
Qualité de l'eau — Évaluation, en milieu aqueux, de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques par détermination de la demande en oxygène dans un respiromètre fermé

iTeh STANDARD PREVIEW
Water quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium by determination of oxygen demand in a closed respirometer
(standards.iteh.ai)

ISO 9408:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e767d9e5-f4b8-485f-a50a-bf080d23587d/iso-9408-1999>



Sommaire	Page
1 Domaine d'application	1
2 Termes et définitions.....	1
3 Principe.....	3
4 Environnement d'essai.....	3
5 Réactifs	4
6 Appareillage	5
7 Mode opératoire.....	5
8 Calcul et expression des résultats.....	8
9 Validité des résultats	10
10 Rapport d'essai	11
Annexe A (informative) Exemple de calcul de la demande théorique en oxygène	12
Annexe B (informative) Correction de la consommation d'oxygène pour éliminer l'interférence avec la nitrification	14
Annexe C (informative) Exemple de courbe de biodégradation	16
Annexe D (informative) Respiromètre fermé	17
Bibliographie	18

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.itih.ai)

[ISO 9408:1999](#)

[https://standards.itih.ai/standards/iso-9408-1999/767d9e5-f1b8-485f-a50a-bf080d23587d/iso-9408-1999](#)

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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

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 9408 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 9408:1991), dont elle constitue une révision technique.

Les annexes A à D de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 9408:1999](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e767d9e5-f4b8-485f-a50a-bf080d23587d/iso-9408-1999)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e767d9e5-f4b8-485f-a50a-bf080d23587d/iso-9408-1999>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9408:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e767d9e5-f4b8-485f-a50a-bf080d23587d/iso-9408-1999>

Qualité de l'eau — Évaluation, en milieu aqueux, de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques par détermination de la demande en oxygène dans un respiromètre fermé

AVERTISSEMENT — Les boues activées et les eaux usées contiennent des organismes potentiellement pathogènes. Prendre les précautions appropriées en les manipulant. Manipuler avec précaution les composés d'essai toxiques et ceux dont on ne connaît pas les propriétés.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode d'évaluation, en milieu aqueux, de la biodégradabilité ultime de composés organiques et d'eaux résiduaires présents à une concentration donnée sous l'action de micro-organismes aérobies, par détermination de la demande en oxygène dans un respiromètre fermé.

La méthode est applicable à des composés organiques

- a) solubles dans l'eau dans les conditions de l'essai;
- b) peu solubles dans l'eau dans les conditions de l'essai, auquel cas il peut être nécessaire de prendre des mesures particulières assurant une bonne dispersion du composé (voir, par exemple, l'ISO 10634);
- c) n'atteignant pas l'absorbant de CO₂ et ne réagissant pas avec lui;
- d) volatils, à condition d'utiliser un respiromètre adapté ou des conditions appropriées (par exemple un plus petit rapport entre les volumes de l'espace de tête et du milieu liquide);
- e) n'ayant pas d'effet inhibiteur sur les micro-organismes d'essai à la concentration choisie pour l'essai. La présence d'un effet inhibiteur peut être mis en évidence suivant la méthode spécifiée en 7.3, ou par toute autre méthode de détermination de l'effet inhibiteur d'un composé sur les bactéries (voir, par exemple, l'ISO 8192).

NOTE Les conditions décrites dans la présente Norme internationale ne correspondent pas toujours aux conditions optimales d'obtention de la biodégradation maximale. D'autres méthodes de biodégradation sont données dans l'ISO 15462.

2 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les termes et définitions suivants s'appliquent.

2.1

biodégradation aérobie ultime

en présence d'oxygène, décomposition par des micro-organismes d'un composé chimique ou d'une matière organique en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux issus de tout autre élément présent (minéralisation) et production de nouvelle biomasse

2.2**biodégradation primaire**

modification structurelle (transformation) d'un composé chimique sous l'action de micro-organismes, entraînant la perte d'une propriété spécifique

2.3**boue activée**

biomasse produite, lors du traitement aérobie des eaux résiduaires, par la croissance de bactéries ou d'autres micro-organismes en présence d'oxygène dissous

2.4**concentration de matières en suspension dans une boue activée**

quantité de matière solide obtenue par filtration ou centrifugation d'un volume connu de boues activées et séchage à 105 °C environ jusqu'à masse constante

2.5**demande biochimique en oxygène****DBO**

concentration en masse de l'oxygène dissous consommé dans des conditions définies lors de l'oxydation biologique aérobie d'un composé chimique ou d'une matière organique dans l'eau

NOTE La DBO s'exprime ici en milligrammes d'oxygène consommé par milligramme (ou gramme) de composé d'essai.

2.6**demande chimique en oxygène****DCO**

concentration en masse d'oxygène équivalente à la quantité d'oxydant spécifié consommée par un composé chimique ou une matière organique lorsqu'un échantillon d'eau est traité avec cet oxydant dans des conditions définies

NOTE La DCO s'exprime ici en milligrammes d'oxygène consommé par milligramme (ou gramme) de composé d'essai.

2.7**demande théorique en oxygène****DThO**

quantité théorique maximale d'oxygène nécessaire pour oxyder complètement un composé chimique, calculée à partir de la formule moléculaire

NOTE La DThO s'exprime ici en milligrammes d'oxygène nécessaire par milligramme (ou gramme) de composé d'essai.

2.8**carbone organique dissous****COD**

partie du carbone organique présent dans l'eau qui ne peut être éliminé par la méthode de séparation de phases spécifiée

NOTE Une séparation de phases peut être spécifiée, par exemple, par centrifugation à 40 000 m·s⁻² pendant 15 min ou par filtration sur membrane de diamètre de pores de 0,2 µm à 0,45 µm.

2.9**phase de latence**

durée entre le début d'un essai et le moment où l'adaptation et/ou la sélection des micro-organismes de dégradation sont achevées et où le taux de biodégradation d'un composé chimique ou d'une matière organique a atteint environ 10 % du niveau maximal de biodégradation

NOTE La phase de latence est exprimée en jours.

2.10**niveau maximal de biodégradation**

dans un essai, taux maximal de biodégradation d'un composé chimique ou d'une matière organique au-delà duquel aucune biodégradation ne survient plus pendant l'essai

NOTE Le niveau maximal de biodégradation est exprimé en pourcentage.

2.11**phase de biodégradation**

durée entre la fin de la phase de latence d'un essai et le moment où environ 90 % du niveau maximal de biodégradation est atteint

NOTE La phase de biodégradation est exprimée en jours.

2.12**phase de plateau**

durée entre la fin de la phase de biodégradation et la fin de l'essai

NOTE La phase de plateau est exprimée en jours.

2.13**préexposition**

préincubation d'un inoculum en présence du composé chimique ou d'une matière organique, destinée à accroître l'aptitude de l'inoculum à dégrader le matériau d'essai par adaptation et/ou sélection des micro-organismes

2.14**préconditionnement**

préincubation d'un inoculum dans les conditions d'essai, mais en l'absence du composé chimique ou de la matière organique, destinée à améliorer l'efficacité de l'essai par acclimatation des micro-organismes aux conditions de l'essai

3 Principe**iTeh STANDARD PREVIEW**

Détermination de la biodégradation des composés organiques par des micro-organismes aérobies dans un milieu d'essai aqueux en condition statique. Dans le contexte de la présente Norme internationale, les composés organiques comprennent également les eaux résiduaires. Le mélange pour essai contient un milieu inorganique, le composé organique comme seule source de carbone et d'énergie à une concentration normalement égale à 100 mg/l [mais sa demande théorique en oxygène (DThO) doit être d'au moins 100 mg/l] ainsi qu'un inoculum mixte provenant d'une usine de traitement des eaux résiduaires ou d'une autre source de l'environnement.

Le mélange est agité dans un récipient d'essai fermé et la consommation d'oxygène est déterminée soit par mesurage de la quantité d'oxygène nécessaire au maintien d'un volume de gaz constant dans le respiromètre, soit par mesurage des variations de volume et/ou de pression dans l'appareil. Le dioxyde de carbone dégagé est absorbé par une substance appropriée, à l'intérieur du récipient d'essai.

La dégradation est suivie sur une période de 28 jours, ou davantage si nécessaire, en déterminant la consommation d'oxygène de façon automatique ou manuelle. La quantité d'oxygène consommée par le composé organique (après correction par comparaison avec un essai à blanc) est exprimée soit en pourcentage de la demande théorique en oxygène (DThO), calculée à partir de la formule du composé, soit en pourcentage de la demande chimique en oxygène (DCO).

Lorsque les composés sont suffisamment solubles dans l'eau, il est possible de déterminer (facultativement) l'élimination du carbone organique dissous (COD) par mesurage de la concentration en COD en début et en fin d'incubation, de manière à obtenir des informations complémentaires sur la biodégradabilité ultime. Si une méthode d'analyse spécifique de la substance est disponible, des informations sur la biodégradabilité primaire peuvent être obtenues.

4 Environnement d'essai

L'incubation doit être menée à l'abri de la lumière ou sous lumière diffuse, à une température maintenue constante durant l'essai (à ± 1 °C près) comprise entre 20 °C et 25 °C.

5 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

5.1 Eau, distillée ou dé-ionisée, dont la teneur en COD est inférieure à 1 mg/l.

5.2 Milieu d'essai

5.2.1 Composition

5.2.1.1 Solution a)

Dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4)	8,5 g
Monohydrogénophosphate de dipotassium anhydre (K_2HPO_4)	21,75 g
Monohydrogénophosphate de disodium 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

Dissoudre dans une quantité suffisante d'eau (5.1) pour compléter à 1 000 ml

NOTE Afin de vérifier cette solution tampon, il est recommandé d'effectuer un mesurage du pH. Si celui-ci n'est pas d'environ 7,4, il convient de préparer une nouvelle solution.

5.2.1.2 Solution b)

Dissoudre 22,5 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dans l'eau (5.1) et compléter à 1 000 ml.

5.2.1.3 Solution c)

Dissoudre 36,4 g de chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans l'eau (5.1) et compléter à 1 000 ml.

5.2.1.4 Solution d)

Dissoudre 0,25 g de chlorure de fer(III) hexahydraté ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dans l'eau (5.1) et compléter à 1 000 ml. Pour éviter les précipités, préparer cette solution juste avant emploi ou ajouter une goutte d'acide chlorhydrique concentré (HCl).

5.2.2 Préparation du milieu d'essai

Pour 1 000 ml de milieu d'essai, ajouter à environ 800 ml d'eau (5.1):

- 10 ml de solution a);
- 1 ml de chacune des solutions b) à d).

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau (5.1). Préparer cette solution extemporanément. Les solutions a) à c) peuvent être conservées pendant 6 mois à l'abri de la lumière et à température ambiante.

5.3 Absorbant du dioxyde de carbone

Solution d'hydroxyde de potassium (à environ 10 mol/l), comprimés de chaux sodée ou tout autre absorbant approprié.

5.4 Solution de chlorure de mercure

Dissoudre 1 g de chlorure de mercure(II) (HgCl_2) dans 100 ml d'eau (5.1).

5.5 Solution d'hydroxyde de sodium

Dissoudre l'hydroxyde de sodium (NaOH) dans l'eau (5.1) pour obtenir une solution ayant une concentration de 0,1 mol/l à 0,5 mol/l.

5.6 Solution d'acide chlorhydrique

Diluer de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) avec de l'eau (5.1) pour obtenir une solution ayant une concentration de 0,1 mol/l à 0,5 mol/l.

6 Appareillage

S'assurer que la verrerie de laboratoire a été soigneusement nettoyée et qu'elle est exempte de matières organiques ou toxiques.

6.1 Respiromètre fermé

Le principe d'un respiromètre fermé est décrit à l'annexe D. Le respiromètre contient des récipients d'essai permettant l'arrivée d'oxygène et l'agitation ainsi que des tubes imperméables à l'oxygène et au dioxyde de carbone. Ces récipients sont conservés dans une enceinte isotherme ou un bain-marie thermostaté. Pour les essais portant sur des composés volatils, utiliser un appareil spécifique ou adapté à cet usage particulier. Veiller à ce qu'aucune perte de composé ne se produise du fait de l'appareil.

6.2 Bain-marie ou enceinte isotherme (satisfaisant aux exigences de l'article 4).

6.3 Appareil de mesure, d'une sensibilité suffisante pour le dosage du carbone organique dissous (COD) (facultatif).

6.4 Dispositif de détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) (facultatif).

6.5 Centrifugeuse, capable de produire une accélération de 4 000 g, ou **dispositif de filtration**, équipé de membranes filtrantes (diamètre nominal des pores de 0,2 µm à 0,45 µm), qui empêchent l'adsorption ou le relargage du carbone organique.

6.6 pH-mètre (équipement courant de laboratoire).

7 Mode opératoire

7.1 Préparation des solutions d'essai

7.1.1 Composé d'essai

Préparer une solution mère de composé d'essai suffisamment soluble dans l'eau, dans le milieu d'essai (5.2) et ajouter dans les récipients d'essai une quantité suffisante de cette solution pour obtenir une concentration finale de 100 mg de composé d'essai par litre, mais équivalent au minimum à une demande théorique en oxygène (DThO) de 100 mg/l. Il est possible d'utiliser d'autres concentrations en fonction des propriétés du composé d'essai (par exemple toxicité) et de l'objectif de l'essai. Ajouter les composés à faible solubilité dans l'eau directement dans les récipients d'essai. Déterminer exactement la quantité ajoutée. Déterminer, si nécessaire, la DCO du composé d'essai, par exemple à l'aide de l'ISO 6060.

NOTE Pour plus de détails sur la manière de procéder avec les composés faiblement solubles dans l'eau, voir l'ISO 10634.

7.1.2 Composé de référence

Utiliser comme composé de référence un composé organique de biodégradabilité connue, tel que l'aniline ou le benzoate de sodium, qui ont un degré de dégradation supérieur à 60 %. Préparer la solution mère du composé de référence dans le milieu d'essai (5.2) de la même manière que pour le composé d'essai soluble dans l'eau (7.1.1) pour obtenir une concentration finale de 100 mg de composé de référence par litre de milieu d'essai.

7.1.3 Solution de contrôle de l'inhibition

Si besoin est (par exemple lorsqu'on ne dispose d'aucune information quant à la toxicité du composé d'essai), préparer une solution contenant dans le milieu d'essai (5.2) à la fois le composé d'essai (7.1.1) et le composé de référence (7.1.2), de préférence à des concentrations de 100 mg/l pour chacun.

7.2 Préparation de l'inoculum

7.2.1 Généralités

Préparer l'inoculum en utilisant de préférence une boue activée ou les sources suivantes (7.2.2 à 7.2.4) ou encore un mélange de ces sources, de manière à obtenir une population microbienne qui offre une activité biodégradante suffisante. Vérifier l'activité de l'inoculum à l'aide du composé de référence (7.1.2 et article 9). Il convient que la DBO du blanc remplisse les critères de validité (voir l'article 9). Pour réduire l'influence du blanc, il peut être utile de préconditionner l'inoculum, par exemple en l'aérant pendant une semaine au plus avant l'emploi. Utiliser un volume convenable pour l'inoculation.

NOTE Afin de permettre une prévision générale du comportement de la dégradation dans l'environnement, il convient, normalement, de ne pas préexposer l'inoculum au composé d'essai. Dans certaines circonstances, selon l'objectif de l'essai, il est admis d'utiliser des inoculums préexposés, à condition d'en faire clairement état dans le rapport d'essai (par exemple: pourcentage de biodégradation = x %, avec des inoculums préexposés) et à condition que la méthode de préexposition soit détaillée dans le rapport d'essai. Les inoculums préexposés peuvent être obtenus à partir d'essais de biodégradation en laboratoire effectués dans diverses conditions (par exemple essai de Zahn-Wellens selon l'ISO 9888 ou essai SCAS selon l'ISO 9887) ou à partir d'échantillons prélevés en des lieux où sont réunies les conditions d'environnement appropriées (par exemple usines assurant le traitement de composés identiques ou zones contaminées).

Compte tenu de l'expérience, un «volume convenable» signifie

- qu'il permet d'obtenir une population offrant une activité de biodégradation suffisante;
- qu'il dégrade le composé de référence au pourcentage spécifié (voir l'article 9);
- qu'il fournit entre 10^3 et 10^6 unités formant colonies par millilitre dans le mélange final;
- que, dans le mélange final, il ne fournit pas plus de l'équivalent de 30 mg/l de matières en suspension provenant de boues activées;
- qu'il convient que la quantité de carbone organique dissous apportée par l'inoculum soit inférieure à 10 % de la concentration initiale en carbone organique introduite par le composé d'essai.

En règle générale, 1 ml à 10 ml d'inoculum est un volume suffisant pour 1 000 ml de solution d'essai.

7.2.2 Inoculum provenant d'une installation de traitement de boues activées

Prélever un échantillon de boue activée recueillie dans le bassin d'aération d'un laboratoire ou d'une usine de traitement d'eaux résiduaires d'origine essentiellement domestique. Bien mélanger et déterminer la concentration des particules solides contenues dans la boue activée (utiliser par exemple l'ISO 11923). Si nécessaire, concentrer la boue par décantation afin que le volume de boue ajouté à la quantité analysée soit minimal, mais tout en respectant les critères de 7.2.1. S'il est supposé que la boue contient des matières inhibitrices, centrifuger, laver à l'aide du milieu d'essai (5.2), centrifuger de nouveau et remettre en suspension dans le milieu d'essai. Conserver l'échantillon dans des conditions aérobies et l'utiliser de préférence le jour du prélèvement. Utiliser un volume convenable (voir 7.2.1) pour obtenir 30 mg/l de matières solides en suspension dans le mélange final.

7.2.3 Inoculum provenant d'eaux résiduaires

Prélever un échantillon dans l'affluent ou l'effluent d'un laboratoire ou d'une usine de traitement d'eaux résiduaires d'origine essentiellement domestique. Si nécessaire, concentrer l'échantillon par filtration ou centrifugation. Bien mélanger. Conserver l'échantillon dans des conditions aérobies et l'utiliser de préférence le jour du prélèvement. Avant l'emploi, laisser décanter l'échantillon pendant 1 h et prélever dans le surnageant un volume convenable pour l'inoculation.

7.2.4 Inoculum provenant d'une eau de surface

Prélever un échantillon dans une eau de surface appropriée. Si nécessaire, concentrer l'échantillon par filtration ou centrifugation. Conserver l'échantillon dans des conditions aérobies et l'utiliser de préférence le jour du prélèvement. Utiliser un volume convenable comme inoculum.

7.3 Essai

Installer le respiromètre fermé (voir 6.1 et l'exemple décrit à l'annexe D). Prévoir un nombre suffisant de récipients d'essai, de façon à disposer

- d'au moins 2 récipients d'essai (symbole F_T), contenant le composé d'essai (7.1.1);
- d'au moins 2 récipients d'essai à blanc (symbole F_B), contenant le milieu d'essai et l'inoculum;
- d'au moins 1 récipient, destiné au contrôle du mode opératoire (symbole F_C), contenant le composé de référence (7.1.2);
- le cas échéant, d'un récipient (symbole F_I) destiné à vérifier un éventuel effet inhibiteur du composé d'essai, contenant la solution 7.1.3;
- le cas échéant, d'un récipient (symbole F_S) destiné à vérifier une possible élimination abiotique, contenant le composé d'essai (7.1.1) mais pas l'inoculum, stérilisé par ajout d'un composé inorganique toxique approprié inhibant l'activité microbienne. Utiliser, par exemple, 1 ml/l d'une solution de chlorure de mercure(II) (5.4). Si nécessaire, ajouter la même quantité de substance toxique deux semaines après le début de l'essai.

Ajouter dans les récipients d'essai respectifs, les quantités convenables de milieu d'essai (5.2), d'inoculum (7.2), de composé d'essai (7.1.1) et de composé de référence (7.1.2) aux concentrations désirées conformément au Tableau 1 afin d'obtenir le volume d'essai final désiré. Ajouter l'absorbant (5.3) dans les compartiments absorbant le CO_2 des récipients. Mesurer le pH du contenu des récipients et, si nécessaire, l'ajuster à 7,4 à l'aide des solutions 5.5 ou 5.6.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e767d9e5-f4b8-485f-a50a-bf080d23587d/iso-9408-1999>

Tableau 1 — Répartition finale des composés d'essai et de référence dans les récipients d'essai

Récipient	Milieu d'essai (5.2)	Composé d'essai (7.1.1)	Composé de référence (7.1.2)	Inoculum (7.2)
F_T (composé d'essai)	+	+	—	—
F_T (composé d'essai)	+	+	—	—
F_B (essai à blanc)	+	—	—	+
F_B (essai à blanc)	+	—	—	+
F_C (contrôle de l'inoculum)	+	—	+	+
F_I (contrôle de l'inhibition) (facultatif)	+	+	+	+
F_S (contrôle de l'élimination abiotique) (facultatif)	+	+	—	—

Placer tous les récipients d'essai dans le bain-marie ou l'enceinte isotherme (6.2); les laisser atteindre la température désirée (voir l'article 4); boucher les récipients et, dans le cas d'un respiromètre automatique, faire les branchements nécessaires et mettre l'agitateur en marche. Effectuer les relevés de demande biochimique en oxygène (consommation d'oxygène) sur les manomètres (en cas d'opération manuelle) ou vérifier que l'enregistreur fonctionne convenablement en cas de fonctionnement automatique. Suivre la méthode indiquée par le fabricant pour le type correspondant de respiromètre.

Lorsque le niveau de consommation d'oxygène se stabilise (phase de plateau) et qu'aucune biodégradation supplémentaire n'est attendue, considérer l'essai comme terminé. En règle générale, la durée de l'essai ne doit pas dépasser 28 jours. Si la dégradation a visiblement commencé mais n'a pas encore atteint une phase de plateau, prolonger l'essai de 1 à 2 semaines.