

NORME INTERNATIONALE

**ISO
9439**

Première édition
1990-12-01

**Qualité de l'eau — Évaluation, en milieu aqueux,
de la biodégradabilité aérobie «ultime» des
composés organiques — Méthode par dosage
du dioxyde de carbone dégagé**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

*Water quality — Evaluation in an aqueous medium of the «ultimate»
aerobic biodegradability of organic compounds — Method by analysis
of released carbon dioxide*

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/05577dc4-d1f5-4441-9dd9-
e57796755176/iso-9439-1990](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/05577dc4-d1f5-4441-9dd9-e57796755176/iso-9439-1990)



Numéro de référence
ISO 9439:1990(F)

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 9439 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

Les annexes A, B et C de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

© ISO 1990

Droits de reproduction réservés. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Qualité de l'eau — Évaluation, en milieu aqueux, de la biodégradabilité aérobie «ultime» des composés organiques — Méthode par dosage du dioxyde de carbone dégagé

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode d'évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité «ultime» de composés organiques présents à une concentration donnée sous l'action de micro-organismes aérobies, par dosage du dioxyde de carbone dégagé.

La méthode est applicable à des composés organiques

- a) solubles dans les conditions de l'essai;
- b) insolubles dans les conditions de l'essai, auquel cas il peut être nécessaire de prendre des mesures particulières assurant une bonne dispersion du composé;
- c) non volatils ou ayant une pression de vapeur négligeable dans les conditions de l'essai;
- d) n'ayant pas d'action inhibitrice, à la concentration choisie, sur les micro-organismes utilisés pour l'essai. L'existence d'une action inhibitrice peut être mise en évidence suivant la méthode prescrite en 8.3, ou par toute autre méthode de détermination de l'action inhibitrice d'une substance sur les bactéries (voir par exemple ISO 8192).

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 7827:1984, *Qualité de l'eau — Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie «ultime» des composés organiques — Méthode par analyse du carbone organique dissous (COD)*.

ISO 8192:1986, *Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la consommation d'oxygène par des boues activées*.

3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent.

3.1 dégradation ultime: Niveau de dégradation atteint lorsque le composé soumis à l'essai a été totalement transformé par les micro-organismes en

dioxyde de carbone, eau, sels minéraux et nouveaux constituants cellulaires microbiens (biomasse).

3.2 matières en suspension (dans une boue activée): Matières éliminées par filtration ou centrifugation d'un volume connu de boue dans des conditions définies et, dans le cadre de la présente Norme internationale, dessiccation à environ 100 °C.

3.3 préexposition (ou préadaptation): Préincubation d'un inoculum en présence du composé à expérimenter, destinée à accroître l'aptitude de l'inoculum à dégrader le composé.

3.4 préconditionnement: Préincubation d'un inoculum dans les conditions d'essai, mais en l'absence du composé à expérimenter, destinée à améliorer l'efficacité de l'essai.

4 Principe

Évaluation de la biodégradation de composés organiques par des micro-organismes aérobies, dans un milieu d'essai.

Le composé organique à expérimenter constitue la seule source de carbone et d'énergie dans le milieu. Le taux de biodégradation est déterminé indirectement par mesurage de la quantité de dioxyde de carbone libéré pendant la durée de l'essai (généralement 28 jours). Le composé est utilisé à une concentration telle que la teneur initiale en carbone organique du milieu soit normalement comprise entre 10 et 40 mg/l. Pour obtenir des données supplémentaires, il est admis d'utiliser, si nécessaire, des concentrations supérieures à 40 mg/l.

Pour les composés suffisamment solubles dans l'eau, on peut mesurer la baisse de concentration du COD en fin d'essai.

5 Environnement d'essai

L'incubation doit être menée à l'obscurité ou sous lumière diffuse dans une enceinte maintenue à température constante (à ± 1 °C près) comprise entre 20 °C et 25 °C, et ne contenant pas de vapeurs toxiques.

6 Réactifs

Utiliser exclusivement des réactifs de qualité analytique reconnue.

6.1 Eau distillée ou déminéralisée.

Elle doit contenir moins de 10 % de la concentration initiale du COD apporté par le composé organique.

6.2 Milieu d'essai

6.2.1 Composition

6.2.1.1 Solution a).

Dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4)	8,5 g
Monohydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4)	21,75 g
Monohydrogénophosphate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33,4 g
Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)	0,5 g

Eau (6.1): compléter à 1000 ml

Le pH de la solution doit normalement être d'environ 7,4.

6.2.1.2 Solution b).

Dissoudre dans 1000 ml d'eau (6.1), 22,5 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

6.2.1.3 Solution c).

Dissoudre dans 1000 ml d'eau (6.1), 27,5 g de chlorure de calcium anhydre (CaCl_2) ou 36,4 g de chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

6.2.1.4 Solution d).

Dissoudre dans 1000 ml d'eau (6.1), 0,25 g de chlorure de fer(III) hexahydraté ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Préparer la solution juste avant emploi.

NOTE 1 Cette précaution n'est pas nécessaire si l'on ajoute à la solution une goutte d'acide chlorhydrique concentré (HCl) ou 0,4 g/l d'acide éthylènediamine-tétracétique (EDTA).

6.2.2 Préparation du milieu d'essai.

Pour 1 l de milieu d'essai, ajouter juste avant emploi à 800 ml d'eau (6.1).

- 10 ml de solution a);
- puis (pour éviter l'apparition de turbidité dans le milieu final) 1 ml de chacune des solutions b), c) et d).

Compléter à 1000 ml avec de l'eau (6.1).

7 Appareillage

S'assurer que la verrerie de laboratoire a été soigneusement nettoyée et, notamment, qu'elle est exempte de toute trace de substances organiques ou toxiques.

Matériel courant de laboratoire, et

7.1 Fioles en verre, coniques (Erlenmeyers), ou **flacons** permettant la purge des gaz et l'utilisation d'un agitateur magnétique (voir 8.3).

7.2 Système de production d'air sans dioxyde de carbone, capable d'alimenter chacune des fioles à un débit compris entre 50 ml/min et 100 ml/min et constant à 10 % près (voir exemple de montage dans l'annexe A).

Vérifier l'absence de dioxyde de carbone dans le système de production de l'air.

7.3 Dispositif de mesure du dioxyde de carbone, analyseur de dioxyde de carbone, ou dispositif de dosage titrimétrique après absorption totale dans une solution alcaline (voir en annexe A le principe de fonctionnement d'un système de dosage du dioxyde de carbone produit).

7.4 Dispositif de filtration, comportant des membranes de porosité adéquate (diamètre nominal des pores de 0,2 µm à 0,45 µm), dans lequel l'adsorption des composés organiques ou le relargage du carbone organique sont réduits au minimum.

7.5 Dispositif de mesure de la concentration en carbone organique dissous.

7.6 Centrifugeuse.

7.7 pH-mètre.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des solutions d'essai

8.1.1 Solution du composé à expérimenter

Préparer une solution mère du composé à expérimenter dans le milieu d'essai (6.2). Diluer une quantité adéquate de cette solution dans le milieu d'essai préalablement aéré (voir 8.3) de façon à obtenir une concentration finale de carbone organique comprise entre 10 mg/l et 40 mg/l.

NOTE 2 Les composés faiblement solubles dans l'eau peuvent être ajoutés directement au milieu, sous forme solide ou liquide, dans la fiole appropriée; une Norme internationale sera ultérieurement élaborée comme directive à ce sujet.

8.1.2 Solution du composé de référence

Préparer une solution mère du composé de référence (composé organique de biodégradabilité connue, tel que l'acétate de sodium, le benzoate de sodium, l'aniline) dans le milieu d'essai (6.2) en procédant comme en 8.1.1, de façon à obtenir une concentration finale de carbone organique de 20 mg/l.

8.1.3 Solution destinée au test d'inhibition

Si nécessaire, préparer une solution contenant, dans le milieu d'essai (6.2), le composé à expérimenter et le composé de référence aux concentrations respectivement définies pour les solutions 8.1.1 et 8.1.2.

8.2 Préparation de l'inoculum

Préparer l'inoculum à partir de matériel provenant d'une ou plusieurs des sources spécifiées ci-dessous, de façon à obtenir une population microbienne suffisamment active. Vérifier son activité au moyen du composé de référence (8.1.2).

La production de dioxyde de carbone dans la solution à blanc doit normalement être comprise entre 30 mg/l et 40 mg/l et ne pas dépasser 70 mg/l. Il peut être utile, pour réduire l'influence du blanc, de préconditionner la boue par aération pendant au plus une semaine avant utilisation [voir l'article 10 b)].

La quantité de carbone organique dissous apportée par l'inoculum doit être inférieure à 10 % de la concentration initiale du carbone organique apporté par le composé à expérimenter.

NOTE 3 Dans certaines circonstances, il est admis d'utiliser des inocula préexposés, à condition que cela soit clairement mentionné dans les résultats d'essai (par exemple: pourcent de biodégradation = x %, avec inocula préexposés) et que la méthode de préexposition soit détaillée dans le rapport d'essai.

Des inocula préexposés peuvent être obtenus à partir d'essais de biodégradation en laboratoire effectués dans différentes conditions (par exemple, essais SCAS ou de Zahn-Wellens) ou à partir d'échantillons prélevés à des emplacements où sont réunies les conditions d'environnement appropriées (par exemple, usines assurant le traitement de composés identiques, zones contaminées, etc.).

8.2.1 Inoculum provenant d'un effluent secondaire

Prélever un échantillon d'effluent secondaire provenant d'une usine de traitement d'eaux résiduelles d'origine principalement domestique. Conserver cet échantillon dans des conditions aérobies et l'utiliser le jour du prélèvement.

À partir de cet échantillon, préparer un inoculum en procédant comme suit:

- laisser décanter l'échantillon pendant 1 h;
- prélever dans le surnageant un volume convenable¹⁾ de liquide, qui servira d'inoculum, et réaliser l'essai le jour même.

8.2.2 Inoculum provenant d'une usine de traitement des boues activées

Prélever un volume convenable¹⁾ d'inoculum, par exemple, un échantillon de boue activée pris dans le bassin d'aération d'une usine de traitement d'eaux résiduelles d'origine essentiellement domestique.

Bien mélanger, conserver dans des conditions aérobies et utiliser le jour du prélèvement.

Déterminer, juste avant emploi, la concentration des matières en suspension¹⁾. Si nécessaire, concentrer la boue par décantation afin que le volume de boue à utiliser pour obtenir 30 mg de matières sèches par litre dans le mélange réactionnel soit minimal.

8.2.3 Inoculum provenant d'une eau de surface ou d'un système affluent d'une station de traitement des eaux domestiques

Prélever un échantillon d'eau de surface appropriée.

Cet échantillon, conservé en conditions aérobies, doit être utilisé le jour de sa préparation.

Prélever pour l'inoculum un volume convenable¹⁾ de cet échantillon.

Si nécessaire, l'inoculum peut être concentré par filtration ou centrifugation.

8.3 Essai

Prévoir un nombre de fioles (7.1) suffisant pour que l'expérience comprenne au moins:

- a) deux fioles destinées à l'essai proprement dit (symbole F_T);
 - b) deux fioles destinées à l'essai à blanc (symbole F_B);
 - c) une fiole destinée au contrôle de l'activité de l'inoculum (symbole F_C);
- plus, si nécessaire,
- d) une fiole destinée à la mise en évidence d'une éventuelle dégradation abiotique du composé (symbole F_S);
 - e) une fiole destinée à la mise en évidence d'une éventuelle action inhibitrice du composé (symbole F_I).

Introduire dans chaque fiole les quantités appropriées de milieu d'essai (6.2) et d'inoculum (8.2), suivant les indications fournies dans le tableau 1.

Homogénéiser le contenu des fioles et brancher celles-ci au système de production d'air sans CO_2 (voir 7.3 et annexe A).

Faire circuler dans les fioles, de l'air ne contenant pas de CO_2 , pendant 24 h, pour purger le système du dioxyde de carbone. Après cette période d'aération, introduire la solution de $Ba(OH)_2$ ou de $NaOH$ dans les flacons d'absorption du CO_2 (voir annexe A) et les brancher en série à la sortie d'air de chacune des fioles d'essai, ou brancher le système de mesurage du CO_2 .

1) Un volume est dit «convenable»

- s'il permet d'obtenir une population suffisamment active;
- s'il assure la dégradation du (des) composé(s) de référence au taux spécifié;
- s'il fournit de 10^3 à 10^5 cellules actives par millilitre;
- si la production de CO_2 dans les solutions d'essai à blanc reste inférieure à 70 mg/l (normalement 30 mg/l à 40 mg/l);
- si la concentration des matières en suspension dans le mélange réactionnel final est au plus équivalente à 30 mg de boue activée par litre.

Tableau 1 — Répartition finale du milieu d'essai et de l'inoculum

Fiole	Solutions				Inoculum ¹⁾ (8.2)
	milieu d'essai (6.2)	solution du composé à expérimenter (8.1.1)	solution du composé de référence (8.1.2)	solution destinée au test d'inhibition (8.1.3)	
	litres				ml
F _T Essai	0	2,5	0	0	n
F _T Essai	0	2,5	0	0	n
F _B Essai à blanc	2,5	0	0	0	n
F _B Essai à blanc	2,5	0	0	0	n
F _C Test d'activité	0	0	2,5	0	n
F _S Test de dégradation abiotique (facultatif)	0	2,5 ²⁾	0	0	0
F _I Test d'inhibition (facultatif)	0	0	0	2,5	n

1) Il convient d'utiliser un volume d'inoculum (n ml) compatible avec la condition de validité relative au blanc [voir l' article 10 b)] et permettant d'obtenir une population microbienne suffisante (voir 8.2).

2) Le volume de solution d'essai (8.1.1) contenu dans la fiole F_S doit être stérilisé par addition de 1 ml d'une solution contenant 10 g/l de chlorure de mercurell (HgCl₂), ou un autre composé toxique inhibant l'activité microbienne.

Ajouter dans les fioles les quantités prescrites (voir tableau 1) des solutions mères du composé à expérimenter (8.1.1) et du composé de référence (8.1.2), et faire incubé pendant 28 jours à température constante (à ± 1 °C près) comprise entre 20 °C et 25 °C.

Vérifier que le débit de l'air est le même dans toutes les fioles et est compris entre 50 ml/min et 100 ml/min.

Mesurer la quantité de dioxyde de carbone libéré dans chacune des fioles, à intervalles de temps réguliers (par exemple, aux jours 1, 7, 14 et 28). Si nécessaire, effectuer les mesurages à intervalles plus courts et/ou sur une durée supérieure à 28 jours.

L'annexe B décrit une méthode de dosage titrimétrique du CO₂ applicable lorsqu'on utilise le dispositif représenté dans l'annexe A.

Si la dégradation a atteint un niveau constant avant la fin de la période de 28 jours, considérer l'essai comme terminé.

Au dernier jour de l'essai (normalement le 28^e), acidifier toutes les fioles avec 1 ml d'acide chlorhydrique concentré afin de décomposer les carbonates et bicarbonates. Poursuivre l'aération pendant 24 h, puis mesurer la quantité de dioxyde de carbone produite dans chacune des fioles.

NOTE 4 Le pouvoir tampon du milieu étant relativement élevé, il est essentiel d'acidifier le mélange à la date du dernier échantillonnage pour que l'ensemble du dioxyde de carbone dissous puisse se dégager. Si l'on suit

également la biodégradation à travers le taux de disparition du COD, prélever au jour 0 et en fin d'essai (avant acidification) un échantillon dans chacune des fioles, et effectuer le dosage.

9 Calcul et expression des résultats

9.1 Calculs

9.1.1 Quantité de dioxyde de carbone produite par la dégradation théorique du composé

La quantité théorique de dioxyde de carbone produite (ThCO₂), en milligrammes, est donnée par la formule

ThCO₂ = C × V × 44 / 12

où

C est la concentration du composé à expérimenter dans la solution d'essai, mesurée ou calculée en tenant compte de la dilution à partir de la concentration du composé dans la solution mère (8.1.1), et exprimée en milligrammes de carbone organique par litre,

V est le volume de la solution d'essai, en litres,

44 et 12 sont, respectivement, la masse moléculaire relative du dioxyde de carbone et la masse atomique relative du carbone.

9.1.2 Pourcentage de dégradation

Déterminer le pourcentage de dégradation D_t pour les fioles F_T (essai), la fiole F_C (test d'activité), et éventuellement la fiole F_I (test d'inhibition), à partir de la quantité de dioxyde de carbone libérée pendant chaque intervalle d'observation, en utilisant la formule suivante:

$$D_T = \frac{(\text{CO}_2)_T - (\text{CO}_2)_B}{\text{ThCO}_2} \times 100$$

où

$(\text{CO}_2)_T$ est la moyenne, en milligrammes, de la quantité totale de dioxyde de carbone libérée dans les fioles F_T entre le début de l'essai et l'instant t ,

$(\text{CO}_2)_B$ est la moyenne, en milligrammes, de la quantité totale de dioxyde de carbone libérée dans les fioles F_B entre le début de l'essai et l'instant t ,

ThCO_2 est la quantité théorique de dioxyde de carbone produit, exprimée en milligrammes et calculée comme indiqué en 9.1.1

NOTES

5 Le pourcentage de dégradation abiotique (fiole F_S) est calculée de la même façon mais sans tenir compte de $(\text{CO}_2)_B$.

6 Le dosage du COD peut être utilisé pour déterminer le pourcentage final de dégradation D_t (voir ISO 7827).

9.2 Expression des résultats

Regrouper dans un tableau les pourcentages de dégradation obtenus pour chaque intervalle d'observation et chaque fiole. Si les résultats obtenus pour les deux fioles d'essai sont comparables, tracer une courbe de dégradation moyenne en fonction du temps (voir exemple dans l'annexe C).

Indiquer également les quantités de dioxyde de carbone libéré dans les fioles destinées aux tests de dégradation abiotique (F_S) et d'inhibition (F_I), si elles sont incluses dans l'essai.

10 Validité des résultats

L'essai est considéré comme valide si

a) le pourcentage de dégradation dans la fiole F_C (test d'activité) est supérieur à 50 % au 14^e jour;

b) la quantité de CO_2 dégagée par la solution à blanc au cours de l'essai n'est pas significative. La quantité totale de CO_2 libéré dans les solutions à blanc en fin d'essai doit normalement être comprise entre 30 mg/l et 40 mg/l et ne pas dépasser 70 mg/l.

Si la fiole F_I (test d'inhibition) est incluse dans l'expérience, on considère que le composé est inhibiteur si le pourcentage de dégradation dans la fiole est inférieur à 25 % au bout de 28 jours. Dans ce cas, répéter la série d'essais avec des concentrations plus faibles de composé.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir toutes les informations utiles, notamment:

- a) référence à la présente Norme internationale;
- b) toutes informations nécessaires à l'identification du composé expérimenté;
- c) nom et concentration du composé de référence utilisé;
- d) ensemble des résultats obtenus (présentés sous forme de tableau), y compris pour le test d'activité de l'inoculum (fiole F_C) et, éventuellement, les tests d'inhibition (fiole F_I) et de dégradation abiotique (fiole F_S), et courbe de dégradation;
- e) principales caractéristiques de l'analyseur de carbone utilisé;
- f) principales caractéristiques du dispositif de dosage du dioxyde de carbone utilisé;
- g) motifs d'un éventuel rejet de l'essai (voir article 10);
- h) éventuellement, méthode de préconditionnement ou de préexposition de l'inoculum;
- i) concentration du composé expérimenté et teneur en COD correspondante;
- j) origine, caractéristiques et volume de l'inoculum utilisé;
- k) toute autre indication importante concernant le mode opératoire suivi.

Annexe A (informative)

Principe de fonctionnement d'un système de dosage du dioxyde de carbone libéré

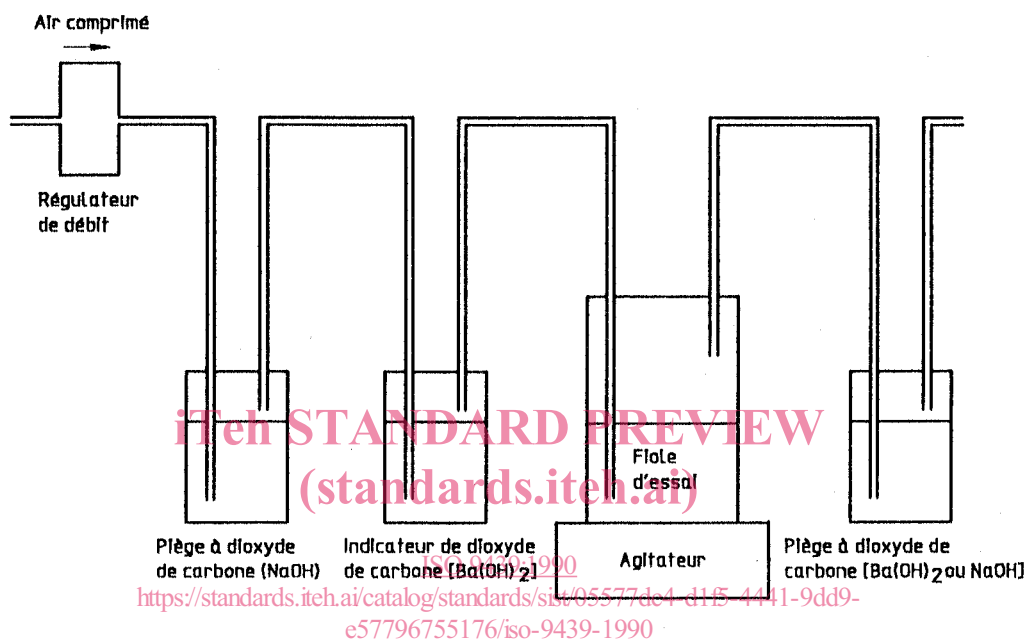


Figure A.1

Le système est alimenté en air comprimé, ou en air artificiel ne contenant pas de dioxyde de carbone, à pression faible et constante.

L'air passe dans une solution d'hydroxyde de sodium qui piège le dioxyde de carbone, puis dans une solution d'hydroxyde de baryum utilisée comme indicateur pour vérifier l'absence totale de dioxyde de carbone.

L'air est ensuite utilisé pour aérer le mélange réactionnel contenu dans les fioles d'essai. Si la biodégradation a lieu, du dioxyde de carbone est produit et absorbé dans un second piège, contenant une solution d'hydroxyde de sodium ou de baryum. Dans le premier cas, le dioxyde de carbone est dosé comme carbone inorganique dissous par un analyseur. Dans le second cas, il est dosé par titrimétrie suivant la méthode décrite dans l'annexe B. Il est alors nécessaire d'utiliser une série de trois pièges.