

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

Adoptée par le Conseil le 17 juillet 1992

Essai Zahn-Wellens/EMPA⁽¹⁾

INTRODUCTION

1. L'essai Zahn-Wellens original (1) a été adopté en 1981 comme Ligne directrice 302 B de l'OCDE pour la détermination de la biodégradabilité intrinsèque. La Suisse et l'Allemagne ont ensuite fait des propositions en vue de modifier cette Ligne directrice en intégrant des éléments contenus dans un essai mis au point par l'EMPA (2), d'où le changement de nom de l'essai. La version nouvelle de l'essai contient en outre des modifications en ce qui concerne le milieu minéral utilisé. Le milieu retenu est identique à celui qui est employé dans les méthodes de disparition, du COD, de respirométrie manométrique, de dégagement de CO₂ et de screening modifié de l'OCDE dans la Ligne directrice 301 (adoptée 1992) relative à la détermination de la biodégradabilité.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2. Un mélange contenant la substance d'essai, des substances nutritives minérales et une proportion relativement importante de boue activée en milieu aqueux est agité et aéré à 20-25°C à l'obscurité ou sous lumière diffuse pendant une durée pouvant atteindre 28 jours. On prépare en parallèle des témoins contenant de la boue activée et des substances minérales nutritives, mais pas la substance à étudier. Le processus de biodégradation est suivi par dosage du COD ou en déterminant la DCO⁽²⁾ dans des échantillons filtrés prélevés chaque jour ou à d'autres intervalles de temps. Le pourcentage de biodégradation au moment de la prise d'échantillon est donnée par le rapport du COD éliminé (ou DCO), ce dernier étant corrigé de la valeur obtenue dans le témoin, sur la teneur initiale en COD. Ce pourcentage est porté sur un graphique en fonction du temps pour donner la courbe de biodégradation.

3. Une analyse spécifique du composé étudié peut s'avérer utile dans les cas où l'on doit détecter des modifications moléculaires provoquées par des réactions biochimiques (biodégradation primaire).

⁽¹⁾ EMPA : Laboratoire fédéral suisse d'essai des matériaux et de recherches

⁽²⁾ COD : carbone organique dissous
DCO : demande chimique en oxygène

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

4. Il est nécessaire de connaître la solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai, et il est également recommandé de connaître ses propriétés moussantes. Si on veut vérifier les valeurs mesurées pour le COD et la DCO, on doit connaître la structure chimique de la substance. Des informations sur la toxicité du produit étudié vis à vis des bactéries sont utiles pour choisir les concentrations d'essai appropriées et pour interpréter les résultats indiquant une biodégradabilité faible (3). L'essai est en général effectué uniquement quand l'essai de biodégradabilité facile a donné un résultat négatif. Ainsi, les propriétés physiques et inhibitrices de la substance ont déjà pu être établies.

CRITÈRES D'APPLICATION

5. On peut tester par cette méthode les produits chimiques non volatils dont la solubilité dans l'eau est d'au moins 50 mg/l de COD, pourvu également qu'ils soient peu adsorbables, qu'ils ne soient pas éliminés par moussage et qu'ils n'aient pas d'effet inhibiteur sur les bactéries à la concentration étudiée.

SENSIBILITÉ

6. Les limites de sensibilité dépendent de la sensibilité des méthodes de dosage du COD (normalement de 0,5 à 1 mg/l de C) ou de la DCO (15 mg/l d'oxygène) et également de la variabilité du témoin. Les concentrations relativement élevées (50 à 400 mg/l de COD) de la substance qui sont mises en oeuvre assurent une plus grande fiabilité de l'analyse.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

7. Afin de vérifier la capacité fonctionnelle de la boue activée, on doit effectuer, pour chaque série, un essai en parallèle avec une substance de référence dont la biodégradabilité est connue. A cette fin, on recommande l'éthylèneglycol, le diéthylèneglycol, le laurylsulfonate et l'aniline. La biodégradation de ces composés doit atteindre au moins 70% (du COD ou de la DCO) en 14 jours.

REPRODUCTIBILITÉ

8. Des essais circulaires ont montré que la reproductibilité de cet essai était bonne.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

9. (a) Des récipients cylindriques en verre d'un volume de 1 à 5 litres, tous équipés d'un agitateur fait dans un matériel inerte et tournant à une distance de 5 à 10 cm au dessus du fond du récipient (on peut également utiliser un agitateur magnétique muni d'un barreau de 7 à 10 cm de long) et d'un tube de verre de 2 à 4 mm de diamètre intérieur introduisant l'air à environ 1 cm au dessus du fond du récipient. On peut également utiliser des récipients munis d'un verre fritté permettant l'aération et l'agitation.

(b) Une alimentation en air comprimé passant à travers un filtre d'ouate et un flacon laveur contenant de l'eau, ou provenant d'une pompe d'aération qui délivre un air exempt de

poussière, d'huile ou d'impuretés organiques.

- (c) Un équipement normal de laboratoire, en particulier une centrifugeuse (capable d'atteindre au moins 1 000 g), un pH-mètre, un appareil de mesure de l'oxygène dissous et des membranes filtrantes (porosité de 0,2 à 0,45 µm).
- (d) Le matériel nécessaire au dosage du COD (4) ou la détermination de la DCO (5).

Réactifs

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

Eau de dilution

11. On utilise de l'eau déminéralisée ou distillée, exempte de substances toxiques (comme les ions Cu^{2+}) à des concentrations inhibitrices. Elle ne doit contenir que des quantités minimales de carbone organique, de façon à ne pas induire de valeurs élevées dans les témoins. Une contamination peut provenir d'impuretés inhérentes, ainsi que des résines échangeuses d'ions et de la lyse de matières provenant des bactéries et des algues. Pour chaque série d'essais, utiliser uniquement une eau du même lot, précédemment vérifiée par une analyse du COD.

Solutions-mères pour le milieu minéral

12. Préparer les solutions-mères suivantes :

- (a) Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 8,50 g
Hydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4 21,75 g
Hydrogénophosphate de sodium dihydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 33,40 g
Chlorure d'ammonium, NH_4Cl 0,50 g

Dissoudre dans de l'eau de dilution et compléter le volume à 1 litre.

Le pH de la solution doit être égal à 7.4.

- (b) Chlorure de calcium anhydre, CaCl_2 27,50 g
ou chlorure de calcium dihydraté, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36,40 g

Dissoudre dans de l'eau de dilution et compléter le volume à 1 litre.

- (c) Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g

Dissoudre dans de l'eau de dilution et compléter le volume à 1 litre.

- (d) Chlorure de fer (III) hexahydraté, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
Dissoudre dans l'eau de dilution et compléter le volume à 1 litre.

REMARQUE. Pour éviter d'avoir à préparer cette solution juste avant usage, ajouter une goutte d'HCl concentré ou de l'acide éthylènediamine-tétracétique (sel disodique de l'EDTA) à raison de 0.4 g par litre.

S'il se forme un précipité dans une solution-mère, la remplacer par une solution fraîchement préparée.

Préparation du milieu minéral

13. Mélanger 10 ml de solution (a) avec 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions (b), (c) et (d) et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau de dilution.

Inoculum

14. Prélever un échantillon de boue activée fraîche dans une station de traitement d'eaux usées (la DBO₅ de l'eau épurée doit être inférieure à 25 mg par litre) et le laver deux fois avec le milieu minéral ou avec l'eau du robinet. Séparer la boue par centrifugation à environ 1 000 g pendant 3 à 5 minutes ou par décantation. Dans certains cas, pour obtenir le plus grand nombre possible d'espèces et de souches différentes, mélanger des échantillons provenant de diverses sources (par exemple d'autres stations d'épuration, d'extraits de sol, d'eaux de rivière, etc...) et traiter le mélange comme ci-dessus. Utiliser la boue dans les six heures après prélèvement, sinon la disperser dans un milieu minéral et l'aérer jusqu'à son utilisation. Vérifier l'activité de la boue par un contrôle de la procédure en utilisant une substance de référence, comme indiqué plus loin (paragraphe 18).

Préparation des récipients

15. Avant de commencer l'essai, si cela n'est pas déjà connu (6)(7), s'assurer par des méthodes appropriées de l'absence d'inhibition de la boue à la concentration choisie de la substance à tester. En cas d'inhibition, abaisser la concentration de la substance d'essai à un niveau peu susceptible d'être inhibiteur.

16. Dans un nombre approprié de récipients d'essai, introduire 500 ml de milieu minéral et des quantités de substance d'essai et d'inoculum calculées de façon à ce que le COD se situe entre 50 et 400 mg/l (DCO entre 100 et 1 000 mg/l) et que l'inoculum corresponde à un poids de matière sèche compris entre 0,2 et 1,0 g/l dans le volume final. S'assurer que le rapport entre l'inoculum et la substance d'essai (exprimé en COD) se situe entre 2,5:1 et 4,0:1. Compléter jusqu'au volume voulu par addition de milieu minéral. Le volume final, entre 1 et 5 litres, dépend du nombre d'échantillons à prélever pour la détermination du COD ou de la DCO et des volumes nécessaires pour les méthodes d'analyse. Normalement un volume de deux litres est suffisant.

17. Préparer en parallèle un ou deux récipients témoins contenant simplement la boue activée et le milieu minéral, et dont les volumes sont identiques à ceux des suspensions d'essai.

18. Pour chaque série d'essais, préparer également en parallèle un récipient pour le contrôle de la procédure, en utilisant un des composés de référence à la place de la substance d'essai. Si on a besoin d'informations sur la dégradation abiotique, on peut préparer une solution stérile du produit chimique étudié, sans inoculum.

Nombre de récipients

19. Dans un essai-type, on utilise les récipients suivants :

- 1 ou 2 récipients contenant la substance d'essai et l'inoculum (suspension d'essai) ;
- 1 ou 2 récipients contenant l'inoculum seul (témoin avec inoculum) ; et
- 1 récipient contenant le composé de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure).

Il est obligatoire de suivre le taux de COD en même temps dans la suspension d'essai et dans le témoin avec inoculum. Il est souhaitable de suivre également en parallèle le taux de COD dans l'autre récipient, mais cela n'est pas toujours possible.

EXÉCUTION DE L'ESSAI

20. Pour des raisons pratiques, ne pas commencer l'essai juste avant un week-end. Réaliser l'essai pendant une durée allant normalement jusqu'à 28 jours à l'obscurité ou sous lumière diffuse, à une température comprise entre 20 et 25°C. Aérer les suspensions avec de l'air purifié et humidifié et agiter, s'il y a lieu, pour s'assurer que la boue ne décante pas et que la concentration en oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 1 mg/l. Vérifier la valeur du pH à des intervalles de temps réguliers (par exemple les jours où l'on fait un prélèvement) et, le cas échéant, ajuster le pH entre 6,5 et 8,0 avec NaOH (40 g/l) ou H₂SO₄ (50 g/l).

Prélèvements

21. Suivre la biodégradation de la substance d'essai en déterminant le COD ou la DCO dans des échantillons de la suspension, prélevés aux périodes suivantes:

- 3 h ± 30 min après l'addition de la substance d'essai afin d'évaluer toute adsorption de celle-ci par la boue activée (voir l'exemple de la Figure 1) ;
- à au moins quatre moments dans l'intervalle compris entre le premier et le 27^{ème} jour ;
- le 27^{ème} et le 28^{ème} jours, ou, si le plateau est atteint en moins de 28 jours, les deux derniers jours de l'essai.

Le volume de l'échantillon dépend du type d'analyseur de carbone. Davantage de prélèvements peuvent être nécessaires afin de décrire la façon dont on atteint le plateau ou si l'on désire suivre l'adaptation.

22. Avant chaque prélèvement, compenser les pertes par évaporation.

Adaptation

23. Si l'on désire suivre l'adaptation (voir la courbe 1, Figure 2), effectuer des analyses du COD ou de la DCO à des intervalles de temps relativement rapprochés (par exemple toute les 24 heures). Prolonger l'essai au-delà de 28 jours si l'adaptation se produit au cours des derniers jours de la période d'essai.

24. S'il est nécessaire de connaître plus en détail le comportement de la boue adaptée, remettre la même boue activée en présence de la substance d'essai. Pour ce faire, arrêter l'aération et l'agitation et laisser décanter la boue. Retirer le surnageant, remplir le récipient jusqu'à son niveau de départ avec le milieu minéral, agiter pendant 15 minutes et répéter une fois l'opération. On peut également isoler la boue par centrifugation (paragraphe 14). Recommencer l'essai en utilisant la boue récupérée, à laquelle on peut ajouter de la boue fraîche si la quantité récupérée est insuffisante pour obtenir 0,2 à 1 g/l de matière sèche.

Méthodes d'analyse

25. Filtrer les échantillons de la suspension de boue (essai, témoin, contrôle de la procédure) dès qu'ils ont été prélevés, en éliminant les cinq premiers ml du filtrat. Utiliser soit des papiers-filtres soigneusement lavés soit des membranes filtrantes ; celles-ci sont utilisables dans la mesure où elles ne libèrent pas ou n'absorbent pas de substances organiques. Si ce n'est pas le cas, laver les membranes trois fois dans de l'eau déminéralisée ou distillée à environ 60°C et les conserver dans l'eau. Les boues qui sont difficiles à filtrer sont séparées par centrifugation ou par d'autres techniques appropriées.

26. Déterminer le COD ou la DCO en double dans les échantillons filtrés ou centrifugés au moyen

de toute méthode adaptée (4)(5). Si on désire suivre la biodégradation primaire, il faut employer des méthodes d'analyse spécifique, comme la spectroscopie UV, en plus de la détermination du COD ou de la DCO. Si on ne peut pas analyser les filtrats le jour du prélèvement, les conserver entre 2 et 4°C pendant au maximum 48 h ou à - 18°C pendant plus longtemps. Cependant, il n'est pas recommandé de stocker les filtrats pendant de longues périodes.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

27. Calculer le taux de dégradation à l'instant à partir de la formule :

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_B}{C_A - C_{BA}} \right] \times 100$$

où

D_t = pourcentage de dégradation à l'instant t ;

C_A = concentration du COD ou de la DCO dans la suspension d'essai, mesurée après 3 h ± 30 min d'incubation (en mg/l) ;

C_t = concentration moyenne du COD ou de la DCO dans la suspension d'essai au temps t (en mg/l) ;

C_B = concentration moyenne du COD ou de la DCO dans les témoins au temps t (en mg/l) ;

C_{BA} = concentration moyenne du COD ou de la DCO dans les témoins mesurée après 3 h ± 30 min. d'incubation (en mg/l).

Effectuer le même calcul pour la substance de référence. Tracer la courbe de biodégradation (comme dans les Figures 1 et 2) et noter (en mg/l) tous les résultats sur les feuilles de résultats.

Critères de validité et interprétation

28. Cet essai est considéré comme valide, si le contrôle de la procédure montre qu'au moins 70% de la substance de référence ont été éliminés en 14 jours et si la diminution du COD (ou de la DCO) dans la suspension d'essai se fait graduellement au cours du temps (jours ou semaines), ce qui indique un phénomène de biodégradation.

29. Cependant, dans certains cas, l'adsorption physico-chimique peut jouer un rôle, et celle-ci est décelée lorsque l'élimination est complète ou importante au cours des trois premières heures et que la différence entre les solutions d'essai et les témoins reste faible, contrairement à ce qu'on attendait. Dans de tels cas, on obtient des informations supplémentaires en comparant la valeur au bout de 3 heures, la valeur initiale attendue, calculée à partir de la quantité de substance d'essai ajoutée, et la valeur mesurée avant l'addition de l'inoculum. Si l'on désire faire une distinction plus précise entre la biodégradation (ou la dégradation partielle) et l'adsorption, il faut effectuer d'autres essais, de préférence un essai respirométrique pour mettre en évidence une biodégradabilité facile, en utilisant comme inoculum le surnageant de la boue acclimatée.

30. Si l'élimination de la substance d'essai est faible ou nulle, cela peut être dû au fait que celle-ci inhibe les bactéries ; on supprime cette possibilité en réalisant un essai d'inhibition aux concentrations utilisées, si cela n'a pas été déjà fait (paragraphe 15).

Rapport d'essai

31. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance d'essai :

- état physique et s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques ;
- données relatives à l'identification.

Inoculum :

- origine, concentration, état d'adaptation.

Conditions d'essai :

- méthodes d'analyse utilisées ;
- contrôle de la procédure et substance utilisée dans le contrôle.

Résultats :

- courbe de biodégradation ;
- évaluations de la toxicité ;
- le taux de biodégradation obtenu à la fin de l'essai après 28 jours, ou plus tôt si la dégradation complète est atteinte en moins de 28 jours, qui est la « biodégradabilité intrinsèque dans un essai statique après x jours » ;
- toute différence importante entre le COD (ou la DCO) déterminé dans le premier échantillon prélevé trois heures après le début de l'essai et la valeur calculée à partir de la quantité de substance d'essai ajoutée, ce qui constitue la quantité « adsorbée sur la boue activée » ;
- la phase d'adaptation (en jours), la phase de biodégradation (en jours) et le pourcentage de biodégradation atteint au bout de x jours et déterminé à partir de la courbe de biodégradation.

Discussion des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Zahn R. et Wellens H. (1974). Ein einfaches Verfahren zur Prüfung der biologischen Abbaubarkeit von Produkten und Abwasserinhaltsstoffen, *Chemiker Zeitung* 98, 228-232.
- (2) Schefer W. et Wälchli O. (1980). Prüfung der biologischen Eliminierbarkeit organisch-chemischer Abwasser-inhaltsstoffen, *Z. Wasser-und Abwasserforschung* 13, 205-209.
- (3) Reynolds L. *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability, *Chemosphere* 16, 2259.
- (4) Norme DIN 38 409 (1983). Partie 3. Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffgehaltes (DOC).
- (5) Norme ISO 6060 (1986). Qualité de l'eau. Détermination de la demande chimique en oxygène.

302 B

OCDE / OECD

- (6) OCDE (1984). Ligne directrice 209. Boue activée, Essai d'inhibition de la respiration.
- (7) Norme ISO 8192 (1986). Qualité de l'eau. Essai d'inhibition de la consommation d'oxygène par des boues activées.

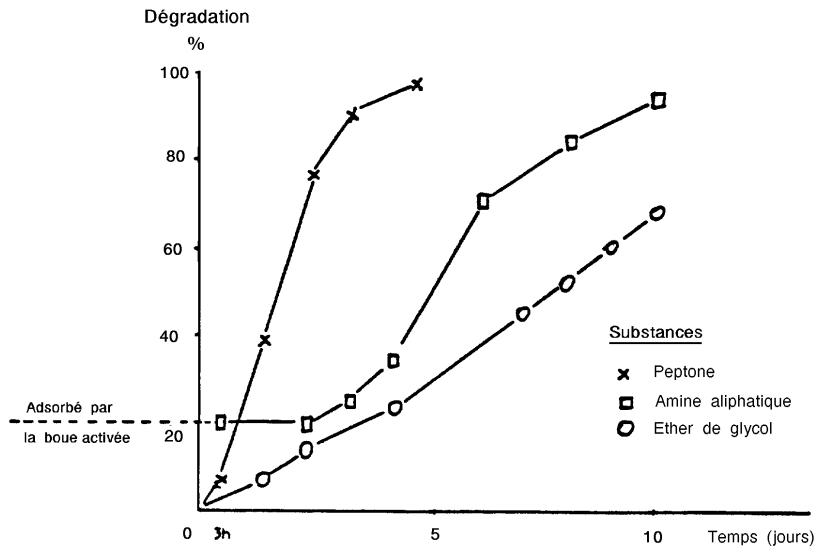


Figure 1 : Exemples de courbe de biodégradation

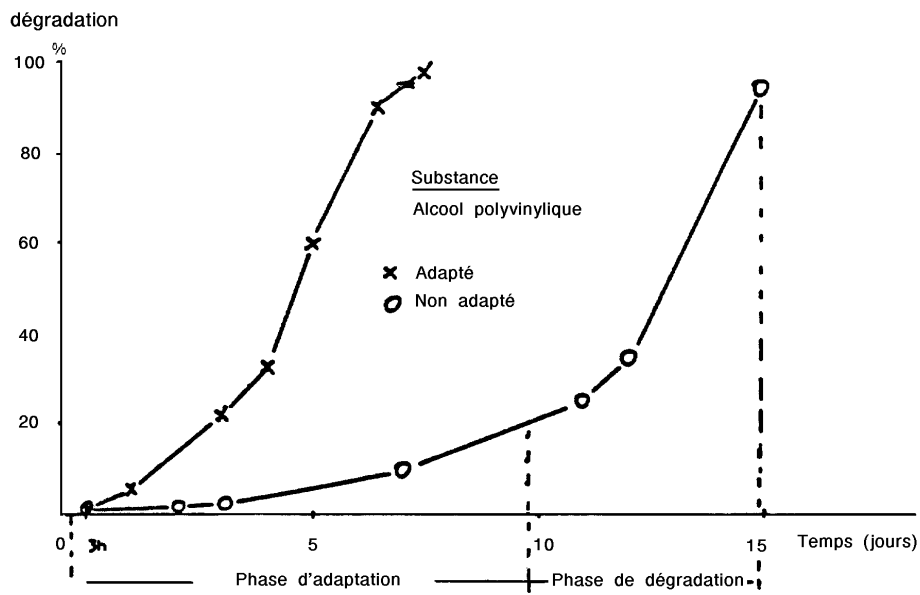


Figure 2 : Exemple d'adaptation d'une boue activée