

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

Détermination de l'inhibition de l'activité des bactéries anaérobies - Réduction de la production de gaz par une boue (d'eaux usées) à digestion anaérobie

INTRODUCTION

1. Les produits chimiques rejetés dans l'environnement aquatique traversent des zones aérobies et des zones anaérobies, dans lesquelles ils peuvent être dégradés et/ou ils peuvent inhiber l'activité bactérienne ; dans certains cas, ils peuvent demeurer dans des zones anaérobies pendant des décennies ou des durées plus longues sans perturbation aucune. Lors du traitement des eaux usées, la première étape, la décantation primaire, est aérobie dans le liquide surnageant et anaérobie dans les boues sous-nageantes. Ensuite, l'étape secondaire fait intervenir une zone aérobie dans le bassin d'aération à boues activées et une zone anaérobie dans la boue sous-nageante dans le bassin de décantation secondaire. Les boues issues de ces deux étapes sont généralement soumises à un traitement anaérobie, et produisent alors du méthane et du dioxyde de carbone habituellement utilisés en production d'électricité. Dans les milieux moins confinés, les produits chimiques qui rejoignent les sédiments dans les baies, les estuaires et la mer ont toutes les chances de rester dans ces zones anaérobies indéfiniment s'ils ne sont pas biodégradables. Certaines propriétés physiques telles qu'une médiocre solubilité dans l'eau, une capacité d'adsorption élevée sur les solides en suspension, ou une inaptitude à la biodégradation aérobie permettront à quelques produits chimiques d'atteindre ces zones en proportions plus importantes.

2. Il est préférable que les produits chimiques rejetés dans l'environnement soient biodégradables en conditions anaérobies et aérobies, mais il est également essentiel qu'ils n'inhibent pas l'activité des microorganismes dans l'une ou l'autre zone. Au Royaume-Uni, quelques cas d'inhibition complète de la production de méthane due, par exemple, au pentachlorophénol présent dans les décharges industrielles, ont été signalés, qui ont engendré des frais considérables de transport des boues inhibées depuis les digesteurs vers des sites "sûrs" et d'importation de boue de digestion non contaminée en provenance d'installations proches. Il existe toutefois de nombreux cas d'interruption moins drastiques de la digestion par plusieurs autres produits chimiques, notamment des hydrocarbures aliphatiques halogénés (nettoyage à sec) et des détergents, qui nuisent gravement à l'efficacité des digesteurs.

3. Seule la Ligne directrice pour les essais de l'OCDE 209 (1) traite de l'inhibition de l'activité bactérienne (Respiration de boue active), et évalue l'effet de substances d'essais sur la vitesse d'absorption de l'oxygène en présence de substrat. La méthode a été largement utilisée en guise d'alerte précoce d'effets potentiellement nocifs de produits chimiques sur le traitement aérobie des eaux usées, ainsi que pour déterminer les concentrations non inhibitrices des substances d'essai susceptibles d'être utilisées dans les divers essais de biodégradabilité. La Ligne directrice pour les essais de l'OCDE 311 (2) permet de déterminer dans une certaine mesure la toxicité d'une substance d'essai sur la production de gaz par une boue anaérobie, diluée dix fois par rapport à sa concentration normale de solides afin d'obtenir la précision requise dans l'évaluation du pourcentage de biodégradation. Les boues diluées étant parfois plus sensibles aux substances inhibitrices, le groupe ISO a décidé de mettre au point une méthode employant une boue non diluée. Trois textes au moins ont été examinés (issus du Danemark, de l'Allemagne et du Royaume-Uni), pour aboutir finalement à la mise au point de deux normes ISO, l'une employant une boue non

diluée, ISO 13 641-1 (3) et l'autre une boue diluée cent fois, ISO 13 641-2 (4), dans l'objectif de représenter les vases et les sédiments à faibles populations bactériennes. Les deux méthodes ont été soumises à un essai tournant (5) ; la première a été reconnue comme une norme acceptable, mais la seconde n'a pu faire l'objet d'un accord. Le Royaume-Uni a considéré que la proportion importante de participants signalant une production de gaz très faible ou nulle, en partie parce que la proportion de l'espace gazeux était trop élevée (75 %) pour une sensibilité optimale, appelait à un nouvel examen de la méthode.

4. Des travaux préalables menés au Royaume-Uni (6)(7) font état d'une méthode manométrique sur boue de digestion non diluée additionnée de boue d'eaux usées à titre de substrat, dans des récipients de 500 ml ; l'appareil était encombrant et l'odeur de la boue brute nauséabonde. Par la suite, l'appareil plus compact et plus pratique de Shelton et Tiedje (8), amélioré par Battersby et Wilson (9) a été exploité avec succès par Wilson et al. (10). Kawahara et al (11) sont parvenus à préparer des boues plus homogènes au laboratoire, pour les utiliser dans des essais de biodégradabilité anaérobie et d'inhibition sur plusieurs produits chimiques. De surcroît, le substrat de boue brute a été remplacé afin de procéder à l'essai avec une boue anaérobie diluée cent fois ou avec des vases, des sédiments, etc., à faible activité bactérienne.

5. Cette méthode permet d'obtenir des informations utiles pour prédire l'effet probable d'une substance d'essai sur la production de gaz dans des digesteurs anaérobies. Toutefois, seuls des essais plus longs qui simulent plus rigoureusement le fonctionnement de digesteurs sont capables d'indiquer si les microorganismes peuvent s'adapter à la substance d'essai ou si ces substances susceptibles d'être absorbées ou adsorbées sur les boues peuvent s'accumuler jusqu'à atteindre une concentration toxique, sur une période plus longue que celle testée dans cet essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des fractions aliquotes d'un mélange de boue à digestion anaérobie (20 g/l à 40 g/l de matières solides totales) et d'une solution de substrat dégradable sont incubées seules et, en parallèle, avec la substance en quantités comprises dans un intervalle de concentrations, dans des récipients scellés, pendant une durée pouvant atteindre trois jours. La quantité de gaz produits (méthane plus dioxyde de carbone) est mesurée par l'augmentation de la pression (Pa) dans les flacons. Les pourcentages d'inhibition de la production de gaz attribuables aux diverses concentrations de la substance d'essai sont calculés à partir des quantités produites dans les flacons d'essai et témoins respectifs. La CE_{50} et d'autres concentrations efficaces sont calculées à partir des courbes du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des produits chimiques d'essai, ou, le plus souvent, de son logarithme.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Les substances d'essai sont habituellement utilisées sous la forme la plus pure facilement accessible, car les impuretés contenues dans certaines substances, par exemple, les chlorophénols, sont parfois plus toxiques que la substance d'essai elle-même. L'utilisation en routine de produits formulés est déconseillée, mais convient parfois pour les substances d'essais de solubilité médiocre. Il convient de connaître les propriétés suivantes de la substance d'essai : solubilité dans l'eau et dans certains solvants organiques, pression de vapeur, coefficient d'adsorption, hydrolyse et biodégradabilité en conditions anaérobies.

CHAMP D'APPLICATION DE LA METHODE

8. Cet essai s'applique à des substances solubles ou insolubles dans l'eau, y compris les substances volatiles. Toutefois, des précautions particulières sont indispensables avec les matériaux à faible solubilité dans l'eau (voir réf. (12)) et à volatilité élevée. Il est également possible d'utiliser des inoculums provenant d'autres sites anaérobies, par exemple, vases, sols saturés et sédiments. Les systèmes bactériens anaérobies préalablement exposés à des substances toxiques peuvent être adaptés de façon à ce que leur activité soit maintenue en présence de produits chimiques xénobiotiques. Les inoculums issus de systèmes bactériens adaptés font parfois preuve d'une tolérance plus élevée aux substances d'essais que des inoculums obtenus à partir de systèmes non adaptés.

SUBSTANCES DE REFERENCE

9. Pour vérifier le mode opératoire, on teste une substance de référence parallèlement à la substance d'essai dans des récipients appropriés en suivant le même protocole ; le 3,5-dichlorophénol s'est révélé un inhibiteur type de la production de gaz anaérobie, ainsi que de la consommation d'oxygène par les boues activées et d'autres réactions biochimiques. Deux autres produits chimiques présentent une capacité d'inhibition plus élevée que celle du 3,5-dichlorophénol sur la production de méthane, le bis-thiocyanate de méthylène et le pentachlorophénol, mais les résultats les concernant n'ont pas encore été validés. Le pentachlorophénol n'est pas recommandé, car il est difficile à obtenir sous forme pure.

REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS

10. Dans un essai tournant international (5), une reproductibilité seulement moyenne a été relevée entre les valeurs de CE₅₀ de 10 laboratoires participants pour le 3,5-dichlorophénol et d'acide 2-bromo-éthane-sulfonique. (L'intervalle pour le premier allait de 32 mg/l à 502 mg/l et pour le second de 220-2190 mg/l.)

Nombre de laboratoires	En mg/l			En mg/g de boue		
	moyenne	e.t.	cv(%)	moyenne	e.t.	cv(%)
10	<u>3, 5-Dichlorophénol</u>					
	153	158	103	5	4.6	92
10	<u>Acide 2-bromo-éthane-sulfonique</u>					
	1058	896	85	34	26	76

Données CE₅₀ de l'essai tournant – boue non diluée

11. Les coefficients de variations élevés entre les laboratoires s'expliquent dans une large mesure par des différences de sensibilité des microorganismes des boues qui ont été ou non préalablement exposés à la substance d'essai ou à d'autres substances de même nature chimique. La précision de la détermination de la valeur de CE₅₀ en fonction de la concentration de boue était à peine meilleure que celle de la valeur "volumétrique" (mg/l). Dans les trois laboratoires ayant indiqué la précision de leur valeur de CE₅₀ pour le 3,5-dichlorophénol, les coefficients de variation étaient nettement inférieurs (22, 9, et 18 % respectivement pour la CE₅₀ en mg/g) que ceux des moyennes des dix laboratoires réunies. Les moyennes individuelles des

trois laboratoires s'élevaient à 3.1, 3.2 et 2.8 mg/g, respectivement. Les coefficients de variation plus faibles et acceptables au sein d'un même laboratoire, comparés aux coefficients beaucoup plus élevés entre les valeurs des laboratoires, c'est-à-dire 9-22 % cf. 92 %, révèlent des différences significatives entre les propriétés des boues individuelles.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Appareillage

12. L'utilisation de matériel courant de laboratoire et des équipement suivants est requise :

(a) Incubateur – anti-étincelles et thermostaté à $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;

(b) Récipients expérimentaux en verre résistant à la pression d'une capacité¹ nominale appropriée, munis d'un septum étanche au gaz, capable de supporter une pression d'environ 2 bars ou 2×10^5 Pa (le revêtement utilisé sera, par exemple du PTFE = polytétrafluoréthylène). L'utilisation de flacons à sérum en verre d'un volume nominal de 125 ml, et d'un volume réel d'environ 160 ml, obturé par des septum² adaptés aux flacons à sérum et des capsules en aluminium serties est recommandée ; il est également possible d'utiliser des flacons d'un volume total compris entre 0.1 et 1 litre ;

(c) Manomètre de précision³ et aiguilles fixées

La production totale de gaz (méthane plus dioxyde de carbone) est mesurée à l'aide d'un manomètre capable de mesurer et d'évacuer les gaz produits, par exemple, un manomètre de précision manuel relié à une aiguille de seringue ; un robinet à trois voies étanche aux gaz permet la libération de la pression excédentaire (ANNEXE 1). Le volume interne des tuyaux et du

¹ La capacité préconisée est comprise entre 0.1 et 1 litre.

² Il est recommandé d'utiliser des septums en silicone étanche au gaz et de vérifier l'étanchéité au gaz des bouchons, en particulier les septums en caoutchouc butylique, car plusieurs types de septum vendus dans le commerce ne sont pas suffisamment étanches au méthane et certains ne sont plus étanches une fois qu'ils ont été percés par une aiguille dans les conditions de l'essai.

- Les septums revêtus étanches au gaz sont recommandés et doivent être utilisés pour les substances volatiles (certains septum du commerce sont relativement minces, d'une épaisseur inférieure à 0.5 cm, et ne sont plus étanches après avoir été percés par une aiguille de seringue) ;
- Les septums en caoutchouc butylique (environ 1 cm) sont recommandés, si les substances d'essai ne sont pas volatiles (ils sont normalement toujours étanches au gaz après avoir été percés).
- Il est conseillé de vérifier soigneusement avant le test que les septum restent étanches au gaz après avoir été percés.

³ Le manomètre doit être utilisé et étalonné régulièrement, conformément aux instructions du fabricant. Si l'on utilise un manomètre de la qualité prescrite, par exemple encapsulé avec une membrane en acier, il n'est pas nécessaire de l'étalonner au laboratoire, mais cette opération sera effectuée par un institut autorisé aux intervalles recommandés. L'exactitude de l'étalonnage peut être vérifiée au laboratoire par une mesure unique à 1×10^5 Pa sur un manomètre à affichage mécanique. Une mesure correcte de ce point assure que la linéarité n'a pas non plus changée. Lorsque l'on utilise d'autres dispositifs de mesure (sans étalonnage certifié par le fabricant), il est recommandé de procéder à une reconversion sur l'intervalle total à intervalles réguliers (ANNEXE 2).

robinet du transducteur de pression doit être aussi faible que possible, de telle sorte que les erreurs introduites en négligeant le volume de l'appareillage restent insignifiantes ;

(d) Récipients isolés, pour le transport des boues de digestion ;

(e) Robinets à pression trois voies ;

(f) Tamis, avec une ouverture de maille de 1 mm ;

(g) Réservoir, pour la boue de digestion, flacon en verre ou en polyéthylène haute densité, d'un volume d'environ 5 litres, muni d'un agitateur et d'un dispositif permettant le passage d'un courant d'azote gazeux (voir paragraphe 13) dans l'espace libre ;

(h) filtres membranaires (0.2 µm) pour stériliser le substrat ;

(i) micro-seringues, pour la connexion étanche au gaz du transducteur de pression (voir paragraphe 12(c)) à l'espace libre des bouteilles (voir paragraphe 12(b)) ; elles servent également à ajouter les matériaux d'essai liquides dans les flacons ;

(j) boîte à gants, en option, mais recommandée, avec une pression d'azote légèrement positive.

Réactifs

13. Des réactifs de qualité analytique sont utilisés dans tout l'essai. Il faut toujours utiliser de l'azote gazeux très pur avec une concentration d'oxygène inférieure à 5 µl/l.

Eau

14. Si une dilution s'avère nécessaire à quelque étape que ce soit, il convient d'utiliser de l'eau désionisée préalablement désaérée. Il n'est pas indispensable de contrôler analytiquement cette eau, mais plutôt de s'assurer que l'appareil de désionisation est régulièrement entretenu. Les solutions mères doivent également être préparées avec de l'eau désionisée. On s'assurera que toutes les solutions ou les dilutions du matériel d'essai sont exemptes d'oxygène avant d'y ajouter l'inoculum anaérobie. Cette absence peut se vérifier par soufflage d'azote gazeux dans l'eau de dilution (ou dans les dilutions) une heure avant l'addition de l'inoculum, ou bien en chauffant l'eau de dilution jusqu'à son point d'ébullition et en la refroidissant à température ambiante dans une atmosphère sans oxygène.

Boue digérée

15. Les boues de digestion activées sont prélevées dans un digesteur de station d'épuration d'eaux usées, ou bien dans un digesteur de laboratoire, affecté au traitement de boues principalement dérivées d'eaux usées domestiques. Les informations pratiques concernant les boues de digesteurs de laboratoire sont disponibles dans d'autres références (11). S'il est prévu d'utiliser un inoculum adapté, il faudra peut-être envisager de prélever une boue de digestion dans une station d'épuration d'effluents industriels. Pour récolter ces boues, il est préférable d'utiliser des flacons à large ouverture en polyéthylène haute densité ou un matériau similaire, capables de se dilater. Remplir ces flacons de boue jusqu'à environ 1 cm de leur embouchure et les fermer hermétiquement, de préférence avec une soupape de sécurité (paragraphe 12 (e)), et les placer dans des réceptacles isolés (paragraphe 12 (d)) pour réduire au minimum le choc thermique, jusqu'à leur transfert dans un incubateur maintenu à 35 °C ± 2 °C. A l'ouverture des flacons, prendre soin de relâcher la pression de gaz en excès en ouvrant avec précaution le bouchon, ou grâce au robinet de libération de la pression trois voies (paragraphe 12 (e)). Il est préférable d'utiliser la boue dans les quelques

heures qui suivent sa récolte ou bien de la conserver à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ sous un espace libre rempli d'azote pendant une durée inférieure à 3 jours, dans le cas où la perte d'activité normale est faible.

Avertissement – Les boues de digestion présentent des risques d'incendie ou d'explosion à cause des gaz inflammables qu'elles dégagent : elles renferment également des organismes potentiellement pathogènes, de sorte que ces boues sont à manipuler avec prudence. Pour des raisons de sécurité, il n'est pas conseillé de recueillir les boues dans des récipients en verre.

Inoculum

16. Immédiatement avant son utilisation, mélanger la boue par agitation douce et la faire passer sur un tamis à mailles de 1 mm^2 (paragraphe 12(f)) avant de l'introduire dans un flacon approprié (paragraphe 12(g)) en la faisant traverser l'espace vide balayé par un courant d'azote. Prélever un échantillon pour la mesure de la concentration des matières solides sèches totales (voir, par exemple, la norme ISO 11 923 (13)). En général, la boue est utilisée sans dilution. La concentration de solides est généralement comprise entre 2 % et 4 % (p/v). Contrôler la valeur du pH de la boue et l'ajuster, s'il y a lieu, à 7 ± 0.5 .

Substrat d'essai

17. Dissoudre 10 g de bouillon nutritif (par exemple Oxoid), 10 g d'extrait de levure et 10 g de D-glucose dans de l'eau désionisée et diluer à 100 ml. Stériliser par filtration sur un filtre membranaire de $0.2\text{ }\mu\text{m}$ (paragraphe 12(h)) et utiliser immédiatement ou conserver à 4 °C pendant une durée inférieure à 1 jour.

Substance d'essai

18. Préparer une solution mère séparée de chaque substance d'essai hydrosoluble de sorte qu'elle contienne, par exemple, 10 g/l de la substance dans de l'eau de dilution sans oxygène (paragraphe 14). Utiliser des volumes appropriés de ces solutions mères pour préparer des mélanges réactionnels de concentrations croissantes. Il est également possible de préparer des dilutions en série de chaque solution mère afin d'ajouter un volume identique dans chaque flacon d'essai pour chaque concentration finale requise. Le pH des solutions mères est ajusté à 7 ± 0.2 , s'il y a lieu.

19. Pour les substances d'essai insuffisamment solubles dans l'eau, se reporter à la norme ISO 10 634 (12). Lorsqu'il faut utiliser un solvant organique, il convient d'éviter l'emploi de solvants tels que le chloroforme, et le tétrachlorure de carbone dont le puissant effet d'inhibition de la production de méthane est notoire. Préparer une solution de concentration appropriée de substance insoluble dans l'eau dans un solvant volatil adapté, par exemple, l'acétone ou l'éther diéthylique. Ajouter des volumes nécessaires de solution de solvant aux flacons d'essai vides (paragraphe 12(b)) et évaporer le solvant avant l'addition de la boue. Pour d'autres traitements, consulter la norme ISO 10 634 (12) en gardant à l'esprit que tout tensioactif utilisé pour produire des émulsions peut inhiber la production de gaz anaérobie. Si l'on estime que la présence de solvants organiques et d'agents émulsifiant est susceptible d'engendrer des artefacts, le produit chimique d'essai peut être directement ajouté au mélange d'essai sous forme d'une poudre ou d'un liquide. Il est possible d'injecter les composés volatiles et les composés d'essais liquides insolubles dans l'eau dans les flacons de sérum inoculé à l'aide de micro-seringues (paragraphe 12(i)).

20. Ajouter les substances d'essai aux flacons afin d'obtenir une série géométrique de concentrations, par exemple, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62.5 mg/l, 31.2 mg/l, et 15.6 mg/l. Lorsque l'intervalle de toxicité n'est pas prévisible en se basant sur des substances similaires, il convient de réaliser tout d'abord un essai préliminaire de détermination de l'intervalle de toxicité approprié sur des concentrations de 1000 mg/l, 100 mg/l et 10 mg/l.

Substance de référence

21. Préparer une solution aqueuse de 3,5-dichlorophénol (10 g/l) en ajoutant progressivement la quantité minimale de 5 mol/l de solution d'hydroxyde de sodium au solide, sous agitation, jusqu'à dissolution. Ajouter ensuite de l'eau de dilution désoxygénée (paragraphe 14) pour ajuster le volume requis ; une sonication peut favoriser la dissolution. D'autres substances de référence peuvent être utilisées lorsque l'intervalle moyen de la CE₅₀ a été obtenu dans au moins trois tests employant des inoculums différents (sources différentes ou dates de récolte différentes).

INTERFERENCE/ERREURS

22. Il est vraisemblable que certains des constituants de la boue réagissent avec des inhibiteurs potentiels, ce qui annulera leurs effets sur les micro-organismes, avec pour résultat une inhibition plus faible, voir nulle. En outre, si la boue contient déjà une substance inhibitrice, l'essai avec la substance donnera des résultats erronés. Ces exemples, et de nombreux autres facteurs identifiés, peuvent produire de faux résultats. Ils sont indiqués en Annexe 3, conjointement à des méthodes permettant d'éliminer ou au moins de réduire les erreurs.

MODE OPERATOIRE

23. Le nombre de répétitions requis dépend du degré de précision exigé pour les indices d'inhibition. Si les bouchons des flacons sont suffisamment étanches aux gaz pendant la durée du test, ne préparer qu'un seul lot (au moins trois répétitions) de flacons d'essai à chaque concentration requise. En parallèle, préparer un lot de flacons avec la substance de référence et un ensemble de témoins. Toutefois, lorsque la fiabilité des bouchons des flacons n'est assurée que pour une ou quelques percées, préparer un lot (par exemple trois répétitions) des flacons d'essai pour chaque intervalle de temps (t) auquel sont requis les résultats à toutes les concentrations d'une substance d'essai. Parallèlement, préparer des lots 't' de flacons équivalents pour la substance de référence et les témoins.

24. L'utilisation d'une boîte à gants (paragraphe 12(j)) est recommandée. Au moins 30 minutes avant le début de l'essai, faire passer un courant d'azote à travers la boîte à gants contenant tout l'équipement nécessaire. S'assurer que la température de la boîte est 35 °C ± 2°C pendant la manipulation et la fermeture hermétique des flacons.

Essai préliminaire

25. Lorsque l'activité de la boue est inconnue, il est recommandé de procéder à un essai préliminaire. Préparer des témoins dont les concentrations de matières solides s'élèvent à 10 g/l, 20 g/l et 40 g/l, par exemple, additionnés de substrat, mais sans substance d'essai. Utiliser également différents volumes de mélange réactionnel afin de disposer de trois ou quatre rapports entre volume d'espace libre et volume de liquide. On choisira parmi les résultats de volumes de gaz produits à divers intervalles de temps les conditions les mieux appropriées à l'obtention de deux mesures quotidiennes caractérisées par des volumes significatifs de gaz et une libération de pression par jour avec une sensibilité⁴ optimale sans risque d'explosion.

⁴ Ceci s'applique au modèle expérimental et aux conditions expérimentales dans lesquels les volumes de gaz produits – par les témoins à blanc et les récipients indiquant une inhibition de 70-80 % - peuvent être estimés avec des marges d'erreurs acceptables.

Addition des substances d'essai

26. Ajouter les substances d'essai hydrosolubles aux flacons d'essai vides (paragraphe 12(b)) sous forme de solutions aqueuses (paragraphe 18). Utiliser des lots de flacons comportant au moins trois répétitions pour chaque concentration de l'intervalle (paragraphe 20). Lorsque les substances d'essai sont insolubles ou médiocrement solubles, les injecter en solution dans des solvants organiques à l'aide d'une micro-seringue dans les flacons vides pour préparer des lots de répétition des cinq concentrations de substance d'essai. Evaporer le solvant par purge à l'aide d'un jet d'azote gazeux sur la surface des solutions dans les flacons d'essai. Il est également possible d'ajouter des quantités pesées des produits chimiques insolubles solides directement dans les flacons d'essai.

27. Les substances d'essai liquides insolubles et médiocrement soluble dans l'eau ajoutées sans solvant sont introduites directement par une micro-seringue dans les flacons d'essai après addition de l'inoculum et du substrat d'essai (voir paragraphe 30). Cette technique peut également s'appliquer aux substances d'essai volatiles.

Addition d'inoculum et de substrat

28. Agiter un volume approprié de boue de digestion tamisée (voir paragraphe 16) dans un flacon de 5 litres (paragraphe 12 (g)), en faisant passer un courant d'azote dans l'espace vide. Purger les flacons d'essai, qui contiennent les solutions aqueuses ou les solutions dans un solvant évaporé de substances d'essai, avec un courant d'azote, pendant environ 2 minutes pour éliminer l'air. Répartir des fractions aliquotes, par exemple de 100 ml, de boue bien mélangée dans les flacons d'essai à l'aide d'une pipette à grande pointe ou d'une éprouvette graduée. Il est essentiel de remplir la pipette en une seule fois jusqu'au volume exact de boue nécessaire, car les matières solides de la boue sédimentent facilement. Dans le cas d'un prélèvement trop important, vider la pipette et recommencer.

29. Ajouter ensuite une quantité suffisante de solution de substrat (paragraphe 17) pour ajuster à 2 g/l la concentration dans le mélange de chacun des composants suivants : bouillon nutritif, extrait de levure et D-glucose, tout en poursuivant la purge à l'azote. Le tableau suivant présente un exemple de lots d'essai.

Concentration finale en masse de la substance d'essai dans les flacons d'essai (mg/l)	Volume de substance d'essai (ml)		Réactifs et milieux (m)		
	Solution stock a) 10 g/l para. 18	Solution stock b) 1 g/l para. 18	Dilution dans l'eau para. 14	Inoculum para. 16	Substrat para. 17
0	-	0	1.0	100	2
1	-	0.1	0.9	100	2
3.3	-	0.33	0.67	100	2
10	0.1	-	0.9	100	2
33	0.33	-	0.67	100	2
100	1.0	-	0	100	2

Volume total du flacon = 160 ml. Volume de liquide = 103 ml
 Volume de gaz = 57 ml, soit 35.6 % du volume total.

30. Purger à l'azote de la même manière un nombre suffisant de flacons d'essai vides pour éliminer tout produit volatil et substance d'essai liquide insoluble (voir paragraphe 27).

Témoins et substance de référence

31. Préparer des lots comportant au moins trois répétitions contenant seulement la boue et le substrat, en guise de témoins. Préparer également des flacons en deux exemplaires contenant de la boue et du substrat additionnés d'une quantité suffisante de solution mère de la substance de référence, le 3,5-dichlorophénol (paragraphe 21) pour ajuster la concentration finale à 150 mg/l. Cette concentration devrait inhiber la production de gaz d'environ 50 %. Il est également possible de préparer la substance de référence à plusieurs concentrations couvrant un intervalle. Trois flacons supplémentaires serviront à la mesure du pH, et contiendront la boue, de l'eau désoxygénée et le substrat. Ajouter la substance d'essai à deux flacons à la concentration la plus élevée de l'essai et ajouter de l'eau désoxygénée aux deux autres flacons.

32. Il convient de s'assurer que toutes les flacons, d'essai, de substances de référence et témoins, contiennent le même volume (V_R) de liquide ; s'il y a lieu, ajouter de l'eau désionisée désoxygénée (paragraphe 14) pour ajuster le volume. L'espace libre doit représenter entre 10 % et 40 % du volume du flacon et sa valeur exacte est choisie en se fondant sur les données obtenues dans l'essai préliminaire. Après introduction de tous les constituants dans les flacons, retirer l'aiguille d'alimentation en gaz et fermer hermétiquement chaque flacon avec un bouchon de caoutchouc et une capsule d'aluminium (paragraphe 12 (b)) en humidifiant le bouchon avec une goutte d'eau désionisée pour faciliter son insertion. Mélanger le contenu de chaque flacon par agitation.

Incubation des flacons

33. Transférer les flacons dans l'incubateur thermostaté, muni de préférence d'un dispositif d'agitation et maintenu à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Les flacons sont incubés à l'obscurité. Au bout d'environ 1 heure, équilibrer la pression dans les flacons avec la pression atmosphérique en insérant l'aiguille de seringue, reliée au manomètre (paragraphe 12(c)), à travers le bouchon de chaque flacon, ouvrir le robinet jusqu'à ce que le

manomètre affiche zéro, puis fermer le robinet. Il convient d'insérer l'aiguille à un angle d'environ 45° pour éviter la fuite du gaz contenu dans les flacons. Si les flacons incubés sont dépourvus de dispositif d'agitation, les agiter manuellement deux fois par jour pendant toute la période d'incubation afin d'équilibrer le système. Incuber les flacons en position inversée pour éviter la perte de gaz à travers le septum. Toutefois, l'inversion est déconseillée dans le cas où des substances d'essai insolubles sont susceptibles d'adhérer au fond du flacon.

Mesure de pression

34. Lorsque la température de tous les flacons a atteint $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, mesurer et noter le pH du contenu de deux des quatre flacons préparés à cette fin et en jeter le contenu. Poursuivre l'incubation des flacons restants à l'obscurité. Mesurer et noter la pression dans les flacons deux fois par jour pendant les 48 à 72 heures suivantes en insérant l'aiguille du manomètre à travers le bouchon de chaque flacon, tout à tour, et en séchant l'aiguille entre chaque mesure. Maintenir toutes les parties du flacon à la température d'incubation pendant la mesure, qui doit être réalisée aussi rapidement que possible. Noter la pression après stabilisation de la mesure. Ouvrir ensuite la soupape de ventilation et la refermer lorsque la valeur de la pression est revenue à zéro. L'essai dure habituellement 48 heures à partir de la première égalisation de la pression, désignée par "temps 0". Dans le cas de produits chimiques volatils, le nombre de mesures et de ventilations doit être réduit à un (à la fin de l'incubation) ou deux pour limiter au minimum la perte de substance d'essai (10).

35. Si la mesure de pression donne un résultat négatif, il ne faut pas ouvrir la soupape. Il arrive que de l'humidité s'accumule dans l'aiguille et le tube de la seringue, ce qui se traduit par une valeur de pression faiblement négative. Dans ce cas, retirer la seringue, secouer le tube, le sécher avec un mouchoir en papier et monter une aiguille neuve.

Mesure de pH

36. Mesurer et enregistrer le pH du contenu de chaque flacon après la mesure de pression finale.

RESULTATS ET RAPPORT

Expression des résultats

37. La somme et la moyenne des pressions enregistrées sont calculées à chaque intervalle de temps pour chaque ensemble de flacons de répétition et la pression de gaz globale cumulée moyenne est calculée à chaque intervalle de temps pour chaque lot de répétitions. Tracer les courbes de production de gaz cumulée moyenne (Pa) en fonction du temps pour les flacons témoins, d'essai et de référence. Choisir un point temporel dans la partie linéaire de la courbe, généralement 48 heures, et calculer le pourcentage d'inhibition (I) pour chaque concentration par l'équation [1] :

$$I = (1 - P_t/P_c) \times 100 \text{ - - - - [1]},$$

où

$$\begin{aligned} I &= \text{pourcentage d'inhibition ;} \\ P_t &= \text{pression gazeuse produite avec le matériau d'essai à un instant donné, en Pascal (Pa) ;} \\ P_c &= \text{pression gazeuse produite dans le flacon témoin au même instant, en Pascal (Pa).} \end{aligned}$$

Il est conseillé de tracer deux courbes, la courbe I en fonction de la concentration, et une autre courbe en fonction du logarithme de la concentration, de façon à choisir la courbe la plus proche de la linéarité. La valeur de CE_{50} (mg/l) est évaluée visuellement ou par analyse de régression à partir de la

courbe la plus proche de la linéarité. A des fins de comparaison, il peut être utile d'exprimer la concentration de la substance en mg de substance/g de matières solides sèches totales. Pour obtenir cette concentration, il suffit de diviser la concentration volumique (mg/l) par la concentration volumique des matières solides de la boue sèche (g/l) (paragraphe 16).

38. Calculer le pourcentage d'inhibition obtenu par l'unique concentration de la substance de référence utilisée, ou bien la CE_{50} lorsqu'un nombre suffisant de concentrations a été analysé.

39. Convertir la pression moyenne du gaz produit dans le flacon témoin (PcPa) en volume en se reportant à la courbe d'étalonnage du manomètre (ANNEXE 2) et de calculer ainsi le rendement en gaz, exprimé en volume produit en 48 heures par 100 ml de boue non diluée à une concentration de matières solides de 2 % (20 g/l) à 4 % (40 g/l).

Critères de validité

40. Les résultats issus de l'essai ISO inter-laboratoires (5) montrent que la substance de référence (3,5-dichlorophénol) provoque une inhibition de 50 % de la production de gaz dans un intervalle de concentrations allant de 32 mg/l à 510 mg/l, avec une moyenne de 153 mg/l (paragraphe 10). L'ampleur de cet intervalle ne permet pas d'établir des limites précises utilisables comme critères de validité, qui ne seront disponibles que lorsqu'auront été mises au point des techniques de production d'inoculum moins variables. Les volumes de gaz produits dans les flacons témoins en 48 heures étaient compris entre 21 ml/g de matières sèches de boue et 149 ml/g (moyenne 72 ml/g). Aucune relation évidente n'a pu être établie entre le volume de gaz produit et la valeur de CE_{50} correspondante. Le pH final variait entre 6.1 et 7.5.

41. La validité de l'essai est reconnue si une inhibition supérieure à 20 % est obtenue dans le témoin de référence contenant 150 mg/l de 3,5-dichlorophénol, si plus de 50 ml de gaz par g de matières sèches sont produits dans le témoin à blanc et si la valeur du pH est comprise dans l'intervalle de 6.2 à 7.5 à la fin de l'essai.

Rapport d'essai

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

Substance d'essai :

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

Conditions expérimentales :

- volumes des contenus liquides et de l'espace vide dans les récipients d'essai ;
- description des récipients d'essai et de l'appareil de mesure des gaz (par exemple, type de manomètre) ;
- ajout de la substance d'essai et de la substance de référence au système expérimental, concentrations expérimentales utilisées et recours à un solvant, le cas échéant ;
- détails sur l'inoculum utilisé : nom de la station d'épuration des eaux usées, description de la source des eaux usées traitées (par exemple, température de fonctionnement, temps de rétention de la boue, origine principalement domestique ou déchets industriels, etc.), concentration de matières solides, activité de production gazeuse du digesteur anaérobie, exposition préalable ou préadaptation éventuelle à des substances toxiques ou site de récolte de vase, de sédiments etc ;
- température d'incubation et intervalle ;

- nombre de répétitions.

Résultats :

- valeurs de pH à la fin de l'essai ;
- toutes les valeurs mesurées dans les récipients d'essai, les témoins à blanc, les témoins contenant la substance de référence, le cas échéant, (par exemple pression en Pa ou en millibars) sous forme de tableau ;
- pourcentage d'inhibition dans les flacons d'essai et de référence et courbes d'inhibition en fonction de la concentration ;
- calcul des valeurs de CE₅₀, exprimées en mg/l et en mg/g ;
- production de gaz par gramme de boue en 48 heures ;
- motifs d'un rejet éventuel des résultats de l'essai ;
- discussion des résultats, en particulier mention de tous les écarts par rapport aux modes opératoires présentés dans cette Ligne directrice et discussion de tous les écarts observés dans les résultats d'essais dus à des interférences et à des erreurs par rapport aux résultats escomptés ;
- objectifs de l'essai : définir si l'essai était destiné à mesurer la toxicité de micro-organismes préalablement exposés ou non.

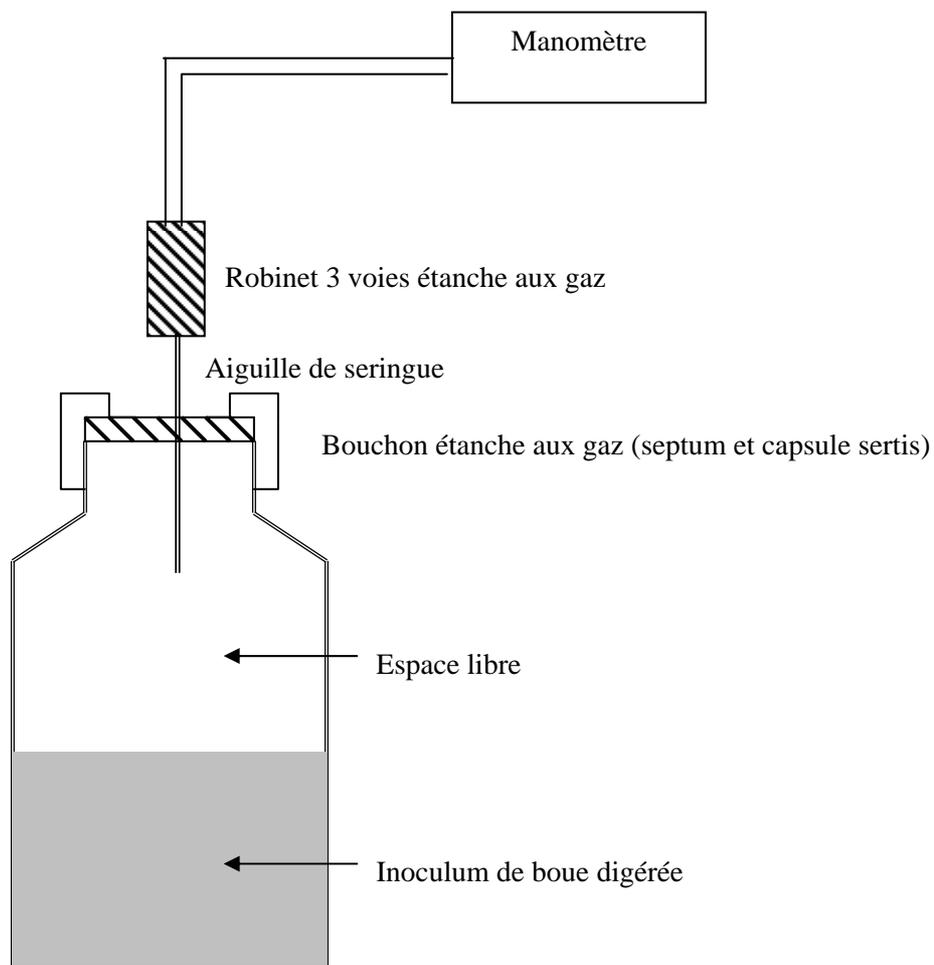
LITTERATURE

- (1) Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (1984). 209 : Boue activée, essai d'inhibition de la respiration. Organisation pour la Coopération et le Développement Economiques, Paris.
- (2) Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (2006). 311 : Essai de biodégradabilité anaérobie des composés organiques dans une boue digérée : mesure du dégagement gazeux. Organisation pour la Coopération et le Développement Economiques, Paris.
- (3) Organisation internationale de normalisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 : General Test.
- (4) Organisation internationale de normalisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2 : Test for low biomass concentrations.
- (5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.
- (6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Wat. Pollut. Control*, 70, 58-70.
- (7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In : Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- (8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.

- (9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- (10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. *Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods*, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).
- (11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 39 (12), 2007-2018.
- (12) Organisation internationale de normalisation (1995) ISO 10 634 Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement de composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.
- (13) Organisation internationale de normalisation (1997) ISO 11 923 Qualité de l'eau – Dosage des matières en suspension par filtration sur filtre en fibres de verre.

ANNEXE 1

Exemple d'un appareil permettant de mesurer la production de biogaz d'après la pression gazeuse



Réceptient d'essai maintenu à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

ANNEXE 2**Conversion des mesures manométriques**

Les pressions relevées au manomètre peuvent être rapportées à des volumes gazeux à l'aide d'une courbe de référence à partir de laquelle le volume de gaz produit par gramme de boue sèche par 48 heures peut être calculé. Cet indice d'activité est l'un des critères d'évaluation de la validité des résultats de l'essai. La courbe de référence est obtenue en injectant des volumes de gaz connus à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans des flacons à sérum contenant un volume d'eau égal à celui du mélange réactionnel, V_R ;

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

ANNEXE 3**Identification des facteurs à l'origine de résultats erronés**(a) Qualité des bouchons de flacons

Différents types de septums pour les flacons de sérums sont disponibles dans le commerce ; nombre d'entre eux, en particulier le caoutchouc butyle, perdent leur étanchéité après avoir été percés d'une aiguille dans les conditions de cet essai. Il arrive que la pression chute très lentement une fois le septum percé par l'aiguille de seringue. L'utilisation de septums étanches aux gaz est recommandée pour éviter les fuites (paragraphe 12 (b)).

(b) Humidité dans l'aiguille de la seringue

L'humidité s'accumule parfois dans l'aiguille et le tube de la seringue, ce qui est signalé par une valeur de pression faiblement négative. Cet incident est corrigé en retirant l'aiguille et en secouant le tube, en le séchant avec un mouchoir en papier et en montant une aiguille neuve (paragraphe 12(c) et 35).

(c) Contamination par l'oxygène

Les méthodes anaérobies sont sensibles aux erreurs engendrées par une contamination par l'oxygène qui peut réduire la production de gaz. L'utilisation de techniques strictement anaérobies, en particulier grâce à la boîte à gants, permet de restreindre au minimum ces problèmes.

(d) Substrats bruts dans la boue

La production anaérobie de gaz et la sensibilité de la boue sont influencées par des substrats transférés avec l'inoculum dans les flacons d'essais. La boue digérée provenant de digesteur anaérobies domestiques contiennent encore souvent des matières identifiables comme des poils et des résidus végétaux de cellulose, qui compliquent la tâche de prélèvement d'échantillons représentatifs. Les matières insolubles grossières peuvent être éliminées de la boue par tamisage, pour augmenter la représentativité de l'échantillonnage (paragraphe 16).

(e) Substances d'essai volatiles

Les substances d'essai volatiles se dégagent dans l'espace vide des flacons d'essai. Elles sont donc susceptibles de s'échapper en partie du système pendant la ventilation qui suit les mesures de pression, ce qui se traduira par des valeurs de CE_{50} fictivement élevées. Ce type d'erreurs peut être réduit par le choix approprié d'un rapport volume vide à volume de liquide et par la suppression de la ventilation après les mesures de pression (10).

(f) Non-linéarité de la production de gaz

Lorsque la courbe de production de gaz cumulée moyenne en fonction de la durée d'incubation ne tend pas vers la linéarité pendant la période de 48 h, la précision de l'essai peut diminuer. Il est conseillé, pour résoudre ce problème, d'utiliser une boue de digestion d'origine différente ou d'ajouter des concentrations plus élevées de substrat d'essai et de bouillon de nutriment, d'extrait de levure et de glucose (paragraphe 29).

ANNEXE 4**Application aux échantillons environnementaux à faible concentration de biomasse – vases anaérobies, sédiments, etc.**Introduction

A.1 En général, l'activité microbienne spécifique (volume de gaz produit par gramme de solides secs) des vases, des sédiments, et des sols anaérobies naturels est très inférieure à celle d'une boue anaérobie prélevée dans des eaux usées. C'est pourquoi il est nécessaire de modifier certaines conditions expérimentales pour mesurer les effets inhibiteurs de produits chimiques sur ces échantillons moins actifs. Dans ce cas, deux approches sont possibles :

- (a) Procéder un essai préliminaire modifié (paragraphe 25) avec l'échantillon de vase, de sol, etc non dilué à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ou à la température du site de prélèvement de l'échantillon, pour optimiser la simulation (comme c'est le cas dans la partie 1 de la norme ISO 13 641) ;
- (b) ou bien mettre en œuvre l'essai avec une boue de digesteur diluée (100 fois) afin de simuler l'activité réduite escomptée de l'échantillon environnemental, tout en maintenant la température à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (comme dans la partie 2 de la norme ISO 13 641).

A.2 L'option (a) peut être adoptée conformément à la méthode décrite ici (qui est équivalente à la partie 1 de la norme ISO 13 641), mais il est essentiel de déterminer les conditions optimales par un essai préliminaire (paragraphe 25), à moins qu'elles ne soient déjà connues grâce à des essais antérieurs. L'échantillon de vase ou de sédiment doit être parfaitement mélangé, par exemple dans un mélangeur, et, s'il y a lieu, dilué avec une proportion mineure d'eau de dilution désaérée (paragraphe 14) afin de lui conférer une fluidité suffisante pour son transfert par une pipette à large pointe ou une éprouvette graduée. Dans le cas où l'on estime que la quantité de nutriments pourrait être insuffisante, il est possible de centrifuger l'échantillon de vase (en conditions anaérobies) et de le remettre en suspension dans un milieu minéral contenant de l'extrait de levure (A.11).

A.3 Option (b). Cette approche reproduit convenablement l'activité réduite des échantillons environnementaux, à l'exception de la concentration élevée en matières solides en suspension présente dans ces échantillons. Le rôle qu'elles jouent dans l'inhibition est inconnu, mais une réaction éventuelle entre les produits chimiques de l'essai et les constituants de la vase, ou bien l'adsorption des produits chimiques d'essai sur les solides, pourrait réduire la toxicité du produit chimique d'essai.

A.4 La température est un autre facteur important : une simulation rigoureuse exige de procéder aux essais à la température du site d'échantillon, sachant que des groupes différents de consortium méthanogènes de bactéries sont fonctionnels dans des intervalles de températures différents, à savoir les groupes thermophiles ($\sim 30\text{--}35\text{ °C}$), mésophiles ($20\text{--}25\text{ °C}$) et psychrophiles ($<20\text{ °C}$), dont les modèles d'inhibition peuvent être différents.

A.5 Durée. Dans l'essai général, Partie 1, sur boue non diluée, la production de gaz en 2-4 jours suffit toujours largement, tandis que dans la partie 2 sur boue diluée 100 fois, la production de gaz, lorsqu'elle existe, s'est révélée insuffisante dans ce délai selon l'essai tournant. Madsen et al (1996), dans leur description de ce second type d'essai, proposent une période de 7 jours.

Essais avec une faible concentration de biomasse (option b)

Les modifications et amendements suivants doivent être apportés, et s'ajoutent à certains des paragraphes ou sous-paragraphes existants du texte principal ou les remplacent.

A.6 Ajout au paragraphe 6 : Principe de l'essai ;

“Cette technique peut être utilisée avec une boue anaérobie diluée 100 fois, pour simuler en partie la faible activité des vases et des sédiments. La température d'incubation peut être égale à 35 °C, ou à la température du site de prélèvement de l'échantillon. En raison d'une activité bactérienne très inférieure à celle d'une boue non diluée, la période d'incubation peut être prolongée jusqu'à au moins 7 jours.”

A.7 Ajout au paragraphe 12 (a) :

“l'incubateur doit être capable de fonctionner à des températures de l'ordre de 15 °C.”

A.8 Ajout d'un réactif supplémentaire après le paragraphe 13 :

“Acide phosphorique (H₃PO₄), 85 % en masse dans l'eau.”

A.9 Ajout à la fin du paragraphe 16 :

“Utiliser une concentration finale de 0.20± 0.05 g/l de matières solides sèches totales dans l'essai.”

A.10 Paragraphe 17. Substrat d'essai

Ce substrat n'est pas utilisé, mais remplacé par de l'extrait de levure (voir paragraphes 17 ; A.11, A.12, A.13).

A.11 La boue anaérobie doit être diluée par un milieu minéral, contenant des oligo-éléments, et le substrat organique, l'extrait de levure, est ajouté pour des raisons pratiques à ce milieu.

Ajout après le paragraphe 17 :

“(a) Milieu minéral d'essai, contenant de l'extrait de levure.

Ce milieu est préparé à partir d'un milieu d'essai concentré 10 fois (paragraphe 17 (b) ; A.12) contenant une solution d'oligo-éléments (paragraphe 17 (c) ; A.13). Utiliser du sulfure de sodium nonhydraté préparé extemporanément (paragraphe 17 (b) ; A.12) ou lavé et séché avant utilisation afin de s'assurer qu'il soit suffisamment réducteur. Dans le cas où l'essai est mis en œuvre sans boîte à gants (paragraphe 12 (j)), la concentration finale de sulfure de sodium dans la solution mère peut être portée à 2 g/l (au lieu de 1 g/l). Le sulfure de sodium peut également être ajouté à partir d'une solution mère appropriée à travers le septum des flacons d'essai fermés, ce mode opératoire diminuant le risque d'oxydation, jusqu'à obtenir une concentration finale de 0.2 g/l. On peut également utiliser du citrate de titane (III) (paragraphe 17 (b)). Celui-ci est ajouté à travers le septum des flacons d'essai fermés, pour ajuster la concentration entre 0.8 mmol/l et 1.0 mmol/l. Le citrate de titane (III) est un agent réducteur très efficace et peu toxique que l'on peut préparer de la manière suivante : dissoudre 2.94 g de citrate de sodium dihydraté dans 50 ml d'eau de dilution sans oxygène (paragraphe 14) (on obtient alors une solution à 200 mmol/l) et ajouter 5 ml d'une solution de chlorure de titane (II) (15 g/100 l d'eau de dilution). Neutraliser à pH 7± 0.5 avec du carbonate de sodium et verser dans un flacon à sérum approprié sous un

courant d'azote gazeux. La concentration du citrate de titane (III) dans cette solution mère est égale à 164 mmol/l. Utiliser le milieu d'essai immédiatement ou bien le conserver à 4 °C pendant une durée inférieure à 1 jour.

A.12 (b) Milieu d'essai concentré 10 fois, préparé à partir des composants suivants :

dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH ₂ PO ₄)	2.7 g
hydrogénophosphate de sodium (Na ₂ HPO ₄) (ou 11.2 g de dodécahydrate)	4.4 g
chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl)	5.3 g
chlorure de calcium dihydraté (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0.75 g
chlorure de magnésium hexahydraté (MgCl ₂ .6H ₂ O)	1.0 g
chlorure de fer (II) tétrahydraté (FeSO ₄ .4H ₂ O)	0.2 g
résazurine (indicateur d'oxygène)	0.01 g
sulfure de sodium nonahydraté (Na ₂ S.9H ₂ O)	1.0 g
(ou citrate de titane (III) citrate) concentration finale	0.8 mmol/l à 1.0 mmol/l
solution d'oligo-élément (voir paragraphe 17 (c) ; A.13)	10.0 ml
extrait de levure	100 g
dissoudre dans de l'eau de dilution (paragraphe 14) et ajuster à :	1000 ml

A.13 (c) Solution d'oligo-éléments, préparée à partir des composants suivants :

chlorure de manganèse (II) tétrahydraté (MnCl ₂ .4H ₂ O)	0.5 g
acide ortho-borique (H ₃ BO ₃)	0.05 g
chlorure de zinc (ZnCl ₂)	0.05 g
chlorure de cuivre (II) (CuCl ₂)	0.03 g
molybdate de sodium dihydraté (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0.01 g
chlorure de cobalt (II) hexahydraté (CoCl ₂ .6H ₂ O)	1.0 g
chlorure de nickel (II) hexahydraté (NiCl ₂ .6H ₂ O)	0.1 g
sélénite de sodium (Na ₂ SeO ₃)	0.05 g
dissoudre dans de l'eau de dilution (paragraphe 14) et ajuster à :	1000 ml''

A.14 Paragraphe 25 : Essai préliminaire

Il est essentiel de procéder à un essai préliminaire comme il est décrit dans le paragraphe 24, mais en employant des concentrations de matières solides de boue égales à un centième de celles indiquées, c'est-à-dire 0.1 g/l, 0.2 g/l et 0,4 g/l. La durée d'incubation doit être d'au moins 7 jours. NOTE : Dans l'essai tournant (5), le volume vide, qui représentait 75 % du volume total, était beaucoup trop élevé. Il devrait se situer dans l'intervalle recommandé de 10 %-40 %. Le critère décisif à satisfaire est l'obtention d'un volume de gaz produit mesurable avec une précision acceptable (par exemple ±5 % à ±10 %) pour une inhibition d'environ 80 %.

A.15 Paragraphes 26 à 30 : Addition de substance d'essai, d'inoculum et de substrat.

L'introduction de ces composants est identique à celle qui est décrite dans ces paragraphes, en remplaçant la solution de substrats (paragraphe 17) par le milieu d'essai additionné de substrat d'extrait de levure (A.11).

En outre, la concentration finale de matières solides de boue sèche est réduite de 2 g/l - 4 g/l à 0.2 ± 0.05 g/l (A.9). Le tableau A.1, qui remplace le tableau du paragraphe 29, présente deux exemples d'addition des composants au mélange d'essai.

A.16 Paragraphe 33 : Incubation des flacons

La vitesse de production de gaz attendue étant plus faible, l'incubation dure au moins 7 jours.

A.17 Paragraphe 34 : Mesures de pression

Le mode opératoire de mesure de la pression dans l'espace vide des flacons est identique à celui décrit au paragraphe 34 lorsqu'il est aussi nécessaire d'analyser les quantités dans la phase gazeuse. Lorsque l'on mesure les quantités totales de CO₂ et de CH₄, le pH de la phase liquide est abaissé à environ pH 2 par l'injection de H₃PO₄ dans chaque flacon concerné et la pression est mesurée au bout de 30 minutes d'agitation à la température de l'essai. Toutefois, la mesure de la pression dans chaque flacon avant et après acidification fournira davantage d'informations sur la qualité de l'inoculum. Par exemple, si le CO₂ est produit beaucoup plus rapidement que le méthane, la sensibilité des bactéries fermentaires est peut-être modifiée, ou bien les bactéries méthanogènes sont préférentiellement affectées par la substance d'essai.

A.18 Paragraphe 36 : mesure du pH

S'il est nécessaire d'utiliser du H₃PO₄, il convient de préparer quelques flacons supplémentaires sans addition de H₃PO₄, en particulier pour la mesure du pH.

Référence : Madsen, T, Rasmussen, HB ; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Table A.1. Exemples d'organisation de l'essai pour des lots d'essai

Mélange réactionnel composants	Exemple 1	Exemple 2	Ordre normal d'addition
Concentration de l'inoculum préparé (g/l)	0.42	2.1	-
Volume d'inoculum ajouté (ml)	45	9	4
Concentration d'inoculum dans les flacons d'essai (g/l)	0.20	0.20	-
Volume de milieu d'essai ajouté (ml)	9	9	2
Volume de milieu d'essai ajouté (ml)	36	72	3
Volume d'eau de dilution ajouté (ml)	9.7	9.7	-
Concentration d'extrait de levure dans les flacons d'essai (g/l)	3	3	1
Volume de solution mère de substance d'essai (ml)	93	93	-
Volume total de liquide (ml)			