

ACTALYS

**TEST DE BIODEGRADABILITE FACILE
(METHODE OCDE 301 B) REALISE SUR
UN PRODUIT REFERENCE :**

ROXY 52 PAE

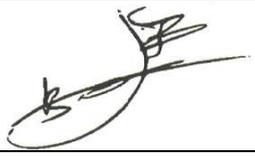
o o o o o

RAPPORT DE TESTS

A : Maxéville, le 25/05/2012	EUROFINS IPL Est :
 Expertises Environnementales	Laboratoires d'Etudes et d'Expertises US Ecotoxicologie rue Lucien Cuénot Site Saint Jacques II – BP 51005 54521 MAXEVILLE ☎ 03 83 50 36 65 – Fax : 03 83 50 23 70

SOMMAIRE

I. PRESENTATION DE L'ECHANTILLON	3
II. DESCRIPTION DU TEST DE BIODEGRADABILITE FACILE (OCDE 301 B).....	3
II.1 PRINCIPE	3
II.2 DEFINITIONS.....	4
II.3 REFERENCES NORMATIVES.....	4
II.4 DESCRIPTION DE LA METHODE STANDARD DE LABORATOIRE	5
II.5 CONFIGURATION DES TESTS STANDARDS.....	6
II.6 REGLES DE CALCULS	6
II.7 INOCULUM BACTERIEN.....	6
II.8 MILIEU MINERAL.....	6
II.9 SUBSTANCE DE REFERENCE.....	7
II.10 CRITERES DE VALIDITE DU TEST	7
II.11 PROTOCOLE	7
II.11.1 Préparation de l'inoculum bactérien.....	7
II.11.2 Préparation des mélanges d'essai.....	7
III. DATES DE REALISATION.....	7
IV. INOCULUM BACTERIEN	8
V. RESULTATS	8
V.1 ANALYSE DE L'ECHANTILLON.....	8
V.2 VALEUR DES DEGAGEMENTS THEORIQUES EN CO ₂ (CO ₂ Th).....	8
V.3 ESSAI DE BIODEGRADABILITE FACILE (OCDE 301 B)	8
V.3.1 Suivie du dégagement du CO ₂ cumulé : lot d'essai témoins négatifs.....	8
V.3.2 Suivie du dégagement du CO ₂ cumulé : témoin positif.....	9
V.3.3 Suivie du dégagement du CO ₂ cumulé : lot d'essai ROXY 52 PAE.....	9
V.3.4 Suivie du dégagement du CO ₂ cumulé : contrôle de toxicité du produit ROXY 52 PAE.....	9
V.3.5 Suivi de la dégradation par rapport aux CO ₂ Th : témoin positif.....	9
V.3.6 Suivi de la dégradation par rapport aux CO ₂ Th : lot d'essai ROXY 52 PAE.....	9
V.3.7 Suivi de la dégradation par rapport aux CO ₂ Th : contrôle de toxicité du produit ROXY 52 PAE... ..	9
V.3.8 Courbes de dégradation.....	10
V.4 VALIDITE DE L'ESSAI.....	11
VI. CONCLUSION	11

	Nom :	Fonction :	Date :	Signature
Rédaction	Yves BARTHEL	Responsable US Ecotoxicologie	25/05/12	
Vérification	AM CHARISSOU	Chargée d'Affaires au Laboratoire d'Etudes et d'Expertises	25/05/12	

I. PRESENTATION DE L'ECHANTILLON

Référence commande : 467 du 05/04/12.

Référence devis EUROFINS IPL Est : 111ABRIP00092YBA révision 0.

Dénomination : ROXY 52 PAE.

Date de réception : 05/04/12.

Teneur en carbone organique dissous (COD) d'une solution à 100 mg/L : 3,0 mg/L.

L'essai de biodégradabilité de l'échantillon a été réalisé à une concentration théorique de 10,0 mg/L de carbone organique dissous (COD) soit 333,3 mg/L d'échantillon.

II. DESCRIPTION DU TEST DE BIODEGRADABILITE FACILE (OCDE 301 B)

II.1 Principe

La biodégradabilité des composés organiques par des micro-organismes en milieu aquatique est déterminée à l'aide d'un système d'essai statique. Le mélange soumis à l'essai contient un milieu inorganique, le composé organique testé constituant la seule source nominale de carbone et d'énergie à une concentration de 10 à 20 mg/L en carbone théorique, ainsi qu'un ensemencement mixte provenant d'une usine traitant en majorité des eaux résiduaires urbaines (concentration en matières en suspension inférieure ou égale à 30 mg/L dans le mélange final).

Le CO₂ formé pendant la dégradation microbienne est piégé dans des récipients externes.

Le CO₂ libéré est comparé à la quantité théoriquement (CO₂Th) dégagée et exprimé en pourcentage.

Le taux de dégradation à un temps donné est calculé suivant l'équation suivant :

$$\% \text{ dégradation} = \frac{CO_2 \text{ cumulé} (mg / xmL)}{CO_2 \text{ Th} (mg / xmL)} \times 100$$

L'essai dure normalement 28 jours, mais peut être prolongé si la courbe de biodégradation n'a pas atteint de palier le 28^{ème} jour.

II.2 Définitions

CO₂Th : dioxyde de carbone théorique. Quantité de dioxyde de carbone, calculée à partir de la teneur en carbone organique connue ou mesurée du produit d'essai, qui doit se dégager lors de la minéralisation complète de celui-ci ; le CO₂Th en mg est calculé suivant l'équation suivante :

$$CO_2Th = \frac{44}{12} \times V_L \times \rho_C$$

où

44 et 12 sont respectivement la masse moléculaire relative du CO₂ et la masse atomique du carbone, destinées à calculer la quantité de CO₂ à partir du carbone organique du produit d'essai ;

V_L est le volume de solution d'essai contenu dans le récipient d'essai, en litres ;

P_C : concentration en carbone organique du produit à analyser dans le récipient d'essai en mg/L.

Le CO₂Th peut également s'exprimer en mg/mg de substance.

Phase de latence : période qui sépare le moment de l'ensemencement de celui où le pourcentage de dégradation a atteint environ 10 %.

Phase de dégradation : période qui commence à la fin de la phase de latence et se termine au moment où 90 % du taux maximal de dégradation est atteint.

Intervalle de 10 jours : 10 jours qui suivent immédiatement le moment où le taux de biodégradation atteint 10 %.

Facilement biodégradable : un produit est considéré comme facilement biodégradable si le taux de biodégradation a atteint au moins 60 % dans l'intervalle de 10 jours qui doit être compris dans les 28 (premiers) jours de test.

Facilement biodégradable sans respect de l'intervalle de 10 jours : un produit est considéré facilement biodégradable sans respect de l'intervalle de 10 jours si le taux de biodégradation a atteint au moins 60 % dans les 28 (premiers) jours de test sans atteindre ce seuil dans l'intervalle de 10 jours.

II.3 Références normatives

- Ligne directrice OCDE n° 301 B « Biodégradabilité facile : essai de dégagement de CO₂ (Essai de Sturm modifié) » - Juillet 1992.
- Méthode d'essai C.4C : « Détermination de la biodégradabilité facile : dégagement de dioxyde de carbone (Essai de Sturm modifié) » en annexe du Règlement (CE) n° 440/2008 de la Commission du 30 mai 2008 établissant des méthodes d'essai conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH).
- Dosage du carbone organique suivant la norme NF EN 1484 de septembre 1997 « Lignes directrices pour le dosage du carbone organique total et carbone organique dissous – Méthode par oxydation au persulfate à chaud ».

II.4 Description de la méthode standard de laboratoire

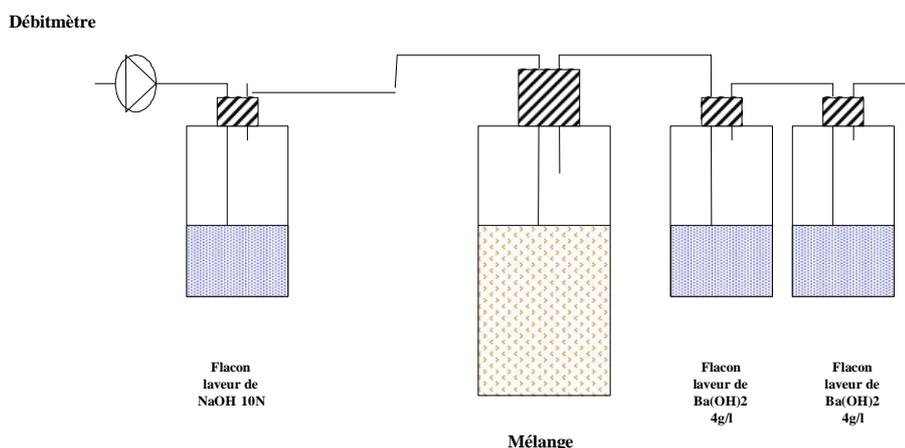
La biodégradabilité des composés organiques par des micro-organismes en milieu aquatique est déterminée à l'aide d'un système d'essai statique. Le mélange soumis à l'essai contient un milieu inorganique, le composé organique constituant la seule source nominale de carbone et d'énergie à une concentration de 10 à 20 mg/L en carbone théorique, ainsi qu'un ensemencement mixte provenant d'une usine traitant en majorité des eaux résiduaires urbaines (concentration en matières en suspension inférieure ou égale à 30 mg/L dans le mélange final).

Le mélange, agité dans des récipients d'essai, est exposé à un flux d'air exempt de CO_2 à un débit de l'ordre de 50 mL/min pendant généralement 28 jours à une température de $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (la durée de l'essai peut être augmentée de deux semaines si la dégradation a de toute évidence commencé, mais qu'elle n'a pas atteint la phase de plateau).

Le CO_2 formé pendant la dégradation microbienne est piégé dans des récipients externes contenant une solution d'hydroxyde de baryum et est déterminé par dosage titrimétrique.

Le CO_2 libéré est comparé à la quantité théoriquement (CO_2Th) dégagée et exprimé en pourcentage.

Schéma du dispositif expérimental :



Le CO_2 piégé est dosé dans le flacon contenant la solution d'hydroxyde de baryum le plus proche du mélange d'essai. Le flacon absorbeur restant est décalé à sa place et remplacé par un flacon contenant de la solution d'hydroxyde de baryum fraîchement préparée.

Le volume de solution d'hydroxyde de baryum contenu dans les flacons absorbeur est de 250 à 300 mL suivant l'intervalle de temps effectif entre deux mesures.

Au 28^{ème} jour, environ 1 mL d'acide chlorhydrique concentré est ajouté dans chaque récipient d'essai, afin de décomposer les carbonates et les bicarbonates : les valeurs obtenues sont référencées comme jour d'incubation « 28bis ».

II.5 Configuration des tests standards

Une série analytique comprend :

- Témoin négatif (milieu minéral + inoculum) : 2 répliques.
- Témoin positif (milieu minéral + substance de référence + inoculum) : 1 réplique.
- Produit d'essai (milieu minéral + produit d'essai + inoculum) : 2 répliques.
- Contrôle de toxicité* : 1 réplique.

* *Contrôle de toxicité d'un produit d'essai : milieu minéral + mélange de la substance de référence et du produit d'essai aux concentrations testées + inoculum.*

II.6 Règles de calculs

Correction du CO₂ cumulé :

Les calculs de biodégradation sont effectués après soustraction de la moyenne de des résultats de CO₂ cumulé des témoins négatifs (représentant l'activité endogène de l'inoculum).

Résultat de biodégradation pour les produits à tester :

Pour un produit donné, le résultat de biodégradation aux différents temps de mesure correspond à la moyenne des valeurs de biodégradation obtenues.

II.7 Inoculum bactérien

Origine : par défaut, boues activées provenant de la station d'épuration de Maxéville (France) traitant principalement des eaux usées domestiques (98 %), ou provenant de la station d'épuration de Toul (France).

Les boues activées sont utilisées dans les 24 heures après prélèvement.

La concentration en matières sèches dans les flacons d'essai contenant de l'inoculum doit être inférieure ou égale à 30 mg/L.

II.8 Milieu minéral

Chaque solution est préparée dans de l'eau ultra-pure.

Composition des solutions mères :

Solution mère A :

Dihydrogénophosphate de potassium, KH₂PO₄ : 8,50 g
Hydrogénophosphate de potassium, K₂HPO₄ : 21,75 g
Hydrogénophosphate de sodium dihydraté, Na₂HPO₄, 2H₂O : 33,40 g
Chlorure d'ammonium, NH₄Cl : 0,50 g
qsp 1 litre ; pH égal à 7,4.

Solution mère B :

Chlorure de calcium anhydre, CaCl₂ : 27,50 g
ou chlorure de calcium dihydraté, CaCl₂, 2H₂O : 36,40 g
qsp 1 litre.

Solution mère C :

Sulfate de magnésium heptahydraté, MgSO₄, 7H₂O : 22,50 g
qsp 1 litre.

Solution mère D (à préparer extemporanément) :

Chlorure de fer III hexahydraté, FeCl₃, 6H₂O : 0,25 g
qsp 1 litre.

Préparation du milieu minéral :

Mélanger 10 mL de la solution A avec 800 mL d'eau ultra-pure, ajouter ensuite 1 mL des solutions B, C et D et compléter le volume à 1 litre.

II.9 Substance de référence

Acétate de sodium.

II.10 Critères de validité du test**Selon la ligne directrice OCDE 301B :**

- Le pourcentage médian de dégradation de la substance de référence a atteint au moins 60 % en 14 jours.
- Le dégagement total de CO₂ médian dans l'essai à blanc (témoin négatif) contenant l'inoculum n'excède normalement pas 40 mg/L de milieu à la fin de l'essai et ne doit pas dépasser 70 mg/L. Si on obtient des valeurs supérieures à 70 mg/L de CO₂, on doit examiner les résultats et les méthodes expérimentales avec un esprit critique.
- Si, lors d'un essai de toxicité mettant en œuvre à la fois le produit à tester et la substance de référence, la dégradation est inférieure à 25 % après 14 jours, on peut estimer que la substance d'essai a un effet inhibiteur.

II.11 Protocole*II.11.1 Préparation de l'inoculum bactérien*

Le jour du prélèvement : lavage de la boue par trois centrifugations successives (1100 g pendant 10 minutes) après remise en suspension du culot dans le milieu minéral et filtration sur tamis inox de porosité égale à 100 µm.

Après traitement, réaliser une mesure de matières en suspension.

La concentration en matières sèches dans les flacons d'essai contenant de l'inoculum doit être inférieure ou égale à 30 mg/L.

II.11.2 Préparation des mélanges d'essai

- Dans une fiole en verre d'un litre, dissoudre x mg du produit correspondant à la concentration en carbone organique testée dans 900 mL de milieu minéral
- Ajouter le volume d'inoculum nécessaire pour obtenir une concentration en matières en suspension inférieure ou égale à 30 mg/L
- Ajuster au trait de jauge avec du milieu minéral
- Distribuer dans les flacons correspondant en agitant régulièrement la fiole.

III. DATES DE REALISATION

Essai de biodégradabilité facile, méthode OCDE 301 B : 25 Avril 2011.

IV. INOCULUM BACTERIEN

Origine : boues activées provenant de la station d'épuration de Maxéville (France) traitant principalement des eaux usées domestiques (98 %).

Date de prélèvement : 24 Avril 2011.

V. RESULTATS

V.1 Analyse de l'Echantillon

Teneur en carbone organique dissous (COD) d'une solution à 100 mg/L : 3,0 mg/L.

Concentration initiale en carbone organique de produit d'essai dans le milieu : 10,0 mg/L.

Concentration initiale de produit d'essai dans le milieu : 333,3 mg/L.

V.2 Valeur des dégagements théoriques en CO₂ (CO₂Th)

Pour le volume testé (1 litre), les CO₂Th sont respectivement égaux à :

- 36,7 mg pour les flacons d'essai « produit d'essai » (premier essai de biodégradabilité) et « substance de référence » pour une concentration en carbone organique de 10 mg/L
- 73,3 mg pour le flacon d'essai « contrôle de toxicité » pour une concentration en carbone organique de 20 mg/L.

V.3 Essai de biodégradabilité facile (OCDE 301 B)

V.3.1 Suivie du dégagement du CO₂ cumulé : lot d'essai témoins négatifs

Nombre de jours	1	2	5	7	9	12	14	20	23	26	28	28bis
Témoin Neg 1	2.0	4.4	6.8	11.2	12.8	15.6	15.6	17.6	18.9	20.5	20.9	22.7
Témoin Neg 2	2.6	5.9	8.4	12.1	14.5	18.7	18.7	18.7	19.1	20.9	22.7	24.2
Moyenne	2.3	5.2	7.6	11.7	13.6	17.2	17.2	18.2	19.0	20.7	21.8	23.4

Critères de validité définis par la ligne directrice OCDE 301 B :

Le dégagement total de CO₂ médian dans l'essai à blanc contenant l'inoculum (témoin négatif) n'excède pas 40 mg pour un litre de milieu à la fin de l'essai : 23,4 mg.

L'essai est donc considéré comme valide.

V.3.2 Suivre du dégagement du CO₂ cumulé : témoin positif

Nombre de jours	1	2	5	7	9	12	14	20	23	26	28	28bis
Témoin Positif	8.8	17.2	25.5	32.3	37.4	42.0	42.2	43.3	45.3	48.0	51.5	53.7

V.3.3 Suivre du dégagement du CO₂ cumulé : lot d'essai ROXY 52 PAE

Nombre de jours	1	2	5	7	9	12	14	20	23	26	28	28bis
ROXY 52 PAE 1	1.3	6.2	18.0	29.0	34.5	42.5	44.2	45.3	46.9	49.1	50.6	52.1
ROXY 52 PAE 2	2.9	6.8	19.1	29.0	34.3	41.4	42.7	43.3	45.3	47.5	50.2	52.4
Moyenne	2.1	6.5	18.6	29.0	34.4	41.9	43.5	44.3	46.1	48.3	50.4	52.3

V.3.4 Suivre du dégagement du CO₂ cumulé : contrôle de toxicité du produit ROXY 52 PAE

Nombre de jours	1	2	5	7	9	12	14	20	23	26	28	28bis
Contrôle toxicité	12.5	22.9	40.9	55.2	63.8	73.9	79.6	81.2	83.4	86.0	86.5	88.4

V.3.5 Suivi de la dégradation par rapport aux CO₂Th : témoin positif

Nombre de jours	1	2	5	7	9	12	14	20	23	26	28	28bis
Témoin Positif	18%	33%	49%	56%	65%	68%	68%	69%	72%	74%	81%	82%

Critères de validité définis par la ligne directrice OCDE 301 B :

Le pourcentage de dégradation de la substance de référence a atteint au moins 60 % en 14 jours : 68 %.

L'essai est donc considéré comme valide.

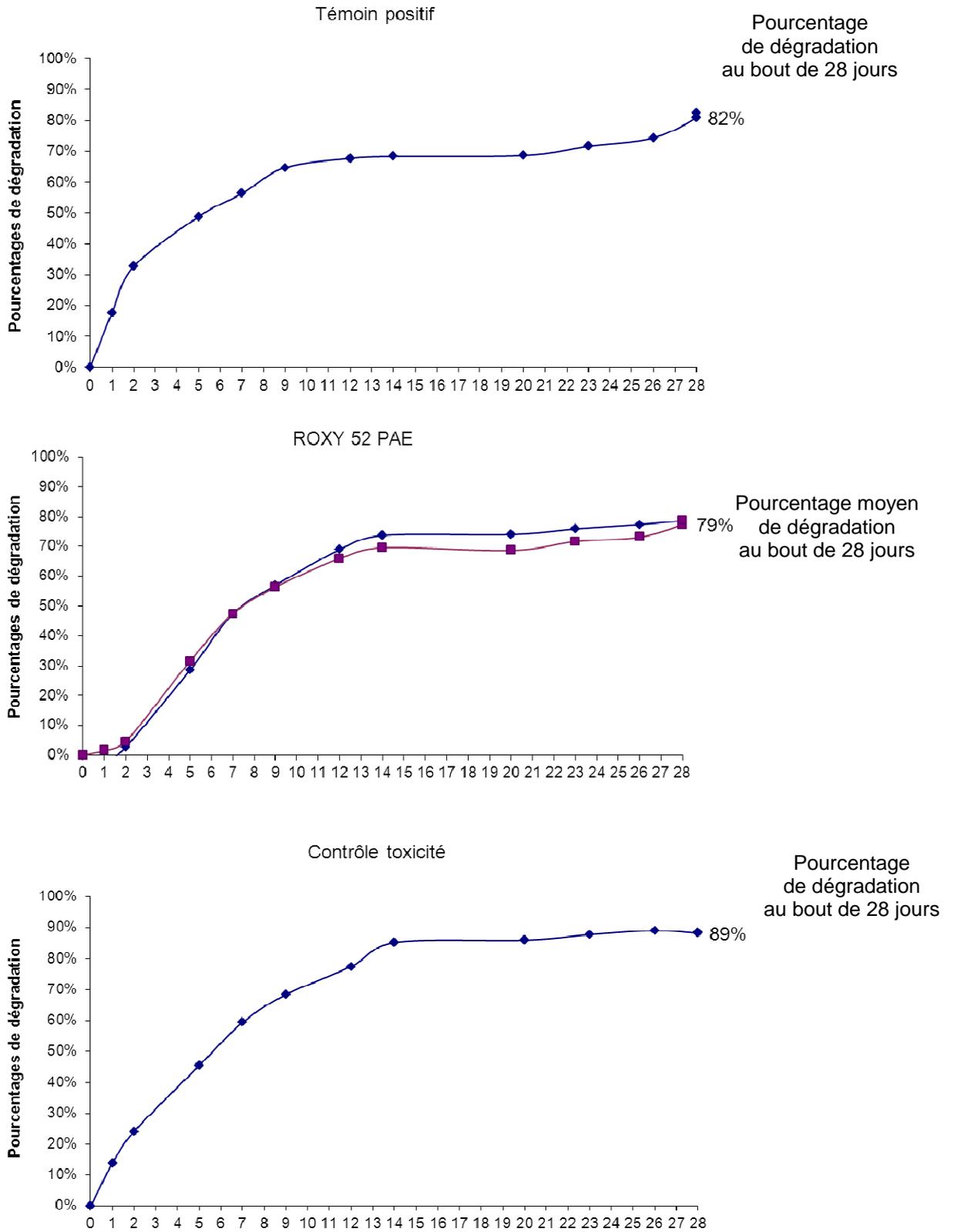
V.3.6 Suivi de la dégradation par rapport aux CO₂Th : lot d'essai ROXY 52 PAE

Nombre de jours	1	2	5	7	9	12	14	20	23	26	28	28bis
ROXY 52 PAE 1	-3%	3%	28%	47%	57%	69%	74%	74%	76%	77%	79%	78%
ROXY 52 PAE 2	1%	4%	31%	47%	56%	66%	70%	69%	72%	73%	77%	79%
moyenne	-1%	4%	30%	47%	57%	67%	72%	71%	74%	75%	78%	79%

V.3.7 Suivi de la dégradation par rapport aux CO₂Th : contrôle de toxicité du produit ROXY 52 PAE

Nombre de jours	1	2	5	7	9	12	14	20	23	26	28	28bis
Contrôle toxicité	14%	24%	45%	59%	68%	77%	85%	86%	88%	89%	88%	89%

V.3.8 Courbes de dégradation



V.4 Validité de l'essai

Etant donné que :

1. Le pourcentage de biodégradation de la substance de référence (acétate de sodium) est supérieur à 60 % (68 %) au quatorzième jour.
2. La quantité de CO₂ dégagé par le témoin à blanc est négligeable : 23,2 mg/L à la fin de l'essai (valeur à ne pas dépasser : 40).
3. Pour l'essai de toxicité mettant en œuvre à la fois le produit à tester et la substance de référence, la dégradation est supérieure à 25 % (85 %) après 14 jours : le produit ROXY 52 PAE n'a pas d'effet inhibiteur vis-à-vis de l'inoculum bactérien.

L'essai est considéré comme valide.

VI. CONCLUSION

Dans les conditions expérimentales du test :

L'échantillon « **ROXY 52 PAE** » est considéré comme facilement biodégradable :

- le niveau de seuil de diminution du CO₂ de 60 % étant acquis dans un intervalle de 10 jours après que 10 % de biodégradabilité soit atteint (67 % au 12^{ème} jour de test pour un taux de biodégradabilité égal à 3 % au 2^{ème} jour de test).

L'échantillon « **ROXY 52 PAE** » est biodégradable à 79 % après 28 jours de test.

