois difficile de mesurer précisément le taux de  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé du fait de la vitesse du transfert de masse du  $^{14}\text{CO}_2$  de l'espace vide dans le piège basique. Il est alors recommandé de procéder simultanément à la mesure indirecte et à la mesure directe du  $^{14}\text{CO}_2$ .

33.  $\text{CO}_2$  dégagé : le premier piège basique de la série est retiré et rapidement bouché. Les autres pièges sont déplacés vers l'avant dans le même ordre, un piège neuf est posé derrière les pièges précédents et le système de piégeage est reconnecté aussi rapidement que possible. Des fractions d'échantillons

d'expériences individuelles (par exemple 1 ml) sont prélevées dans les pièges basiques et transférés dans des flacons à scintillation, puis combinés avec un cocktail de scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide.

34.  $^{14}\text{CO}_2$  dissous : des échantillons (par exemple 10 à 25 ml) sont prélevés par l'orifice d'échantillonnage du flacon expérimental. Ils sont ensuite placés dans des récipients (par exemple Bellco Glass Biometer 2556-10250) contenant un compartiment rempli d'une substance absorbant le  $\text{CO}_2$  appropriée (par exemple KOH 1.5 N). Les récipients sont hermétiquement fermés et on ajoute suffisamment d'acide (par exemple HCl 6 N) pour abaisser le pH des échantillons en dessous de 2 sans ouvrir les récipients à l'atmosphère (voir Annexe 1). On laisse reposer les échantillons pendant une durée suffisante (par exemple une nuit) pour permettre le dégagement du  $\text{CO}_2$  contenu dans la solution et son piégeage dans l'espace libre par le sorbant. Des échantillons de sorbant sont combinés avec un cocktail à scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et ils sont analysés par comptage à scintillation liquide.

### **Mesure indirecte de $^3\text{H}_2\text{O}$**

35. Des échantillons issus d'expériences individuelles (par exemple 1 ml) sont recueillis dans chaque milieu de traitement et introduits dans des flacons séparés qui contiennent une quantité suffisante d'acide (par exemple 1 ml de HCl 0,1 N) pour abaisser le pH de l'échantillon à une valeur inférieure à 2 et ils sont placés dans une hotte. En outre, la quantité totale de solides dans les échantillons ne doit pas dépasser 30 mg de poids sec.

36. La moitié des échantillons est immédiatement analysée directement par comptage à scintillation liquide pour obtenir une « mesure en conditions humides ». On laisse les autres échantillons sécher complètement pour éliminer le  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Les échantillons sont combinés avec un cocktail à scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide. Le pourcentage de  $^3\text{H}_2\text{O}$  est calculé d'après la différence entre le nombre total de coups dans les échantillons humides et le nombre de coups dans les échantillons secs et la quantité initiale de radioactivité introduite dans les échantillons.

### **Mesure de la radioactivité totale dans les solides en suspension dans le liquide mixte (SSLM)**

37. Des échantillons de petit volume de solides en suspension dans le liquide mixte (par exemple 1 ml) sont directement analysés par comptage à scintillation liquide pour quantifier la radioactivité présente dans chaque milieu de traitement au cours du temps. Ces mesures sont utilisées pour confirmer que la récupération de radioactivité à partir des échantillons extraits est acceptable et pour contrôler la volatilisation. La quantité totale de solide dans ces échantillons ne doit pas dépasser 30 mg de poids sec car le comptage perdrait alors de son efficacité.

### **Mesure de la substance parent et des produits de dégradation**

#### **Extraction**

38. On prélève un échantillon de SSLM dans le milieu de traitement abiotique et un dans le milieu biotique. Le volume de ces échantillons est généralement supérieur ou égal 10 ml, mais dépend toutefois de la concentration expérimentale, de l'activité spécifique et de la sensibilité des protocoles analytiques.

39. Diverses approches peuvent être envisagées pour concentrer et extraire les échantillons. Par exemple, une méthode reconnue adaptée à l'analyse des produits chimiques d'essai non volatils implique la congélation éclair des échantillons, puis la lyophilisation et l'extraction du résidu séché dans un ou plusieurs solvants appropriés au parent et aux produits de dégradation. La congélation éclair arrête



soudainement l'activité biologique sans hydrolyse ni autre altération des substances d'essai labiles. Il s'agit d'un processus rapide lorsque la profondeur du bain de glace sèche/acétone ou d'azote liquide permet de submerger le tube d'échantillon. Le niveau du bain doit être situé au-dessus du niveau de l'échantillon dans le tube. Les extraits obtenus peuvent être concentrés par évaporation, puis la radioactivité totale dans chaque extrait est déterminée par comptage à scintillation liquide.

40. Lorsque les substances d'essai sont volatiles, les SSLM peuvent être soumis successivement à une filtration et à une extraction en phase solide sur colonne ou sur disque, avec une élution consécutive par des solvants appropriés pour récupérer la substance parent et les produits de dégradation. Il est également possible de centrifuger les échantillons et d'extraire du liquide la substance parent et les produits de dégradation par extraction en phase solide ou liquide/liquide. Les matières solides peuvent ensuite être extraites directement ou mélangées avec un agent de séchage (sulfate de sodium) et séchées avant extraction dans un système de solvant approprié. Il est également possible d'extraire les solides et d'éliminer l'eau du solvant par passage sur une colonne contenant un agent de séchage. Dans la plupart des cas, l'extraction liquide/liquide ne permet pas de récupérer la substance parent et les produits de dégradation contenus dans les SSLM. La radioactivité totale dans tous les extraits est déterminée par comptage à scintillation liquide. La concentration des extraits contenant des substances d'essai ou des produits de dégradation volatils demande certaines précautions.

41. Il est possible d'utiliser encore d'autres approches, mais quelle que soit la méthode choisie, il est important décrire en détail les récupérations et de tenir compte de la durée nécessaire à l'arrêt de l'activité biologique et de l'intégrer dans les durées expérimentales utilisées pour les analyses cinétiques.

#### **Analyse de la substance parent et des produits de dégradation**

42. L'abondance relative de la substance parente et des produits de dégradation dans les extraits peut être déterminée par le biais de la chromatographie sur couche mince (CCM), de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ou d'autres techniques de séparation associées à une détection de la radioactivité.

43. Lorsqu'il existe des méthodes analytiques spécifiques sensibles, la biodégradation primaire peut être évaluée en substituant une mesure de la concentration résiduelle totale des substances d'essai et des produits de dégradation aux techniques radio-isotopiques.

#### **Caractérisation des produits de dégradation**

44. Dans la mesure du possible, il faut comparer le comportement chromatographique des pics inconnus à celui des produits de dégradation prédits, dès lors qu'il existe des étalons authentiques. Habituellement, la quantité et la pureté des produits de dégradation issus de cet essai ne permettent pas une identification concluante par d'autres moyens directs. En fonction du comportement chromatographique, il est généralement possible de déterminer si un métabolite est plus polaire ou moins polaire que son parent. Cette information, associée la mise en œuvre de réactions biochimiques connues et à la chronologie d'apparition et de disparition d'un métabolite dans la séquence de biodégradation peut donner des indices supplémentaires pour l'identifier. Si nécessaire, le  $P_{oe}$  des produits de dégradation principaux peut être estimé par CLHP (par exemple [Ligne directrice 117 de l'OCDE 117] (24)) en utilisant un détecteur de radioactivité en ligne.

#### **Mesure des solides extraits et incorporation dans la biomasse**

45. Les solides extraits sont brûlés afin de déterminer le niveau d'activité résiduelle dans les solides. Une quantité de radioactivité dans les solides biotiques plus élevée que celle mesurée dans les solides du

témoin abiotique indique habituellement une incorporation de la radioactivité dans la biomasse. La distribution de cette radioactivité entre les différents composants de la biomasse (à savoir acide nucléique, protéines, paroi cellulaire, etc.) peut être estimée grâce à la méthode de Sutherland et Wilkinson modifiée (7, 25).

#### **Mesure de la radioactivité volatilisée**

46. Dans le cas de substances d'essai volatiles, les pièges à substances volatiles sont extraits dans des solvants appropriés et la radioactivité dans l'extrait est analysée par comptage à scintillation liquide. L'abondance relative de la substance parente et des produits de dégradation dans le ou les extraits peut être déterminée comme dans les paragraphes précédents.

## **314 C MINERALISATION ET TRANSFORMATION DANS UNE BOUE DE DIGESTEUR ANAEROBIE**

### **INTRODUCTION**

1. Cet essai pour objectif d'évaluer le degré auquel un produit chimique peut être dégradé au cours d'une digestion anaérobie. Il indique également les vitesses de biodégradations primaire et finale dans les conditions qui règnent à l'intérieur d'un digesteur. La digestion anaérobie est couramment utilisée pour stabiliser et réduire la masse de boue produite par les stations d'épuration des eaux usées. La biodégradation par digestion anaérobie est particulièrement adaptée aux produits chimiques qui ont une tendance marquée à se dissocier entre la boue primaire et la boue secondaire. L'élimination au cours de la digestion anaérobie est susceptible de réduire significativement la quantité d'un produit chimique présent dans une boue utilisée pour amender le sol. De surcroît, l'essai est facilement adaptable aux boues septiques afin d'évaluer la biodégradation anaérobie dans les fosses septiques. Dans le cadre de l'évaluation des risques, l'essai 314 B doit généralement être mis en œuvre avant cet essai. Dans d'autres objectifs, ces essais peuvent être menés séparément.

2. Sachant que de nombreux digesteurs s'apparentent à des systèmes discontinus ou à piston, dans lesquels les temps de séjour sont longs (30 – 60 jours), l'obtention au début de l'essai d'un état stationnaire entre produit chimique et populations responsables de sa dégradation n'est pas critique pour obtenir des vitesses utiles à des fins d'évaluation de l'exposition.

3. Afin de simuler les conditions engendrées par le rejet épisodique d'un produit chimique, une boue de digesteur récemment collectée peut être incubée avec la concentration maximale de la substance chimique d'essai supposée présente dans la boue en cas de rejets périodiques. Holman (21) et le European Technical Guidance Document (22) proposent des approches permettant d'estimer les concentrations attendues dans les boues. Dans le cas de produits chimiques évacués en permanence dans les eaux usées, il est possible d'incuber la boue de digesteur récemment collectée avec un produit chimique d'essai radiomarké en une quantité faisant office de traceur ou à la concentration que l'on s'attend à trouver dans une boue de digesteur. Habituellement, dans le cadre temporel de l'essai, les nouveaux produits chimiques ont suffisamment de temps pour s'acclimater. Toutefois, on peut envisager d'utiliser un réacteur anaérobie de laboratoire à fonctionnement semi-continu (remplissage et vidange) avec introduction du produit chimique à la concentration attendue dans la boue pour produire une boue acclimatée. Ce type de boue permettrait d'obtenir les données cinétiques les plus précises pour un nouveau produit chimique dont la présence permanente dans l'eau usée est envisagée.

### **MODE OPERATOIRE GENERAL DE L'ESSAI**

4. Le produit chimique de l'essai est incubé avec une boue de digesteur abiotique et une boue biotique pendant un temps donné. L'activité biologique est inhibée dans le témoin abiotique, qui est utilisé pour estimer la minéralisation par différence, en déterminant l'efficacité d'extraction et la récupération de la molécule parent et en quantifiant d'autres processus de perte, comme l'hydrolyse, l'oxydation, la volatilisation ou la sorption sur l'appareil utilisé dans l'expérimentation.

5. Lorsqu'une méthode analytique dotée de la sensibilité requise est connue, il est possible de déterminer la vitesse de dégradation ou de transformation de la molécule parent en utilisant une substance d'essai non radiomarkée ou en suivant la disparition d'un produit chimique initialement présent dans l'eau usée. Toutefois, si la voie de biodégradation n'est pas parfaitement élucidée et en l'absence de méthodes

analytiques dotées de la sensibilité requise pour analyser les éventuels produits de dégradation, il est impossible de déterminer la biodégradation finale d'une substance non radiomarquée.

6. La substance d'essai est introduite à une concentration pertinente au plan environnemental dans les systèmes expérimentaux abiotiques et biotiques, qui sont incubés à une température appropriée dans des conditions statiques avec mélange occasionnel ou continu. Des échantillons sont périodiquement prélevés afin d'analyser la minéralisation et la biodégradation primaire.

7. Les essais peuvent se dérouler dans un système discontinu ouvert ou dans un système discontinu hermétiquement clos à écoulement continu, muni de pièges de capture du  $^{14}\text{CO}_2$  et du  $^{14}\text{CH}_4$  dégagés. Le système clos à écoulement continu est obligatoire pour les substances d'essai volatiles et préférentiellement utilisé pour les produits chimiques d'essai marqués au  $^{14}\text{C}$ . Les systèmes ouverts conviennent aux produits chimiques d'essai non volatils marqués au  $^3\text{H}$  et permettent de préciser la cinétique de biodégradation des substances d'essai non volatiles marquées au  $^{14}\text{C}$ , dont l'aptitude à la minéralisation a été préalablement établie. Dans le système ouvert, la minéralisation en  $^{14}\text{CO}_2$  et en  $^{14}\text{CH}_4$  peut être déterminée indirectement par mesure de la différence de radioactivité résiduelle entre les échantillons des traitements biotiques et abiotiques après acidification. De manière analogue, la minéralisation en  $^3\text{H}_2\text{O}$  peut être indirectement déterminée par mesure de la différence de radioactivité résiduelle d'un échantillon avant et après séchage. Dans le système discontinu clos, on peut également employer des sacs d'échantillonnage de gaz pour piéger des gaz issus d'une boue de digesteur anaérobie. Dans les systèmes à écoulement continu, on mesure directement le  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé dans les pièges basiques et le  $^{14}\text{CH}_4$  est brûlé en  $^{14}\text{CO}_2$  qui est directement mesuré dans un second ensemble de pièges basiques. Le  $^{14}\text{CO}_2$  dissous peut éventuellement être analysé après acidification des échantillons dans un récipient hermétiquement fermé et mesure de la radioactivité dans un piège basique contenu dans le récipient.

8. La radioactivité totale, la substance parent extractible et les produits de dégradation ainsi que la radioactivité associée aux matières solides extraites sont analysés dans les échantillons issus des deux types de traitement. La quantité de substance parent et de produits de dégradation est déterminée en utilisant une séparation chromatographique, et s'il y a lieu, des méthodes de détection radioanalytiques. Les solides résiduels à l'issue du processus d'extraction sont brûlés afin d'estimer l'incorporation dans la biomasse par différence ou ils peuvent être à nouveau fractionnés afin de déterminer l'absorption dans divers composants de la biomasse. La somme totale de toutes les fractions de chaque prélèvement permet de calculer le bilan massique complet du système expérimental.

### **APPLICABILITE DE L'ESSAI**

9. La méthode s'applique facilement aux substances hydrosolubles ou médiocrement hydrosolubles qui ne sont pas volatiles. Elle peut être adaptée aux substances volatiles. Habituellement, le radiomarquage des composés au  $^{14}\text{C}$  ou au  $^3\text{H}$  est nécessaire pour évaluer la minéralisation. On peut utiliser aussi bien le composé radiomarqué que le composé non radiomarqué pour analyser la biodégradation primaire.

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

#### **Appareil de l'essai**

10. Le volume de boue de digesteur dans les traitements expérimentaux est déterminé en fonction du nombre et du volume des échantillons nécessaires à l'évaluation. On place habituellement 0.25 à 1 litre de boue de digesteur diluée avec un milieu salin anaérobie dans des récipients de 0.5 à 2 litres. La boue est diluée pour faciliter le prélèvement quantitatif d'échantillons au cours de l'étude. La boue anaérobie doit être isolée de l'oxygène à tous les stades, y compris lors de la préparation et de l'échantillonnage.

11. Les systèmes discontinus ouverts sont généralement fermés par un bouchon en mousse ou en coton pour minimiser la perte d'eau par évaporation et ils sont incubés à l'intérieur d'une chambre anaérobie sous atmosphère réductrice. Les récipients expérimentaux à écoulement continu sont scellés par un système de fermeture approprié comprenant un orifice d'échantillonnage muni d'une vanne pour prélever des échantillons de boue et de connexions aux lignes de gaz entrant et sortant. Il peut s'agir d'un bouchon de caoutchouc, mais le verre est préférable lorsque la substance d'essai est un produit volatil hydrophobe. Lors d'essais sur composés volatils, il est également recommandé d'utiliser des lignes de gaz et des tubes d'échantillonnage constitués de matériaux inertes (par exemple polytétrafluoroéthylène (PTFE), acier inoxydable, verre).

12. Le système à écoulement continu est dérivé de celui décrit à l'origine par Steber et Wierich (10), et amélioré par la suite par Nuck et Federle (11). Un exemple d'un système type est présenté dans l'Annexe 1. Les récipients expérimentaux sont purgés en permanence par un flux d'azote et reliés à une série de pièges contenant une solution d'hydroxyde de potassium (1.5 N) ou un autre agent absorbant le CO<sub>2</sub> approprié. Un piège vide est habituellement ajouté dans la chaîne de piégeage à titre de précaution contre l'écoulement à rebours ou la condensation. Les gaz effluents contenus dans ces pièges sont mélangés avec de l'oxygène, puis traversent une colonne de quartz remplie d'oxyde cuprique et maintenue à environ 800 °C dans un four tubulaire afin de brûler le méthane en CO<sub>2</sub>. On fait ensuite passer le gaz sortant de la colonne de combustion sur une autre série de pièges basiques.

### Matériel

13. Le matériel de laboratoire standard suivant est utilisé :

- verrerie et pipettes diverses ;
- agitateurs magnétiques ou mélangeur pour le mélange continu des flacons expérimentaux ;
- centrifugeuse ;
- pH-mètre ;
- CO<sub>2</sub> solide (glace sèche)/acétone ou bain d'azote liquide ;
- cryodessicateur (lyophilisateur) ;
- four ou four à micro-onde pour les déterminations de poids secs ;
- appareil de filtration sur membrane ;
- autoclave ;
- équipement de manipulation des substances radiomarquées ;
- appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H dans les échantillons liquides et dans les échantillons solides (par exemple compteur à scintillation liquide) ;
- appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H dans les échantillons solides (par exemple appareil pour oxyder les échantillons) ;
- dispositif de piégeage du <sup>14</sup>C et du <sup>3</sup>H volatilisés dans le système de piégeage des gaz (piège à charbon actif en ligne ou dispositif équivalent) ;
- équipement de chromatographie sur couche mince (CCM) ou de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ;
- appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H en CCM (analyseur à balayage) ou en CLHP (détecteur en ligne) ;
- équipement analytique pour déterminer la substance d'essai (et la substance de référence) lorsqu'on utilise une analyse chimique spécifique (par exemple chromatographe gazeux, chromatographe liquide à haute performance, spectromètre de masse).

14. L'équipement spécialisé suivant peut être utilisé :

- chambre anaérobie ;
- fours tubulaires ;
- sonde redox et mV-mètre ;

### **Sélection de la source de boue de digesteur**

15. La source de boue de digesteur doit répondre à l'objectif de l'essai de simulation. Pour une évaluation spécifique d'un site, la boue doit être prélevée dans le système de digesteur spécifique concerné. Pour une évaluation générique, la boue de digesteur doit être collectée dans un digesteur standard mono-étage ou de premier étage alimenté en boues primaires et secondaires issues d'une station d'épuration collectant principalement des eaux usées domestiques. Si le produit chimique est déjà un composant de l'eau usée qui entre dans l'installation de traitement ou qui est rejeté par intermittence dans les eaux usées, on privilégiera l'utilisation d'une boue de digesteur récemment collectée. Si l'essai concerne un nouveau produit chimique destiné à être rejeté en continu dans les eaux usées, une boue acclimatée issue d'un réacteur anaérobie de laboratoire peut être mieux adaptée. Pour une évaluation générique, ce réacteur doit simuler le fonctionnement d'un digesteur anaérobie mono-étage, et il faut l'alimenter en mode semi-continu d'une boue constituée des solides de boues primaire et secondaire combinés issus d'une station d'épuration collectant principalement des eaux usées domestiques, avec addition du produit chimique d'essai à la concentration prévue dans la boue pendant environ 60 jours.

### **Collecte, transport et stockage de la boue de digesteur**

16. La boue doit être collectée dans le digesteur en veillant à la protéger contre l'oxygène. Il est recommandé d'utiliser pour cette collecte des bouteilles à large col en polyéthylène haute densité ou en un matériau similaire susceptible de se dilater. Il faut noter la température de l'échantillon lors de la collecte. Les récipients contenant des échantillons doivent être hermétiquement scellés. Au cours du transport, la température de l'échantillon ne doit pas dépasser significativement la température utilisée dans l'essai. La boue digérée est généralement stockée dans un milieu sans oxygène à la température de l'essai. Les récipients de stockage doivent être ventilés de façon à libérer les biogaz en excès en interdisant l'entrée d'air ambiant dans le récipient

### **Préparation des traitements expérimentaux**

#### **Milieu de dilution**

17. Il convient de préparer avant le début de l'essai un volume approprié de la solution de sels minéraux suivante. Cette solution est autoclavée pendant 30 minutes à une température d'environ 120 °C et à une pression d'environ 15 psi, avec évacuation lente, puis laissée à refroidir une nuit dans une chambre anaérobie ou sous une atmosphère anaérobie. Habituellement, le volume de milieu est inférieur ou égal à la moitié du volume du récipient autoclavé (par exemple, 500 ml de solides du digesteur dans un récipient de 1 l).

<u>Composants</u>	<u>Quantité</u>
Phosphate de potassium monobasique, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	8.5 mg/l
Phosphate de potassium dibasique, $\text{K}_2\text{HPO}_4$	21.8 mg/l
Phosphate de sodium dibasique, heptahydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50.3 mg/l
Chlorure d'ammonium, $\text{NH}_4\text{Cl}$	20.0 mg/l
Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2 mg/l
Chlorure de calcium anhydre, $\text{CaCl}_2$	2.8 mg/l
Chlorure ferreux, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/l
Eau déionisée	Ajuster au volume final

### **Boue de digesteur**

18. Il est particulièrement recommandé de stocker et de manipuler la boue de digesteur à l'intérieur d'une chambre anaérobie ou sous une atmosphère anaérobie, car les bactéries contenues en concentration élevée dans la boue consomment rapidement tout l'oxygène présent et le système revient à des conditions anaérobies. Toutefois, il est possible de protéger la boue d'une exposition à l'oxygène par d'autres moyens. La boue de digesteur doit être filtrée sur un tamis de 2 mm. La concentration totale de matières solides doit être mesurée.

19. En pratique, il est possible de travailler pendant l'étude sur des échantillons contenant environ 25 000 mg/l. Si la concentration est trop élevée, les solides peuvent être dilués par le milieu de dilution. En revanche, si elle est trop basse, on peut laisser les solides sédimenter, décanter le liquide et remettre la boue en suspension dans le milieu de dilution. Il convient de déterminer ensuite la teneur finale en matières solides et le pH.

20. La boue abiotique est généralement préparée à l'aide d'une combinaison de stérilisations chimique et thermique. Une méthode reconnue consiste à ajouter une solution de chlorure mercurique (1 g/l) à la boue, qui est ensuite autoclavée pendant au moins 90 minutes. Après refroidissement, le pH de la boue abiotique doit être mesuré et ajusté à la même valeur que celui de la boue biologiquement active. On peut également envisager d'autres approches pour désactiver la boue afin de réduire la production de déchets particuliers. Lors de sa préparation, la boue abiotique doit être stockée et manipulée dans une chambre anaérobie. On peut la protéger contre l'exposition à l'oxygène par d'autres moyens.

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

21. De préférence, il faut utiliser de l'eau distillée pour préparer les solutions mères des substances d'essai et de référence. S'il y a lieu, on peut employer une méthode différente de solubilisation ou de dispersion du produit chimique d'essai pour simuler son entrée normale dans la boue de digesteur. Dans la mesure du possible, les solutions d'essai doivent être équilibrées une nuit dans une atmosphère réductrice afin d'éliminer l'oxygène dissous avant utilisation. Le volume de solution mère ajouté doit permettre d'assurer une distribution rapide et uniforme de la substance d'essai dans le milieu de traitement et l'application d'une dose précise dans des expériences similaires. Dans l'idéal, lorsqu'on introduit des solutions aqueuses, le volume ajouté doit être supérieure ou égale à 1 ml et inférieure à 10 ml ; et s'il s'agit de solvants non toxiques, le volume est inférieur à 0.1 ml/N. L'activité de la solution mère peut être contrôlée par comptage à scintillation liquide. L'adsorption de la substance d'essai sur un support solide inerte, qui est ensuite introduit dans le système expérimental, peut convenir à des composés qui sont médiocrement solubles et généralement associés aux matières solides des boues. S'il est impossible de distribuer uniformément la substance d'essai dans le système expérimental avant le premier prélèvement, on peut préparer des systèmes expérimentaux individuels destinés à un échantillonnage destructif à chaque point de prélèvement.

22 Il est également possible d'appliquer le produit chimique d'essai sur des solides de boue inactive séchée, et les mélanger ensuite dans le système expérimental. Des solvants miscibles à l'eau et non toxiques peuvent être employés si besoin est, mais il conviendra alors de tenir compte de la charge organique associée introduite par l'addition de solvants organiques. L'échantillon peut également être ajouté sous forme pure selon un mode d'application qui optimise sa distribution uniforme et rapide dans la boue.

### **Conditions expérimentales**

**Température expérimentale**

23. L'incubation est de préférence mise en œuvre à l'obscurité, ou bien sous une lumière diffuse et à une température contrôlée, qui peut être la température de fonctionnement habituelle d'un digesteur anaérobie ( $35\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ ), la température in situ ou une température de laboratoire standard de 20-25 °C.

**Agitation**

24. Afin de simuler les conditions statiques qui règnent dans un digesteur, les récipients expérimentaux ne sont habituellement pas soumis à un mélange continu. Il faut toutefois bien les mélanger pendant le prélèvement pour obtenir un échantillon représentatif. De plus, on peut procéder à une agitation douce pendant quelques minutes 2 à 3 fois par semaine.

**Durée de l'essai**

25. La durée de l'essai doit permettre d'évaluer l'ampleur et la vitesse de biodégradation du produit chimique d'essai pendant son temps de séjour normal dans une boue anaérobie. Normalement, la période d'essai s'étend sur environ 60 jours. Elle peut être prolongée pour obtenir des points de données supplémentaires permettant de calculer les constantes cinétiques ou de déterminer si la dégradation est intégrale dans les conditions de l'essai. Inversement, elle peut être interrompue avant le temps imparti si la dégradation a atteint un plateau.

**Nombre de récipients expérimentaux**

26. Il doit y avoir au minimum un récipient expérimental en conditions abiotiques et un récipient en conditions biotiques pour chaque concentration de substance d'essai. Des expériences identiques peuvent être ajoutées à des fins d'analyse chimique spécifique. Les milieux des expériences identiques supplémentaires sont maintenus en conditions anaérobies, mais ne sont généralement pas reliés à l'appareil de minéralisation et il est possible d'en prélever des fractions ou de les sacrifier en un point particulier. En termes de variance, la qualité des données cinétiques obtenues dépend davantage de l'augmentation du nombre de points d'échantillons pour chaque traitement que de l'augmentation du nombre d'expériences identiques.

**MODE OPERATOIRE****Application de la substance**

27. Au début de l'essai, la substance d'essai est quantitativement ajoutée directement dans la boue de digesteur avec agitation constante. Le mode d'application doit permettre de protéger le système expérimental d'une exposition à l'oxygène. Il est recommandé d'appliquer la substance progressivement en dessous de l'interface air-eau afin d'assurer une distribution uniforme de la substance d'essai dans la boue. L'application est identique dans les traitements biotiques et abiotiques.

**Calendrier de l'échantillonnage**

28. Les intervalles entre les prélèvements sont définis en s'appuyant sur les données de biodégradation disponibles ou les résultats d'une étude pilote, car il n'y a pas de calendrier d'échantillonnage établi universellement applicable. Un programme recommandé pour un produit chimique rapidement dégradé pourrait inclure des points à 30, 60 et 120 minutes, et des prélèvements supplémentaires à 4, 8 et 24 heures. D'autres échantillons peuvent être prélevés aux jours 2, 4 et 7 et toutes les semaines jusqu'au 56e jour. Le calendrier appliqué à un produit chimique à dégradation lente doit être adapté de façon à obtenir un nombre de mesures suffisant pendant la phase de dégradation.



### **Mesure de la minéralisation**

29. La minéralisation peut être mesurée par des méthodes directes ou indirectes.

#### **Mesure indirecte des gaz marqués au $^{14}\text{C}$ ( $^{14}\text{CO}_2$ et $^{14}\text{CH}_4$ )**

30. Le comptage par scintillation liquide direct des échantillons est impossible car les teneurs en matières solides dans les échantillons sont trop élevées. Par conséquent, les échantillons sont centrifugés et la radioactivité totale est analysée dans les surnageants par comptage à scintillation liquide, puis les solides sont brûlés et leur radioactivité est ensuite analysée afin de déterminer la radioactivité totale dans l'échantillon. Des échantillons issus de chaque expérience individuelle (par exemple 1 ml) de boue de digesteur sont collectés dans chaque milieu de traitement et placés dans des tubes à centrifugation qui contiennent une quantité d'acide suffisante pour abaisser le pH de l'échantillon à une valeur inférieure à 2. Les échantillons sont centrifugés et le surnageant est transféré dans un flacon à scintillation, et laissé au repos une nuit sous hotte afin que le  $^{14}\text{CO}_2$  dissous dans les échantillons se dégage. Les échantillons sont combinés avec un cocktail de scintillation approprié à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide. Les solides restant dans le tube à centrifugation sont brûlés avant le comptage à scintillation liquide employant un agent oxydant l'échantillon. Le pourcentage total de gaz marqués au  $^{14}\text{C}$  produits est calculé par la différence entre le nombre total de coups dans les échantillons biotiques et le nombre total dans les échantillons abiotiques.

#### **Mesure directe de $^{14}\text{CO}_2$ et de $^{14}\text{CH}_4$**

31  $^{14}\text{CO}_2$  et  $^{14}\text{CH}_4$  dégagés : la mesure directe du  $^{14}\text{CO}_2$  et du  $^{14}\text{CH}_4$  ne peut être effectuée que dans un système discontinu à écoulement hermétiquement clos et relié à des pièges basiques. Pour le  $^{14}\text{CO}_2$ , le premier piège basique de la série est retiré et rapidement bouché. Les autres pièges sont déplacés vers l'avant dans le même ordre, un piège neuf est posé derrière les pièges précédents et le système de piégeage est reconnecté aussi rapidement que possible. Des fractions d'échantillons d'expériences identiques (par exemple 1 ml) prélevées dans le piège basique retiré sont transférées dans des flacons à scintillation, puis combinés avec un cocktail de scintillation qui convient à la matrice d'échantillons, puis analysés par comptage à scintillation liquide. Ce processus est répété pour la seconde série de piège prévue pour la détermination du  $^{14}\text{CH}_4$ .

32. Échantillons de  $^{14}\text{CO}_2$  dissous (facultatif) : des échantillons de boue (par exemple 10 ml) sont prélevés par l'orifice d'échantillonnage du flacon expérimental. Ils sont ensuite placés dans des récipients (par exemple Bellco Glass Biometer 2556-10250) contenant un compartiment rempli d'une substance absorbant le  $\text{CO}_2$  appropriée (par exemple KOH 1.5 N). Les récipients sont hermétiquement fermés et on ajoute une quantité d'acide suffisante pour abaisser le pH des échantillons en dessous de 2 sans ouvrir les récipients à l'atmosphère (voir annexe 1). On laisse reposer les échantillons pendant une durée suffisante pour permettre le dégagement du  $\text{CO}_2$  contenu dans la solution et son piégeage dans l'espace libre par le sorbant. Des échantillons de sorbant sont combinés avec un cocktail à scintillation qui convient à la matrice d'échantillons, puis ils sont analysés par comptage à scintillation liquide.

#### **Mesure indirecte de $^3\text{H}_2\text{O}$**

33. Des échantillons répliques (par exemple n=8) de boue sont recueillis dans chaque milieu d'essai et introduits dans des tubes à centrifugation qui contiennent une quantité d'acide suffisante pour abaisser le pH de l'échantillon à une valeur inférieure à 2. Le contenu des tubes est mélangé et centrifugé. Des échantillons individuels (par exemple 1 ml) de surnageant sont placés dans des flacons séparés. La moitié

des échantillons est immédiatement analysée directement par comptage à scintillation liquide pour obtenir une « mesure en conditions humides ». On laisse les autres échantillons sécher complètement pendant une nuit sous hotte pour éliminer le  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Les échantillons sont combinés avec un cocktail à scintillation qui convient à la matrice d'échantillons, puis analysés par comptage à scintillation liquide. Le pourcentage de  $^3\text{H}_2\text{O}$  est calculé d'après la différence entre le nombre total de coups dans les échantillons humides et le nombre de coups dans les échantillons secs et la quantité initiale de radioactivité introduite dans les échantillons.

### **Mesure de la radioactivité totale une boue de digesteur**

34. Le comptage direct par scintillation liquide des échantillons est impossible car leurs teneurs en matières solides sont trop élevées. Par conséquent, les échantillons sont centrifugés et la radioactivité totale est analysée dans les surnageants par comptage à scintillation liquide, puis les solides sont brûlés et leur radioactivité est ensuite analysée afin de déterminer la radioactivité totale dans l'échantillon. Des échantillons de boue de digesteur issus de chaque expérience individuelle (par exemple 1 ml) sont collectés dans chaque milieu de traitement et placés dans des tubes à centrifugation. Les échantillons sont centrifugés et le surnageant est transféré dans un flacon à scintillation. Les échantillons sont combinés avec un cocktail de scintillation approprié à la matrice d'échantillons, puis analysés par comptage à scintillation liquide. Les solides restant dans le tube à centrifugation sont brûlés avant le comptage à scintillation liquide en employant un agent oxydant l'échantillon.

### **Mesure de la substance parent et des produits de dégradation**

#### **Extraction**

35. On prélève un échantillon de boue de digesteur dans les milieux de traitements abiotiques et biotiques. Le volume de ces échantillons est généralement inférieur ou égal à 10 ml. Toutefois, il dépend de la concentration expérimentale, de l'activité spécifique et de la sensibilité des protocoles analytiques.

36. Diverses approches peuvent être envisagées pour concentrer et extraire les échantillons. Une méthode reconnue adaptée à l'analyse des produits chimiques d'essai non volatils implique la congélation éclair des échantillons, puis la lyophilisation et l'extraction du résidu séché dans un ou plusieurs solvants appropriés au parent et aux produits de dégradation. La congélation éclair arrête soudainement l'activité biologique sans hydrolyse ni autre altération des substances d'essai labiles. Il s'agit d'un processus rapide lorsque la profondeur du bain de glace sèche/acétone ou d'azote liquide permet de submerger le tube d'échantillon. Le niveau du bain doit être situé au-dessus du niveau de l'échantillon dans le tube. Les extraits obtenus peuvent être concentrés par évaporation, puis la radioactivité totale dans chaque extrait est déterminée par comptage à scintillation liquide.

37. Lorsque les substances d'essai sont volatiles, on peut centrifuger les échantillons et extraire la substance parent et les produits de dégradation du liquide par extraction en phase solide ou liquide/liquide. Les matières solides peuvent ensuite être extraites directement ou mélangées avec un agent de séchage (sulfate de sodium) et séchées avant extraction dans un système de solvant approprié. Il est également possible d'extraire les solides, puis d'éliminer l'eau par passage sur une colonne contenant un agent de séchage. La radioactivité totale dans tous les extraits est déterminée par comptage à scintillation liquide. La concentration des extraits contenant des substances d'essai ou des produits de dégradation volatils demande certaines précautions.

38. Il est possible d'utiliser encore d'autres approches, mais dans tous les cas, il est important de décrire en détail les récupérations et de tenir compte de la période d'arrêt de l'activité biologique et de l'intégrer dans les durées expérimentales reportées dans les analyses cinétiques.

### **Analyse de la substance parent et des produits de dégradation**

39. L'abondance relative de la substance parente et des produits de dégradation dans les extraits peut être déterminée par le biais de la chromatographie sur couche mince (CCM), de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ou d'autres techniques de séparation associées à une détection de la radioactivité.

40. Lorsqu'il existe des méthodes analytiques spécifiques sensibles, la biodégradation primaire peut être évaluée en substituant une mesure de la concentration résiduelle totale des substances d'essai et des produits de dégradation aux techniques radio-isotopiques.

### **Caractérisation des produits de dégradation**

41. Dans la mesure du possible, il faut comparer le comportement chromatographique des pics inconnus à celui des produits de dégradation prédits, dès lors qu'il existe des étalons authentiques. Habituellement, la quantité et la pureté des produits de dégradation issus de cet essai ne permettent pas une identification concluante par d'autres moyens directs. En fonction du comportement chromatographique, il est généralement possible de déterminer si un métabolite est plus polaire ou moins polaire que son parent. Cette information, associée à la mise en œuvre de réactions biochimiques connues et à la chronologie d'apparition et de disparition d'un métabolite dans la séquence de biodégradation peut donner des indices supplémentaires pour l'identifier. Si nécessaire, le  $P_{oe}$  des produits de dégradation principaux peut être estimé par CLHP (par exemple [Ligne directrice 117 de l'OCDE 117] (24)) en utilisant un détecteur de radioactivité en ligne.

### **Mesure des extraits solides et incorporation dans la biomasse**

42. Les solides extraits sont brûlés afin de déterminer le niveau d'activité résiduelle dans les solides. Une quantité de radioactivité dans les solides biotiques plus élevée que celle mesurée dans les solides du témoin abiotique indique habituellement une incorporation de la radioactivité dans la biomasse. La distribution de cette radioactivité entre les différents composants de la biomasse (à savoir acide nucléique, protéines, paroi cellulaire, etc.) peut être estimée grâce à la méthode de Sutherland et Wilkinson modifiée (7, 24).

### **Mesure de la radioactivité volatilisée**

43. Dans le cas de substances d'essai volatiles, les pièges à matières volatiles sont extraits dans des solvants appropriés et la radioactivité dans l'extrait est analysée par comptage à scintillation liquide. L'abondance relative de la substance parent et des produits de dégradation dans le ou les extraits peut être déterminée comme dans les paragraphes précédents.

## **314 D BIODEGRADATION DANS UNE ZONE DE MELANGE EFFLUENT TRAITE - EAU DE SURFACE**

### **INTRODUCTION**

1. L'objectif de cet essai est d'évaluer la biodégradation de la fraction d'un produit chimique subsistant après le traitement et rejeté dans l'effluent vers l'eau de surface. Il peut permettre de démontrer que la biodégradation à l'œuvre dans la station d'épuration se poursuit dans l'environnement de rejet. Il a également pour fonction de déterminer le degré de biodégradation ainsi que les vitesses de biodégradations primaire et finale dans ce compartiment de l'environnement. Les résultats peuvent être appliqués à l'estimation de la réduction de la concentration du produit chimique attribuable à la biodégradation dans un volume d'eau qui circule en aval du point de rejet d'une station d'épuration. Le système expérimental est formé d'eau de surface et d'effluent récemment collectés. Les vitesses mesurées sont d'autant plus utiles pour prédire avec précision l'exposition en aval que la simulation est fidèle aux conditions réelles dans la zone de mélange. Les facteurs à prendre en compte lors de la conception de cet essai, outre la concentration de la substance d'essai, comprennent la quantité de matières solides dans l'effluent et le facteur de dilution de l'effluent dans l'eau de surface.

2. Les conditions associées au rejet épisodique d'un produit chimique sont simulées par l'incubation d'un mélange judicieux d'eau de surface et d'effluent avec le produit chimique d'essai à une concentration supposée caractéristique de l'effluent dilué dans l'eau de surface lors d'un événement de rejet. Habituellement, le produit chimique et les populations d'agents de dégradation ne se trouvent pas à l'état stationnaire dans ces situations et la cinétique observée devrait être de quasi premier ordre ou de type Monod de second ordre. Des approches permettant d'estimer les concentrations dans les effluents sont proposées dans Holman (21) et dans le European Technical Guidance Document (22)

3. Lorsque les produits chimiques sont ou seront rejetés en permanence dans l'eau usée, les populations d'agents de dégradation contenues dans la station d'épuration s'acclimatent au produit chimique. S'il s'agit de produits chimiques déjà existants évacués en continu dans l'eau usée, les paramètres cinétiques les plus réalistes seront dérivés de l'utilisation d'une eau de surface contenant le produit chimique d'essai à la concentration prévue et un effluent récemment collecté en se conformant à un scénario de rejet donné. Dans le cas de nouveaux produits chimiques destinés à être évacués en continu dans l'eau usée, l'utilisation d'un effluent ayant été exposé au produit chimique dans des conditions de boue activée simulées au laboratoire (par exemple 303 A) produira la cinétique la plus précise. Il convient de noter que l'utilisation de la Ligne directrice 303 A peut donner lieu à une surestimation des produits de dégradation par rapport aux conditions de rejet réelles dans l'environnement.

4. Pour des raisons analytiques, il est impossible dans la plupart des cas de mener l'essai à des concentrations réelles qui règnent dans l'eau de surface. Par conséquent, les vitesses de biodégradation observées ne sont pas toujours parfaitement représentatives des conditions environnementales réelles, et cette réserve doit être intégrée l'interprétation des résultats.

### **MODE OPERATOIRE GENERAL DE L'ESSAI**

5. Le produit chimique de l'essai est incubé avec des mélanges abiotiques et biotiques d'eau de surface et d'effluent pendant une période de temps donnée. Le rapport des composants dépend du caractère spécifique ou générique du scénario de rejet de l'effluent traité dans l'eau de surface. L'activité biologique est inhibée dans le témoin abiotique, qui est utilisé pour estimer la minéralisation par différence, en déterminant l'efficacité d'extraction et la récupération de la molécule parent et en quantifiant d'autres

processus de perte, comme l'hydrolyse, l'oxydation, la volatilisation ou la sorption sur l'appareil utilisé dans l'expérimentation.

6. Lorsqu'une méthode analytique dotée de la sensibilité requise est connue, il est possible de déterminer la vitesse de dégradation ou de transformation de la molécule parent en utilisant une substance d'essai non radiomarquée ou en suivant la disparition d'un produit chimique initialement présent dans l'eau usée. Toutefois, si la voie de biodégradation n'est pas parfaitement élucidée et en l'absence de méthodes analytiques dotées de la sensibilité requise pour analyser les éventuels produits de dégradation, il est impossible de déterminer la biodégradation finale.

7. La substance d'essai est introduite à une concentration pertinente au plan environnemental dans les systèmes expérimentaux abiotiques et biotiques, qui sont incubés sous mélange continu s'il y a lieu. Des échantillons sont périodiquement prélevés afin d'analyser la minéralisation et la biodégradation primaire.

8. Les essais peuvent se dérouler dans un système discontinu ouvert ou dans un système discontinu clos à écoulement continu, muni de pièges de capture du  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé. Le système clos à écoulement continu est obligatoire pour les substances d'essai volatiles et préférentiellement utilisé pour les produits chimiques d'essai marqués au  $^{14}\text{C}$ . Les systèmes ouverts conviennent aux produits chimiques d'essai non volatils marqués au  $^3\text{H}$  et permettent de préciser la cinétique de biodégradation des substances d'essai non volatiles marquées au  $^{14}\text{C}$ , dont l'aptitude à la minéralisation a été préalablement établie. Dans le système ouvert, la minéralisation en  $^{14}\text{CO}_2$  peut être déterminée indirectement par mesure de la différence de radioactivité résiduelle entre les échantillons des traitements biotiques et abiotiques après acidification. De manière analogue, la minéralisation en  $^3\text{H}_2\text{O}$  peut être indirectement déterminée par mesure de la différence de radioactivité d'un échantillon avant et après séchage. Dans les systèmes à écoulement continu, on mesure directement le  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé dans les pièges basiques. En outre, le  $^{14}\text{CO}_2$  dissous est analysé par acidification des échantillons dans un récipient hermétiquement fermé et mesure de la radioactivité dans un piège basique contenu dans le récipient.

9. La radioactivité totale, la substance parent extractible et les produits de dégradation ainsi que la radioactivité associée aux matières solides extraites sont analysés dans les échantillons issus des deux types de traitement. La quantité de substance parent et de produits de dégradation est déterminée en utilisant une séparation chromatographique, et s'il y a lieu, des méthodes de détection radioanalytiques. Les solides résiduels à l'issue du processus d'extraction sont brûlés afin d'estimer l'incorporation dans la biomasse par différence ou ils peuvent être à nouveau fractionnés afin de déterminer l'absorption dans divers composants de la biomasse. La somme totale de toutes les fractions de chaque prélèvement permet de calculer le bilan massique complet du système expérimental.

### **APPLICABILITE DE L'ESSAI**

10. La méthode s'applique facilement aux substances hydrosolubles ou médiocrement hydrosolubles qui ne sont pas volatiles. Elle peut être adaptée aux substances volatiles. Habituellement, le radiomarquage des composés au  $^{14}\text{C}$  ou au  $^3\text{H}$  est nécessaire pour évaluer la minéralisation. On peut utiliser aussi bien le composé radiomarqué que le composé non radiomarqué pour analyser la biodégradation primaire.

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

#### **Appareils de l'essai**

11. Le volume de mélange eau de surface-effluent dans les traitements expérimentaux est déterminé en fonction du nombre et du volume des échantillons nécessaires à l'évaluation. On place habituellement 1

ou 2 litres d'eau usée dans des flacons de 2 ou 4 litres. Les systèmes discontinus ouverts sont généralement fermés par un bouchon en mousse ou en coton pour minimiser la perte d'eau par évaporation. Les systèmes à écoulement continu sont scellés par un système de fermeture approprié comprenant un orifice d'échantillonnage muni d'une vanne pour prélever des échantillons et de connexions aux lignes de gaz entrant et sortant (voir Annexe 1). Il peut s'agir d'un bouchon de caoutchouc, mais le verre est préférable lorsque la substance d'essai est un produit volatil hydrophobe. Lors d'essais sur composés volatiles, il est également recommandé d'utiliser des lignes de gaz et des tubes d'échantillonnage constitués de matériaux inertes (par exemple polytétrafluoroéthylène (PTFE), acier inoxydable, verre).

12. L'espace libre dans le récipient expérimental est en permanence purgé à l'air ou à l'air exempt de CO<sub>2</sub> dont le débit permet de maintenir l'eau usée à la concentration d'oxygène dissous désirée, mais est suffisamment bas pour le piégeage efficace du CO<sub>2</sub>. Le récipient expérimental est connecté à une série de pièges contenant de l'hydroxyde de potassium (par exemple 1.5 N) ou une autre substance absorbant le CO<sub>2</sub> appropriée. Habituellement, la chaîne de pièges comprend un piège vide à titre de précaution contre l'écoulement à rebours ou la condensation.

### **Matériel**

13. Le matériel de laboratoire suivant est utilisé :

- verrerie et pipettes diverses ;
- agitateurs magnétiques ou mélangeur pour le mélange continu des flacons expérimentaux ;
- centrifugeuse ;
- pH-mètre ;
- CO<sub>2</sub> solide (glace sèche)/acétone ou bain d'azote liquide ;
- cryodessicateur (lyophilisateur) ;
- four ou four à micro-ondes pour les déterminations de poids secs ;
- appareil de filtration sur membrane ;
- autoclave ;
- équipement de manipulation des substances radiomarquées ;
- appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H dans les échantillons liquides et dans les échantillons solides (par exemple compteur à scintillation liquide) ;
- appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H dans les échantillons solides (par exemple appareil pour oxyder les échantillons) ;
- dispositif de piégeage du <sup>14</sup>C et du <sup>3</sup>H volatilisés dans le système de piégeage des gaz (piège à charbon actif en ligne ou dispositif équivalent) ;
- équipement de chromatographie sur couche mince (CCM) ou de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ;
- appareil pour quantifier le <sup>14</sup>C et le <sup>3</sup>H en CCM (analyseur à balayage) ou en CLHP (détecteur en ligne) ;
- équipement analytique pour déterminer la substance d'essai (et la substance de référence) lorsqu'on utilise une analyse chimique spécifique (par exemple chromatographe gazeux, chromatographe liquide à haute performance, spectromètre de masse).

### **Sélection des échantillons environnementaux**

14. La source d'eau de surface, de boue activée ou d'effluent doit répondre à l'objectif de l'essai de simulation. Pour une évaluation spécifique d'un site, la boue activée ou l'effluent doit provenir de la station d'épuration des eaux spécifique concernée. De manière analogue, l'eau de surface doit être obtenue en amont du point de rejet de la station d'épuration. Le rapport des composants choisi doit simuler un scénario d'écoulement spécifique (par exemple, basses eaux ou moyennes eaux). Cependant, si les conditions

hydrauliques au point de rejet sont connues, le système expérimental peut se limiter à des échantillons obtenus en aval de la sortie du flux. Ces conditions sont toutefois variables et difficiles à reproduire.

15. Dans une évaluation générique, la boue activée ou l'effluent doit provenir d'une station d'épuration standard principalement alimentée par des eaux usées domestiques. L'eau de surface doit elle aussi être représentative des eaux de surface dans lesquelles l'effluent est évacué. Lorsque le produit chimique est déjà un composant des eaux usées entrant dans l'équipement de traitement ou lorsqu'il est rejeté épisodiquement dans ces eaux, l'idéal est d'utiliser dans l'essai une boue activée ou un effluent récemment collecté. L'effluent de station d'épuration contient essentiellement du liquide et des biosolides de boue activée, mais la teneur en matières solides varie et dépend de la chloration ou d'autres procédés. Pour simuler au mieux ces conditions, le scénario consiste à utiliser un effluent et une eau de surface filtrée combinés selon le rapport de dilution souhaité et d'ajouter séparément des biosolides de boue activée à la concentration voulue. S'il est difficile de se procurer l'effluent, on peut filtrer ou centrifuger la boue activée pour en éliminer les biosolides, puis ajouter ensuite le liquide et les biosolides selon un rapport défini pour cet essai. Pour une évaluation générique, l'European Technical Guidance Document s'appuie sur l'hypothèse d'un effluent contenant 30 mg/l de solides biologiques dilué 10 fois dans une eau de surface contenant 15 mg/l de solides en suspension (22). Ce scénario générique est donc représenté au plus près par 3 mg de biosolides dans 100 ml d'effluent filtré ou de liquide de boue activée et 900 ml d'eau de surface. On peut également envisager un autre scénario dans lequel 10 mg de biosolides et 330 ml d'effluent ou de liquide filtré par litre permettent de simuler des conditions de basses eaux critiques susceptibles de s'installer pendant les saisons sèches.

16. La boue activée ou l'effluent idéal pour l'analyse d'un nouveau produit chimique destiné à être rejeté en continu dans l'eau usée peut être obtenu par un système de traitement de laboratoire, par exemple, un vase poreux ou un système continu sur boue activée [OCDE 303 A] (2), alimenté en eau usée additionné de substance d'essai non marquée. Les sources de boue initiale, d'eau usée (flux entrant) et les conditions opératoires (concentration du flux entrant, temps de rétention hydraulique, temps de rétention des solides) de l'unité de laboratoire doivent précisément représenter les conditions spécifiques du site ou des conditions génériques. Dans ce dernier cas, le European Technical Guidance Document (22) recommande un temps de rétention hydraulique de 6.9 heures et un temps de rétention des solides de 9.2 jours dans son scénario générique de traitement des eaux usées. L'European Technical Guidance Document propose également des directives concernant l'évaluation d'eaux usées en fonction des volumes d'usage prévus. En général, l'état stationnaire est atteint en 2 à 3 fois le temps de rétention des solides, intervalle après lequel les biosolides ou l'effluent peuvent être utilisés dans l'essai.

### **Collecte, transport et stockage des échantillons environnementaux**

17. La boue activée doit être collectée dans une zone bien mélangée du bassin d'aération, et l'effluent doit être recueilli au point d'évacuation de la station d'épuration des eaux usées. L'eau de surface doit être collectée sur un site où les apports en eau usée sont connus. Il faut noter la température des échantillons au moment de la collecte. Les récipients de collecte doivent permettre une ventilation adéquate, et il faut veiller à empêcher la température de l'eau usée de dépasser significativement la température utilisée dans l'essai. L'eau usée est habituellement stockée à la température de l'essai sous aération continue. Les échantillons ne doivent pas être congelés.

### **Préparation des traitements expérimentaux**

18. Il convient de caractériser l'eau de surface par mesure de la quantité totale de solides en suspension, de la dureté totale et du pH et, facultativement par un comptage sur boîte standard et une analyse du carbone organique. Lorsque l'effluent de station d'épuration est représenté par une boue activée, les solides en suspension du liquide mixte sont filtrés sur un tamis de 2 mm, mélangés (facultatif) et laissés

à sédimenter. La concentration totale de solides en suspension du liquide est mesurée. Un volume suffisant du liquide est ajouté à l'eau de surface pour obtenir la concentration de biosolides souhaitée. S'il faut un volume plus important pour obtenir la dilution prévu dans l'essai, on ajoute du liquide de boue activé filtré ou centrifugé pour atteindre le rapport de dilution nécessaire. Lorsque l'on utilise un effluent traité et des biosolides de boue activée à la concentration souhaitée, l'effluent est filtré et mélangé à l'eau de surface au rapport de dilution voulue. Les solides en suspension dans le liquide mixte sont préparés conformément à la description précédente. Le pH et la quantité totale de solides en suspension du mélange préparé d'eau de surface doivent être mesurés. En option, on peut réaliser un comptage sur boîte standard et une analyse du carbone organique.

19. Le traitement abiotique est habituellement préparé à l'aide d'une combinaison de stérilisations chimique et thermique. Une méthode reconnue consiste à ajouter du chlorure mercurique (0.1 g/l) au mélange, qui est ensuite autoclavé pendant au moins 90 minutes à une température d'environ 121 °C et à une pression d'environ 15 psi. Le volume de milieu est généralement inférieur ou égal à la moitié du volume du récipient qui est autoclavé (par exemple 500 ml d'eau de surface dans un récipient de 1 l). Après refroidissement, le pH du milieu abiotique est mesuré et ajusté à la même valeur que celui du milieu biologiquement actif. D'autres méthodes de désactivation du milieu de traitement peuvent également être envisagées pour réduire la quantité de déchets particuliers.

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

20. De préférence, il faut utiliser de l'eau distillée pour préparer les solutions mères des substances d'essai et de référence. S'il y a lieu, on peut employer une méthode différente pour solubiliser ou disperser le produit chimique d'essai de façon à simuler son entrée normale dans l'environnement. Il est possible d'utiliser des solvants miscibles à l'eau et non toxiques s'il s'agit là du seul moyen de mener l'essai, mais il conviendra alors de tenir compte de la charge organique introduite par l'addition de solvants organiques. L'échantillon peut également être ajouté sous forme pure au système expérimental selon un mode d'application qui optimise sa distribution uniforme et rapide dans les milieux de traitement expérimentaux. L'adsorption de la substance d'essai sur un support solide inerte, qui est ensuite introduit dans le système expérimental, peut convenir à des composés de médiocre solubilité généralement associés dans l'effluent à des matières solides en suspension. S'il est impossible de distribuer uniformément la substance d'essai dans le système expérimental avant le premier prélèvement, on peut préparer des systèmes individuels destinés à un échantillonnage destructif à chaque point de prélèvement.

21. Le volume de solution mère ajouté doit permettre d'assurer une distribution rapide et uniforme de la substance d'essai dans le milieu de traitement et l'application d'une dose précise dans les expériences identiques. Dans l'idéal, lorsqu'on introduit des solutions aqueuses, le volume ajouté doit être supérieur ou égal à 2 ml et inférieur à 10 ml ; et s'il s'agit de solvants non toxiques, le volume est inférieur à 0.1 ml/l. Si besoin est, les solutions appliquées peuvent être préparées à l'avance et réfrigérées. L'activité de la solution mère doit être vérifiée par comptage à scintillation liquide.

#### **Conditions expérimentales**

##### **Température expérimentale**

22. De préférence, l'incubation se déroule à l'obscurité, ou bien sous une lumière diffuse à une température contrôlée, qui peut être la température in situ ou une température de laboratoire standard de 20-25 °C.

##### **Agitation**



23. Pour maintenir le milieu d'essai en suspension, les récipients expérimentaux sont soumis à une agitation minimale au moyen d'un mélange ou d'une agitation continu. L'agitation facilite également le transfert d'oxygène entre l'espace libre et le liquide et maintient ainsi des conditions aérobies adéquates.

#### **Durée de l'essai**

24. La durée de l'essai doit permettre d'évaluer l'ampleur et la vitesse de biodégradation du produit chimique d'essai pendant son temps de séjour normal dans la zone de mélange effluent de station d'épuration-eau de surface. La période d'essai s'étend normalement sur 28 jours. Elle peut être prolongée pour obtenir des points de données supplémentaires permettant de calculer les constantes cinétiques ou de déterminer si la dégradation est intégrale dans les conditions de l'essai. Inversement, elle peut être interrompue avant le temps imparti si la dégradation a atteint un plateau.

#### **Nombre de récipients expérimentaux**

25. Il doit y avoir au minimum un récipient expérimental en conditions abiotiques et un récipient expérimental en conditions biotiques pour chaque concentration de substance d'essai. Chaque traitement peut être répété par des expériences identiques pour la mesure de variance (par exemple 3 expériences identiques). Toutefois, l'amélioration de la qualité des données cinétiques obtenues dépend davantage de l'augmentation du nombre d'échantillons prélevés au cours d'un même traitement que de l'augmentation du nombre d'expériences identiques.

### **MODE OPERATOIRE**

#### **Application de la substance**

26. Au début de l'essai, le récipient expérimental est ouvert et la substance d'essai est quantitativement ajoutée directement dans le milieu de traitement sous agitation constante. Il est recommandé d'administrer la dose progressivement en dessous de l'interface air-eau afin d'assurer une distribution uniforme de la substance d'essai dans le milieu d'essai. L'application est identique dans les milieux de traitements biotiques et abiotiques. Généralement, les systèmes biotiques reçoivent la substance en premier, et ensuite les systèmes abiotiques. Un respect scrupuleux de la chronologie est généralement plus critique pour les traitements biotiques que pour les traitements abiotiques à des fins d'analyses cinétiques.

#### **Calendrier de l'échantillonnage**

27. Les intervalles entre les prélèvements sont définis en s'appuyant sur les données de biodégradation disponibles ou les résultats d'une étude préliminaire, car il n'existe pas de calendrier d'échantillonnage établi universellement applicable. Un programme recommandé pour un produit chimique rapidement dégradé pourrait inclure des points à 5, 30 et 60 minutes, et des prélèvements supplémentaires à 3, 5, 8, 12 et 24 heures. D'autres échantillons peuvent être prélevés aux jours 2, 3, 4, 5, 6 et 7 et une fois par semaine jusqu'au 28e jour. Pour un produit chimique à dégradation lente, le calendrier doit être adapté afin d'obtenir un nombre de mesures suffisant pendant la phase de dégradation.

#### **Mesure de la minéralisation**

28. La minéralisation peut être mesurée par des méthodes directes ou indirectes.

#### **Mesure indirecte du $^{14}\text{CO}_2$**

29. Des échantillons issus d'expériences individuelles (par exemple 1 ml) sont prélevés dans chaque milieu de traitement et introduits dans des flacons séparés qui contiennent une quantité suffisante d'acide (par exemple 1 ml de HCl 0,1 N) pour abaisser le pH de l'échantillon à une valeur inférieure à 2 et ils sont placés dans une hotte.

30. Les échantillons sont soumis à un barbotage d'air pendant plusieurs heures, ou bien laissés au repos une nuit pour permettre le dégagement du  $^{14}\text{CO}_2$  dissous dans les échantillons. Ils sont combinés avec un cocktail de scintillation approprié à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide. Le pourcentage de  $^{14}\text{CO}_2$  est calculé par la différence entre le nombre total de coups dans les échantillons biotiques et le nombre total dans les échantillons abiotiques.

### Mesure directe du $^{14}\text{CO}_2$

31. Dans le cas des produits chimiques à dégradation rapide, il est parfois difficile de mesurer précisément le taux de  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé du fait de la vitesse du transfert de masse du  $^{14}\text{CO}_2$  de l'espace vide dans le piège basique. Il est alors recommandé de procéder simultanément à la mesure indirecte et à la mesure directe du  $^{14}\text{CO}_2$ .

32.  $\text{CO}_2$  dégagé : le premier piège basique de la série est retiré et rapidement bouché. Les autres pièges sont déplacés vers l'avant dans le même ordre, un piège neuf est posé derrière les pièges précédents et le système de piégeage est reconnecté aussi rapidement que possible. Des fractions d'échantillons d'expériences individuelles (par exemple 1 ml) prélevées dans le piège basique retiré sont transférées dans des flacons à scintillation, puis combinés avec un cocktail de scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide.

33.  $^{14}\text{CO}_2$  dissous : des échantillons (par exemple 25 à 50 ml) sont prélevés par l'orifice d'échantillonnage du flacon expérimental. Ils sont ensuite placés dans des récipients (par exemple Bellco Glass Biometer 2556-10250) contenant un compartiment rempli d'une substance absorbant le  $\text{CO}_2$  appropriée (par exemple KOH 1.5 N). Les récipients sont hermétiquement fermés et on ajoute suffisamment d'acide (par exemple HCl 6 N) pour abaisser le pH des échantillons en dessous de 2 sans ouvrir les récipients à l'atmosphère (voir annexe 1). On laisse reposer les échantillons pendant une durée suffisante (par exemple une nuit) pour permettre le dégagement du  $\text{CO}_2$  contenu dans la solution et son piégeage dans l'espace libre par le sorbant. Des échantillons de sorbant sont combinés avec un cocktail à scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et ils sont analysés par comptage à scintillation liquide.

### Mesure indirecte de $^3\text{H}_2\text{O}$

34. Des échantillons issus d'expériences individuelles (par exemple 1 ml) sont prélevés dans chaque milieu de traitement et introduits dans des flacons séparés qui contiennent une quantité suffisante d'acide (par exemple 1 ml de HCl 0,1 N) pour abaisser le pH de l'échantillon à une valeur inférieure à 2 et ils sont placés dans une hotte.

35. La moitié des échantillons est immédiatement analysée directement par comptage à scintillation liquide pour obtenir une « mesure en conditions humides ». On laisse les autres échantillons sécher complètement pour éliminer le  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Les échantillons sont combinés avec un cocktail à scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide. Le pourcentage de  $^3\text{H}_2\text{O}$  est calculé d'après la différence entre le nombre total de coups dans les échantillons humides et le nombre de coups dans les échantillons secs et la quantité initiale de radioactivité introduite dans les échantillons.

### Mesure de la radioactivité totale dans l'eau de surface

36. Des échantillons de petit volume (par exemple 1 ml) sont directement analysés par comptage à scintillation liquide pour quantifier la radioactivité présente dans chaque milieu de traitement au cours du temps. Ces mesures sont utilisées pour confirmer que la récupération de radioactivité à partir des échantillons extraits est acceptable et pour contrôler la volatilisation.

### **Mesure de la substance parent et des produits de dégradation**

#### **Extraction**

37. On prélève un échantillon dans le milieu de traitement abiotique et un dans le milieu biotique. Le volume de ces échantillons est généralement supérieur ou égal 25 ml, mais dépend toutefois de la concentration expérimentale, de l'activité spécifique et de la sensibilité des protocoles analytiques.

38. Diverses approches peuvent être envisagées pour concentrer et extraire les échantillons. Une méthode reconnue adaptée à l'analyse des produits chimiques d'essai non volatils implique la congélation éclair des échantillons, puis la lyophilisation et l'extraction du résidu séché dans un ou plusieurs solvants appropriés au parent et aux produits de dégradation. La congélation éclair arrête soudainement l'activité biologique sans hydrolyse ni autre altération des substances d'essai labiles. Il s'agit d'un processus rapide lorsque la profondeur du bain de glace sèche/acétone ou d'azote liquide permet de submerger le tube d'échantillon. Le niveau du bain doit être situé au-dessus du niveau de l'échantillon dans le tube. L'extrait est filtré afin de récupérer les solides extraits. Le filtre doit être compatible avec le type de solvant (aqueux ou non). Les extraits obtenus peuvent être concentrés par évaporation, puis la radioactivité totale dans chaque extrait est déterminée par comptage à scintillation liquide.

39. Lorsque les substances d'essai sont volatiles, l'échantillon peut être soumis successivement à une filtration et à une extraction en phase solide sur colonne ou sur disque, avec une élution consécutive par des solvants appropriés pour récupérer la substance parent et les produits de dégradation. Il est également possible d'extraire les échantillons aqueux dans un système de solvant approprié, puis de les filtrer pour recueillir les solides de la biomasse, dans l'hypothèse d'une extraction suffisamment efficace. La radioactivité totale dans tous les extraits est déterminée par comptage à scintillation liquide. La concentration des extraits contenant des substances d'essai ou des produits de dégradation volatils demande certaines précautions.

40. Il est possible d'utiliser encore d'autres approches, mais dans tous les cas, il est important de décrire en détail les récupérations et de tenir compte de la période d'arrêt de l'activité biologique et de l'intégrer dans les durées expérimentales reportées dans les analyses cinétiques.

### **Analyse de la substance parent et des produits de dégradation**

41. L'abondance relative de la substance parente et des produits de dégradation dans les extraits peut être déterminée par le biais de la chromatographie sur couche mince (CCM), de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ou d'autres techniques de séparation associées à une détection de la radioactivité.

42. Lorsqu'il existe des méthodes analytiques spécifiques sensibles, la biodégradation primaire peut être évaluée en substituant une mesure de la concentration résiduelle totale des substances d'essai et des produits de dégradation aux techniques radio-isotopiques.

### **Caractérisation des produits de dégradation**

43. Dans la mesure du possible, il faut comparer le comportement chromatographique des pics inconnus à celui des produits de dégradation prédits, dès lors qu'il existe des étalons authentiques. Habituellement, la quantité et la pureté des produits de dégradation issus de cet essai ne permettent pas une identification concluante par d'autres moyens directs. En fonction du comportement chromatographique, il est généralement possible de déterminer si un métabolite est plus polaire ou moins polaire que la substance parent. Cette information, associée à la mise en œuvre de réactions biochimiques connues et à la chronologie d'apparition et de disparition d'un métabolite dans la séquence de biodégradation peut donner des indices supplémentaires pour l'identifier. Si nécessaire, le  $P_{oe}$  des produits de dégradation principaux peut être estimé par CLHP (par exemple [Ligne directrice 117 de l'OCDE 117] (24)) en utilisant un détecteur de radioactivité en ligne.

#### **Mesure des solides extraits**

44. Les filtres contenant les solides extraits peuvent être brûlés pour déterminer le niveau d'activité résiduelle dans les solides. Cependant, lorsque le  $^{14}\text{CO}_2$  dissous est présent en grande quantité, le filtre retient les microorganismes et les carbonates. Dans ces conditions, le filtre sera immergé dans une solution d'acide faible (1 ml de HCl 0.1N) pendant une durée suffisante (par exemple une nuit) pour permettre le dégagement du  $^{14}\text{CO}_2$  dissous dans les échantillons avant l'analyse par comptage à scintillation liquide. Un niveau de radioactivité dans les solides biotiques supérieur à celui mesuré dans les solides du témoin abiotique indique habituellement à une incorporation de la radioactivité dans la biomasse.

#### **Mesure de la radioactivité volatilisée**

45. Dans le cas de substances d'essai volatiles, les pièges à matières volatiles sont extraits par des solvants appropriés et la radioactivité dans les extraits est analysée par comptage à scintillation liquide. L'abondance relative de la substance parente et des produits de dégradation dans le ou les extraits peut être déterminé comme dans les paragraphes précédents.

## **314 E BIODEGRADATION DANS UNE ZONE DE MELANGE EAU USEE NON TRAITEE-EAU DE SURFACE**

### **INTRODUCTION**

1. Dans les régions en développement dépourvues d'infrastructure d'épuration des eaux usées, les eaux usées sont couramment rejetées telles quelles dans les eaux de surface. L'objectif de cet essai est de simuler ces situations et d'évaluer la biodégradation d'un produit chimique rejeté dans l'eau de surface à titre de composant d'une eau usée non traitée. Il a également pour fonction de déterminer le degré de biodégradation ainsi que les vitesses de biodégradations primaire et finale dans ce compartiment de l'environnement. Les résultats peuvent être appliqués à l'estimation de la réduction de la concentration du produit chimique attribuable à la biodégradation dans un volume d'eau qui se circule en aval du point de rejet d'une station d'épuration. Il est également possible de comparer cette réduction à la diminution d'autres paramètres caractérisant l'eau usée, par exemple, la demande en oxygène biochimique, la demande chimique en oxygène ou la quantité totale de carbone organique. Le système expérimental est composé d'eau usée et d'eau de surface récemment collectées. Les vitesses mesurées sont d'autant plus utiles pour prédire avec précision l'exposition en aval que la simulation est fidèle aux conditions réelles dans la zone de mélange. Les facteurs à prendre en compte lors de la conception de cet essai, outre la concentration de la substance d'essai, comprennent la concentration d'oxygène dissous et le degré de dilution de l'effluent dans l'eau de surface.

2. Si l'essai porte sur des produits chimiques existants présents en permanence dans les eaux usées, les paramètres cinétiques les plus réalistes en termes de charge chimique réelle seront obtenus par l'utilisation d'une eau usée et d'une eau de surface récemment collectées incubées avec une quantité de produit chimique d'essai radiomarqué faisant office de traceur. Lorsque les produits chimiques ne sont pas présents en permanence dans l'eau usée, il convient d'ajouter une quantité suffisante de produit chimique d'essai (radiomarqué et non radiomarqué) qui représente au mieux la concentration attendue dans l'eau usée diluée dans l'eau de surface lors d'un rejet épisodique ou après commercialisation d'un nouveau produit chimique. Des approches permettant d'estimer cette concentration prévue dans l'eau usée sont présentées dans Holman (21) et dans l'European Technical Guidance Document (22).

3. Dans les situations de faible dilution, il est préférable d'incuber les mélanges dans des conditions de concentrations réduites d'oxygène dissous (1 – 4 mg/l) afin de simuler une concentration d'oxygène dissous en aval point de rejet d'une station d'épuration. Dans cet essai, le produit chimique et les populations d'agents de dégradation se trouvent rarement à l'état stationnaire et la cinétique observée est de quasi premier ordre ou de type Monod de second ordre.

4. L'essai peut se conformer à un modèle à une ou deux phases. Dans le premier cas, la biodégradation est évaluée dans l'eau usée après dilution de celle-ci dans une eau de surface propre ou polluée par une eau usée. Dans le second cas, la biodégradation est évaluée dans l'eau usée après dilution séquentielle dans une eau de surface propre et polluée par des eaux usées. Dans ce modèle d'essai, le produit chimique est introduit dans l'eau usée diluée par une eau de surface propre et sa disparition et celle des polluants conventionnels (demande en oxygène biologique, demande chimique en oxygène, etc.) sont suivies au cours du temps (phase 1). Ensuite, une seconde dose de produit chimique d'essai et d'eau usée est ajoutée au même système afin de simuler la dilution de l'eau usée dans une eau de surface préalablement polluée par une eau usée (phase 2).

**MODE OPERATOIRE GENERAL DE L'ESSAI**

5. Le produit chimique d'essai est incubé avec des mélanges abiotiques et biotique d'eau usée et d'eau de surface, généralement en conditions de faible concentration d'oxygène dissous (1 – 4 mg/l) pendant une période de temps donnée. Le rapport de ces composants dépend des scénarios spécifiques ou génériques de rejet des eaux usées dans l'eau de surface. L'activité biologique est inhibée dans le témoin abiotique, qui est utilisé pour estimer la minéralisation par différence, en déterminant l'efficacité d'extraction et la récupération de la molécule parent et en quantifiant d'autres processus de perte, comme l'hydrolyse, l'oxydation, la volatilisation ou la sorption sur l'appareil utilisé dans l'expérimentation.

6. Lorsqu'une méthode analytique dotée de la sensibilité requise est connue, il est possible de déterminer la vitesse de dégradation ou de transformation de la molécule parent en utilisant une substance d'essai non radiomarkée ou en suivant la disparition d'un produit chimique initialement présent dans l'eau usée. Toutefois, si la voie de biodégradation n'est pas parfaitement élucidée et en l'absence de méthodes analytiques dotées de la sensibilité requise pour analyser les éventuels produits de dégradation, il est impossible de déterminer la biodégradation finale.

7. La substance d'essai est introduite à une concentration pertinente au plan environnemental dans les systèmes expérimentaux abiotiques et biotiques, qui sont incubés à une température appropriée sous agitation continue. Le mode d'incubation des échantillons biotiques permet de maintenir des concentrations d'oxygène dissous réduites (1 – 4 mg/l), caractéristiques en aval d'un point de rejet d'eaux usées. Des échantillons sont périodiquement prélevés pour déterminer la minéralisation et la biodégradation primaire et, facultativement, les concentrations des autres composants des eaux usées (par exemple, demande chimique en oxygène, carbone organique total et ammoniacque) peuvent être déterminées simultanément.

8. Dans le modèle d'essai en deux phases, après stabilisation de la biodégradation du produit chimique d'essai et des composants de l'eau usée, on mélange une deuxième dose du produit chimique d'essai et d'eau usée fraîche dans le système expérimental en place pour simuler la dilution de l'eau usée dans une eau de surface préalablement polluée, puis on répète le processus d'échantillonnage.

9. Les essais peuvent se dérouler dans un système discontinu ouvert ou dans un système discontinu clos à écoulement continu, muni de pièges de capture du  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé. Le système clos à écoulement continu est obligatoire pour les substances d'essai volatiles et préférentiellement utilisé pour les produits chimiques d'essai marqués au  $^{14}\text{C}$ . Les systèmes ouverts conviennent aux produits chimiques d'essai non volatils marqués au  $^3\text{H}$  et permettent de préciser la cinétique de biodégradation des substances d'essai non volatiles marquées au  $^{14}\text{C}$ , dont l'aptitude à la minéralisation a été préalablement établie. Dans le système ouvert, la minéralisation en  $^{14}\text{CO}_2$  peut être déterminée indirectement par mesure de la différence de radioactivité résiduelle entre les échantillons des traitements biotiques et abiotiques après acidification. De manière analogue, la minéralisation en  $^3\text{H}_2\text{O}$  peut être indirectement déterminée par mesure de la différence de radioactivité d'un échantillon avant et après séchage. Dans les systèmes à écoulement continu, le  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé est directement mesuré dans les pièges basiques. De surcroît, le  $^{14}\text{CO}_2$  dissous est déterminé par acidification des échantillons dans un récipient hermétiquement fermé et mesure de la radioactivité dans un piège basique contenu dans le récipient.

10. La radioactivité totale, la substance parent extractible et les produits de dégradation ainsi que la radioactivité associée aux matières solides extraites sont analysés dans les échantillons issus des deux types de traitement. La quantité de substance parente et de produits de dégradation est déterminée en utilisant une séparation chromatographique, et, s'il y a lieu, des méthodes de détection radioanalytiques. Les solides résiduels à l'issue du processus d'extraction sont brûlés afin d'estimer l'incorporation dans la biomasse par différence ou ils peuvent être à nouveau fractionnés afin de déterminer l'absorption dans divers

composants de la biomasse. La somme totale de toutes les fractions de chaque prélèvement permet de calculer le bilan massique complet du système expérimental.

### **APPLICABILITE DE L'ESSAI**

11. La méthode s'applique facilement aux substances hydrosolubles ou médiocrement hydrosolubles qui ne sont pas volatiles. Elle peut être adaptée aux substances volatiles. Habituellement, le radiomarquage des composés au  $^{14}\text{C}$  ou au  $^3\text{H}$  est nécessaire pour évaluer la minéralisation. On peut utiliser aussi bien le composé radiomarqué que le composé non radiomarqué pour analyser la biodégradation primaire.

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

#### **Appareils de l'essai**

12. Le volume de mélange eau usée-eau de surface dans les traitements expérimentaux est déterminé en fonction du nombre et du volume des échantillons nécessaires à l'évaluation. On place habituellement 1 ou 2 litres d'échantillon dans des flacons de 2 ou 4 litres. Dans l'idéal, le mélange eau usée-eau de surface est incubé dans une ou plusieurs conditions de concentration d'oxygène dissous contrôlées (généralement, 1 et 4 mg/l). La régulation est obtenue grâce à une sonde à oxygène immergée dans l'eau usée et reliée à un dispositif régulant l'oxygène connecté à une vanne de commande, qui suit et contrôle l'aération de l'eau usée (voir Annexe 1). Cette aération s'équilibre avec le barbotage continu d'azote et permet d'obtenir la concentration d'oxygène dissous souhaitée. L'eau usée peut également être incubée sous agitation mais avec une aération minimale et addition périodique d'azote ou d'air pour maintenir des concentrations réduites d'oxygène dissous. Il est nécessaire dans ce cas de noter les mesures de concentration d'oxygène dissous à intervalles réguliers.

13. Les systèmes ouverts sont généralement fermés par un bouchon en mousse ou en coton pour minimiser la perte d'eau par évaporation. Les systèmes à écoulement continu sont hermétiquement fermés par un système approprié comprenant un orifice d'échantillonnage muni d'une vanne pour prélever des échantillons et de connexions aux lignes de gaz entrant et sortant. Il peut s'agir d'un bouchon de caoutchouc, mais le verre est préférable lorsque la substance d'essai est un produit volatil hydrophobe. Lors d'essais sur composés volatiles, il est également recommandé d'utiliser des lignes de gaz et des tubes d'échantillonnage constitués de matériaux inertes (par exemple polytétrafluoroéthylène (PTFE), acier inoxydable, verre).

14. L'espace libre dans le récipient expérimental est en permanence purgé par de l'air ou de l'air sans  $\text{CO}_2$ , dont le débit permet de maintenir le système en conditions aérobies, mais est suffisamment bas pour un piégeage efficace du  $\text{CO}_2$ . Le récipient expérimental est connecté à une série de pièges contenant de l'hydroxyde de potassium (par exemple 1.5 N) ou une autre substance absorbant le  $\text{CO}_2$  appropriée. La chaîne de pièges comprend un piège vide placé devant l'absorbant qui prévient l'écoulement à rebours ou la condensation.

#### **Matériel**

- verrerie et pipettes diverses ;
- agitateurs magnétiques ou mélangeur pour le mélange continu des flacons expérimentaux ;
- centrifugeuse ;
- pH-mètre ;
- $\text{CO}_2$  solide (glace sèche)/acétone ou bain d'azote liquide ;
- cryodessicateur (lyophilisateur) ;
- four ou four à micro-ondes pour les déterminations de poids secs ;

- appareil de filtration sur membrane ;
- autoclave ;
- équipement de manipulation des substances radiomarquées ;
- appareil pour quantifier le  $^{14}\text{C}$  et le  $^3\text{H}$  dans les échantillons liquides et dans les échantillons solides (par exemple compteur à scintillation liquide) ;
- appareil pour quantifier le  $^{14}\text{C}$  et le  $^3\text{H}$  dans les échantillons solides (par exemple appareil pour oxyder les échantillons) ;
- dispositif de piégeage du  $^{14}\text{C}$  et du  $^3\text{H}$  volatilisés dans le système de piégeage des gaz (piège à charbon actif en ligne ou dispositif équivalent) ;
- équipement de chromatographie sur couche mince (CCM) ou de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ;
- appareil pour quantifier le  $^{14}\text{C}$  et le  $^3\text{H}$  en CCM (analyseur à balayage) ou en CLHP (détecteur en ligne) ;
- équipement analytique pour déterminer la substance d'essai (et la substance de référence) lorsqu'on utilise une analyse chimique spécifique (par exemple chromatographe gazeux, chromatographe liquide à haute performance, spectromètre de masse).

15. Le matériel de laboratoire suivant n'est pas indispensable, mais il est utile :

- oxygénomètre
- appareil de régulation de l'oxygène muni d'une sonde et d'une vanne de commande
- flacon de digestion pour la demande chimique en oxygène
- ensemble de réactifs pour l'azote ammoniacal
- spectrophotomètre
- analyseur de carbone organique

### **Sélection des échantillons environnementaux**

16. La source d'eau usée et d'eau de surface doit répondre à l'objectif de l'essai de simulation. Pour une évaluation spécifique d'un site, l'eau usée doit provenir du système d'égout spécifique concerné et l'eau de surface doit être prélevée en amont du point de rejet des eaux usées. Ces composants sont associés en un rapport visant à simuler un scénario d'écoulement spécifique (par exemple, basses eaux ou moyennes eaux). Cependant, si les conditions hydrauliques au point de rejet sont connues, le système expérimental peut se limiter à des échantillons obtenus en aval du flux rejeté. Ces conditions sont toutefois variables et difficiles à reproduire.

17. Une évaluation générique emploie des échantillons d'eau usée essentiellement dérivés de sources domestiques et l'eau de surface doit être représentative des eaux dans lesquelles les eaux usées sont évacuées. Selon le mode opératoire du European Technical Guidance Document, toutefois difficile à reproduire en pratique, les valeurs par défaut de concentration de matières solides en suspension et de demande biologique en oxygène (DBO) atteignent respectivement 450 mg/l et 270 mg/l dans l'eau usée (22). En Amérique du Nord, les eaux usées contiennent habituellement de 100 à 350 mg/l de solides en suspension et sont caractérisées par une demande biologique en oxygène de 100 à 400 mg/l de selon leur force (23).

### **Collecte, transport et stockage des échantillons environnementaux**

18. L'eau usée doit être collectée au niveau d'un point d'accès à l'égout ou à l'entrée d'une station d'épuration des eaux usées. Il faut noter la température de l'échantillon au moment de la collecte. Il faut s'assurer que la température de l'eau usée pendant le transport ne dépasse jamais significativement la



température utilisée dans l'essai. L'eau usée est habituellement stockée à la température de l'essai sous agitation lente. Les échantillons ne doivent pas être congelés.

19. L'eau de surface doit être collectée sur un site sur lequel les apports en eau usée sont connus. Il faut noter la température des échantillons au moment de la collecte. Pendant le transport, la température de l'échantillon ne doit pas dépasser significativement la température utilisée dans l'essai. L'eau de surface est habituellement stockée à la température de l'essai sous aération continue. Les échantillons ne doivent pas être congelés.

### **Préparation des traitements expérimentaux**

20. L'eau usée récemment collectée doit être pratiquement exempt de grosses particules. La quantité totale de solides en suspension, le pH et la demande chimique en oxygène (DCO) doivent être déterminés dans l'eau usée. Éventuellement, on analysera le  $\text{NH}_3$ , le carbone organique et on réalisera un comptage sur boîte standard. Il faut caractériser l'eau de surface par mesure de la quantité totale de solides en suspension, de la dureté totale et du pH, et éventuellement par une analyse du carbone organique et un comptage sur boîte standard. Un volume suffisant d'eau usée est ajouté à l'eau de surface pour obtenir la dilution souhaitée de l'eau usée dans l'eau de surface. Le pH, la demande chimique en oxygène et la quantité totale de solides en suspension du mélange d'eau de surface préparé doivent être mesurés. En option, on peut réaliser un comptage sur boîte standard, une analyse du  $\text{NH}_3$  et du carbone organique.

21. Le traitement abiotique est habituellement préparé à l'aide d'une combinaison de stérilisations chimique et thermique. Une approche reconnue consiste à ajouter du chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2 = 0.1 \text{ g/l}$ ) à l'eau usée, qui est ensuite autoclavée pendant au moins 90 minutes à une température d'environ  $121^\circ\text{C}$  et à une pression d'environ 15 psi. Le volume de milieu est généralement inférieur ou égal à la moitié du volume du récipient qui est autoclavé (par exemple 500 ml d'eau de surface dans un récipient de 1 l). Après refroidissement, le pH du milieu de traitement abiotique est mesuré et ajusté à la même valeur que celui du milieu biologiquement actif. D'autres méthodes de désactivation du milieu de traitement peuvent également être envisagées pour réduire la quantité de déchets particuliers.

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

22. De préférence, il faut utiliser de l'eau distillée pour préparer les solutions mères des substances d'essai et de référence. S'il y a lieu, on peut employer une méthode différente pour solubiliser ou disperser le produit chimique d'essai de façon à simuler son entrée normale dans l'environnement. Il est possible d'utiliser des solvants miscibles à l'eau et non toxiques s'il s'agit là du seul moyen de mener l'essai, mais il conviendra alors de tenir compte de la charge organique introduite par l'addition de solvants organiques. L'échantillon peut également être ajouté sous forme pure au système expérimental selon un mode d'application qui optimise sa distribution uniforme et rapide dans les milieux expérimentaux. L'adsorption de la substance d'essai sur un support solide inerte, qui est ensuite introduit dans le système expérimental, peut convenir à des composés de médiocre solubilité généralement associés dans l'eau usée à des matières solides en suspension. S'il est impossible de distribuer uniformément la substance d'essai dans le système expérimental avant le premier prélèvement, on peut préparer des systèmes individuels destinés à un échantillonnage destructif à chaque point de prélèvement.

23. Le volume de solution mère ajouté doit permettre d'assurer une distribution rapide et uniforme de la substance d'essai dans le milieu de traitement et l'application d'une dose précise dans les expériences identiques. Dans l'idéal, lorsqu'on introduit des solutions aqueuses, le volume ajouté doit être supérieur ou égal à 2 ml et inférieur à 10 ml ; et s'il s'agit de solvants non toxiques, le volume est inférieur à 0.1 ml/l. Si besoin est, les solutions appliquées peuvent être préparées à l'avance et réfrigérées. L'activité de la solution mère doit être vérifiée par comptage à scintillation liquide.

### **Conditions expérimentales**

#### **Température expérimentale**

24. De préférence, l'incubation se déroule à l'obscurité, ou bien sous une lumière diffuse à une température contrôlée, qui peut être la température in situ ou une température de laboratoire standard de 20-25 °C.

#### **Agitation**

25. Pour maintenir les solides en suspension, les récipients expérimentaux sont soumis à une agitation minimale au moyen d'un mélange ou d'une agitation continu.

#### **Durée de l'essai**

26. La durée de l'essai doit permettre d'évaluer l'ampleur et la vitesse de biodégradation du produit chimique d'essai pendant son temps de séjour normal dans la zone de mélange eau usée-eau de surface. La période d'essai s'étend normalement sur 28 jours. Elle peut être prolongée pour obtenir des points de données supplémentaires permettant de calculer les constantes cinétiques ou de déterminer si la dégradation est intégrale dans les conditions de l'essai. Inversement, elle peut être interrompue avant le temps imparti si la dégradation a atteint un plateau.

#### **Nombre de récipients expérimentaux**

27. Il doit y avoir au minimum un récipient expérimental en conditions abiotiques et un récipient expérimental en conditions biotiques pour chaque substance d'essai et chaque concentration de substance d'essai. Chaque traitement peut être répété par des expériences identiques pour la mesure de variance (par exemple 3 expériences identiques). Toutefois, l'amélioration de la qualité des données cinétiques obtenues dépend davantage de l'augmentation du nombre d'échantillons prélevés au cours d'un même traitement que de l'augmentation du nombre d'expériences identiques.

### **MODE OPERATOIRE**

#### **Application de la substance**

28. Au début de l'essai, le dispositif de fermeture du récipient expérimental est retiré et la substance d'essai est quantitativement ajoutée directement dans le milieu de traitement sous agitation constante. Il est recommandé d'administrer la dose progressivement en dessous de l'interface air-eau afin d'assurer une distribution uniforme de la substance d'essai dans l'eau usée. L'application est identique dans les milieux de traitements biotiques et abiotiques. Généralement, les systèmes biotiques reçoivent la substance en premier, et ensuite les systèmes abiotiques. Un respect scrupuleux de la chronologie est généralement plus critique pour les traitements biotiques que pour les traitements abiotiques à des fins d'analyses cinétiques.

#### **Calendrier de l'échantillonnage**

29. Les intervalles entre les prélèvements sont définis en s'appuyant sur les données de biodégradation disponibles ou les résultats d'une étude préliminaire, car il n'existe pas de calendrier d'échantillonnage établi universellement applicable. Un programme recommandé pour un produit chimique rapidement dégradé pourrait inclure des points à 15, 30 et 60 minutes, et des prélèvements supplémentaires à 2, 5, 8, 12 et 24 heures et aux jours 2, 3, et 7 et ensuite une fois par semaine. Pour un

produit chimique à dégradation lente, le calendrier doit être adapté afin d'obtenir un nombre de mesures suffisant pendant la phase de dégradation.

### **Mesure de la minéralisation**

30. La minéralisation peut être mesurée par des méthodes directes ou indirectes.

#### **Mesure indirecte du $^{14}\text{CO}_2$**

31. Des échantillons issus d'expériences individuelles (par exemple 1 ml) sont prélevés dans chaque milieu de traitement et introduits dans des flacons séparés qui contiennent une quantité suffisante d'acide (par exemple 1 ml de HCl 0,1 N) pour abaisser le pH de l'échantillon à une valeur inférieure à 2 et ils sont placés dans une hotte.

32. Les échantillons sont soumis à un barbotage d'air pendant plusieurs heures, ou bien laissés au repos une nuit pour permettre le dégagement du  $^{14}\text{CO}_2$  dissous dans les échantillons. Ils sont combinés avec un cocktail de scintillation approprié à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide. Le pourcentage de  $^{14}\text{CO}_2$  est calculé par la différence entre le nombre total de coups dans les échantillons biotiques et le nombre total dans les échantillons abiotiques.

#### **Mesure directe du $^{14}\text{CO}_2$**

33.  $\text{CO}_2$  dégagé : Le premier piège basique de la série est retiré et rapidement fermé. Les autres pièges sont déplacés vers l'avant dans le même ordre, un piège neuf est posé derrière les pièges précédents et le système de piégeage est reconnecté aussi rapidement que possible. Des fractions d'échantillons d'expériences individuelles (par exemple 1 ml) prélevés dans le piège basique sont transférées dans des flacons à scintillation, puis combinées avec un cocktail de scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide.

34.  $^{14}\text{CO}_2$  dissous : des échantillons (par exemple 10 à 25 ml) sont prélevés par l'orifice d'échantillonnage du flacon expérimental. Ils sont ensuite placés dans des récipients (par exemple Bellco Glass Biometer 2556-10250) contenant un compartiment rempli d'une substance absorbant le  $\text{CO}_2$  appropriée (par exemple KOH 1.5 N). Les récipients sont hermétiquement fermés et on ajoute suffisamment d'acide (par exemple HCl 6 N) pour abaisser le pH des échantillons en dessous de 2 sans ouvrir les récipients à l'atmosphère (voir annexe 1). On laisse reposer les échantillons pendant une durée suffisante (par exemple une nuit) pour permettre le dégagement du  $\text{CO}_2$  contenu dans la solution et son piégeage dans l'espace libre par le sorbant. Des échantillons de sorbant sont combinés avec un cocktail à scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et ils sont analysés par comptage à scintillation liquide.

#### **Mesure indirecte de $^3\text{H}_2\text{O}$**

35. Des échantillons issus d'expériences individuelles (par exemple 1 ml) sont prélevés dans chaque milieu de traitement et introduits dans des flacons séparés qui contiennent une quantité suffisante d'acide (par exemple 1 ml de HCl 0,1 N) pour abaisser le pH de l'échantillon à une valeur inférieure à 2 et ils sont placés dans une hotte.

36. La moitié des échantillons est immédiatement analysée directement par comptage à scintillation liquide pour obtenir une « mesure en conditions humides ». On laisse les autres échantillons sécher complètement pour éliminer le  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Les échantillons sont combinés avec un cocktail à scintillation qui convient à la matrice d'échantillons et analysés par comptage à scintillation liquide. Le pourcentage de  $^3\text{H}_2\text{O}$  est calculé d'après la différence entre le nombre total de coups dans les échantillons humides et le

nombre de coups dans les échantillons secs et la quantité initiale de radioactivité introduite dans les échantillons.

### **Mesure de la radioactivité totale dans le mélange eau usée-eau de surface**

37. Des échantillons de petit volume (par exemple 1 ml) sont directement analysés par comptage à scintillation liquide pour quantifier la radioactivité présente dans chaque milieu de traitement au cours du temps. Ces mesures sont utilisées pour confirmer que la récupération de radioactivité à partir des échantillons extraits est acceptable et pour contrôler la volatilisation.

### **Mesure de la substance parent et des produits de dégradation**

#### **Extraction**

38. On prélève un échantillon dans le milieu de traitement abiotique et un dans le milieu biotique. Le volume de ces échantillons est généralement supérieur ou égal 10 ml, mais dépend toutefois de la concentration expérimentale, de l'activité spécifique et de la sensibilité des protocoles analytiques.

39. Diverses approches peuvent être envisagées pour concentrer et extraire les échantillons. Une méthode reconnue adaptée à l'analyse des produits chimiques d'essai non volatils implique la congélation éclair des échantillons, puis la lyophilisation et l'extraction du résidu séché dans un ou plusieurs solvants appropriés au parent et aux produits de dégradation. La congélation éclair arrête soudainement l'activité biologique sans hydrolyse ni autre altération des substances d'essai labiles. Il s'agit d'un processus rapide lorsque la profondeur du bain de glace sèche/acétone ou d'azote liquide permet de submerger le tube d'échantillon. Le niveau du bain doit être situé au-dessus du niveau de l'échantillon dans le tube. Les solides lyophilisés sont extraits. Les solides extraits peuvent être récupérés par centrifugation ou filtration ; le filtre doit être compatible avec le type de solvant (par exemple, aqueux ou non aqueux). Les extraits obtenus peuvent être concentrés par évaporation préalablement à l'analyse et à la détermination de la radioactivité totale par comptage à scintillation liquide.

40. Lorsque les substances d'essai sont volatiles, l'échantillon peut être soumis successivement à une filtration et à une extraction en phase solide sur colonne ou sur disque, avec une élution consécutive par des solvants appropriés pour récupérer la substance parent et les produits de dégradation. Il est également possible d'extraire directement les échantillons aqueux dans un système de solvant approprié, puis de les filtrer pour recueillir les solides de la biomasse. La radioactivité totale dans tous les extraits est déterminée par comptage à scintillation liquide. La concentration des extraits contenant des substances d'essai ou des produits de dégradation volatils demande certaines précautions.

41. Il est possible d'utiliser encore d'autres approches, mais dans tous les cas, il est important de décrire en détail les récupérations et de tenir compte de la période d'arrêt de l'activité biologique et de l'intégrer dans les durées expérimentales reportées dans les analyses cinétiques.

#### **Analyse de la substance parent et des produits de dégradation**

42. L'abondance relative de la substance parent et des produits de dégradation dans les extraits peut être déterminée par le biais de la chromatographie sur couche mince (CCM), de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ou d'autres techniques de séparation associées à une détection de la radioactivité.

43. Lorsqu'il existe des méthodes analytiques spécifiques sensibles, la biodégradation primaire peut être évaluée en substituant une mesure de la concentration résiduelle totale des substances d'essai et des produits de dégradation aux techniques radio-isotopiques.

#### **Caractérisation des produits de dégradation**

44. Dans la mesure du possible, il faut comparer le comportement chromatographique des pics inconnus à celui des produits de dégradation prédits, dès lors qu'il existe des étalons authentiques. Habituellement, la quantité et la pureté des produits de dégradation issus de cet essai ne permettent pas une identification concluante par d'autres moyens directs. En fonction du comportement chromatographique, il est généralement possible de déterminer si un métabolite est plus polaire ou moins polaire que son parent. Cette information, associée à la mise en œuvre de réactions biochimiques connues et à la chronologie d'apparition et de disparition d'un métabolite dans la séquence de biodégradation peut donner des indices supplémentaires pour l'identifier. Si nécessaire, le  $P_{oe}$  des produits de dégradation principaux peut être estimé par CLHP (par exemple [Ligne directrice 117 de l'OCDE 117] (24)) en utilisant un détecteur de radioactivité en ligne.

#### **Mesure des solides extraits et incorporation dans la biomasse**

45. Les filtres contenant les solides extraits peuvent être brûlés pour déterminer le niveau d'activité résiduelle dans les solides. Cependant, lorsque le  $^{14}\text{CO}_2$  dissous est présent en grande quantité, le filtre retient les microorganismes et les carbonates. Dans ces conditions, le filtre sera immergé dans une solution d'acide faible (1 ml de HCl 0.1N) pendant une durée suffisante (par exemple une nuit) pour permettre le dégagement du  $^{14}\text{CO}_2$  dissous dans les échantillons avant l'analyse par comptage à scintillation liquide. Un niveau de radioactivité dans les solides biotiques supérieur à celui mesuré dans les solides du témoin abiotique indique habituellement à une incorporation de la radioactivité dans la biomasse.

#### **Mesure de la radioactivité volatilisée**

46. Dans le cas de substances d'essai volatiles, les pièges à matières volatiles sont extraits par des solvants appropriés et la radioactivité dans les extraits est analysée par comptage à scintillation liquide. L'abondance relative de la substance parente et des produits de dégradation dans le ou les extraits peut être déterminée comme dans les paragraphes précédents.

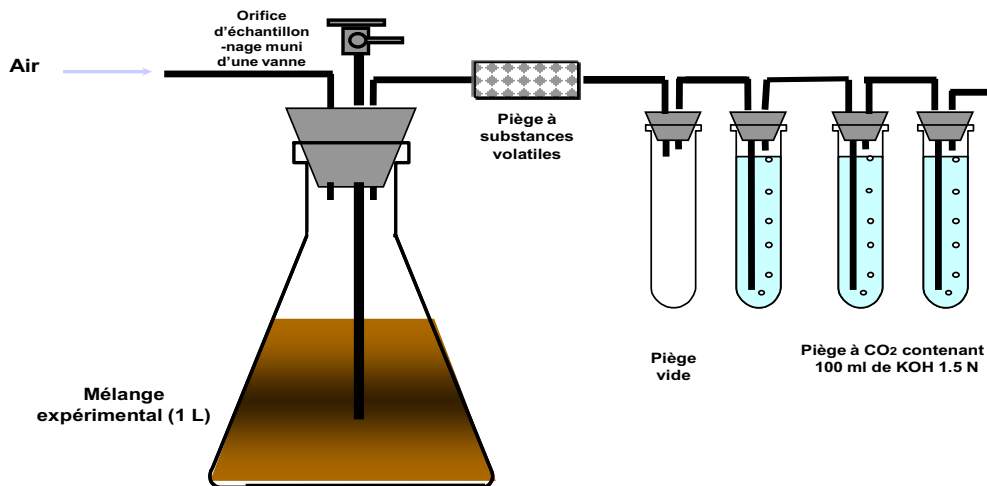
**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) OCDE (1992). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 301: [Biodégradabilité Facile](#). OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2001). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 303: Essai de simulation - Traitement aérobie des eaux usées. OCDE, Paris.
- (3) OCDE (2004). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 309: Minéralisation aérobie dans les eaux superficielles – Essai de simulation de la biodégradation. OCDE, Paris.
- (4) OCDE (2006). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 310: Biodégradabilité facile - dégagement de CO<sub>2</sub> dans des flacons hermétiquement clos (essai de l'espace libre au-dessus du liquide) OCDE, Paris
- (5) OCDE (2006). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 311: Essai de biodégradabilité anaérobie des composés organiques dans une boue digérée : mesure du dégagement gazeux. OCDE, Paris.
- (6) Matthijs, E.; Debaere, G.; Itrich, N.R.; Masscheleyn, P.; Rottiers, A.; Stalmans, M.; Federle, T.W. (1995). The Fate of Detergent Surfactants in Sewer Systems. *Water Sci Technol.* 13:321-328.
- (7) Federle, T.W.; Itrich, N.R. (1997). A comprehensive approach for assessing the kinetics of primary and ultimate biodegradation of chemicals in activated sludge: Application to linear alkylbenzene sulfonate (LAS). *Environ Sci. & Technol.* 31:3597-3603.
- (8) Itrich, N.R.; Federle, T.W. (2004). Effect of ethoxylate number and alkyl chain length on the pathway and kinetics of linear alcohol ethoxylate biodegradation in activated sludge. *Environ. Toxicol. Chem* 23: 2790-2798.
- (9) Federle, T.W.; Itrich, N.R. (2006). Fate of free and linear alcohol ethoxylate derived fatty alcohols in Activated Sludge. *Ecotox. Environ. Safety* 64: 30-41.
- (10) Steber, J; Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with <sup>14</sup>C-labelled model surfactants. *Water Res.*, 21, 661-667.
- (11) Nuck, B.A; Federle, T.W. (1996). Batch test for assessing the mineralization of <sup>14</sup>C radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ Sci. & Technol* 30: 3597-3600
- (12) OCDE (1995). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 105: Solubilité dans l'eau. OCDE, Paris.
- (13) OCDE (1981). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 112: Constante de dissociation dans l'eau. OCDE, Paris.
- (14) OCDE (1995). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 104 : Pression de vapeur. OCDE, Paris.
- (15) OCDE (2004). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 111: Hydrolyse en fonction du pH. OCDE, Paris.

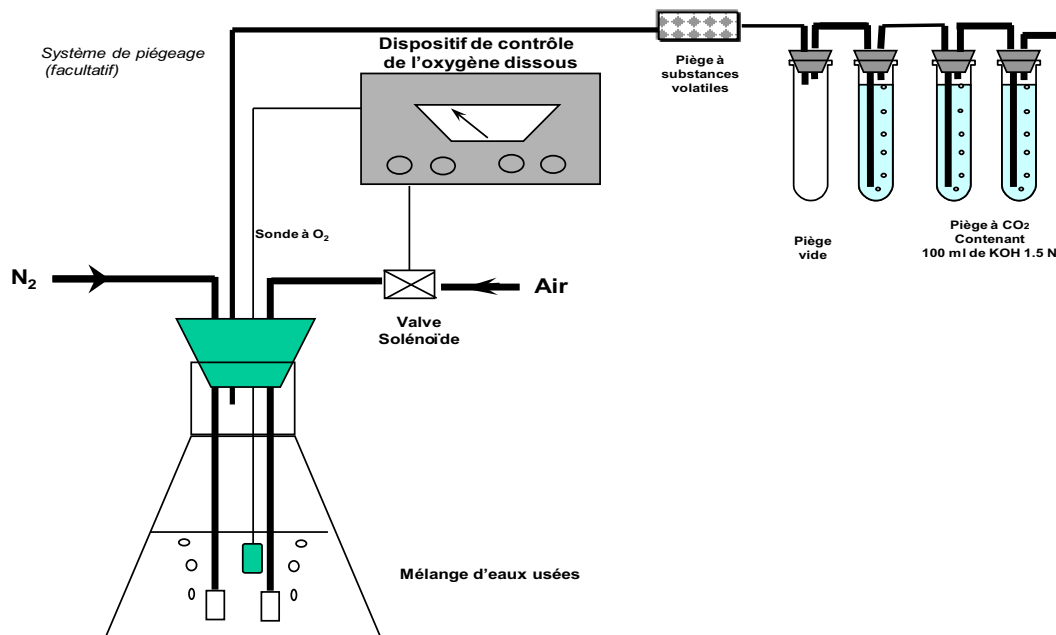
- (16) OCDE (1984). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 209: Boue activée, essai d'inhibition de la respiration. OCDE, Paris.
- (17) OCDE (1981). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 302 A: Biodégradabilité dite intrinsèque: Méthode SCAS modifiée. OCDE, Paris.
- (18) OCDE (1992). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 302 B: Biodégradabilité dite intrinsèque : Essai Zahn-Wellens. OCDE, Paris.
- (19) OCDE (1981). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 302 C: Biodégradabilité dite intrinsèque: Essai MITI modifié (II). OCDE, Paris.
- (20) Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration (2006). Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version 2.0, 434 pp.
- (21) Holman, W.F. Estimating the Environmental Concentrations of Consumer Product Components. (1981). Aquatic Toxicology and Hazard Assessment -4<sup>th</sup> Conference, pp. 159-182. Branson, D.R. Dickson, K.L., eds. STP 737. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- (22) Bureau européen des substances chimiques (2003) Technical Guidance Document on Risk Assessment: Part II. Centre commun de recherche de la Commission européenne.
- (23) Tchobanoglous G and Burton FL (Revs). (1991). Wastewater Engineering: treatment, disposal and reuse / Metcalf & Eddy, Inc. McGraw-Hill. New York, NY, USA.
- (24) OCDE (2004). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. LD 117: Coefficient de partage (n-octanol/eau), méthode HPLC. OCDE, Paris.
- (25) Sutherland, I.W.; Wilkinson, J.F. (1971) In Methods in Microbiology. Vol 5B. Norris, J.R., D.W. Eds. Academic Press, Inc, New York, pp 345-383.
- (26) *Nature* **218**, 472-473 (4 May 1968) Tritium exchange from compounds in dilute aqueous solutions, Waterfield WR, Spanner JA, Stanford FG

ANNEXE 1

### Exemple de dispositif expérimental à écoulement continu



### Exemple de dispositif expérimental à écoulement continu et oxygène dissous contrôlé





**Exemple de récupération du  $^{14}\text{CO}_2$  dissous**

Orifice muni  
d'une valve pour  
acidifier  
l'échantillon

Echantillon prélevé  
dans le récipient  
expérimental  
(10 – 20 ml)

KOH 1.5 N  
(1 – 2 ml)

**Exemple de dispositif expérimental anaérobie à  
Écoulement continu**

