

---

---

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

*Water quality — Evaluation of the ready, ultimate aerobic  
biodegradability of organic compounds in an aqueous medium —  
Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC)*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 7827:2010

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff6d28e1-a8f1-41a6-a282-  
bd28867437fc/iso-7827-2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff6d28e1-a8f1-41a6-a282-bd28867437fc/iso-7827-2010)



**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 7827:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff6d28e1-a8f1-41a6-a282-bd28867437fc/iso-7827-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff6d28e1-a8f1-41a6-a282-bd28867437fc/iso-7827-2010>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2010

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

**Sommaire**

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>2</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>3</b>
<b>5</b> <b>Environnement d'essai</b> .....	<b>3</b>
<b>6</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Appareillage et matériaux</b> .....	<b>4</b>
<b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>5</b>
<b>9</b> <b>Calcul et expression des résultats</b> .....	<b>8</b>
<b>10</b> <b>Validité de l'essai</b> .....	<b>9</b>
<b>11</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>9</b>
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Courbe de dégradation typique</b> .....	<b>11</b>
<b>Annexe B</b> (informative) <b>Interprétation des résultats</b> .....	<b>12</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>14</b>

[ISO 7827:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff6d28e1-a8f1-41a6-a282-bd28867437fc/iso-7827-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff6d28e1-a8f1-41a6-a282-bd28867437fc/iso-7827-2010>

## 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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 7827 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 7827:1994), qui a fait l'objet d'une révision technique.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff6d28e1-a8f1-41a6-a282-bd28867437fc/iso-7827-2010>

# Qualité de l'eau — Évaluation de la biodégradabilité aérobie «facile», «ultime» des composés organiques en milieu aqueux — Méthode par analyse du carbone organique dissous (COD)

**AVERTISSEMENT** — Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

**IMPORTANT** — Il est absolument essentiel que les essais réalisés conformément à la présente Norme internationale soient exécutés par un personnel ayant reçu une formation adéquate.

**PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ** — Les boues activées et les eaux usées contiennent des organismes potentiellement pathogènes. Prendre par conséquent les précautions appropriées lors de leur manipulation. Manipuler avec précaution les composés pour essai toxiques ou dont les propriétés ne sont pas connues.

(standards.iteh.ai)

## 1 Domaine d'application

ISO 7827:2010

La présente Norme internationale spécifie une méthode d'évaluation de la biodégradabilité «facile» et «ultime» des composés organiques à une gamme de concentrations données sous l'action de micro-organismes aérobies. Dans ce contexte, la présente Norme internationale fournit également des définitions spécifiques des termes «facile» et «ultime».

La méthode s'applique à des composés organiques qui sont:

- solubles à la concentration utilisée dans les conditions de l'essai [concentrations de 10 mg/l à 40 mg/l de carbone organique dissous (COD)];
- non volatils, ou ayant une tension de vapeur négligeable dans les conditions de l'essai;
- non absorbables significativement sur le verre et les boues activées;
- non inhibiteurs, à la concentration choisie pour l'essai, vis-à-vis des micro-organismes d'essai.

La méthode ne convient pas aux eaux usées, car elles contiennent en général des quantités importantes de carbone organique insoluble dans l'eau, qui ne fait pas partie des mesurages COD.

## 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 8245, *Qualité de l'eau — Lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (COT) et du carbone organique dissous (COD)*

ISO 9408, *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*

ISO 9439, *Qualité de l'eau — Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime en milieu aqueux des composés organiques — Essai de dégagement de dioxyde de carbone*

### 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

#### 3.1 temps de dégradation

$t_2$   
temps qui sépare la fin du temps de latence,  $t_1$ , du moment où 90 % du niveau maximal de biodégradation est atteint

NOTE Le temps de dégradation est exprimé en jours.

#### 3.2 biodégradation inhérente

niveau de biodégradation atteint indiquant qu'il est peu probable que le composé soumis à essai persiste dans l'environnement

NOTE Voir l'Annexe B.

#### 3.3 temps de latence

$t_1$   
temps depuis le début de l'essai jusqu'à atteindre 10 % de biodégradation

NOTE Le temps de latence est exprimé en jours.

#### 3.4 niveau maximal de biodégradation

taux de biodégradation d'un composé chimique ou d'une matière organique au cours d'un essai, au-dessus duquel il ne se produit plus de biodégradation pendant la durée de l'essai

#### 3.5 biodégradation primaire

modification structurelle (transformation) d'un composé chimique, sous l'action de micro-organismes, se traduisant par la perte de ses propriétés spécifiques

#### 3.6 biodégradation «facile»

niveau de biodégradation atteint dans des conditions définies, indiquant que le composé soumis à essai peut être considéré comme une substance se dégradant rapidement et entièrement dans des conditions d'environnement aquatique aérobie

NOTE Voir l'Annexe B.

#### 3.7 matières en suspension

(boue activée) matières en suspension dans une boue activée d'un diamètre de particule > 45 µm

NOTE La concentration des matières en suspension est obtenue par filtration ou centrifugation d'un volume connu de boue dans des conditions spécifiées, dessiccation à 105 °C et correction du volume d'échantillon. La concentration des matières en suspension est exprimée en milligrammes par litre.

**3.8****biodégradation «ultime»**

décomposition d'un composé chimique ou de matière organique sous l'action de micro-organismes, en dioxyde de carbone, eau et tout autre élément présent (minéralisation), et production de biomasse nouvelle

**4 Principe**

La biodégradation des composés organiques par des micro-organismes aérobie en milieu minéral est déterminée par mesurage de la concentration en COD. Les composés organiques sont la seule source de carbone dans le milieu. La concentration des composés utilisés est telle que la concentration initiale en COD dans le milieu est comprise entre 10 mg/l et 40 mg/l. Si nécessaire, des concentrations supérieures à 40 mg/l peuvent être utilisées. L'aération de la solution d'essai s'effectue dans l'obscurité ou sous une lumière diffuse à une température de  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

La biodégradation est contrôlée par le mesurage du COD au début de l'essai (jour 0), à la fin de l'essai (jour 28, ou plus longtemps si nécessaire) et au moins à trois intervalles de temps intermédiaires. Le pourcentage d'élimination du COD est calculé à chaque intervalle de temps et la biodégradabilité des composés organiques est établie sur la base de ces données. Des analyses spécifiques peuvent donner des informations supplémentaires sur la biodégradation primaire.

L'essai ne convient pas aux composés qui sont inhibiteurs à la concentration utilisée pendant l'essai. Leur action inhibitrice éventuelle peut être mise en évidence comme spécifié en 8.3, ou par toute autre méthode de détermination de l'effet inhibiteur d'une substance vis-à-vis de bactéries (par exemple l'ISO 8192<sup>[1]</sup>).

Les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale ne correspondent pas nécessairement aux conditions optimales permettant d'atteindre le taux maximal de biodégradation. Les essais de biodégradabilité facile répondent à des conditions très rigoureuses et une substance qui subit ces essais avec succès est considérée comme une substance se dégradant rapidement et entièrement dans n'importe quel milieu aquatique aérobie, en particulier dans les stations d'épuration traitant des eaux usées. Voir l'ISO/TR 15462<sup>[6]</sup> pour d'autres méthodes de biodégradation.

Voir l'Annexe B pour des informations sur l'interprétation des résultats.

**5 Environnement d'essai**

L'incubation doit être réalisée dans l'obscurité ou sous lumière diffuse dans une enceinte maintenue à  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  et ne contenant pas de vapeurs toxiques pour les micro-organismes.

**6 Réactifs**

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue (le cas échéant).

**6.1 Eau**, distillée ou déminéralisée, contenant moins de 10 % de la concentration initiale de COD introduite par le composé soumis à essai pour maintenir une fidélité acceptable.

**6.2 Milieu d'essai****6.2.1 Composition****6.2.1.1 Solution A**

Dihydrogénophosphate de potassium anhydre, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	8,5 g
Hydrogénophosphate de dipotassium anhydre, $\text{K}_2\text{HPO}_4$	21,75 g

## ISO 7827:2010(F)

Hydrogénophosphate de disodium dihydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,4 g
Chlorure d'ammonium, $\text{NH}_4\text{Cl}$	0,5 g
Eau (6.1), quantité suffisante pour	1 000 ml

Mesurer le pH de la solution. Il convient que celui-ci se situe à  $7,4 \pm 0,2$ . Si ce n'est pas le cas, préparer une nouvelle solution.

### 6.2.1.2 Solution B

Dissoudre 22,5 g de sulfate de magnésium heptahydraté ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) dans de l'eau (6.1) et compléter à 1 000 ml.

### 6.2.1.3 Solution C

Dissoudre 27,5 g de chlorure de calcium anhydre ( $\text{CaCl}_2$ ) dans de l'eau (6.1) et compléter à 1 000 ml.

### 6.2.1.4 Solution D

Dissoudre 0,25 g de chlorure de fer(III) hexahydraté ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) dans de l'eau (6.1) et compléter à 1 000 ml. Préparer cette solution au moment de l'emploi.

La nécessité de préparer cette solution au moment de l'emploi peut être évitée si l'on ajoute une goutte d'acide chlorhydrique concentré (HCl) ou d'acide éthylènediamine tétraacétique à 0,4 g/l (EDTA).

## 6.2 Préparation

Pour 1 l de milieu d'essai, ajouter à environ 500 ml d'eau (6.1):

- 1 ml de chacune des solutions B, C et D;
- 10 ml de la solution A.

Compléter jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau (6.1). La solution A est ajoutée en dernier, afin d'éviter une précipitation des sels. Préparer le milieu d'essai au moment de l'emploi. Les solutions A à C peuvent être conservées jusqu'à 6 mois dans l'obscurité à température ambiante, et la solution D (avec conservateur) pendant 3 mois.

## 7 Appareillage et matériaux

S'assurer que la verrerie est soigneusement nettoyée et, notamment, qu'elle est exempte de toute trace de matière organique ou toxique.

Utiliser du matériel de laboratoire courant et, en particulier, ce qui suit.

**7.1 Appareil d'une sensibilité suffisante**, pour la mesure du COD dans la gamme de concentrations de 0,5 mg/l à 40 mg/l déterminées conformément à l'ISO 8245.

**7.2 Centrifugeuse**, pouvant centrifuger des échantillons à 40 000 m/s<sup>2</sup> pour la concentration des matières solides des boues et la préparation des échantillons pour l'analyse COD.

**7.3 Dispositif d'agitation ou agitateur**, permettant aération et agitation.

**7.4 Incubateur**, ou **environnement à température contrôlée**, pouvant maintenir les solutions d'essai à une température de  $22 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  dans l'obscurité ou sous lumière diffuse.

**7.5 pH-mètre.**



**7.6 Fioles coniques**, de capacité appropriée (par exemple 2 000 ml).

**7.7 Dispositif de filtration**, avec **filtres** de porosité convenable (diamètre nominal des pores de 0,2 µm à 0,45 µm), dans lequel l'adsorption ou le relargage du carbone organique est réduit au minimum.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Préparation des solutions d'essai

#### 8.1.1 Solution du composé soumis à essai

Préparer une solution mère du composé soumis à essai dans l'eau (6.1) ou dans le milieu d'essai (6.2). Diluer une quantité adéquate de cette solution dans le milieu d'essai de façon à obtenir une concentration finale en carbone organique comprise entre 10 mg/l et 40 mg/l. Il est possible d'ajouter directement les substances à faible solubilité (de 10 mg/l à 100 mg/l) au contenu du récipient d'essai, en s'assurant de leur complète dissolution ( $F_T$  en 8.3.1).

#### 8.1.2 Solution du composé de référence

Préparer une solution mère du composé de référence (composé organique à haute biodégradabilité connue, tel que l'acétate de sodium, le benzoate de sodium ou l'aniline) en procédant comme en 8.1.1 de façon à obtenir une concentration finale en carbone organique comprise entre 10 mg/l et 40 mg/l ( $F_C$  en 8.3.1).

#### 8.1.3 Solution de contrôle de l'inhibition

Si nécessaire, préparer une solution contenant, dans le milieu d'essai (6.2), le composé soumis à essai et le composé de référence aux concentrations respectivement utilisées pour la préparation des solutions en 8.1.1 et 8.1.2 ( $F_I$  en 8.3.1).

ISO 7827:2010

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff6d28e1-a8f1-41a6-a282-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff6d28e1-a8f1-41a6-a282-bd28867437fc/iso-7827-2010)

### 8.2 Préparation de l'inoculum

#### 8.2.1 Généralités

Préparer l'inoculum à partir des sources spécifiées en 8.2.2 à 8.2.4, ou à partir d'un mélange de ces sources, de façon à obtenir une population microbienne offrant une activité de biodégradation suffisante. Utiliser un volume convenable pour l'ensemencement (voir Note 2).

NOTE 1 Dans certaines circonstances, un inoculum pré-exposé peut être utilisé, à condition que cela soit clairement mentionné dans les résultats d'essai (par exemple pourcentage de biodégradation =  $w$  %, avec inoculum pré-exposé) et que la méthode de pré-exposition soit détaillée dans le rapport d'essai. Des inocula pré-exposés peuvent être obtenus à partir d'essais de biodégradation en laboratoire effectués dans différentes conditions [par exemple essai de Zahn-Wellens (ISO 9888<sup>[3]</sup>) et essai SCAS (ISO 9887<sup>[2]</sup>)] 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 ou zones contaminées). En cas d'utilisation d'un inoculum pré-exposé, les résultats sont interprétés comme démontrant que le composé soumis à essai est biodégradable «de façon inhérente» (voir l'Annexe B).

NOTE 2 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 (voir l'Annexe B);
- s'il fournit entre  $10^3$  et  $10^6$  cellules actives par millilitre dans le mélange final;
- s'il fournit une concentration de boue activée au plus équivalente à 30 mg/l dans le mélange final;
- s'il contribue au COD dans la solution d'essai à moins de 10 % du COD introduit par le composé soumis à essai (par exemple < 4 mg/l à une concentration d'essai de 40 mg/l).

### 8.2.2 Inoculum provenant d'un effluent secondaire

Prélever un échantillon d'effluent secondaire provenant d'une usine ou d'un laboratoire de traitement d'eaux résiduaires d'origine principalement domestique. Bien mélanger, conserver l'échantillon en conditions aérobies et l'utiliser le jour du prélèvement.

À partir de cet échantillon, préparer un inoculum en:

- a) laissant décanter l'échantillon d'effluent pendant 1 h;
- b) prélevant dans le surnageant un volume convenable (voir Note 2 en 8.2.1).

### 8.2.3 Inoculum provenant d'une usine de traitement des boues activées

Prélever un échantillon de boue activée provenant du bassin d'aération ou de la canalisation de retour des boues d'une usine ou d'un laboratoire de traitement d'eaux résiduaires d'origine principalement domestique. Bien mélanger, conserver l'échantillon en conditions aérobies et utiliser le jour du prélèvement. Si nécessaire (voir Note 2 en 8.2.1), laver l'inoculum pour réduire sa concentration en COD en le centrifugeant et en procédant à une resuspension des matières solides des boues en milieu minéral (6.2).

Déterminer, juste avant emploi, la concentration en matières en suspension. Si nécessaire, concentrer la boue par décantation de façon que le volume de boue ajouté soit minimal. Ajouter un volume convenable de façon à obtenir au plus 30 mg/l de matières en suspension dans le mélange final.

Une autre alternative consiste à utiliser des boues homogénéisées à raison de 3 g/l à 5 g/l de matières en suspension. Traiter les boues au mélangeur pendant 2 min au maximum, mais ne pas laisser la température dépasser 25 °C. Laisser le liquide décanter pendant 30 min et se servir du surnageant décanté comme inoculum, à raison de 10 ml par litre de milieu d'essai.

### 8.2.4 Inoculum provenant d'une eau de surface ISO 7827:2010

Prélever un échantillon d'une eau de surface appropriée. Conserver l'échantillon en conditions aérobies et l'utiliser le jour du prélèvement.

Utiliser un volume convenable comme inoculum (voir Note 2 en 8.2.1).

## 8.3 Mode opératoire d'essai

### 8.3.1 Préparation de l'essai et des récipients de contrôle

Disposer un nombre suffisant de fioles coniques (7.6) de volume convenable (par exemple 2 000 ml, mais il est également possible d'utiliser d'autres volumes et types de fioles) de façon à avoir:

- a) au moins deux fioles d'essai (désignées par  $F_T$ ) contenant 1 000 ml de la solution d'essai (8.1.1);
- b) au moins deux fioles d'essai à blanc (désignées par  $F_B$ ) contenant 1 000 ml du milieu d'essai (6.2);
- c) au moins une fiole pour le contrôle du mode opératoire (désignée par  $F_C$ ) contenant 1 000 ml de la solution du composé de référence (8.1.2);
- d) si besoin est, une fiole pour le contrôle d'un éventuel effet inhibiteur du composé soumis à essai (désignée par  $F_I$ ) contenant 1 000 ml de la solution de contrôle de l'inhibition (8.1.3);
- e) si besoin est, une fiole pour le contrôle d'une éventuelle élimination abiotique (désignée par  $F_S$ ) contenant 1 000 ml de solution d'essai (8.1.1) mais sans inoculum, stérilisée par addition, par exemple, de 1 ml/l d'une solution de chlorure de mercure(II) ( $HgCl_2$ ) à 10 g/l ou de tout autre composé toxique inorganique approprié inhibant l'activité microbienne ou par stérilisation par filtration — lorsque des substances très facilement dégradables sont analysées, il est recommandé d'ajouter, après deux semaines d'essai, la même quantité de composé toxique.

La comparaison des pourcentages d'élimination dans les fioles  $F_T$  et  $F_S$  permet de vérifier si le composé soumis à essai fait l'objet d'une élimination due aux mécanismes physico-chimiques abiotiques, tels que l'adsorption ou l'entraînement gazeux.

Si la boue activée est utilisée comme inoculum, le composé soumis à essai peut être adsorbé en quantité significative sur la boue. Cela peut être vérifié en utilisant l'essai tel que décrit pour la fiole  $F_S$ , mais en ajoutant un inoculum (8.2). Normalement, seuls les composés purs ou pratiquement purs sont soumis à essai, mais, lorsque des mélanges sont soumis à essai, une adsorption sélective des divers constituants peut se produire.

Ensemencer les fioles  $F_T$ ,  $F_B$ ,  $F_C$  et, si elle a été prévue, la fiole  $F_I$ , avec un volume approprié (voir Note 2 en 8.2.1) d'inoculum (8.2). Mélanger le contenu des fioles. En général, un volume de 10 ml à 100 ml d'inoculum suffit pour 1 000 ml de solution d'essai.

### 8.3.2 Incubation et prélèvement

Pendant toute la durée de l'essai, maintenir les fioles sur le dispositif d'agitation ou agitateur (7.3) à une température de  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

Pour compenser les pertes d'eau dues à l'évaporation, vérifier, avant chaque prélèvement d'échantillon, le volume du milieu dans les fioles et, si nécessaire, compléter avec de l'eau (6.1) pour atteindre le volume ou la masse mesurée après le prélèvement de l'échantillon précédent.

Au début de l'essai (jour 0), à la fin de l'essai (normalement après 28 jours) et au moins à trois intervalles de temps entre le début et la fin de l'essai (par exemple 7 jours, 14 jours et 21 jours), prélever dans les fioles  $F_T$ ,  $F_B$ ,  $F_C$  et, si prévu, également dans  $F_I$ , un volume minimal. Si nécessaire, effectuer des mesurages à des intervalles plus courts ou sur une période supérieure à 28 jours. S'il faut identifier une plage de 10 jours (voir l'Annexe B), il est nécessaire de prévoir plus de points de prélèvement dès le tout début de l'essai. Au début de l'essai, prélever un échantillon de la fiole  $F_S$ . Si la fiole  $F_S$  estensemencée (voir 8.3.1), prélever un échantillon après 0 jour et 1 jour. Filtrer ces échantillons, ou en particulier si le produit est susceptible de s'adsorber sur la membrane, centrifuger à environ  $40\,000\text{ m/s}^2$  pendant 25 min.

Mesurer les concentrations en COD des échantillons conformément à l'ISO 8245 au moins deux fois pour chaque période et pour chaque fiole. Pour des informations supplémentaires sur la biodégradation primaire, des analyses spécifiques de la substance peuvent être réalisées. La concentration mesurée dans la solution d'essai au début de l'essai (jour 0) est utilisée comme concentration initiale dans le calcul final.

Si, avant la fin de la période d'essai de 28 jours, un degré suffisant ( $> 80\%$ ) et un niveau constant de dégradation sont atteints, considérer l'essai comme terminé. Poursuivre l'essai durant 1 semaine ou 2 semaines si la dégradation a effectivement commencé mais n'a pas atteint un plateau.

Si des mesurages du carbone organique doivent être différés de 48 h, conserver les échantillons à  $4\text{ °C}$  dans l'obscurité dans des fioles hermétiquement fermées. Si les échantillons doivent être conservés plus de 48 h avant les mesurages, conserver les échantillons à  $\leq -18\text{ °C}$ , ou bien ajouter une substance toxique inorganique appropriée, par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure(II) ( $\text{HgCl}_2$ ) inhibant l'activité bactérienne et conserver à  $4\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .