



302A

Adoptée :
12 mai 1981

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

**« Biodégradabilité dite Intrinsèque :
Méthode SCAS Modifiée »**

1. INTRODUCTION

• Connaissances requises

- Solubilité dans l'eau
- Teneur en carbone organique de la substance à tester

• Informations générales

Il est utile de disposer d'informations sur les proportions relatives des composants principaux pour interpréter les résultats obtenus, en particulier lorsqu'ils sont proches de la limite.

Des informations sur la toxicité du produit chimique peuvent être utiles pour interpréter les résultats concernant des valeurs faibles et pour choisir les concentrations d'épreuve appropriées.

• Conditions particulières

La méthode n'est applicable qu'aux substances à tester organiques qui, à la concentration utilisée dans l'essai :

- sont solubles dans l'eau (au moins 20 mg de carbone organique dissous par litre),
- présentent un tension de vapeur négligeable,
- n'ont aucun effet inhibiteur sur les bactéries,
- ne présentent pas d'absorption notable sur des surfaces de verre,
- ne s'échappent pas de la solution d'essai sous forme de mousse.

Le Groupe d'Experts de l'OCDE « dégradation/accumulation » a estimé que cet essai était adéquat pour déterminer la biodégradabilité intrinsèque des produits chimiques dans des conditions aérobies.

• Recommandations

Les produits chimiques à tester perdant plus de 20% de COD dans cet essai peuvent être considérés comme intrinsèquement biodégradables ; une diminution de COD supérieure à 70%

« Biodégradabilité dite Intrinsèque : Méthode SCAS Modifiée »

indique une biodégradabilité totale. La sensibilité peut être accrue par l'utilisation d'une technique analytique spécifique de la substance à tester marquée au carbone-14. Dans ces derniers cas, on peut considérer un niveau moins élevé comme une preuve de biodégradabilité inhérente.

- Documents de référence

La présente Ligne directrice est fondée sur l'article cité dans la bibliographie chapitre 4, référence 1.

2. MÉTHODE

A. INTRODUCTION, OBJET, PORTÉE, PERTINENCE, APPLICATION ET LIMITES DE L'ESSAI

Cette méthode constitue une adaptation de la méthode semi-continue en présence de boues activées (SCAS), mise au point par la « Soap and Detergent Association », pour la détermination de la biodégradation primaire de l'alkylbenzène sulfonate. Dans cette méthode le produit chimique est mis en présence de concentrations de micro-organismes relativement élevées pendant une période longue (si possible plusieurs mois). Tout au long de cette période, de l'eau d'égout décantée est ajoutée quotidiennement aux micro-organismes comme source de nourriture.

Etant donné la longue période de séjour (36 heures) et l'introduction intermittente de matières nutritives, l'essai ne reproduit pas les conditions réelles de fonctionnement d'une station de traitement des eaux d'égout. Des résultats positifs obtenus avec une substance d'épreuve indiquent qu'elle possède un potentiel de biodégradation élevé ; c'est pourquoi elle est particulièrement indiquée pour évaluer la biodégradabilité intrinsèque.

Etant donné que les conditions dans lesquelles se déroule l'essai sont très favorables à la sélection et/ou à l'adaptation de micro-organismes capables de dégrader le composé d'épreuve, cette méthode peut être également utilisée pour la production d'inoculums acclimatés en vue d'autres essais.

Cet essai s'applique à des produits organiques solubles dans l'eau, non volatils et n'ayant pas d'action inhibitrice sur les bactéries à la concentration expérimentale.

« Biodégradabilité dite Intrinsèque :
Méthode SCAS Modifiée »

- Substances de référence

Dans certains cas, des substances de référence peuvent être utiles dans l'examen d'une nouvelle substance, mais, à l'heure actuelle, on ne peut recommander aucune substance de référence particulière. Des résultats obtenus sur plusieurs composés utilisés dans des essais sont fournis en annexe, dans le but surtout de permettre de calibrer la méthode périodiquement et de comparer les résultats lorsqu'une autre méthode est utilisée.

- Principe de la méthode d'essai

Des boues activées provenant d'une station de traitement d'eaux d'égout sont déposées dans une unité d'aération (SCAS). On y ajoute le composé et de l'eau d'égout domestique décantée. Le mélange est ensuite aéré pendant 23 heures. Après avoir arrêté l'aération, on laisse décanter la boue et on élimine le liquide surnageant. La boue restant dans la chambre d'aération est ensuite mélangée à une nouvelle portion de composé d'épreuve et d'eau d'égout, puis le cycle est recommencé.

La biodégradation est déterminée par la teneur en carbone organique dissous dans le liquide surnageant. On compare ensuite ce résultat avec celui obtenu dans un tube contenant une solution témoin réalisée uniquement avec de l'eau d'égout décantée.

- Critères de qualité

Reproductibilité

La reproductibilité de cette méthode modifiée, basée sur l'élimination du carbone organique dissous, n'a pas encore été établie. En ce qui concerne la biodégradabilité primaire, la méthode fournit des données très précises pour des produits subissant une forte dégradation. Les résultats mentionnés dans le document de référence (1) indiquent, dans des limites de confiance à 95%, une variation inférieure à $\pm 3\%$, et ce sur la base d'essais inter-laboratoires. Comme on peut s'y attendre, on obtient des limites de confiance plus large pour des substances moins biodégradables.

« Biodégradabilité dite Intrinsèque : Méthode SCAS Modifiée »

Sensibilité

La sensibilité de cette méthode dépend essentiellement de la précision avec laquelle on détermine le carbone organique dissous, ainsi que de la teneur en composé d'épreuve dans le liquide au début de chaque cycle. A la fin de l'aération, il reste environ 10 mg de carbone organique dissous par litre de liquide surnageant dans l'expérience témoin. Si l'on considère que la détermination du carbone organique dissous s'effectue avec une précision de $\pm 5\%$ et que 20 mg/l de carbone sont ajoutés au début de la période d'aération en guise de substance d'épreuve, la biodégradation peut être mesurée à $\pm 6\%$ près pour un taux de biodégradation compris entre 80 et 100%.

Spécificité

La méthode s'applique à tout composé organique non volatil et soluble dans l'eau.

Possibilités de normalisation

Etant donné que la méthode utilise, comme apport nutritif, de la véritable eau d'égout décantée, il est impossible d'assurer une normalisation absolue, à moins de remplacer cet apport par un apport artificiel. Toutefois, étant donné que cette méthode a été conçue pour fournir des informations sur le potentiel de biodégradabilité d'un produit chimique et non une simulation, la normalisation est inutile.

Possibilités d'automatisation

Il serait possible d'automatiser cette méthode, mais le coût en serait élevé. De plus, la méthode n'étant pas très exigeante en main d'œuvre, il ne serait guère avantageux de l'automatiser.

B. MODE OPÉRATOIRE

• Préparations

Laver les unités d'aération et les fixer sur un support adéquat. Brancher les tubes d'arrivée d'air sur la tubulure d'alimentation. Utiliser un petit compresseur de laboratoire pour alimenter les unités d'aération ; prés-saturer l'air avec de l'eau afin de réduire les pertes par évaporation.

**« Biodégradabilité dite Intrinsèque :
Méthode SCAS Modifiée »**

Dans une station d'épuration à boues activées traitant essentiellement des eaux d'égout domestiques prélever le liquide nécessaire aux tests. Prévoir environ 150 ml de liquide homogénéisé pour chaque unité d'aération.

Etalonner l'appareil à déterminer le carbone organique au moyen de phtalate monopotassique.

Préparer les solutions mères des composés à tester : la concentration normalement requise est de 400 mg/l de carbone organique, ce qui donne une concentration de 20 mg/l de carbone pour le composé d'essai au début de chaque cycle d'aération s'il n'y a pas de biodégradation.

Mesurer la teneur en carbone organique des solutions mères.

- Conditions expérimentales

Utiliser une concentration élevée de micro-organismes aérobies ; la durée effective de séjour est de 36 heures. L'oxydation de la plupart des matières carbonées contenues dans l'eau d'égout est très active au cours des 8 heures suivant le début de chaque cycle d'aération. Pendant le reste de la période d'aération, la boue respire de façon endogène et le seul substrat alors disponible est le composé d'épreuve, à moins que celui-ci ne soit facilement métabolisé. Ces facteurs, associés à un réensemencement quotidien de la solution d'épreuve lorsqu'on utilise de l'eau d'égout domestique comme milieu, offrent des conditions particulièrement favorables à l'acclimatation et à la biodégradation.

- Exécution de l'essai

Prélever un échantillon de liquide mélangé d'une station d'épuration à boues activées appropriée et procéder à son aération pendant le transport au laboratoire. Verser 150 ml de ce liquide dans chacune des unités d'aération et aérer pendant 23 heures. Laisser ensuite la boue décanter pendant 45 minutes. Ouvrir le robinet et soutirer 100 ml de surnageant. Prélever un échantillon d'eau d'égout domestique décantée immédiatement avant de l'utiliser et en ajouter 100 ml à la boue restante dans chaque unité d'aération. Aérer de nouveau. A ce stade, on n'ajoute pas encore de substance d'épreuve et on alimente quotidiennement les unités d'aération uniquement

« Biodégradabilité dite Intrinsèque : Méthode SCAS Modifiée »

avec de l'eau d'égout domestique jusqu'à obtention d'un liquide surnageant limpide après décantation. Cette opération demande normalement jusqu'à 2 semaines. Pendant cette période, la teneur du liquide surnageant en carbone organique dissous doit être inférieure à 12 mg/l à la fin de chaque cycle d'aération.

A l'expiration de cette période, mélanger les différentes boues décantées et introduire 50 ml du mélange obtenu dans chaque unité.

Introduire 100 ml d'eau d'égout décantée dans les témoins et 95 ml + 5 ml de solution mère de substance à tester (400 mg/l) dans les unités d'essai. Recommencer à aérer et maintenir l'aération pendant 23 heures. Laisser ensuite la boue décanter pendant 45 minutes, prélever le liquide surnageant et mesurer sa teneur en carbone organique.

Répéter quotidiennement les opérations de remplissage et de soutirage décrites ci-dessus pendant toute la durée de l'essai.

Avant la décantation, il peut être nécessaire de nettoyer les parois des unités afin de prévenir l'accumulation de matières solides au dessus du niveau du liquide. Utiliser un grattoir ou une brosse par unité afin de prévenir toute contamination réciproque.

Il est recommandé de déterminer quotidiennement la teneur des surnageants en carbone organique dissous, bien que des mesures moins fréquentes soient également admissibles. Avant de procéder aux analyses, passer les liquides à analyser sur des membranes filtrantes d'une porosité de 0,45 µm, préalablement lavées, puis centrifuger. Au cours de la centrifugation la température de l'échantillon ne doit pas dépasser 40°C.

La durée de cet essai, pour des substances présentant une biodégradation nulle ou faible, est indéterminée mais l'expérience montre qu'elle doit être au moins de 12 semaines.

3. RÉSULTATS ET RAPPORT

• Calcul des résultats

Tracer la courbe de teneur en carbone organique dissous dans les surnageants dans les unités d'essai et dans les unités-témoins en fonction du temps. A mesure que la biodégradation progresse, la valeur enregistrée dans les unités d'essai doit se rapprocher de celle des unités-

**« Biodégradabilité dite Intrinsèque :
Méthode SCAS Modifiée »**

témoins. Lorsque la différence entre les deux valeurs reste constante après trois mesures consécutives, effectuer trois nouvelles mesures et calculer le taux de biodégradation de la substance à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Taux de biodégradation (\%)} = \frac{100 \times [O_T - (O_t - O_c)]}{O_T}$$

dans laquelle

O_T = est la teneur en carbone organique du composé d'épreuve ajouté à l'eau d'égout décantée au début de la période d'aération.

O_t = est la teneur en carbone organique dissous dans le surnageant d'épreuve à la fin de la période d'aération.

O_c = est la teneur en carbone organique dissous dans le surnageant témoin.

Le taux de biodégradation est donc exprimé en pourcentage d'élimination du carbone organique.

Si l'on constate, dès le début, que la différence entre la valeur témoin et la valeur d'essai est nulle ou si cette différence reste constante à un niveau inférieur à celui normalement prévisible en l'absence de dégradation, il est nécessaire de procéder à d'autres essais afin de déterminer la part qui est imputable à la biodégradation et celle qui est imputable à l'adsorption. A cet effet, on peut utiliser les surnageants comme inoculum pour effectuer des essais tels que l'essai de Sturm ou l'essai en fiole fermée (Ligne directrice de l'OCDE 301).

4. BIBLIOGRAPHIE

1. « A Procedure and Standards for the Determination of the Biodegradability of Alkyl Benzene Sulphonate and Linear Alkylate Sulphonate », Journal of the American Chemical Society, Vol. 42, p. 986 (1965).

« Biodégradabilité dite Intrinsèque :
Méthode SCAS Modifiée »

5. ANNEXE

EXEMPLES DE RÉSULTATS DE L'ESSAI SUR DIFFÉRENTS COMPOSÉS UTILISÉS
DANS L'ESSAI DE COMPARAISON OCDE/CEE

Composé à tester	O _T (mg/l)	O _T - O _C (mg/l)	taux de biodégradation/ bioélimination
Sulphonate 4-acétyl amino-benzène	17,2	2,0	85
Sulphonate tétra- propylène-benzène	17,3	8,4	51,4
4-nitrophénol	16,9	0,8	95,3
Diéthylène glycol	16,5	0,2	98,8
Aniline	16,9	1,7	95,9

Durée de l'essai : 40 jours

Résultats obtenus pour le cyclopentane tétracarboxylate

O _T (mg/l)	O _T - O _C (mg/l)	taux de biodégradation/ bioélimination
17,9	3,2	81,1

Durée de l'essai : 120 jours