

EUROPEAN COMMISSION

DIRECTORATE GENERAL III - INDUSTRY

**Study on new biodegradability test methods
for surfactants in detergents**

Contract ETD/96/500210

Final Report

16 October 1997

Europius s.a.

rue Van Elewijck 11
B-1050 Bruxelles

EUROPEAN COMMISSION

DIRECTORATE GENERAL III - INDUSTRY

**Study on new biodegradability test methods
for surfactants in detergents**

Contract ETD/96/500210

Final Report

16 October 1997

Europius s.a.

**rue Van Elewijck 11
B-1050 Bruxelles**

TABLE OF CONTENT**SUMMARY**

1. INTRODUCTION	6
2. THE EXISTING ANALYTICAL METHODS	7
2.1 ANIONIC SURFACTANTS	7
2.1.1 <i>Semi-specific method</i>	7
2.1.2 <i>Instrumental analytical methods</i>	8
2.2 NON-IONIC SURFACTANTS	10
2.2.1 <i>Semi-specific methods</i>	10
2.2.2 <i>Instrumental analytical methods</i>	14
2.3 CATIONIC SURFACTANTS.....	17
2.3.1 <i>Semi-specific method</i>	17
2.3.2 <i>Instrumental analytical method</i>	18
2.4 AMPHOTERIC SURFACTANTS	20
2.4.1 <i>Semi-specific methods</i>	20
2.4.2 <i>Instrumental analytical method</i>	21
3. REMARKS AND PROPOSALS CONCERNING THE ANALYTICAL METHODS	23
3.1 ANIONIC SURFACTANTS	23
3.2 NON-IONIC SURFACTANTS	23
3.3 CATIONIC SURFACTANTS	24
3.4 AMPHOTERIC SURFACTANTS	25
4. APPLICABILITY OF ANALYTICAL METHODS TO THE COMMERCIALY AVAILABLE SURFACTANTS USED IN DETERGENTS	25
4.1 TABLES OF COMMERCIALY AVAILABLE SURFACTANTS USED IN DETERGENTS	25
4.2 SUMMARY CONCERNING THE APPLICABILITY OF THE ANALYTICAL METHODS TO COMMERCIAL SURFACTANTS IN DETERGENTS.....	29
4.2.1 <i>Anionic surfactants</i>	29
4.2.2 <i>Non-ionic surfactants</i>	29
4.2.3 <i>Cationic surfactants</i>	29
4.2.4 <i>Amphoteric Surfactants</i>	30
5. BIODEGRADABILITY TESTS	30
5.1 EXISTING BIODEGRADABILITY TEST METHODS	30
5.1.1 <i>Directive on Detergents</i>	30
5.1.2 <i>Other existing biodegradability test methods</i>	31
5.2 OPERATING PROBLEMS: ADSORPTION, SOLUBILITY, TOXICITY	33
5.2.1 <i>Adsorption</i>	33
5.2.2 <i>Solubility</i>	34
5.2.3 <i>Toxicity</i>	34
5.3 ADAPTATION OF THE EXISTING TEST METHODS.....	35
5.3.1 <i>Screening test- Possible changes to the method</i>	35
5.3.2 <i>Confirmatory test: Possible adaptation of the test method</i>	35
5.4 NEW BIODEGRADABILITY TEST.....	37
6. OPERATION COSTS	41

7. CONCLUSIONS.....42

7.1 ANALYTICAL METHODS42

7.2 BIODEGRADABILITY TESTS.....43

7.3 PROPOSALS43

8. BIBLIOGRAPHY44

9. ANNEXES47

9.1 OECD TECHNICAL REPORT 197647

9.2 FRENCH STANDARD PR., T 73-280.....47

9.3 ISO/DIS 14593 HEAD SPACE METHOD47

SUMMARY

The present study is making a state of the art concerning the new biodegradability test methods available to measure the biodegradability of surfactants contained in detergents.

It is intended to be used for determining which developments are to be considered by priority, in the field of analytical techniques and biodegradation test methods needed to update Directive 73/404/EEC on detergents and daughter Directives.

To help in the realisation of this project, the consultant has used the results of the research provided by the expert rapporteur for each surfactant, namely anionic, non-ionic, cationic and amphoteric. In addition, all the relevant issues regarding this subject have been collected from recent literature and have been assembled in this report.

Two major areas of development have been investigated. One concerns the analytical methods used for determining the concentration of surfactants in the biodegradation test. The other concerns the operational aspect of biodegradation tests.

Regarding the analytical techniques used, both semi-specific and specific analysis have been described.

For the determination of the concentration of anionic and non-ionic surfactants, the semi-specific methods currently used (Directive 82/242 and 82/243) are still valid today. The possibility to include a new analytical semi-specific method in the Directive is also envisageable. The real problem encountered concerns mainly the separation of the surfactants from interfering substances.

For cationic surfactants, the semi-specific disulfine blue method has been reported as a candidate for inclusion in the Directive. However, some questions regarding the applicability of this method to all categories of cationic surfactants have to be discussed. Furthermore, the method needs to be validated by an intercomparison test between European laboratories.

A semi-specific method for measuring the concentration of amphoteric surfactants is under development/test by industry. The results of this exercise are expected to help deciding on further measures.

In general, the alternative instrumental techniques allowing the determination of the concentration of specific surfactants within each classes of surfactants, are used for environmental samples (rivers, sediments, etc.) which have very low concentration. Thus, these methods are not exactly suited for samples from biodegradability tests.

However, for surfactants not responding to the current semi-specific analytical methods such as MBAS, BiAS or DBAS, these instrumental methods may be the only alternative.

Regarding the operational aspects of the biodegradation tests, the latest developments concerning two types of test have been investigated; the screening tests and the activated sludge simulation tests.

In addition to the existing OECD/die-away test to measure the primary biodegradability of surfactants, several screening tests to measure the ultimate biodegradability of chemical substances have been well validated.

It has been suggested to incorporate these tests in the overall decision strategy used to allow surfactants on the market.

A comparison of the operational parameters is provided.

The latest developments concerning the activated sludge simulation tests have also been presented and suggestions of modification to the existing operation parameters have been made to apply these methods to surfactants.

1. INTRODUCTION

Since 1996 the services of the Commission have undertaken to examine the existing European legislation on detergents in force since 1973 in order to propose its updating in relation to the scientific and technical progress of today.

To achieve this objective the Commission has proposed to take the following points into consideration:

- * Does the existing legislation on detergents still respond to today's requirements concerning the high level of protection of men and the environment?
- * Is this existing legislation still well integrated into fast changing international arena concerned with environmental issues?
- * Are there important scientific and technical progress to take into account for a possible up-dating of the legislation?

To answer to these questions a task force with several experts groups was created.

Regarding technical issues relating to the problems of primary biodegradability of surfactants the services of the Commission established a group of experts within this task force.

One rapporteur per class of surfactants i.e. anionics, non-ionics, cationics and amphoteric volunteered to submit to the Commission a short review of the state of the art concerning the latest development in the field of analytical techniques for the determination of primary biodegradability of these surfactants.

The task assigned by the services of the Commission to Europlus was to examine any new biodegradability tests, including the analytical methods, which could serve the purpose of determining the primary biodegradability of surfactants contained in detergents. The reports provided by each rapporteur was used as a basis to carry out this task.

In addition, all recent developments concerning this topic published in the literature were examined and reported.

Throughout the establishment of his report, the consultant took contact with the services of the Commission and with the Industry and national co-ordinators. He wishes to thank all those who have co-operated so actively to the realisation of this report.

To fulfil the request of the services of the Commission the contractant has divided his report in two subjects:

- ⇒ One concerns the existing analytical methods for the determination of surfactants
- ⇒ The other concerns the existing biodegradation tests.

2. THE EXISTING ANALYTICAL METHODS

The analytical methods to detect the different classes of surfactants are of two types:

1. Semi-specific (i.e. applicable to the 'entire' class of surfactants) or
2. Specific (i.e. applicable to single compounds within the class of surfactants).

The latter methods are essentially instrumental techniques using chromatography whereas the former are classical chemical methods principally based on colorimetry.

In the following chapters, the methods of analysis will be presented with respect to each class of surfactant i.e. anionic, non-ionic, cationic and amphoteric.

A summary of the analytical methods available for each class of surfactants is given in tables 1a to 1e.

2.1 ANIONIC SURFACTANTS

2.1.1 Semi-specific method

The classical method currently used to follow the primary biodegradation of anionic surfactants is a colorimetric method. The principle of the method is that the anionic surfactant reacts with a cationic dye to form a paired ion association complex which is soluble in organochlorinated solvents. After extraction the concentration of the paired ion is then determined spectrophotometrically.

The cationic dye used is methylene blue.

Methylene Blue Active Substances- MBAS

Soaps, carboxylates, phosphates and phosphonates anionic surfactants do not react to methylene blue (see also table 2a for applicability).

The following procedure is currently applied to measure anionic surfactants (Painter 1995):

- * Reaction of the anionic surfactant with the methylene blue
- * Extraction of the complex from the alkaline solution of the dye into chloroform
- * Back extraction from the chloroform phase with an acidified methylene blue solution (to remove interference such nitrate and chloride anions)
- * Determination of the complex concentration by spectrophotometry at 650 nm.

In parallel to the blank a series of concentrations of a chosen standards are run to obtain the calibration curve.

Both sulphates and sulphonates react to the methylene blue. To differentiate between the two classes of anionic surfactants, the sample can be hydrolysed in acid. Alkyl sulphates and also ethoxy sulphates will be transformed into inorganic sulphate and the corresponding alcohol.

For LAS extraction is reported to be completed from C₁₆ to C₈ while for homologues with a lower number of carbon extraction occurs to a less extend.

The detection limit is in the range of 0.02- 0.05 mg/l.

This analytical method is described in the European legislation on detergents Directive 82/243/EEC.

This method has also been adopted by the OECD (1976) and as a standard by ISO (1984a).

An automated method for the methylene blue active substances is also available. It is reported that in the presence of suspended solids, the results may be lower than those obtained by using the manual method because of adsorption of the complex on the solid in the coil system.

Limit of detection: 0,2 mg/l.

2.1.2 Instrumental analytical methods

Thin Layer Chromatography (TLC), Gas Chromatography (GC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods have been used with success for the determination of anionic surfactants. TLC is considered as a semi-quantitative method.

These methods can be used for separating the different types of anionic surfactants and also for the determination of homologues and isomers.

Gas Chromatography - CG

As it is the case for non-ionic surfactants gas chromatography cannot be applied to anionic surfactants if they have not been previously derivatised. This is due to the low volatility of these compounds.

Derivatives used today include methyl esters, fluoride and also thiols. Conditions for separation depend on the efficacy of capillary column used and on the temperature programming system.

GC coupled to mass spectrometry offers powerful means of detection.

High Performance Liquid Chromatography - HPLC

The most commonly used instrumental technique for the determination of anionic surfactants in waste waters, activated sludge or in environmental samples is certainly HPLC. This method allows to identify all homologues and isomers present for one type of anionic surfactant for example LAS (Feijtel et al 1995).

The advantage of HPLC over gas chromatography is that derivatisation is not needed. On the other hand preconcentration is required.

The following steps are required to carry out the determination of anionic surfactants (LAS) by HPLC (Matthijs & De Henau 1987):

- * Liquid samples are dried and extracted several times with methanol
- * Column ion exchange to separate the anionics from other surface active materials
- * Elution and concentration of the LABS onto a reversed-phase column
- * Elution of concentrate extract with methanol
- * Analysis on a reversed - phase HPLC system with a fluorescence detector at 230-290 nm.

Alternatively UV detection at 230 nm or a sulphur-specific inductively coupled argon-plasma emission spectrometer detector can also be used.

The method can be made compound-specific and the detection limit can be as low as 1 µg/l.

TABLE 1a

ANIONIC SURFACTANTS

Semi-specific analytical method

Method	Reagent	Complex	Extraction with	Detection method	Limit of detection	Applicability
MBAS	Methylene blue cationic dye	ion-pair coloured complex	chloroform	spectrometry at 650 nm	0.02 - 0.05 mg/l	Carboxylates including soaps, phosphate and phosphonate surfactants do not respond under conditions of the test

MBAS method is also automated but lower MBAS values in the presence of suspended solids.

Alternative instrumental analytical method

Method	Reaction to enable detection	Detection	Limit of detection	Applicability
HPLC Performance liquid chromatography)	depends on anionic class ion pairing	UV, Fluorescence or sulphur specific coupled argon plasma emission spectrometry	1 µg/l	applicable to any class of anionic surfactants possibility to splitting down into homologues within each class. (substance specific) Normally not used for primary biodegradation

TLC and GC methods with or without derivatisation have also been used to determine the concentration of anionic surfactants.

For soaps biodegradability as been measured as dissolved organic carbon with EDTA in the medium to maintain the soap in solution

Higher fatty (soaps) acids have been determined by GC after derivatisation and also by HPLC.

2.2 NON-IONIC SURFACTANTS

2.2.1 Semi-specific methods

The semi-specific methods for the determination of non-ionic surfactants are based on the formation of a complex between the polyethoxylated chain and an inorganic cation followed by the reaction of this complex with an anionic compound to yield a precipitated salt or a solvent extractable colour compound. A major draw back to these methods is the interference of other surfactants and of other organic compounds.

Given that the reaction involves the polyethoxylated chain, non-ionic surfactants not containing ethoxylates will not react. This is the case for some sugar derivatives (see table 2b for applicability).

Bismuth Active Substances- BiAS

The polyethoxylated part of the non-ionic surfactants forms a precipitate with a preparation containing barium tetraiodobismuthate (Dragendorff reagent). Complexes can be formed when the non-ionic surfactant contains a chain of more than five ethoxylates (>EO5). The surfactant is measured by potentiometric titration of the bismuth in the precipitate.

The following procedure is currently applied to measure non-ionic surfactants (Wickbold 1972):

- * Removal of particulates by filtration (raw sample from the biodegradation test)
- * Sublation into ethyl acetate using a stream of nitrogen
- * Removal of cationic surfactants by cation exchange resin
- * Precipitation of the non-ionic surfactants by the barium bismuth iodide reagent
- * Dissolution of precipitate in hot ammonium tartrate
- * Measurement of the bismuth of the precipitate by potentiometric titration with pyrrolidine dithiocarbamate.

As an alternative to potentiometric titration, bismuth may be determined by UV absorbance at 263.5 nm by adding EDTA to the dissolved precipitate or by atomic adsorption spectrometry by dissolving the precipitate in a nitric acid solution.

Interfering substances : polyethylene glycol, cationic and amphoteric surfactants, biodegradation by-products. Because of the possibility of interference of these compounds, the methods tends to overestimate the concentration of non-ionic surfactants. This is particularly the case for environmental samples.

The atomic ratio between bismuth and oxygen from ethoxylates in the precipitate is 1/9.8.

Detection limit: in the range of 0.01 to 0.05 mg/l

This method has been adopted by the OECD (1976). It is included in the EEC legislation on detergents Directive 82/242/EEC. It also applied as a standard by ISO (1984b).

Cobalt Thiocyanate Active Substances - CTAS

In this method the non-ionic surfactants are measured spectrophotometrically by absorbance after forming a complex with a cobalt thiocyanate reagent. The procedure is best applicable to non-ionic surfactants having between 6 to 25 ethylene oxide groups. Below 6 and above 25 EO groups the absorbance is not linear.

The following procedure is currently used (Boyer et al, 1977):

- * Sublation of the sample in ethyl acetate
- * Ion exchange to remove other surfactants
- * Reaction with cobalt thiocyanate
- * Extraction of complex with methylene chloride
- * Spectrophotometric determination at 320 or 620 nm.

A calibration curve is prepared by using different concentrations of standard non-ionic surfactants.

The recovery rate of added alcohol ethoxylates is above 90%.

The sensitivity of the method is largely dependent on the number of ethoxylate groups and the quality of the extraction procedure.

This method is also influenced by interfering materials, such as strongly basic or acidic solution, cationic and anionic surfactants and polyethylene glycol.

The limit of detection is of 0.1 mg/l.

This method is applied as a standard by the Soap and Detergent Association (SDA) in the USA. This method can be automated.

Potassium Picrate Active Substances - PPAS

After concentration and extraction of the sample into ethylene dichloride the ethoxylate chain of the non-ionic surfactant is complexed with K^+ and paired with the picrate anion. The picrate is then determined by spectrophotometry.

The steps are the following :

- * Purification/concentration and extraction into ethylene dichloride
- * Complexation of the ethoxylate chain with K^+ and pairing with picrate anion
- * Extraction into methylene chloride
- * Determination of the picrate content by spectrophotometry at 378 nm.

The method is applicable to non-ionic surfactants with ethoxylate chains ranging from 7 to 28 EO.

Cationic surfactants present in the sample can interfere with the method.

The range for the limit of detection is of 0.05 to 0.1 mg/l.

Tetrakis Active Substances - TAS

This method, like PPAS, is based on the reaction of the ethylene oxide units with the potassium ion but it uses tetrakis-(4-fluorophenyl) borate salt as complexing agent. The positively charged formed complex is determined by two phase titrimetric analysis.

Procedure:

- * Alkalinisation with KOH of an aqueous solution of an ethoxylated non-ionic surfactant
- * Addition of the 'Victoria blue' indicator and dichloroethane.
- * The two phase mixture under stirring conditions is titrated by a 'tetrakis' solution.

The method is reported to be very simple.
There is no mention of interferences.

Limit of detection: 0.5 mg/l.

TABLE 1b

NON-IONIC SURFACTANTS

Semi-specific analytical methods

Method	Reagent	Complex	Extraction with	Detection method	Limits of detection	Applicability
BiAS	Tetraiodo bismuth-ate Ba(BiI ₄) ₂ (modified Dragendorff)	orange complex with EO 6-30	ammonium tartrate	potentiometric titration, atomic absorp. (Bi) or UV	0.01- 0.05 mg/l	Much used hard working method but most reliable. EO<5 not detected Extraction by sublation
CTAS	Ammonium cobalto thiocyanate	colored ion association complex	Dichloromethane CH ₂ Cl ₂	spectrometric at 320 nm or 620 nm	0.1 mg/l	official standard of SDA in USA -simpler and faster than BiAS EO<5 not detected Extraction by sublation Possible automatization
PPAS	picrate anion	EO-K ⁺ paired with picrate anion colored complex	Dichloromethane CH ₂ Cl ₂	spectrometric at 378 nm	0.05-0.1 mg/l	Simple and sensitive method EO<5 not detected
TAS	tetrakis-(4-fluorophenyl) borate salt	EO-K ⁺ complex in dichloroethane		two phase titrimetric analysis	0.5 mg/l	Simple method, sufficiently sensitive EO<5 not detected

1) Regular powder and liquids

Minor problems because non-ionic fraction is made of alkoxyated surfactants.

2) Compacts, concentrated powder and liquids

The non-ionic fraction contains other organic compounds (for ex. amphoteric, TAED and derivatives, non-ionic surfactants other than alkoxyated). BiAS is not representative of the total non-ionic fraction but only the alkoxyated surfactants.

2.2.2 Instrumental analytical methods

These methods have two advantages. They are far more sensitive than the semi-specific methods (detection of non-ionic surfactants in the microgram per liter range) and give information on the nature of the surfactant and its degradation intermediates. Therefore, these methods can be regarded as specific.

Thin Layer Chromatography - TLC

The method of Paterson et al 1966 currently used involves:

- * The addition of magnesium sulphate to the aqueous sample
- * Extraction of non-ionic surfactants and polyglycols into chloroform
- * Washing the extract with saline, acid and alkaline solutions
- * Spotting on a coated silica gel plate alongside with standards
- * Development with suitable solvents ethyl acetate, water, acetic acid
- * Characterisation and quantification following spraying with modified Dragendorff reagent

The method is applicable to non-ionic surfactants with an ethylene oxide chain of at least 4 EO.

Neither anionic surfactants nor PEG are reported to interfere with the method.

Detection limit in the range of 1 to 5 µg/l.

This method is reported to be convenient for biodegradation test studies.

Gas Chromatography - GC

The method can in principle be applied to mixtures containing more than one single non-ionic class.

The method is difficult to apply to non-ionic surfactants with ethylene oxide chain above EO7 because of their low volatility and because they decompose at higher temperature. Derivatisation with silyl compounds is needed. The detection is usually made with a flame ionisation detector (FID).

This technique has been applied to determine polyoxyethylene chain with 1 to 6 EO of alcohol ethoxylates.

Gas chromatography has been also used for the determination of ethoxylated surfactants in wastewater by converting to hydrogen bromide cleavage products (fission technique).

The following steps were required:

- * Extraction from test liquors (sublation into ethyl acetate)
- * Clean-up from interfering substances by ion exchange and silica gel
- * Addition of internal standard
- * HBr cleavage
- * Extraction with carbon disulphide
- * Concentration determined by GC coupled with flame ionisation detector.

A calibration curve is made by plotting the dibromoethane (from the ethylene oxide groups)/dibromobutane (from the internal standard) peak area ratios against weight of standard non-ionic surfactants.

The detection limit is around 5 µg/l.

High Performance Liquid Chromatography - HPLC

This technique is useful for separating the ethoxy components of mixtures of non-ionic surfactants and their PEG metabolites as well as for the alkyl and ethoxy chain lengths of individual. The current method of detection is by UV absorption and fluorescence but mass spectrometry and flame ionization detectors can also be used.

Usually the non-ionic surfactants should be derivatised with suitable chromophores to be detectable by UV or fluorescence.

In the case of non-saturated compounds derivatisation may be unnecessary before UV detection.

Non-derivatised AE can be analysed in a substance-specific way only by coupling HPLC with mass spectrometry detection.

Detection limit around 1 µg/l.

The method has been applied to biodegradation studies.

TABLE 1c

NON-IONIC SURFACTANTS

Alternative instrumental analytical methods

Method	Reaction to enable detection	Detection	limit of detection	Applicability
TLC (Thin Layer Chromatography)	reagents dependent on non-ionic class	revelator or flame ionisation detector (FID)	1-5 µg/l	for EO>4 applied in biodegradation studies. for any single non-ionic class
HPLC (High Performance liquid chromatography)	derivatised with suitable chromophors if non-derivatised	UV absorption or Fluorescence detector coupled with mass spectrometry	1µg/l APE depends on detec. method	applied to biodegradation. of AE. possible to apply to any class of non-ionics substance-specific
GC (Gas Chromatography)	derivatisation (silyl derivatives) necessary to increase volatility of higher MW oligomers	Flame ionisation detector (FID)	5 µg/l	applied to mixtures, more than one single non-ionic class (for low EO<6) for environmental samples

These methods can be used to follow the biodegradation of single classes of non-ionic surfactants GC and HPLC with mass spectrometry applied to single class of non-ionics for ex. sugar derivatives

2.3 CATIONIC SURFACTANTS

Contrary to anionic and non-ionic surfactants there is no European 'legally' accepted analytical method to follow the primary biodegradation of cationic surfactants. However, a practical analytical 'colorimetric' method has been in use for more than 10 years in European laboratories and has even been standardised by some Member States of the Community.

For the applicability of the methods to commercially available cationic surfactants in detergents see table 2c.

2.3.1 Semi-specific method

Disulfine Blue Active Substances - DBAS

As with the two previous surfactants, the disulfine blue method is based on the formation of a colored association complex between the cationic surfactants and an anionic dye. The concentration of the complex is determined spectrophotometrically.

The method involves the following steps:

- * If the sample contains anions it should be treated on an ion-exchange resin because cationic surfactants react with interfering anions other than the anionic dye
- * Reaction with anionic dye (disulfine blue)
- * Extraction of the ion-association complex with trichloromethane
- * Measurement of the absorbance at 628 nm.

The method is suited for cationic surfactants containing alkyl chain of C8 or C10. It has been used to calibrate instrumental techniques (Nitschke et al, 1992).

The ion-complex formation between the cationic surfactants and the anionic dye is operated in an acidic medium (in the case of instrumental method Nitschke et al (1992), in a medium at pH 1) and is therefore in principle not applicable to Esterquats (quaternary ammonium compounds containing long chain ester groups) because these cationic surfactants tend to hydrolyse under this condition.

It has been reported to us at the meeting of the national co-ordinators in May 1997 by the representative of industry dealing with cationics that by using an adequate ion-complex formation/extraction method, the disulfine blue method was perfectly applicable to Esterquats. This point is of course crucial given that almost 99% of the commercially available cationic surfactants in detergents are Esterquats (see table 2d).

The disulfine blue reacts with other substances than surfactants. The method is therefore referred to as disulfine blue 'active substances'.

The detection limit is around 0.1 mg/l.

This method was published as standard in France T 73-280 and in the Federal Republic of Germany (1989) DIN 38 409 Teil 20.

2.3.2 Instrumental analytical method

High Performance Liquid Chromatography - HPLC

L. Nitschke et al 1992 describe a simple and fast procedure for the determination of trace amounts of commercially used cationic surfactants by HPLC. It is an adaptation of the method of Wee and Kennedy 1982 to routine laboratory analysis.

The method allows to detect individual cationic surfactants at low concentrations.

The method involves the following steps:

- * Reaction of the cationic surfactants contained in an aqueous sample with sodium dodecylbenzenesulphonate in an acidic medium
- * Extraction of the sample with methylene chloride
- * After evaporation to dry the residue is dissolved in a 80 : 20 mixture of chloroform and methanol
- * HPLC with the same solvent system
- * Conductometric detection

This method is suited for the determination of long alkyl chain quaternary ammonium surfactants in environmental samples. It has been used to detect distearyldimethylammonium chloride (DSDMAC) and imidazoline derivatives.

Nitschke et al (1992) indicate that the method is difficult to apply to Esterquats (quaternary ammonium compounds containing long chain ester groups). These compounds appear as multiple peaks on the chromatogram.

The problem may be the same as for semi-specific analysis, namely the reaction with the anionic surfactants under strong acidic conditions.

Reproducibility: It is reported that >90% recovery of added standard is achieved.

Limits of detection: According to the original procedure of Wee and Kennedy QACs': 0.2 µg/l

In Nitschke et al (1992):

- * Distearyldimethylammonium chloride DSDMAC: 3 µg/l
- * Ditallowimidazolinium methosulphate : 16 µg/l
- * Dodecylpyridinium chloride : 6 µg/l

TABLE 1d

CATIONIC SURFACTANTS

Semi-specific analytical method

Method	Reagent	Complex	Extraction with	Detection method	Limit of detection	Applicability
DBAS Disulfine Blue	Disulfine Blue anionic dye	ion- association complex	trichloromethane	spectrometry at 628 nm	0.1mg/l	responds to cationics, except Esterquats also to amphoterics

This method was reported not to be applicable to Esterquats. However, Dr. Godefroy indicated that upon proper pre-treatment of the samples Esterquats could also be measured by this method.

Alternative instrumental analytical method

Method	Reaction to enable detection	Detection method	Limit of detection	Applicability
HPLC coupled with conductivity detector	derivatisation not necessary	conductivity detector	QACs: 0.2 µg/l	Wee & Kennedy method (1982) Substance specific, reproducible, >90% recoveries of stand. addition

L. Nitschke & al (1992)

Detection limits for:

- DSDMAC - Distearyl(dimethyl ammonium chloride) : 3 µg/l
- DTIM - Ditalowimidazolium methosulphate: 16 µg/l
- DPC - Dodecylpyridinium chloride: 6 µg/l

For Esterquats for example Ditalowestearammonium methosulphate 3 peaks obtained by HPLC. The analysis of these substances seems more difficult.

P. Gerike & al (1994) HPLC technique applied to DHTDMAC detection limit: 2,5 µg/l.

2.4 AMPHOTERIC SURFACTANTS

Similarly to cationic surfactants there is no analytical method described in the EEC legislation on detergents to follow the primary biodegradation of amphoteric surfactants. It is true also that amphoteric surfactants represent only a low percentage of all commercially available surfactants used in detergents. Therefore, the development of an analytical method for this category of surfactants has never been considered as a priority.

The interesting feature of these surfactants is that depending on the pH they can display anionic and/or cationic properties. Commercially available amphoteric surfactants have different iso-electric points varying between pH 1 to 11.

For the applicability of the method to commercially available amphoteric surfactants in detergents see table 2d.

2.4.1 Semi-specific methods

The semi-specific analytical method for the determination of amphoteric surfactants is based on the cationic properties of these surfactants.

The DBAS method

The same method as that used for cationic surfactants i.e. Disulfine blue active substances can in principle be applied to amphoteric surfactants in their cationic form. However, this requires that no other cationic surfactants are present in the test sample. If the test sample is passed on a strong cationic exchange resin it is likely that other cationics, if present in the sample, will be retained too.

The rapporteur of the sub-group amphoteric reported that additional work is needed if this method is intended to be included in the European legislation.

The Orange II method

This method is based on the work of Boiteux 1984. The principle of this method is similar to that used for other surfactants, it is based on the formation of solvent-extractable colored complex of the surfactants and the orange II reagent (anionic dye). The detection is followed spectrophotometrically at 485 nm.

The work carried out by Boiteux was to investigate on the possible use of betaines in detergents and products for personnel hygiene in third world countries areas infested by the parasites causing the Schistosomoses disease (Bilharzioses). The amphoteric surfactants seem to exert an inhibitory effect on the cercarial larvae responsible for causing this disease.

The analytical method requires the following steps:

- * Extraction of the amphoteric surfactant from the test liquor
- * Formation of a complex of the amphoteric surfactants and an azodye (Orange II) at pH 1-1.5
- * Azodye: p(hydroxy 1 naphthyl azo) benzene sulfonic acid, sodium salt
- * Extraction of the sample with chloroform
- * Measurement of absorbance at 485 nm.

The method as been applied to alkyl betaine C₈ or C₁₈ and alkyl amido betaine C₁₂ or C₁₈ at a concentration range between 1 to 12 ppm.

Limit of detection: around the ppm.

The rapporteur for amphoteric surfactants indicated that the feasibility and optimisation of the Orange II method for determination of selected amphoteric surfactant is being investigated by TEGEWA (the german federation of surfactant manufacturers).

The method to extract amphoteric surfactant from the test liquor is expected to be the sublation method described for other classes of surfactants. Some adaptation may be needed to ensure adequate recoveries. This problem is investigated at this moment by the German federation of surfactant manufacturers -TEGEWA.

As for other surfactants the proposed separation method will be based on ion-exchange. It is reported that both types of amphoteric surfactants i.e. ampholytes and betaines are retained on a strong cationic exchange resin. They can be eluted with an ethanol/hydrochloric acid mixture with a recovery of 95 to 100%. Care must be taken if cationic surfactants are present in mixture with amphoteric because they are likely to interfere with the detection of amphoteric surfactants.

It is further suggested by the rapporteur that ion exchange procedure described in Directive 82/242/EEC could be used to retain amphoteric surfactants. However, some additional work may be needed.

Polarography

Another analytical method involves the determination of the loss of surface active properties of cationic surfactants by tensiometry or by polarography.

2.4.2 Instrumental analytical method

High Performance Liquid Chromatography- HPLC

A specific method developed for measuring trace levels of quaternary ammonium compounds in river water was adapted to measure also alkyl betaines.

The analytical procedure involves the separation of quaternary ammonium compounds on a cyanoamino bonded phase column and the determination of the ionic species by conductivity.

The method is reported to be relatively simple. There is no need for derivatization, ion-pairing or other suppressor methods.

The modification of the method to measure alkyl betaines involves lowering of the pH in order to enhance the cationic form of the amphoteric surfactants.

Detection limit: 2 µg/l

TABLE 1e

AMPHOTERIC SURFACTANTS

Semi-specific analytical methods

Method	Reagent	Complex	Extraction with	Detection method	Limit of detection	Applicability
ORANGE II (Boiteux)	Orange II	coloured complex	chloroform	spectrometry at 485 nm	1 ppm	feasibility and optimisation for quantitative determination of selected amphoteric is investigated by TEGEWA
DBAS Disulfine Blue	Disulfine Blue anionic dye	ion-association complex	trichloromethane	spectrometry at 628 nm	?	for amphoteric in their cationic form Additional work needed

Loss of surface-active property also measured by polarography.

During extraction on strong cationic exchange resin if cationic surfactants are also present they will also be isolated

Alternative instrumental analytical method

Method	Reaction to enable detection	Detection	Limit of detection	Applicability
HPLC with conductivity detector	derivatisation not necessary	conductivity	2 µg/l	Substance specific Wee & Kennedy method for quaternary ammonium compds. modified to measure alkyl betaines pH to be lowered

3. REMARKS AND PROPOSALS CONCERNING THE ANALYTICAL METHODS

3.1 ANIONIC SURFACTANTS

Dr. Painter reported that the MBAS method is well suited for routine laboratory analysis providing that the anionic surfactants to be determined is well isolated from potential interfering substances which could also react to the methyl blue reagent and be sufficiently hydrophobic to be extracted by chloroform.

According to the rapporteur of this sub-group, the detergents placed on the market today are no longer made with a single well identified surfactant but are merely mixtures with several categories of surfactants. Hence the essential difficulty of the authorities in charge of the control of compliance with the legislation is to be able to separate correctly the different surfactants from the starting detergent mixture.

If the separation technique is not successful the biodegradability of a surfactant may be overestimated.

It is therefore suggested that for the discussions on analytical methods for anionic surfactants particular attention should be paid to the separation (isolation) procedure proposed.

In the opinion of the rapporteur instrumental analytical method should not be developed for the purpose of measuring primary biodegradability of anionic surfactants given that under normal circumstances the MBAS method would serve the purpose of the legislation. However, they may well be the only alternative regarding surfactants which do not respond to the methylene blue under the condition of the test (see table 2a).

3.2 NON-IONIC SURFACTANTS

In his conclusion the rapporteur of this sub-group Dr Cavalli indicates that the BiAS is a hard working method, essentially because of the need to apply multi sublation steps. However it is considered a reliable method.

Dr. Cavalli however, questions the applicability of the BiAS to modern detergents containing several classes of surfactants. According to his opinion after solvent extraction and ion-exchange the test fraction may still contain substances likely to interfere with the determination of the non-ionic surfactants such as amphoteric or non alkoxylated surfactants.

Because it has been used in biodegradation studies the rapporteur suggest to optimise the methodology for the determination of non-ionic surfactants by introducing the thin layer chromatography technique (TLC) particularly because it is simple, less hard-working and in principle applicable to any class of non-ionics.

Similarly to the problem raised for anionic surfactants, the methodology for separating non-ionic surfactants requires to be considered carefully.

During the meeting in April 1997 the experts of the ad-hoc working group agreed to consider the cobalt thiocyanate (CTAS) method as a candidate for inclusion in the Directive on detergents because it is widely used and because of the possibility of its automatisation.

3.3 CATIONIC SURFACTANTS

The semi-specific DBAS method has been used for more than 10 years in laboratories for measuring concentration of quaternary ammonium surfactants (QACs). This method however, has never been included in the European legislation on detergents.

From the opinion of the experts of the working group this method should be relatively easy to standardise.

Two points need to be discussed:

A) The presence of anionic compounds may interfere with the method given the high affinity of cationic surfactants for anionic compounds including the anionic dye used to form the ion-association complex.

From the information available the way to separate the cationic surfactants from anionic compounds is as follows:

The residues from the pre-concentrated samples are extracted with methanol and the extract is treated on an ion-exchange resin to remove interfering anionic compounds. Then the isolated cationic surfactants is reacted with the dye.

In the proposed French standard T 73 280 there is some confusion as to the solvent used for extraction (methanol or ethanol?) but the procedure followed to separate anionic compounds is similar to that described above.

In the summary report from the rapporteur however, the extraction method is presented differently namely that, the insoluble complex between the cationic surfactants and the dye is extracted from the complex by treating it on a ion-exchange resin to fix the anionic compounds. We do not know whether it is a deviation from the French standard or not?

B) The applicability of the method to Esterquats

Esterquats are according to the information received from industry the most commonly used cationic surfactants in detergents. (see table 2c). The other cationic surfactants used in detergents belong to the family of tallow dimethyl ammonium chloride.

Esterquats contain multiple esters bonding which can be readily hydrolysed under strong acidic conditions. This point is important because the complex formation and solvent extraction procedure is normally performed in acidic conditions. According to some experts such experimental conditions would not allow the extraction of esterquats.

This opinion is challenged by the rapporteur for cationic surfactants who claims that by using an adequate extraction method the esterquats could also be measured by the DBAS method.

It must be underlined that in both the German standard DIN 38 409 T20 and in the French standard T 73-280 the formation of the ion-complex disulfine blue-cationic surfactant is carried out in a buffered medium (pH 3-5).

The rapporteur indicated that the proposed DBAS method has the advantage of using simple equipment. However this method may not be as popular as the HPLC method used more internationally.

The rapporteur proposes a sequential plan of action regarding analytical methods for cationic surfactants.

This plan has essentially three goals:

- * Industry should identify more precisely which cationic surfactants are actually used in detergents
- * To carry out ring tests on the extraction and analysis methods on appropriate samples identified under the first step
- * To define and launch a ring test on the biodegradability method including the analytical procedure selected from the results of step 2.

According to the rapporteur it is essential to be sure that the complete method is reliable and can be used in most cases.

3.4 AMPHOTERIC SURFACTANTS

Historically physico-chemical techniques have been used in laboratories to measure the primary biodegradability of amphoteric surfactants such as the loss of surface active property of the surfactant by tensiometry or by polarography.

More recently non-specific analytical methods were developed to determine these compounds.

The Orange II method based on the formation of a solvent extractable ion-association complex is presently investigated by the German federation of surfactants manufacturers (TEGAWA).

The rapporteur indicated that the feasibility and optimisation of the orange II method for quantitative determination of selected amphoteric surfactants is examined by TEGEWA. At the expert meeting in March 1997, a representative of the German industry confirmed that the results of the exercise should be analysed for the end of September 1997.

The rapporteur indicated also that the use of the DBAS method could be envisaged for measuring amphoteric surfactants in their cationic form but further work would be needed.

4. APPLICABILITY OF ANALYTICAL METHODS TO THE COMMERCIALY AVAILABLE SURFACTANTS USED IN DETERGENTS

4.1 TABLES OF COMMERCIALY AVAILABLE SURFACTANTS USED IN DETERGENTS

The following tables are intended to show which analytical methods are available for each type of surfactant. The information provided by industry allowed also to give a rough estimate of the percentage of tonnage of surfactants used in detergents.

The percentages data were computed on the basis of the information supplied to us by AIS/CESIO (March 1997).

ABBREVIATIONS:

HPLC: High Performance Liquid Chromatography
HPLC/cond: HPLC coupled with conductivity detector
GC: Gas Chromatography
MS: Mass Spectrometry
TLC: Thin Layer Chromatography
FAB: Fast Atom Bombardment

PRIMARY BIODEGRADATION: ANALYTICAL METHODS

TABLE 2a

Anionic surfactants			
Surfactant	% *	Analytical method	
		Semi-sp	Specific
		MBAS	
Sulphonates		YES	TLC, HPLC, GC/(MS)
Linear Alkyl Benzene Sulphonates (LAS)	20		
Prim. Alkane Sulphonates (PAS)	<1		
Secondary alkane sulphonates (SAS)	2		
Alpha olefine Sulphonates (AOS)	<1		
Alpha sulpho fatty acid esters (FES) /			
Alkanoic Acid Methyl Ester Sulphonates (MES)			
Alkyl Sulfosuccinates		YES	HPLC, GC
Di-Alkyl-	<1		
Mono Alkyl-	<1		
Ethoxylated Mono Alkyl-	<1		
Alkyl Sulphates (AS)		YES	HPLC, GC/(MS), FAB/MS
Alcohol- (linear and monobranched)	20		
Ethyl Hexyl Alcohol-	<1		
Alkyl Ether Sulphates (AES)		YES	HPLC, FAB/MS, TLC GC/(MS)
Alcohol-	20		
Fatty Acid Ethanolamide-			
Alkyl Phenol-	<1		
Soaps			
Carboxylates		NO	HPLC, GC
Fatty Acid (Palmitic Acid, Stearic Acid, Ca)	36		
Alcohol Ether-	<1		
Alkyl Phenol Ether-	<1		
Phosphates		NO	measur. based on foam and surface tension
Alcohol-	<1		
Alcohol Ether-	<1		
Alkyl Amine Ether-			
% *: % of tonnages of anionic surfactants used in detergents placed on the market			

TABLE 2b

Non-ionic surfactants			
Surfactant	%*	Analytical method	
		Semi-sp*	Specific
		BiAS	
Alkyl Phenol Ethoxylates (APE)	6	YES	HPLC, GC/(MS)
Alcohol Ethoxylates (AE)		YES	TLC, HPLC, GC, HPLC/MS
Alcohol-, linear and mono branched, 2-20 EO	62		
Alcohol-, linear and mono branched, >20 EO	6		
Alcohol- poly branched	6		
Alcohol-, endcapped methyl or butyl	<1		
Alkoxylates			TLC, HPLC, GC, HPLC/MS
Alcohol-, linear and mono branched			
hydrophilic: EO>4 and EO/PO or EO/2BO>1	6	YES	
hydrophobic: EO<4 and EO/PO or EO/2BO <1	<1	?	
endcapped methyl: EO>2 and EO/2BO >2	<1	?	
Ester Ethoxylates		YES	HPLC
Fatty acid-	<1		
Castor oil, hydrogenated	<1		
Fatty Acid Glycerol-	<1		
Amide		YES	HPLC
Fatty Acid-, mono ethanol amide	<1		
Fatty Acid-, diethanol amide			
Fatty Acid-, mono ethoxylated			
Fatty Acid-, bis ethoxylated			
Alkyl Amine Ethoxylates	<1	YES	HPLC
Amine Oxides		NO	HPLC ?
Alkyl Dimethyl-	<1		
Alkyl Amine 2EO Oxide			
Alkyl Amido Propyl Dimethyl Amine Oxide			
Sugar Surfactants		NO	FAB/MS, TLC, GC, HPLC/MS
Alkyl Poly Glucoside	6		
Alkyl Glucamide	<1		
Sorbitol Esters	<1		
Sucrose Esters	<1		
%*: % of tonnages of non-ionic surfactants used in detergents placed on the market			
Semi-sp*: semi-specific analyses as BiAS, CTAS, PPAS, TAS, EO>6			

TABLE 2c

Cationic surfactants			
Surfactant	%*	Analytical method	
		Semi-sp	Specific
		DBAS	
Dialkyl Quats	1	YES	TLC, HPLC/cond, FAB/MS
Dialkyl (C16-18) Dimethyl Ammonium			
Dialkyl (C10) Dimethyl Ammonium			
Diester Quats	99	(NO)	HPLC/cond
MDA Diester			
TEA Diester		YES*	
Dimethyl Amino Propyl			
Alkyl Pyridinium Derivatives	**	YES	HPLC/cond
Imidazolinium	**	YES	HPLC/cond
%*: % of tonnages of cationic surfactants used in detergents placed on the market			
** not used in detergents			
YES*: Experimental French Standard T 73 280			

TABLE 2d

Amphoteric surfactants			
Surfactant	%*	Analytical method	
		Semi-sp	Specific
Betaines		YES*	HPLC/cond
Sulpho Betaines C8-18	1		
Sulpho Hydroxy Betaines	1		
Amidobetaines	80		
Alkyl Dimethyl Betaines	8		
Other Amphoterics		?	?
Alkyl Glycinate C8-18	1		
Alkyl Carboxy Glycinates C8-18	8		
Alkyl Amino Propionate C8-18	1		
%*: % of tonnages of amphoteric surfactants used in detergents placed on the market			
Semi-specific analytical method: DBAS (cationic), Orange II method			
YES*: Orange II method under investigation by TEGEWA			

4.2 SUMMARY CONCERNING THE APPLICABILITY OF THE ANALYTICAL METHODS TO COMMERCIAL SURFACTANTS IN DETERGENTS

4.2.1 Anionic surfactants

The semi-specific analytical method MBAS as described in the Directive 82/243/EEC can be used for the determination of 60-65% of the anionic surfactants used in detergents on the market.

For 36-38% of the soaps - carboxylates on the market the MBAS method can not be used. Specific analytical methods such as HPLC, GC could be proposed. If a specific method could be selected it would require standardisation and a ring-test before it is included in the European legislation.

For the Phosphate Ester surfactants, <1% on the market, the MBAS method can not be used. At this moment the determination of primary biodegradability is made on the basis of foam formation and surface tension.

4.2.2 Non-ionic surfactants

The BiAS method can be used for all of non-ionic surfactants containing an ethylene oxide chain with EO>5. Thus from table 2b this method is theoretically applicable to the bulk of commercially available non-ionic surfactants i.e. around 80 %.

At the expert meeting Dr. Cavalli indicated that in his opinion that more than 60% of the total tonnage of non-ionic surfactants in detergents could be determined by the BiAS method. The experts underlined also the fact that for non-ionic surfactants with EO < 4 the complex formation tends to decrease the hydrophobic balance with the result that less complex is extracted. In such a case more extraction is needed.

It is not clear whether alkoxyated non-ionic surfactants with EO < 4 and with propylene oxide or butylene oxide do respond to the BiAS in the condition of the test.

The larger group of non-ionic surfactants which do not respond to the BiAS method is the group of sugar derivatives 6% on the market. For this type of non-ionic surfactants, a specific analytical method such as HPLC could be proposed. To develop such a standard method, the potential increase of tonnage of this surfactant placed on the market would need to be considered.

The rapporteur for non-ionic surfactants indicated that BiAS method was not applicable to amine oxide surfactants < 1 % . He indicated that HPLC method could in principle be used but it would need some research.

During the ad-hoc experts meeting of March 1997 it has also been suggested that the CTAS method could be added to the Directive 82/242/EEC because this method is more easy to handle, it is as valuable as the BiAS method and it can be automated.

4.2.3 Cationic surfactants

The DBAS method is reported to be applicable to the class of tallowdimethyl ammonium chloride surfactants and also to imidazolium and pyridinium derivatives. There is however some doubts as to the applicability of this method to Esterquats derivatives (see chapter 2.3).

On the basis of the information concerning the tonnages of cationic surfactants on the market from AIS/CESIO, Esterquats represent almost 99% of the cationic surfactants used in detergents. It is in our opinion critical to find out if indeed the DBAS method is applicable to this category of cationic surfactants.

The application of specific instrumental methods such as HPLC to Esterquats has been attempted but has been reported as unsatisfactory.

France made a proposal to use the Experimental French Standard T73 280 which is also based on the use of the disulfine blue reagent for the analyses of Ester Quats. However, this method is still under investigation.

4.2.4 Amphoteric Surfactants

If the results of the investigation carried out currently by TEGAWA are positive the Orange II method could be used for most of the betaines surfactants >80% of the existing amphoteric surfactants contained in detergents.

It is unclear whether the glycinates surfactants can be measure by this method.

The Orange II method is under investigation by TEGEWA, the results of the ringtest carried out by industry is expected for the end of September 1997.

5. BIODEGRADABILITY TESTS

5.1 EXISTING BIODEGRADABILITY TEST METHODS

5.1.1 Directive on Detergents

Screening test - Die-Away Test

References:

- Directive 73/405/EEC, 82/242/EEC, 82/243/EEC:
 - OECD method, technical report 1976
 - Germany, Bundesgesetzblatt 1977
 - France, AFNOR 1977

For comparison of operating parameters, see table 3a

Principle:

A solution of the surfactant at 5 mg/l active substance in an organic medium is inoculated with 0.05 % of secondary effluent from waste water treatment plant. The mixture is aerated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ until the concentration of the surfactant falls to a constant level, for a period no longer than 19 days. Biodegradation is followed by semi-specific analysis of the samples taken at regularly time intervals. Anionic surfactants are determined by the methylene blue method, reported as MBAS, and non-ionic surfactants as bismuth active substances (BiAS). The procedure is validated by using two standard anionic surfactants, a "soft" or easily biodegradable surfactant and a "hard" or relatively non-biodegradable one.

The French methods (T 73-260 / T 73-270) are die-away tests quite different from the other screening tests. These tests have two incubation periods: one of 7 days followed by sampling, the next after a new addition of 5 mg/L of test substance from day 8 to 10 followed by analysis of MBAS or BiAS.

The biodegradation level after 7 days and after 10 days is determined to obtain a weighted biodegradation level for the duration of the experiment.

Confirmatory test - Activated Sludge Simulation test

References:

- Annex to Directive 82/242/EEC and 82/243/EEC
 - OECD method, technical report 1976
 - Germany, Bundesgesetzblatt 1977
 - United Kingdom, Porous Pot Test, technical report 70/1978

Principle:

The confirmatory test uses a small activated sludge simulation unit which is fed with synthetic sewage. Synthetic sewage containing the required concentration of the surfactant under test is supplied at a constant rate to a vessel in which 3 l of activated sludge is aerated. The mixed liquor passes to an adjoining vessel where it settles and the settled sludge is continuously recycled to the aeration vessel, while the supernatant liquid is collected as effluent. The percentage removal of the surfactant is calculated for each sampling time from the concentrations in the sewage and in the corresponding effluent. The concentration of the surfactant is determined by semi-specific analyses MBAS or BiAS.

In the UK method the Porous Pot is used as an alternative test system to the Husmann system.

5.1.2 Other existing biodegradability test methods

There exists other comparable OECD and EEC test methods to determine the biodegradability of chemical substances. Some of these methods use non specific analytical methods such as DOC to determine the ultimate biodegradation of a substance. The biological test procedure has been adapted after years of experience with different chemicals. The biological part of the test methods described in the detergent Directive could be adapted in the same way.

Screening Tests

References:

- OECD Guideline 301A,
- EC, C4 A: DOC Die-Away

For comparison of operating parameters, see table 3b

Principle:

A measured volume of inoculated mineral medium, containing a known concentration of the test substance (10-40 mg DOC/l) as the nominal sole source of organic carbon, is aerated in the dark or diffuse light at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The inoculum may be activated sludge, sewage effluents, surface waters, soils or a mixture of these ($30 \text{ mg}^{\text{SS}}/\text{l}$, 10^6 CFU/ml).

Degradation is followed by DOC analysis at frequent intervals over a 28-day period. The degree of biodegradation is calculated by expressing the concentration of DOC removed (corrected for that in the blank inoculum control) as a percentage of the concentration initially present.

Primary biodegradation may also be calculated from supplemental chemical analysis of the parent compound made at the beginning and end of the incubation.

References:

- OECD Guideline 301E,
- EC, C4 B: Modified OECD Screening test

Principle:

A measured volume of mineral medium, containing a known concentration of the test substance (10-40 mg DOC/l) as the nominal sole source of organic carbon, is inoculated with 0,5 ml effluent per litre of medium. The mixture is aerated in the dark or diffuse light at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Degradation is followed by DOC analysis at frequent intervals over a 28-day period. The degree of biodegradation is calculated by expressing the concentration of DOC removed (corrected for that in the blank inoculum control) as a percentage of the concentration initially present.

The degree of primary biodegradation may also be calculated from supplemental chemical analysis of the parent compound made at the beginning and end of the incubation.

Activated Sludge Simulation Tests

For comparison of operating parameters, see table 4

Reference:

- ISO 11733: Water Quality - Evaluation of the elimination and biodegradability of organic compounds in an aqueous medium - Activated Sludge Simulation Test

Principle:

Two continuously operating test units (activated sludge plants or porous pots) are run in parallel under identical conditions, with a mean hydraulic retention time of normally 6 h and a mean sludge age (sludge retention time) of 6 d to 10 d. The test compound is normally added at a concentration 10 - 20 mg/l DOC, to the influent of only one of the test units, the second unit is used as a control.

The influent is an organic medium. Synthetic sewage, domestic sewage or a mixture of both can be used.

In regularly taken samples of the effluents, the DOC or COD are measured. If required the test compound concentration are measured by specific analyses. The difference between the effluent concentrations in the test and control units compared with the influent concentration of the test compound is used to determine the biodegradation and elimination of the test compound.

Reference:

- OECD Guideline 303 Proposal: Simulation Test Aerobic Sewage Treatment.
Being revised as 303A, B, C.

Principle:

Two continuously operating test units (activated sludge plants or porous pots) are run in parallel under identical conditions which are chosen to suit the purpose of the test. Normally the mean hydraulic retention time is 6 h and a mean sludge age (sludge retention time) of 6 d to 10 d. The test substance is normally added at a concentration 10 - 20 mg/l DOC, to the influent (organic medium) of only one of the test units, the second unit is used as a control.

The influent is an organic medium. Synthetic sewage, domestic sewage or a mixture of both can be used.

In frequently taken samples of the effluents, the DOC or COD is determined, together with the concentration of the test substance (if required) by specific analysis, in the effluent from the unit receiving the test substance.

The difference between the effluent concentrations in the test and control units is assumed to be due to the test substance or its organic metabolites. This difference is compared with the influent concentration of the added test substance in order to determine the biodegradation, elimination of the test compound.

References

- EC method, Part C, Biodegradation: Activated Sludge Simulation Test
(Directive 88/302/EEC O.J. L133 of 30.05.88 p.1)

Principle:

For the determination of the ultimate biodegradability, two activated sludge pilot units (OECD confirmatory test or porous pot units) are run in parallel.

The test substance is added to the influent (synthetic or domestic sewage) of one of the units, while the other receives the sewage alone.

The DOC (or COD) concentrations are measured in the effluents, the difference in mean concentrations between the test and the control effluents is assumed to be due to undegraded test material.

The units may be operated following the "coupled units mode" by a transinoculation procedure.

For the determination of primary biodegradation with specific analysis in the influent and effluent, only one unit is used. Change in the concentration of the parent molecule can be measured by specific analysis (primary biodegradation).

5.2 OPERATING PROBLEMS: ADSORPTION, SOLUBILITY, TOXICITY

5.2.1 Adsorption

Surfactants which strongly adsorb, such as cationic surfactants, may lead to false degradation/elimination results. Therefore it is prudent to determine the amount of surfactants adsorbed on to suspended solids.

The shape of the removal-time curve can give an indication of what is occurring. A typically shaped biodegradation curve has a lag phase followed by a steady rise in removal over a number of days until it reaches a plateau, but if adsorption takes place as well as degradation a positive removal occurs initially followed by a decrease, thereafter a normal biodegradation curve is obtained.

To control the loss on to suspended solids a preliminary test can be done or suitable control vessels can be set up in the biodegradability test.

Supplementary information can be obtained by determining the content of the surfactant on sludge and on the suspended solids in the effluent, so that a mass balance may be made.

In some cases pre-treatment of the test vessels could be necessary. Methods for the pre-treatment of the test vessels with the surfactant are developed by the manufacturer.

5.2.2 Solubility

Some cationic surfactants are not very soluble, so that they cannot be assessed by DOC methods or by the DBAS die-away method unless special measures are taken.

To determine the biodegradability of poorly soluble surfactants a "ready" biodegradability test will be more appropriate.

The ISO 10634 (1995) describes four techniques for dispersing organic products, which are to be subjected to biodegradability tests in an aqueous medium, which are not enough soluble to perform the tests in the normal manner.

The four techniques are: direct addition, ultrasonic dispersion, adsorption on an inert medium and dispersion with an emulsifying agent.

These techniques are applicable where the evaluation of the biodegradability of the substances under test is carried out in accordance with the methods by analysis of the released carbon dioxide or by determination of the oxygen consumption (OECD 301B, D, F).

New ready biodegradability test methods are also under development to determine the biodegradability of poorly soluble test substances.

The "Headspace" CO₂ method could be appropriate for testing poorly soluble surfactants (see new test methods-ISO/DIS 14593) (Annex 9.3).

5.2.3 Toxicity

The toxicity of the surfactant to the activated sludge can be determined in an activated sludge respiration inhibition test to determine the test concentration to use in the biodegradation test. In the case where the surfactant is toxic to the activated sludge a lower test concentration compared to that given in the method of the Directive has to be used. When using a lower test concentration attention should be paid that the semi-specific analyses can still be done (detection limit).

Another possibility is to perform specific analyses or to use labelled carbon.

To decrease the level of toxicity pre-adaptation of the bacterial inoculum can be performed before starting the biodegradation test. A proposal has been made to use pre-adapted inoculum for "ready" biodegradability tests.

5.3 ADAPTATION OF THE EXISTING TEST METHODS

5.3.1 Screening test- Possible changes to the method

Proposal from Dr. Painter to take following changes into consideration:

- * To increase the inoculum density from 0,5 ml effluent/l to not more than 30 mg activated sludge solids /l; only at much higher concentrations does adsorption to solids become significant. The test would be of shorter duration and results would be more reproducible
- * To acclimatise the inoculum (for no longer than 14 days) as in the SDA test, again to shorten the test and to obtain less variable results
- * To bring the medium in-line with the medium included in the revised OECD "ready" tests (1992)
- * Alternatively to add trace elements and peptone to the medium for greater consistency of results. This will be unnecessary if activated sludge were to be used as the inoculum.

The screening tests for primary biodegradation have stringent conditions. One of these conditions concern the low inoculum content of the test medium. It is reasonably assumed that if a surfactant is meeting the pass value of 80% it will certainly undergo primary biodegradation in the environment.

Among the proposals of modifications made by the experts the increase of inoculum content of the test medium to put it in line with the conditions of ultimate ready biodegradability tests and also to improve the reproducibility of results of the tests has been proposed.

One could argue that by putting similar test conditions for screening test for primary biodegradability with those of ultimate ready biodegradability one could loose some of the stringency of the original primary biodegradability tests. This may need to be considered for the modification of the detergent legislation.

5.3.2 Confirmatory test: Possible adaptation of the test method

*** Critical points (see table 4)**

-- Nutrient solution: only synthetic (reconstituted) sewage is used.

The use of synthetic sewage can give problems, when operating the system for several weeks. Bulking problems caused by the proliferation of filamentous micro-organisms in the sludge are currently observed.

Practical inconvenience: the synthetic sewage has to be freshly prepared daily.

-- Inoculum:

No choice of inoculum, only secondary effluent, 3 ml is used

-- Operating parameters:

- * Addition of nutrient solution: continually
- * Exposure time: HRT(Hydraulic retention time): 3h, influent rate: 1l/h
- * Suspended solids: 2.5 g/l
- * Air lift pump: continually

*** Proposal for adaptation (see table 4)**

The EEC, ISO, OECD have published a version of the activated sludge simulation test which allows the choice of a number of factors, including Husmann unit or Porous Pot system, synthetic or domestic sewage, and single or coupled units.

An adaptation of the existing confirmatory test could be proposed for following parameters:

-- Nutrient solution:

Proposal: The choice to use synthetic sewage or real domestic sewage or a mixture of both.

The advantages are:

- * Test performance during a longer period of time will be easier to handle
- * This is a simulation test and will be more realistic referring to sewage treatment plants
- * Practical: the real sewage could be used during several days if the sewage is stored cool and if it is proved that the DOC has not significantly decreased during storage.

--Inoculum:

Different inocula could be used such as activated sludge, secondary effluent or soils

-- Operating parameters:

- * Addition of nutrient solution: discontinuously, bulking problems will be minimised
- * Exposure time: HRT: 6h, influent rate: 0.5 l/h
SRT: 6 - 10 days (discarding sludge xml every day).

The influent flow can be reduced by a factor 2 which means a flow rate of 0.5 l/h.

This increases the hydraulic retention time in the reactor from 3 to 6 hours for vessels of 3 l.

The sludge recirculation rate is considerably reduced and constant sludge wastage (500-300) ml/day allows stable operation when operating with a sludge retention time between 6-10 days.

- * Suspended solids: 1-3 g/l
- * Air lift pump: discontinuously (ex. 5 min every 2.5 hours)

*** Reproducibility**

- * Reproducibility between (simultaneous) replicates is good (within 10-15 %) for test substances degraded by 80 % or more, for substances less degraded the variability is greater. With some borderline substances disparate results have been recorded on different occasions.
- * Little difference has been found in results obtained by coupling units or with the two types of apparatus, Husmann unit and Porous Pot, the difference in test results is more dependent on the sewage. Domestic sewage will initiate biodegradation more rapidly than synthetic sewage.
- * To obtain information of the influence of the operating parameters on the biodegradability of a test substance using a CAS test, AIS/CESIO had organized a ring test in 1987.
Results of this ringtest were not available.

5.4 NEW BIODEGRADABILITY TEST

ISO test method: Head space CO₂ method

References:

- Draft International Standard ISO/DIS 14593, Water quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Method by analysis of released inorganic carbon in sealed flasks.

This method is a "ready" biodegradability test which can also be applied to organic compounds which are poorly soluble, special measures may be necessary to achieve a good dispersion of the compound.

Principle:

Determination of the ultimate biodegradation of organic compounds by micro-organisms, using an aqueous aerobic test medium. The test substance, as the sole source of carbon and energy, is added to a mineral salts medium inoculated with a mixed population of micro-organisms and incubated in sealed vessels with a headspace of air. The concentration of the compound used normally yields an initial organic carbon concentration in the medium of 2 to 40 mg/l (20 mg/l is recommended). Biodegradation (mineralisation to CO₂) is determined by measuring the net increase in inorganic carbon (IC) levels over time compared with unamended blanks. The test generally runs for 28 days. The extent of biodegradation is expressed as a percentage of the theoretical IC production based on the amount of test substance (as organic carbon) added initially.

If a suitable analytical method is available, the primary biodegradation during the test may also be determined.

Experimental French standard

References:

- Projet de norme expérimentale: Agents de surface - Détergents. Agents de surface cationiques. Détermination de la biodégradabilité. Pr, T 73-280

Principle:

The biological part of this method follows the same principle as that for the anionic and non-ionic surfactants mentioned in the existing French standard (T73-260 and T73-270).

A solution of mineral medium is inoculated with secondary effluent after enrichment with nutritive substances. The cationic surfactant is added to the mineral medium at a concentration of 5 mg/l and aerated.

The biodegradation is followed by DBAS analyses of the cationic surfactant after 7 days of incubation. Thereafter a new addition of 5 mg/l cationic surfactant is performed followed by analyses on day 10.

Validity of the test system is checked by running a reference substance at the same time.

Remarks on the test method:

- * Apparatus with a capacity to contain a test volume of 20 - 10 l are mentioned on page 5, 6, these volumes seems high for practical reasons to perform screening tests
The figure on last page needs more explanation (dimensions) and need to be in accordance with the test description.
- * The nutrient solution is quite different from the other existing screening tests
A proposal is to bring the medium in line with that in the revised "ready" tests (1992).
- * Confusion is occurring in the test by using "anionic" surfactant instead of "cationic" surfactant.

SCREENING TESTS

Comparison of operating parameters

TABLE 3a

DIRECTIVE DETERGENTS

TEST	Act. subs. mg/l	inoculum	reference substance	test duration (days)	sampling
OECD Die- AWAY	5	secondary effluent 0.5 ml/l $\pm 10^3$ cells/ml	soft + hard anionic standard	19	day 5 and 8, after every 2 days
NFT73 - 260 anionics + NFT73 - 270 non-ionics	20	domestic sewage 10^5 - 10^7 cells/ml	sodium alkylbenzene sulfonate	1-7 8-10 with addition of act. substance	end of 7th end of 10 day
Tenside verordnung BGBl I, S. 244	5	secondary influent empirically determined	soft + hard anionic standard	19	day 5 and 8, after every 2 days

TABLE 3b

READY BIODEGRADABILITY TESTS

TEST	Test subs. mg DOC/l	Inoculum	Reference substance	Test duration (days)	sampling
DOC Die- AWAY	10-40	« 30 mg/l SS or « 100 ml effluent 10^7 - 10^8 cells/ml	aniline sodium benzoate sodium acetate (diethyleneglycol)	28	- sufficiently frequently - duplicate
Modified OECD Screening	10-40	« 0.5 ml/l secondary effluent 10^5 cells/ml	aniline sodium benzoate sodium acetate (diethyleneglycol)	28	- sufficiently frequently - duplicate

TABLE 4

ACTIVATED SLUDGE SIMULATION TESTS <i>Comparison of operating parameters of the existing test methods</i>					Proposal for adaptation
Operating parameters	Confirmatory test	ISO 11733	OECD 303 proposal	EC Part C Activ. Sludge Simul. test	Confirmatory test
Nutrient solution	Synthetic sewage	Synthetic sewage Domestic sewage Mixture of both	Synthetic sewage Domestic sewage Mixture of both	Synthetic sewage Domestic sewage	Synthetic sewage Domestic sewage Mixture of both (COD: 250-350 mg/l)
Inoculum	Secondary effluent 3 ml	Activated sludge 2,5 g/l	Activated sludge	Activated sludge Secondary effluent Composite inoculum	Activated sludge Secondary effluent Composite inoculum
Test concentration	20 ± 2 mg MBAS/l or mg BiAS/l	10-20 mg/l DOC (5 mg/l)	10-20 mg/l DOC (5 mg/l)	10-20 mg/l DOC	20 ± 2 mg MBAS/l or mg BiAS/l
Operating parameters					
1. Addition nutrient solution	continually	discontinuously	continually or discontinuously		discontinuously
2. Exposure time					
* HRT	3h	6h	6h	3-6h	6h
* SRT		6-10 days	6-10 days		6-10 days
3. Suspended solid	2,5 g/l	1-3 g/l	1-3 g/l	2.5 g/l	1-3 g/l
4. Room temperat.	19-24 °C	20-25 °C	20-25 °C	18-25 °C	20-25 °C
5. Air lift pump	continually	discontinuously 5 min every 2,5h			discontinuously 5 min every 2,5h
6. Sampling					
MBAS/BiAS	every day				5/week
DOC/COD	2/week	3/week	3/week	14-20 determinations	2/week

6. OPERATION COSTS

It is important for the legislator and for the industry performing such primary biodegradability test to know the costs involved.

The information provided under this chapter is only indicative and does not necessarily reflect all existing situations.

The following indications were obtained:

Analytical methods	Costs/sample
- semi-specific: MBAS, BIAS, DBAS, CTAS:	45 - 130 Ecus extraction included
- specific analyses:	
GC/MS	125 - 150 Ecus
HPLC	50 - 100 Ecus
more sophisticated techniques	150 - 450 Ecus
Not included:- sample preparation and extraction	
- validation of the analytical method	
Biodegradability test method	Operation costs
- Screening test: OECD Die-Away test:	1 000 - 1 500 Ecus
- Confirmatory test	9 000 - 11 000 Ecus
- Ready biodegradability tests non-specific analyses included	1 500 - 5 700 Ecus
- Pre-adaptation of the inoculum (supplementary cost)	380 - 500 Ecus

Total costs of the biodegradability tests as performed according to the detergent Directive:

- Screening test: OECD Die-Away test, 19 days:	1 800 - 3 500 Ecus
- Confirmatory test, 28 days	10 200 - 15 000 Ecus

Price information is based on the prices indicated by different laboratories for biodegradability tests performed under GLP.

7. CONCLUSIONS

7.1 ANALYTICAL METHODS

To make the content of the conclusions on analytical methods more practical it is necessary to order the proposals or developments according to their "urgency".

Development of an analytical method for cationic surfactants

Before an analytical method can be introduced into the European legislation on detergents it is suggested to use the following approach:

- * To identify the cationic surfactants normally used in detergents
- * To examine the applicability of the Disulfine blue method (DBAS) to all cationic surfactants including Esterquats
- * To discuss the content of the existing DBAS standards and the French proposal T73-280 and to prepare if necessary a new draft of an the accepted analytical protocol
- * To discuss the problem of separation of cationic surfactants from other interfering substances
- * To carry out an intercomparison exercise between European laboratories experienced with the DBAS method to confirm the validity of the test
- * To include the test method in the European legislation.

Problem of separation of surfactants

Depending on the outcome of "burden of proof" the problem of separation/extraction of surfactant from the detergent mixture may need to be discussed by an expert group.

Problem of surfactants not responding to non-specific methods

By using the summary of the table of applicability of non-specific analytical methods (Table 2a to d) of this report, it is necessary to identify which groups of surfactants will require the use of alternative methods. Priority in the establishment of instrumental methods may need to be discussed.

Development of the Orange II method for amphoteric surfactants

Further developments of this method are dependent on the results of the study carried out by TEGEWA in Germany (End September 1997).

Inclusion of the Cobalt Thiocyanate method (CTAS) in the European legislation

A discussion should take place between experts to find out if this method can be introduced in the European legislation taking into account its:

- * Facility of use
- * Sensitivity
- * Reproducibility

7.2 BIODEGRADABILITY TESTS

- * The existing biodegradability tests as described in the detergent Directive can remain unchanged unless adaptation of the test methods as proposed for the screening test and the confirmatory test are adopted. The proposals for adaptation have to be considered for practical reasons and to be in line with other existing test methods
- * Existing "ready" biodegradability tests could be accepted for testing surfactants but taking into account difficulties such as adsorption, solubility, toxicity
- * The development of new biodegradability tests, such as the Headspace CO₂ evolution test has to be considered, this would allow to test for instance poorly soluble surfactants.

7.3 PROPOSALS

- * Adaptation of the existing detergent Directive relating to the analytical and biological part of the test methods for practical reasons
- * Introduce analytical test methods for cationic and amphoteric surfactants, validation is still needed. Introduce the CTAS method for the non-ionic surfactants as a supplementary analytical method
- * To discuss surfactants for which semi-specific methods are not applicable
- * Introduce the "ready" biodegradability tests to perform tests with difficult surfactants and to develop a strategy for the acceptance of surfactants in accordance with the legislation
- * Discuss new biodegradability tests under investigation for possible inclusion in the directive.

B. BIBLIOGRAPHY

- Boiteux, J.P. (1984) Dosage colorimétrique d'agents de surface amphotères et étude du comportement d'une alkyl amido bétaine en milieu naturel *La Revista italiana delle sostanze grasse LXI* , 491-495
- Boyer, S.L., Guin, K.F., Kelley, R.M., Mausner, M.L., Robinson, H.F., Schmitt, T.M., Stahl, C.R. and Setzkorn, E.A. (1977) Analytical Method for Nonionic Surfactants in Laboratory Biodegradation and Environmental Studies. *Envir. Sci. Technol.* **11** 1167-1171
- Europlus s.a. (1996) Impact of the internal market on the detergent and soap sector, Part B : Study on the future needs of the internal market, technical aspects. EEC contract ETD/95/84077, Final Report, 31 March 1996
- Feijtel, T.C.J., Van de Plassche, E.J. (1995) Environmental risk, characterisation of 4 major surfactants used in the Netherlands. National Institute for Public Health and Environmental Protection, Bilthoven. Dutch Soap Association, Zeist. The Netherland Report n° 679101 025.
- Gerike, P., Klotz, H., Kooijman, J.G.A., Matthijs, E. and Waters, J. (1994) The determination of dihardenetallowdimethyl ammonium compounds (DHTDMAC) in environmental matrices using trace enrichment techniques and high performance liquid chromatography with conductometric detection *Wat Res* **28 (1)** 147-154
- Matthijs, E. and De Henau, H. (1987) Determination of LAS. *Tenside Deterg.* **24(4)**, 193-199
- Nietsche, L, Müller, R., Metzner, G. and Huber, L (1992) Trace analysis of cationic surfactants in water using HPLC with conductometric detection *Fresenius J Anal Chem* **342** : 711-713
- Painter, H.A. "Biodegradability of surfactants" Ed. D.R. Karsa & M.R. Porter (1995); Blackie Academic and Professional (Chapman & Hall) London
- Painter, H.A. and Bealing, D.J. "Experience and data from the OECD Activated Sludge Simulation Test" in CEC Wat. Poll. Research Reports No. 18, Lab. Test for Simulation of Water Treatment Processes, 23-24 Nov. 1989, Ispra
- Patterson, S.J., Hunt, E.C., and Tucker, K.B.E. (1966) The determination of commonly used non-ionic detergents in sewage effluents by TLC method *J. Proc. Inst. Sewage Purif* **65(2)**, 3-11
- Strotmann U. J., Schwarz H. & Pagga U. The combined CO₂/DOC test - a new method to determine the biodegradability of organic compounds, *Chemosphere*, Vol.30, No.3, pp. 525-538 (1995).
- Struijs J. & Stoltenkamp J., Headspace Determination of Evolved Carbon Dioxide in a Biodegradability Screening Test. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **19**, 204 211 (1990)

- Swisher, R.D. (1987) *Surfactant Biodegradation*. Marcel Dekker, Inc., NY
- Talmage, S.S. (1994) *The Soap and Detergent Association, Environmental and Human Safety of Major Surfactants. Alcohol Ethoxylates and Alkylphenol Ethoxylates*. Lewis Publishers
- Wee V. T. , Kennedy J. M. (1982) Determination of trace levels of quaternary ammonium compounds in river water by HPLC with conductometric detection *Anal Chem* **54** : 1631-1633
- Wickbold, R. (1972) On the determination of non-ionic surfactants in river and waste waters. *Tenside* **9** ,173-177

- Review reports on anionic, non-ionic, cationic and amphoteric surfactants prepared by Dr Painter, Dr Cavalli, Dr Mantisi and Dr Masscheleyn
- Council Directive 73/405/EEC of 22 November 1973 on the approximation of the laws of the Member States relating to methods of testing the biodegradability of anionic surfactants. Official Journal n° L347 of 17.12.73, p.53
- Council Directive 82/242/EEC of 31 March 1982 on the approximation of the laws of the Member States relating to methods of testing the biodegradability of nonionic surfactants and amending Directive 73/404/EEC. Official Journal N° L109 of 22.04.1982, p.1
- Council Directive 82/243/EEC of 31 March 1982 amending Directive 73/405/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to methods of testing the biodegradability of anionic surfactants. Official Journal N° L109 of 22.04.1982, p.18
- Methods for the determination of ecotoxicity, Part C, Biodegradation
 - C.10 : Activated Sludge Simulation Test *in*

Commission Directive 88/302/EEC of 18 November 1987 adapting to technical progress for the ninth time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal n° L133 of 30.05.88, p.1
- Methods for the determination of ecotoxicity, Part C, Biodegradation
 - C.4-A: Dissolved organic carbon (DOC) die-Away
 - C.4-B: Modified OECD Screening Test *in*

Commission Directive 92/69/EEC of 31 July 1992 adapting to technical progress for the seventeenth time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal n° L393 of 29.12.92, p.113
- Verordnung über die Abbaubarkeit anionischer und nichtionischer grenzflächenaktiver Stoffe in Wasch- und Reinigungsmitteln (Tensidverordnung – TensV). Vom 30. Januar 1977 Bundesgesetzblatt I, S.244)
- Deutsche Norm DIN 38 409 Teil 20 (1989) Summarische Wirkungs und Stoffkenngrößen (Gruppe H) Bestimmung der disulfonblau-aktiven Substanzen

- Draft International Standard ISO/DIS 14593, Water quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Method by analysis of released inorganic carbon in sealed flasks.
- ISO 7875/1 (1984) International Organisation for Standardization, Determination of Surfactants Part 1 - Determination of the anionic surfactants by the methylene blue spectrometric method
- ISO 7875/2 (1984) International Organisation for Standardization, Determination of Surfactants Part 2 - determination of the non-ionic surfactants by using the Dragendorff reagent
- ISO 10634 (1995). Water quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- ISO 11733: Water Quality – Evaluation of the elimination and biodegradability of organic compounds in an aqueous medium – Activated sludge simulation test. First edition 1995-12-15, International Standard, reference number ISO 11733:1995(E)
- Norme Française Homologuée NF T 73-260, Juin 1981 : Agents de surface - Détergents - Agents de surface anioniques : Détermination de la biodégradabilité. AFNOR 81156
- Norme Française Homologuée NF T 73-270, Mai 1983 : Agents de surface - Détergents - Agents de surface non-ioniques : Détermination de la biodégradabilité. AFNOR 83083
- NF Projet de norme expérimentale - Agents de surface cationiques, Détermination de la biodégradabilité. Pr. T 73-280
- OECD Guideline 301, Ready Biodegradability, 301A, "DOC Die-Away Test", Adopted 17.07.92
- OECD Guideline 301, Ready Biodegradability, 301E, "Modified OECD Screening Test", Adopted 17.07.92
- OECD Guideline 303 A: "Simulation Test – Aerobic Sewage Treatment: Coupled Units Test", Adopted 12.05.81
- OECD (1976) Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents. Environment Directorate. OECD Paris
- Technical Report TR 70, WRC Porous-pot method for assessing biodegradability. June 1978, Water Research Center

9. ANNEXES

9.1 OECD TECHNICAL REPORT 1976

9.2 FRENCH STANDARD PR., T 73-280

9.3 ISO/DIS 14593 HEAD SPACE METHOD

ANNEX 9.1
OECD TECHNICAL REPORT 1976



DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT

METHODE PROPOSEE POUR LA DETERMINATION
DE LA BIODEGRADABILITE DES AGENTS DE SURFACE
UTILISES DANS LES DETERGENTS SYNTHETIQUES

ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DEVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES

PARIS 1976

METHODE PROPOSEE POUR LA DETERMINATION
DE LA BIODEGRADABILITE DES AGENTS DE SURFACE
UTILISES DANS LES DETERGENTS SYNTHETIQUES*

Le rapport présente les résultats et conclusions de deux groupes d'experts de l'OCDE sur la standardisation des méthodes analytiques et la détermination de la biodégradabilité des agents de surface anioniques et non ioniques utilisés dans les détergents ménagers synthétiques.

Les méthodes analytiques proposées ont fait l'objet d'un large accord de la part des deux groupes, et reflètent l'état des techniques d'analyse chimique à l'époque de leur approbation.

En ce qui concerne la détermination de la biodégradabilité, on propose une méthode commune pour les deux types d'agents de surface. Cette méthode repose sur le choix des techniques de laboratoire qui ont jusqu'à présent reçu l'accord le plus large parmi les pays Membres en vue d'évaluer le comportement des agents de surface en ce qui concerne leur dégradation dans les stations d'épuration des eaux usées. Avec la méthode choisie on ne peut pas s'attendre à ce que les résultats simulent des conditions spéciales, ou satisfassent à des exigences particulières, aussi importantes qu'elles puissent être localement.

Il est certain que les recherches se poursuivent et devraient être encouragées en vue de mettre au point des méthodes communes plus appropriées sur lesquelles les pays Membres pourraient ultérieurement se mettre d'accord.

* La diffusion générale de ce document a été décidée le 31 mai 1976.

TABLE DES MATIERES

	Page
1. Appréciation et recommandations générales....	3
2. Terminologie.....	7
3. Test statique (test de triage).....	8
4. Test dynamique de simulation (test de confirmation).....	15
5. Traitement préliminaire des produits à examiner.....	19
6. Dosage des agents de surface non ioniques dans les eaux et les eaux résiduaires.....	35
Figures.....	41
Appendice. Liste des membres du groupe d'experts	47

1. APPRECIATION ET RECOMMANDATIONS GENERALES

1.1 Il y a une vingtaine d'années, l'utilisation croissante des détergents synthétiques a eu pour conséquence, en dehors des progrès réalisés dans la technique du lavage et du nettoyage, de perturber le fonctionnement des stations d'épuration d'eaux usées, et de provoquer une nouvelle forme de pollution de l'eau. L'effet le plus visible en a été l'apparition de mousses, en quantités parfois très importantes, sur les rivières dans de nombreux pays. Cet aspect particulier des nuisances résultait des agents de surface*, principalement des agents de surface anioniques qui représentent actuellement environ les trois-quarts des tensioactifs commercialisés, et également, bien qu'à un degré moindre, des agents de surface non ioniques (environ un quart du marché).

1.2 Dans un premier temps, en accord avec les pouvoirs publics, l'industrie a assez rapidement mis au point des agents de surface anioniques biodégradables (dits "doux" par opposition aux produits précédemment utilisés, appelés "durs"). Ces nouveaux produits sont en grande partie éliminés au cours des opérations d'épuration biologique conventionnelle des eaux usées ; une certaine élimination peut également s'effectuer grâce au processus d'autoépuration dans les cours d'eau. L'introduction de produits de remplacement biodégradables ne peut, à elle seule, résoudre tous les problèmes posés par les agents de surface utilisés dans les détergents synthétiques (digestion des boues et influence sur le transfert d'oxygène, par exemple), mais elle a conduit à une amélioration importante.

1.3 Dans de nombreux pays, des mesures ont été prises ou sont sur le point de l'être par les pouvoirs publics en vue de prohiber l'utilisation des produits qui ne présenteraient pas un taux de biodégradation acceptable. Ces mesures consistent en la conclusion d'accords entre l'administration et les fabricants de détergents ou en l'application de réglementations ou législations.

1.4 En ce qui concerne les agents de surface anioniques, une législation est en vigueur en Allemagne depuis 1964. Sur le plan international, un "Accord Européen sur la limitation de l'emploi de certains détergents dans les produits de lavage et de nettoyage" a été conclu en 1968 dans le cadre du Conseil de l'Europe (Accord partiel), et est entré en

* On ne considèrera pas dans ce rapport les effets éventuels (eutrophisation, par exemple) dus à des constituants autres que les agents de surface.

vigueur le 16 février 1971. Ultérieurement, d'autres pays européens ont adopté une législation similaire, conduisant le Conseil des Communautés Européennes à publier une directive en ce domaine le 22 novembre 1975.

1.5 En ce qui concerne les agents de surface non ioniques, certains pays, dont la France et l'Allemagne, ont envisagé dès 1972 la mise en place de législations spécifiques. Au début de 1974, la France a avisé la Commission des Communautés Européennes de son intention de publier prochainement un arrêté en la matière.

1.6 Diverses méthodes, ayant chacune leurs avantages et leurs inconvénients, ont été proposées en vue de contrôler a priori, par détermination du taux de biodégradation, si les agents de surface contenus dans les préparations détergentes mises sur le marché présentent bien les qualités requises. Ces méthodes sont fondées sur des processus biologiques et sont particulièrement soumises de ce fait à l'influence de nombreux facteurs ; les résultats fournis sont donc forcément différents d'une méthode à l'autre et une certaine variabilité peut être observée d'un laboratoire à l'autre.

1.7 Les travaux effectués au cours des années 1968-1970 par un groupe d'experts de l'OCDE sous la direction du Groupe Sectoriel sur la Gestion de l'Eau, ont abouti à la mise au point d'un système de contrôle à utiliser pour estimer la biodégradabilité des agents de surface synthétiques du type anionique. Ce système comporte deux étapes différant tant dans leur principe que dans les indications que l'on peut en tirer en ce qui concerne la biodégradabilité des agents de surface qui y sont soumis :

- un test statique du type "en flacon ouvert"
- un test dynamique fondé sur la simulation des conditions existant dans les stations d'épuration biologique d'eaux usées.

Le test statique (test de triage) offre l'avantage d'être relativement simple et rapide et de pouvoir être effectué sur un grand nombre de produits à la fois ; il permet d'obtenir aisément une première discrimination entre les produits examinés.

Le test dynamique de simulation (test de confirmation) présente l'avantage d'être plus proche des conditions réelles d'épuration dans les stations de traitement des eaux usées. Il nécessite cependant le recours à un équipement plus complexe et un travail s'étendant sur plusieurs semaines.

Les deux tests s'appliquent aux agents de surface anioniques, soit tels quels, soit contenus dans les détergents prêts à l'emploi ; dans ce dernier cas, il est nécessaire de procéder à une extraction préalable de la matière active.

1.8 Les considérations qui précèdent ont conduit le Conseil de l'OCDE à recommander l'application de ce système de contrôle pour les agents de surface anioniques dans les conditions suivantes :

- (i) utilisation du test statique comme "test de triage" et acceptation des produits dont la biodégradabilité déterminée par ce test dépasse le pourcentage requis ; et
- (ii) utilisation du test dynamique de simulation comme "test de confirmation" pour les seuls produits n'ayant pas satisfait au "test de triage", les résultats du test de confirmation étant les seuls à prendre en considération pour ce qui concerne le refus ou l'acceptation des produits non acceptés par le test de triage.

Le test dynamique est considéré comme méthode de référence dans la Directive des Communautés Européennes.

1.9 Dès juillet 1972, les travaux ont été poursuivis dans le but de mettre au point une méthode d'essai commune pour la détermination de la biodégradabilité des agents de surface non ioniques. Ces travaux ont tout d'abord porté sur la mise au point d'une technique analytique satisfaisante pour doser ces produits dans les eaux, une telle technique n'étant pas disponible. Des essais circulaires inter-laboratoires ont abouti à recommander la méthode au tétra-iodobismuthate de Wickbold (voir Chapitre 6). Une autre technique analytique, basée sur la chromatographie en couche mince (méthode de Patterson) *, a également été considérée comme utile, notamment pour étudier les produits intermédiaires de la biodégradation.

1.10 L'adoption de la technique analytique a permis de commencer à étudier le comportement des agents de surface non ioniques dans les stations d'épuration d'eaux usées. Les travaux effectués montrent que les alcools ethoxylés sont facilement dégradés, quelles que soient les conditions. Par contre, les alkylphénols ethoxylés peuvent nécessiter une période d'adaptation prolongée et, si une biodégradation satisfaisante peut être obtenue dans certaines installations, elle est insuffisante dans d'autres cas, notamment dans des conditions géographiques et climatiques particulières (les basses températures ont notamment une influence négative importante). Etant donné que les alkylphénols ethoxylés ont des applications industrielles particulières, les problèmes de pollution pouvant provenir de leur utilisation sont plutôt concentrés dans certaines zones et peuvent être résolus au moyen d'installations de traitement appropriées.

* Methods of Testing Water Used in Industry - British Standard 2690 : Part 11 : 1971.

1.11 En ce qui concerne la détermination du taux de biodégradation en laboratoire, les essais réalisés montrent que le test statique précédemment recommandé pour les agents de surface anioniques peut, en utilisant la technique analytique de Wickbold, donner une certaine indication quant au comportement des agents de surface non ioniques, et pourrait être utilisé comme test d'acceptation dans les mêmes limites que celles qui sont prévues pour les produits anioniques au paragraphe 1.8 ci-dessus.

1.12 Des essais circulaires interlaboratoires ont également été organisés dans le but de vérifier si le test dynamique recommandé pour les agents de surface anioniques pouvait, en utilisant la technique analytique de Wickbold, être appliqué aux agents de surface non ioniques. Tenant compte des résultats obtenus, la majorité du Groupe d'experts a été d'avis que ce test pouvait être retenu comme méthode internationale de référence pour évaluer le taux de biodégradation des agents de surface non ioniques.

1.13 Certains membres du Groupe d'experts ont cependant estimé que la méthode proposée ne donnait pas entière satisfaction du fait de la variabilité des résultats obtenus, de difficultés concernant la formation des boues, et parce qu'elle ne tenait pas compte de l'effet des basses températures.

1.14 Il est possible que des améliorations de la reproductibilité des résultats puissent être obtenues lorsque les laboratoires auront acquis une expérience plus approfondie de la méthode. Il est conseillé aux laboratoires qui utilisent la méthode pour la première fois, ou qui éprouvent des difficultés, de consulter un laboratoire plus expérimenté.

1.15 Les deux tests s'appliquent aux agents de surface non ioniques, soit tels quels, soit contenus dans les détergents prêts à l'emploi. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de procéder à une extraction préalable de la matière active et à une séparation des agents de surface anioniques et non ioniques (voir Chapitre 5).

1.16 Des instituts de recherche poursuivent encore des études sur la biodégradabilité des agents de surface, et il est possible que des progrès importants soient faits à ce sujet au cours des prochaines années. Des changements profonds pourraient d'autre part intervenir dans les caractéristiques des détergents mis ultérieurement sur le marché. Le critère à utiliser pour juger de la validité d'un test de laboratoire doit en définitive être que le test en question conduise à des résultats comparables à ceux obtenus dans les conditions de l'épuration biologique des eaux usées.

1.17 Les méthodes décrites dans le présent rapport sont considérés par la majorité du Groupe d'experts comme valables dans les circonstances présentes.

2. TERMINOLOGIE

. Un détergent est un produit dont la composition pratique est spécialement étudiée pour concourir au développement des phénomènes de détergence. Il comprend des composants essentiels (agents de surface) et des composants complémentaires (adjuvants, renforçateurs, charges et additifs). Seuls les agents de surface anioniques et non ioniques sont considérés dans le présent rapport.

. Dans le présent contexte un agent de surface est le composant tensio-actif d'un détergent prêt à l'emploi.

. Dans le présent contexte, "biodegradabilité" a pour signification la décomposition d'un composé organique par des micro-organismes, dans les conditions des méthodes d'essai, avec pour conséquence la perte de certaines propriétés initiales responsables de nuisances pour l'environnement.

. Dans le cas des agents de surface anioniques, le déroulement de la biodegradabilité est suivi au moyen d'une technique analytique basée sur la formation avec le bleu de méthylène de sels solubles dans le chloroforme ; on l'exprime en termes d'un produit connu de tétrapropylène benzène sulfonate.

. Dans le cas des agents de surface non ioniques, le déroulement de la biodegradabilité est suivi au moyen d'une technique analytique (méthode de Wickbold) basée sur la formation d'un précipité avec le tétraiodobismuthate de bariun. Dans sa forme actuelle cette technique s'applique essentiellement aux produits éthoxylés et propoxylés solubles dans l'eau. Ce groupe de produits comprend la majorité des agents de surface non ioniques actuellement utilisés.

3. TEST STATIQUE

(Test de triage)

3.1 Domaine d'application - Limites du test

La méthode s'applique aux agents de surface anioniques ou non ioniques, agents de surface eux-mêmes ou formulations en renfermant.

Les substances chimiques (solutions ou gaz) susceptibles d'inhiber l'activité des micro-organismes pourront freiner les processus de biodégradation et donc influencer sur les résultats. Parmi ces substances, il convient de citer notamment les composés fortement basiques, les sels métalliques toxiques, les solvants organiques et les produits bactéricides.

Les agents de surface eux-mêmes peuvent inhiber l'activité des micro-organismes lorsqu'ils sont présents à une concentration suffisamment élevée.

Les composés alcalins et d'autres substances présentes dans les produits de lavage peuvent interférer sur le pH. C'est pourquoi la méthode prescrit de travailler en milieu tamponné et sur des extraits purifiés contenant les agents de surface (voir Chapitre 5).

3.2 Principe du test

Une quantité déterminée de l'agent de surface, ou du produit préalablement extrait, correspondant à 5 ng/l de substance active, est dissoute dans une solution minérale (5.3.2). Cette solution estensemencée à l'aide d'une faible quantité de micro-organismes aérobies représentant une population mixte, et mise en incubation à 25° C + 1 jusqu'à ce que la concentration en substance active reste approximativement constante. Les agents de surfaces anioniques sont déterminés comme substance active au bleu de méthylène (MBAS). Les agents de surface non ioniques sont déterminés comme substance active à l'iodobismuthate (BIAS) en utilisant la méthode de Wickbold (voir Chapitre 6). L'efficacité des processus biologiques est contrôlée au moyen de deux substances standard anioniques.

3.3 Réactifs

3.3.1 Eau déionisée (ou distillée)

Comme solvant, on utilise de manière générale une eau déionisée ou distillée exempte de substances toxiques (cuivre notamment).

* Pour plus de détails sur la méthode de Wickbold et autres, voir le chapitre 6 (BIAS) 107/.

3.5.2 Solution minérale

On prépare un milieu (3.5.2) renfermant 1 ml de chacune des solutions suivantes (a) à (d) par litre d'eau :

(a) K H ₂ PO ₄ p.a.	8,5 g
K ₂ H PO ₄ p.a.	21,75 g
Na ₂ H PO ₄ . 2 H ₂ O p.a.	35,4 g
NH ₄ Cl p.a.	1,7 g
eau	1.000 ml

Le pH de cette solution devrait être de 7,2.

- (b) 22,5 g de Mg SO₄.7H₂O p.a. dissous dans 1.000 ml d'eau.
- (c) 27,5 g de CaCl₂ p.a. dissous dans 1.000 ml d'eau.
- (d) 0,25 g de FeCl₃.6 H₂O p.a. dissous dans 1.000 ml d'eau.

Cette solution doit être préparée immédiatement avant usage.

3.5.3 Solution de chlorure mercurique

Solution de HgCl₂ à 1 pour cent dans l'eau.

3.4 Standards de biodégradabilité

3.4.1 Standard anionique "doux"

Il a été décidé d'adopter le Marlou A*, un alkyl-benzène sulfonate linéaire commercial. La biodégradabilité de ce produit, dans les conditions du test proposé, est d'environ 92 pour cent**.

3.4.2 Standard anionique "dur"

Un alkyl-benzène sulfonate peu dégradable, du type tétrapropylène benzène sulfonate ramifié (TBS*) est également nécessaire. La biodégradabilité de ce produit, dans les conditions du test proposé, est de 0 - 55 pour cent.

* Le Marlou A et le TBS sont produits par Chemische Werke Hüls A.G., 457 Marl Nr. Recklinghausen, Postfach 1180, République fédérale d'Allemagne.

** La biodégradabilité du Marlou A, déterminée au cours des essais préliminaires du Groupe d'Experts est de 92,4 pour cent avec une déviation standard de 2,1.

3.4.5 Standards non ioniques

On a examiné la possibilité de recommander l'utilisation de certains agents de surface non ioniques comme standards de biodégradabilité ; l'expérience dont on dispose actuellement est insuffisante pour permettre de faire un choix.

3.5 Préparation des échantillons

3.5.1 Les agents de surface peuvent être testés tels quels. La teneur en IBAS ou BIAS doit être dosée dans le but de préparer la solution (1) utilisée pour le test.

3.5.2 Dans le cas de formulations, on procède à la détermination des taux de IBAS et/ou BIAS et de savon. On procède à une extraction alcoolique dans les conditions suivantes (voir Chapitre 5) :

3.5.2.1 Extraction alcoolique si le taux de savon est inférieur au taux de IBAS ou BIAS.

3.5.2.2 Extraction alcoolique et élimination de savon si l'échantillon contient plus de savon que de IBAS ou BIAS.

3.5.2.3 Séparation des agents de surface anioniques IBAS et des agents de surface non ioniques BIAS.

3.6 Préparation de la solution utilisée pour le test

On utilise une solution (1) contenant 1 g/l de IBAS ou BIAS comme solution de base. A partir de cette solution de base, on prépare une autre solution, contenant environ 5 mg/l, qui est utilisée pour déterminer analytiquement le contenu en IBAS ou BIAS. Cette étape est nécessaire pour s'assurer que la concentration est dans la zone de précision maximale de la méthode de détermination. La solution (1) sert à préparer la solution utilisée pour le test, selon la procédure décrite au paragraphe 3.9.

3.7 Insemencement

En principe, tout milieu renfermant des micro-organismes aérobies représentant une population mixte peut convenir. Dans tous les cas, le standard de biodégradabilité "doux" doit atteindre un taux de biodégradation d'environ 92 pour cent et le standard "dur" un taux de biodégradation de 0-35 pour cent (voir 3.4.1). La quantité d'inoculum nécessaire pour obtenir cette condition dépend principalement de l'activité biologique du milieu choisi.

Il est essentiel que l'activité de l'inoculum soit précisée expérimentalement lorsque la méthode est utilisée pour la première fois, ou lorsqu'un changement quelconque est apporté à la nature de l'inoculum. Dans ce but, et au moyen d'essais préliminaires faisant intervenir des quantités variables de l'inoculum choisi, on étudie le comportement des deux standards qui ont été définis en 3.4 ci-dessus. La quantité d'inoculum qui permet d'obtenir pour les standards des taux de biodégradation qui répondent aux conditions définies au paragraphe 3.11 doit être considérée comme étant appropriée. Généralement, une quantité de 0,5 ml/litre est suffisante. Il est recommandé de confirmer de temps en temps ces résultats, surtout si des variations sont observées concernant la vitesse et le taux de biodégradation des standards.

L'ensemencement sera de préférence réalisé au moyen d'un effluent secondaire de bonne qualité prélevé dans une station d'épuration biologique traitant principalement des eaux usées d'origine domestique. L'effluent doit être maintenu dans des conditions aérobies pendant la période précédant son utilisation. Pour préparer l'inoculum, l'échantillon est filtré sur filtre en papier (filtre en papier mou à filtration rapide) ; on élimine les 200 premiers ml ; le reste est maintenu en aération jusqu'au moment de l'emploi. Cet inoculum doit être utilisé le jour même où il a été recueilli.

3.8 Appareillage

- Agitateur permettant l'utilisation d'Erlenmeyers de 2000 ml avec régulation éventuelle de température. Au cas où l'agitateur n'aurait pas sa propre régulation, local à température constante ($25^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$).
- Erlenmeyers de 2000 ml à ouverture pas trop étroite.

Les flacons doivent être soigneusement lavés et rincés à l'alcool, et séchés, avant usage afin d'éviter la contamination pouvant être due à des résidus d'essais précédents.

3.9 Protocole expérimental

3.9.1 Agents de surface anioniques

Les échantillons à examiner et les standards sont testés simultanément en double exemplaire. À 2000 ml de la solution minérale (3.3.2) on ajoute 10 ml de la solution (1) - échantillon ou standard - et la quantité appropriée d'inoculum déterminée selon le paragraphe 3.7. Les solutions (1) utilisées pour le test doivent être exemptes de mousse ; on procède à une double détermination de leur concentration en B.A.S. La valeur moyenne obtenue est la concentration

initiale C_0 ; cette concentration doit être comprise entre 4,5 et 5,5 mg IBAS/l, et doit être déterminée à 0,1 mg IBAS/l près. On introduit 900 ml dans chacun des deux Erlenmeyers utilisés pour l'essai. Les deux flacons sont bouchés à l'aide de coton, de telle sorte que l'échange d'air entre le flacon et l'atmosphère environnante ne soit pas indûment contrarié ; les flacons sont ensuite mis en incubation à $25^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ}$ sur l'agitateur prévu à cet effet. La température de $25^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ}$ doit être maintenue constante pendant toute la durée du test et les flacons doivent être à l'abri de la lumière directe. L'air ambiant doit être exempt de matières polluantes et toxiques (solvants chlorés, etc.).

Dans chacun des flacons, on procède au dosage des IBAS au 5^{ème} jour d'incubation, au 8^{ème} jour, puis tous les deux jours, jusqu'à ce que la différence correspondant à 2 prélèvements séparés par une période de 4 jours soit inférieure à 0,15 mg IBAS/l. Le dosage correspondant au premier de ces deux prélèvements est adopté comme début du palier de la courbe du pourcentage de dégradation. On trace la courbe du pourcentage de dégradation en fonction du temps (voir Figure 1). Le programme de prélèvement peut être modifié si le début du palier de la courbe de biodégradation est établi avec précision ; mais la durée du test ne peut en aucun cas dépasser 19 jours. Pour les dosages, on évitera d'effectuer des prélèvements trop importants. Au début de l'essai, des prélèvements de 10 à 20 ml sont suffisants ; leur volume peut s'élever à 100 ml, en fin d'essai. On procédera à l'élimination de la mousse puis à l'homogénéisation de la solution. Si les échantillons ne sont pas analysés dans les 3 heures suivant le prélèvement, ils seront conservés par addition d'une solution de chlorure mercurique (3.3.5) permettant d'obtenir une concentration de 50 mg HgCl_2 par litre.

3.3.2 Agents de surface non ioniques

Les échantillons à examiner et les standards (standards anioniques, voir 3.4) sont testés simultanément en double exemplaire. Pour les échantillons non ioniques, à 5000 ml de la solution minérale 3.3.2 on ajoute 25 ml de la solution (1) et la quantité appropriée d'inoculum déterminée selon le paragraphe 3.7. Pour les standards anioniques, à 2000 ml de la solution minérale 3.3.2 on ajoute 10 ml de la solution (1) et la quantité appropriée d'inoculum déterminée selon le paragraphe 3.7. Les solutions (1) utilisées pour le test doivent être exemptes de mousse ; on procède à une double détermination de leur concentration en IBAS ou IBAS. La valeur moyenne obtenue est la concentration

initiale C_0 ; cette concentration doit être comprise entre 4,5 et 5,5 mg/l, et doit être déterminée à 0,1 mg/l près (voir chapitre 6). On introduit 1200 ml de la solution minérale contenant l'échantillon non ionique dans chacun des quatre Erlenmeyers utilisés pour l'essai. Deux autres Erlenmeyers sont nécessaires pour chaque standard; on introduit dans chacun 900 ml de solution. Les flacons sont bouchés à l'aide de coton, de telle sorte que l'échange d'air entre le flacon et l'atmosphère environnante ne soit pas indûment contrarié; les flacons sont ensuite mis en incubation à $25^\circ \text{C} + 1^\circ$ sur l'agitateur prévu à cet effet. La température de $25^\circ \text{C} + 1^\circ$ doit être maintenue constante pendant toute la durée de l'essai, et les flacons doivent être à l'abri de la lumière directe. L'air ambiant doit toujours être exempt de matières polluantes et toxiques, solvants chlorés etc.

Pour les échantillons non ioniques, afin de disposer du volume nécessaire pour l'analyse, on effectue le dosage sur un mélange obtenu en prélevant des volumes égaux dans deux flacons. Les dosages sont effectués aux 5ème et 19ème jours de l'essai, les volumes prélevés dans chaque flacon étant respectivement de 200 et 500 ml; l'analyse porte ainsi sur des volumes combinés de 400 ml et de 1000 ml ce qui permet, compte tenu des limites de la technique analytique, de déterminer des taux de biodégradation dans la gamme de 95 %. Dans le cas de substances ayant un taux de biodégradation inférieur à 80 %, le volume prélevé pourrait être réduit (600 ml). Pour les standards, on effectue le dosage en suivant la procédure indiquée pour les agents de surface anioniques (3.5.1).

On procèdera à l'élimination de la mousse puis à l'homogénéisation des solutions. Si les échantillons ne sont pas analysés dans les trois heures suivant le prélèvement, ils seront conservés par addition d'une solution de chlorure mercurique (3.5.5) permettant d'obtenir une concentration de 50 mg HgCl_2 par litre.

3.10 Expression des résultats

Le pourcentage de dégradation (A_t) de l'échantillon, et le pourcentage de dégradation (A_s) des standards de biodégradabilité, sont calculés en appliquant la formule suivante :

$$A_t = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100$$

où,

A_t = pourcentage de dégradation au temps t ,

C_0 = concentration initiale moyenne déterminée sur la solution (I), exprimée en mg LBAS/l ou mg BIAS/l

C_t = concentration déterminée sur la solution (II) au temps t , exprimée en mg LBAS/l ou mg BIAS/l.

Dans le cas des agents de surface anioniques, le pourcentage de dégradation pour un seul essai (A_e) est obtenu pour $A_t = A_e$ et $C_t = C_e$, pour lequel C_0 représente la concentration obtenue pour le premier prélèvement correspondant au palier de biodégradation (condition définie en 3.9). La moyenne arithmétique des deux valeurs correspondantes (A_e) est le taux de biodégradation (A) de l'échantillon. Pour les produits qui ne présentent pas un palier de biodégradation, C_e est la concentration obtenue à la fin du test, c'est-à-dire au 19ème jour. Les résultats sont calculés à 0,1 pour cent près, et la valeur générale des taux de biodégradation est arrondie à l'unité (les résultats correspondant à 0,5 étant ramenés à l'unité inférieure).

Dans le cas des agents de surface non ioniques, dans l'état actuel des connaissances, le pourcentage de dégradation sera calculé en se basant uniquement sur la moyenne des concentrations obtenues au 19ème jour ($C_t = C_{19}$). Le dosage effectué au 5ème jour sert à vérifier que la dégradation s'effectue à une vitesse satisfaisante.

3.11 Validité des résultats

Les résultats sont valables si le taux de biodégradation du standard "dcur", calculé selon les conditions définies au paragraphe 3.9, est compris entre 90 et 95 pour cent dans le courant d'une période de 14 jours (une durée de 7 à 10 jours est en général nécessaire) ; et si le standard "dur" n'est pas dégradé à plus de 35 pour cent environ.

Si ces conditions ne sont pas remplies, il est nécessaire de recommencer la série.

4. TEST DYNAMIQUE DE SIMULATION

(Test de confirmation)

4.1 Equipement nécessaire

La méthode de mesure est basée sur l'emploi d'une installation de boue activée schématisée dans la Figure 2 et décrite de manière plus détaillée dans la Figure 3.

L'équipement se compose d'une cuve A pour stocker les eaux résiduaires synthétiques, d'une pompe doseuse B, d'une cuve d'aération C, d'un décanteur D, d'une pompe à air comprimé E pour recycler la boue activée, et d'une cuve F pour recueillir l'effluent traité.

Les cuves A et F doivent être en verre ou en matière plastique appropriée, et contenir au moins 24 litres. La pompe B doit assurer une alimentation régulière de la cuve d'aération en effluent synthétique ; en cours de fonctionnement normal, cette cuve doit contenir 5 litres du mélange. Un verre fritté G destiné à l'aération est suspendu dans la cuve C, au sommet du cône inférieur de cette cuve. La quantité d'air insufflée par le dispositif d'aération doit être contrôlée par un débitmètre.

4.2 Techniques analytiques

Les agents de surface anioniques (IBAS) sont déterminés selon une technique analytique appropriée.

Les agents de surface non ioniques (BIAS) sont déterminés selon la technique de Wickbold (voir Chapitre 6).

4.3 Effluent synthétique

Pour effectuer ce test, on se sert d'un effluent synthétique en préparant 24 litres (débit par jour) d'une solution qui contient, par litre d'eau de ville, les éléments ci-après :

150 mg de peptone
110 mg d'extrait de viande
30 mg d'urée
7 mg de chlorure de sodium
4 mg de chlorure de calcium, 2 H₂O
2 mg de sulfate de magnésium, 7 H₂O et
20 ± 2 mg de IBAS
ou
10 ± 1 mg de BIAS.

On extrait le IBAS ou le BIAS du produit faisant l'objet du test au moyen de la méthode indiquée au Chapitre 5. L'effluent synthétique est préparé chaque jour.

4.4 Préparation des échantillons

4.4.1 Les produits de base renfermant uniquement des IBAS ou BIAS peuvent être testés tels quels. La teneur en IBAS ou BIAS doit être dosée dans le but de préparer les effluents synthétiques utilisés pour le test (4.5).

4.4.2 Dans le cas de formulations, on procède à la détermination des taux de IBAS et/ou BIAS et de savon. On procède à une extraction alcoolique dans les conditions suivantes (voir Chapitre 5).

4.4.2.1 Extraction à l'isopropanol si le taux de savon est inférieur au taux de IBAS ou BIAS.

4.4.2.2 Extraction à l'isopropanol et élimination du savon si l'échantillon contient plus de savon que de IBAS ou BIAS.

4.4.2.3 Séparation du BIAS et du IBAS.

On procède à la détermination de la teneur en IBAS ou en BIAS en vue de préparer les effluents synthétiques utilisés pour le test.

4.5 Fonctionnement de l'installation

Au départ, on remplit la cuve d'aération C et le décanteur D avec de l'effluent synthétique. Le décanteur D doit être fixé à une hauteur telle que la cuve d'aération C contienne 3 litres. Comme ensencement, on introduit 3 ml d'un effluent secondaire de bonne qualité récemment prélevé dans une station d'épuration biologique traitant principalement des eaux usées d'origine domestique. L'effluent doit être maintenu dans des conditions aérobies pendant la période précédant son utilisation. On met ensuite en marche le dispositif d'admission d'air, la pompe à air comprimé E et le doseur B. L'effluent synthétique doit passer dans la cuve d'aération C à un débit horaire de 1 litre, ce qui donne un temps moyen de rétention de l'ordre de 3 heures.

Il faut régler le rythme d'aération de telle façon que le contenu de la cuve C reste constamment en suspension et que la teneur en oxygène dissous soit au minimum de 2 mg par litre. La formation de mousse doit être empêchée par des moyens appropriés ; on n'utilisera cependant pas d'agents anti-mousse qui ont une action inhibitrice sur la boue activée ou qui contiennent du IBAS ou du BIAS. La pompe E doit être réglée de telle sorte qu'il y ait dans la cuve d'aération C un

recyclage continu et régulier de la boue activée issue du décanteur. La boue qui s'est accumulée au sommet de la cuve d'aération C, au fond du décanteur D, ou dans le circuit de circulation doit être remise en circulation au moins une fois par jour par brossage ou tout autre moyen approprié. Quand la boue ne décante pas, on peut en augmenter la densité par addition, répétée si nécessaire, de portions de 2 ml d'une solution à 5 pour cent de chlorure ferrique.

L'eau sortant du décanteur D est recueillie dans la cuve F pendant 24 heures ; au bout de ce temps, on prélève un échantillon après avoir procédé à l'homogénéisation du mélange. La cuve F doit être nettoyée soigneusement.

4.6 Contrôle du dispositif de mesure

La teneur en IBAS ou en BIAS (en mg/litre) de l'effluent synthétique est déterminée immédiatement avant usage.

La teneur en IBAS ou en BIAS (en mg/litre) de l'eau résiduaire collectée pendant 24 heures dans la cuve F doit être déterminée analytiquement par les mêmes méthodes, aussitôt après le prélèvement ; si cela n'est pas possible, les échantillons doivent être préservés, de préférence par congélation. Les concentrations doivent être déterminées à 0,1 mg/l près.

Pour vérifier le bon fonctionnement du système, on mesure au moins deux fois par semaine la DCO ou le taux de carbone organique dissous des eaux résiduaires accumulées dans la cuve F, ainsi que ceux de l'effluent synthétique stocké dans la cuve A. Ces déterminations sont effectuées après filtration.

La diminution de la DCO ou du carbone organique dissous doit se stabiliser lorsque la dégradation journalière du IBAS ou BIAS est à peu près régulière, c'est-à-dire à la fin de la période initiale indiquée sur la Figure 4.

La teneur en matières sèches de la boue activée contenue dans la cuve d'aération doit être déterminée deux fois par semaine (en g/litre). Si elle dépasse 2,5 g/litre, il faut éliminer l'excès de boue activée.

Le test est effectué à la température ambiante ; cette température doit être régulière et doit être comprise entre 18 et 25° C.

4.7 Calcul de la biodégradabilité

Les pourcentages de dégradation du IBAS ou du BIAS doivent être calculés quotidiennement à partir des teneurs en IBAS ou BIAS (exprimées en mg/litre) de l'effluent synthétique et de l'eau résiduaire correspondante recueillie dans la cuve F.

Les chiffres de dégradation ainsi obtenus doivent être présentés graphiquement, comme sur la Figure 4.

On calcule les biodégradabilités du MBAS ou du BIAS comme étant la moyenne arithmétique des chiffres obtenus au cours des 21 jours suivant la période initiale, délai pendant lequel la dégradation doit avoir été régulière et l'installation doit avoir fonctionné sans aucune panne. En aucun cas, la durée du temps d'adaptation ne dépassera six semaines.

Le calcul des taux de dégradation journalière doit être effectué à 0,1 % près. Le taux de biodégradation final sera arrondi à l'unité.

Dans certains cas, la fréquence des prélèvements peut être diminuée. Pour calculer la moyenne, on utilisera cependant les résultats d'au moins 14 prélèvements journaliers, répartis sur la période de 21 jours qui suit la période initiale.

5. TRAITEMENT PRELIMINAIRE DES PRODUITS A EXAMINER

Tableau résumé

Traitement des agents de surface et des détergents prêts à l'emploi, préalablement à l'essai de biodégradabilité des agents de surface selon le test dynamique de simulation ou le test statique.

	<u>Produits</u>	<u>Traitement</u>
1.0	Agents de surface anioniques	
1.1	Agents de surface	Aucun
1.2	Détergents prêts à l'emploi contenant moins de savon que d'agents de surface anioniques	Extraction à l'isopropanol
1.3	Détergents prêts à l'emploi contenant plus de savon que d'agents de surface anioniques	Extraction à l'isopropanol suivie de séparation du savon
2.0	Agents de surface non ioniques	
2.1	Agents de surface	Aucun
2.2	Détergents prêts à l'emploi ne contenant ni savon ni agents de surface anioniques	Extraction à l'isopropanol
2.3	Détergents prêts à l'emploi contenant du savon et/ou des agents de surface anioniques	Extraction à l'isopropanol suivie d'échange d'ions.

5.1 EXTRAIT ALCOOLIQUE

Le but de l'extraction est d'éliminer des produits commercialisés les composants insolubles et inorganiques qui peuvent, le cas échéant, perturber le test de dégradation.

Une élimination quantitative n'est pas plus nécessaire qu'un transfert quantitatif dans l'extrait des substances actives de lavage. On devrait cependant concentrer dans l'extrait au moins 90 pour cent des IBA.S et/ou BIA.S présentes dans le produit à examiner.

Deux méthodes peuvent être utilisées pour réaliser l'extraction alcoolique, l'une à l'éthanol et l'autre à l'isopropanol. La méthode à l'isopropanol convient particulièrement lorsqu'il s'agit d'extraire des quantités importantes, comme c'est le cas pour le test dynamique de simulation.

5.1.1 Extraction à l'éthanol

5.1.1.1 Préparation de l'échantillon

(i) Produits en poudre :

Préparer un échantillon représentatif de 250 g environ, soit par la méthode des quarts alternés, soit suivant la recommandation ISO N° 607.

Passer cet échantillon dans un broyeur à couteaux, type ménager, de manière que la poudre obtenue ne présente pas de grains d'une grosseur supérieure à 200 microns.

Homogénéiser convenablement la poudre, la placer dans un poudrier.

(ii) Produits liquides :

Peser, à 0,1 g près, environ 40 g du produit, préalablement homogénéisé. Les placer dans le ballon décrit en 5.1.1.2(iii).

Ajouter 50 ml d'éthanol [5.1.1.2(ii)].
Evaporer à sec au bain-marie, et en aspirant sous faible dépression les vapeurs, jusqu'à ce que deux pesées consécutives ne diffèrent pas de plus de 0,1 g. Les pesées peuvent être effectuées sur toute balance appropriée donnant une précision de 0,01 g.

5.1.1.2 Préparation de la solution éthanolique de base

(i) Principe :

Extraction par l'éthanol d'une quantité de produit suffisante pour entreprendre les dosages de savon, d'anioniques et/ou non ioniques, ainsi que les essais biologiques.

(ii) Réactif :

Ethanol 95-96 pour cent.

(iii) Appareillage :

Matériel courant de laboratoire, en particulier :

- ballon fond rond 1 litre, col court, rodage femelle 29-52,
- réfrigérant droit 400 mm, rodage mâle 29-52,
- filtre verre fritté porosité 10-20 microns (N° 4), fiole jaugée 1 litre.

5.1.1.3 Mode opératoire

Placer 40 ± 1 g de produit [5.1.1.1(i)] dans le ballon de 1 litre, ou prendre le ballon contenant l'extrait sec préparé en 5.1.1.1(ii). Soit E la masse en grammes de la prise d'essai.

Ajouter 500 ml d'éthanol [5.1.1.2(ii)] ; adapter le réfrigérant, puis faire bouillir 15 minutes à reflux, passer sur verre fritté la couche décantée, sous faible dépression et à chaud. Répéter l'opération sur le résidu du ballon 2 fois avec, chaque fois, 200 ml d'éthanol. Rassembler quantitativement les extraits et le lavage du filtre. Rassembler quantitativement les extraits et le lavage du filtre et évaporer. Redissoudre le résidu à l'eau distillée et compléter à 1 litre. Déterminer le contenu en MBAS et/ou BIAS. Une quantité appropriée est utilisée comme solution de base (1) conformément au paragraphe 3.6 (Chapitre 3).

5.1.2 Extraction à l'isopropanol

Calculer la quantité à mettre en oeuvre à partir de la teneur en MBAS et/ou BIAS du produit commercial, de manière à obtenir un extrait de 50 g environ, suffisant pour deux tests dynamiques de simulation.

5.1.2.1 Appareillage

Selon l'importance de la préparation :

- Récipients, 5 à 25 l de capacité, par exemple fioles à col large et récipients émaillés.
- Broyeurs à turbine ou broyeurs à billes.
- Entonneurs filtrants (Buchner), jusqu'à un diamètre de 50 cm.
- Fioles à vide, jusqu'à 20 l de capacité.
- Ampoules à décantier, jusqu'à 20 l de capacité.
- Ballon de distillation, jusqu'à 10 l de capacité.
- Récipients récepteurs, jusqu'à 10 l de capacité.
- Capsules en porcelaine, environ 20 cm de diamètre.
- Colonne à distiller, réfrigérants, bains-marie.

5.1.2.2 Réactifs

- Eau distillée, ou de pureté équivalente.
- Isopropanol, pur.
- Carbone de potassium (K_2CO_3), chimiquement pur.
- Hydroxyde de potassium (KOH), solution à 10 pour cent.
- Sulfite de sodium (Na_2SO_3), pur, anhydre.

5.1.2.3 Mode opératoire

(i) Traitement préalable

Produits solides : délayer à l'eau distillée /5.1.2.4(i)/ jusqu'à obtention d'une pâte fluide, afin de détruire les grains (agiter pendant 10 minutes). Pour 100 g d'eau utilisée, ajouter 50 g de carbonate de potassium et agiter jusqu'à dissolution (10 minutes).

Produits liquides ou pâteux : traiter, en principe, de la même façon que les produits solides. La partie liquide distillable ou bain-marie, déterminée au cours d'un essai préalable sur 10 g de produit environ, doit être considérée comme étant la teneur en eau, même s'il y a encore des solvants organiques volatils. En fonction de la teneur en eau trouvée, la prise d'essai doit être additionnée de carbonate de potassium.

Produits acides : neutraliser les suspensions ou solutions aqueuses par la solution à 10 pour cent d'hydroxyde de potassium avant addition du carbonate de potassium.

Produits contenant du chlore actif : détruire le chlore en ajoutant du sulfite de sodium à leur suspension ou solution, avant la neutralisation. Un léger excès est sans importance.

(ii) Extraction

Ensuite, ajouter de l'isopropanol et agiter le tout pendant 30 minutes. Puis filtrer sous vide le mélange. Laver plusieurs fois le résidu restant sur le Buchner avec des petites quantités d'isopropanol. Transférer le filtrat, qui doit en tous cas se séparer en deux couches dans la fiole à vide, dans une ampoule à décanter. Rincer avec de l'isopropanol. Soutirer et rejeter la couche aqueuse. Filtrer sur filtre à plis la couche alcoolique supérieure et la placer dans le ballon de distillation. Distiller l'isopropanol [5.1.2.4(iii)] au bain-marie, le plus complètement possible. Transférer le résidu de distillation quantitativement dans une capsule en porcelaine et rincer à l'isopropanol. Concentrer le contenu de la capsule au bain-marie en agitant fréquemment. La concentration est terminée au moment où deux pesées réalisées à une heure d'intervalle diffèrent de moins de 1.0 g. Dissoudre l'extrait dans l'eau au bain-marie. Déterminer la teneur en BAS et/ou BMS de cette solution.

Appliquer la formule suivante :

$$\frac{\text{g ..AS dans la solution d'extrait}}{\text{g ..AS dans le produit commercialisé}} \times 100 = \% \text{ ..AS rendement de l'extraction}$$

5.1.2.4 Remarques

Lors de l'exécution de l'extraction, tenir compte des indications suivantes :

- (i) Etant donné la variété des produits de lavage et de nettoyage, il est impossible d'indiquer une proportion numérique fixe généralement valable pour la quantité d'eau et d'isopropanol qui puisse être utilement mise en oeuvre pour l'essai d'un produit donné. Par expérience, on sait que les quantités nécessaires varient dans les proportions (en parties) ci-dessous :

Produit de lavage : et de nettoyage (en poids)	Eau : (en volume)	Isopropanol : (en volume)
1	0,5-2	1-2,5

Cependant, en principe, il n'y a pas de limites supérieures pour l'eau et l'isopropanol.

Plus la masse s'agglomère dans la suspension, plus grand est le besoin en eau. Il convient d'ajouter autant d'eau qu'il en faut pour qu'il n'y ait pas trace de dépôt lors de l'agitation.

La quantité utile d'isopropanol ne devrait pas être inférieure à la proportion suivante :

Produit de lavage et de nettoyage/isopropanol = 1/1

Une quantité supérieure d'isopropanol est nécessaire quand la teneur en LEAS du produit commercialisé dépasse largement 10 pour cent ou si, au cours de l'agitation, on constate une séparation rapide des deux phases.

- (ii) L'eau doit être saturée de carbonate de potassium. Un excès minime de ce dernier est sans importance. Si la concentration en carbonate de potassium est trop basse, ou bien la séparation des couches ne se produit pas, ou bien la phase isopropanol reste trop hydratée, ce qui perturbe le pouvoir d'extraction.
- (iii) L'isopropanol distillé contient de l'eau et peut être saturé avec le carbonate de potassium. La couche inférieure qui se sépare alors doit être éliminée. L'isopropanol restant peut être utilisé pour une nouvelle préparation d'extraction. Les produits de distillation en provenance de traitements de produits liquides qui sont susceptibles de contenir d'autres solvants sont à rejeter.

5.2 SEPARATION DU SAVON (pour essai de dégradabilité des anioniques)

L'essai de biodégradabilité d'un détergent commercial peut se trouver faussé, même si on utilise un extrait à l'isopropanol. Les courbes de dégradation d'un produit facilement biodégradable présentent parfois une allure similaire à celle obtenue dans le cas d'un produit difficilement dégradable (TBS). Avant de contrôler la biodégradabilité il est alors nécessaire d'enlever de l'extrait à l'isopropanol une grande partie du savon qui peut gêner.

La présente prescription est prévue afin de pouvoir séparer de grandes quantités de savon de l'extrait à l'isopropanol, par une méthode de laboratoire. L'extrait ainsi obtenu ne sera utilisé que pour l'essai de dégradabilité et non pour d'autres séparations ou déterminations analytiques.

5.2.1 Principe

Dissolution dans du méthanol d'une quantité suffisante d'extrait à l'isopropanol pour disposer de 25 g de MBAS au minimum. Acidification de la solution avec de l'acide chlorhydrique afin de libérer les acides gras du savon. Addition d'eau jusqu'à ce que la proportion du méthanol et d'eau atteigne 80 à 20, puis extraction des acides gras avec de l'hexane. Rejet de l'extrait ainsi obtenu. Réalcalinisation de la phase méthanol-eau, puis concentration par évaporation jusqu'à dessiccation complète.

Utilisation du résidu sec tel quel pour l'essai de dégradation après détermination de sa teneur en MBAS.

5.2.2 Mode opératoire

Dans une fiole conique de 2 l, dissoudre dans 100 ml environ de méthanol une quantité d'extrait à l'isopropanol contenant au minimum 50 g de MBAS en chauffant modérément. Après avoir ajouté en tout 800 ml de méthanol, ajouter 5 à 10 gouttes d'une solution de bleu de bromophénol (à 0,04 pour cent) et amener le pH à 5 (coloration jaune) par addition d'acide chlorhydrique 2 N /Solution de bleu de bromophénol : dissoudre 0,4 g de bleu de bromophénol dans 200 ml d'éthanol à 96 pour cent et ajouter de l'eau distillée pour porter le volume à 1000 ml/. Compléter avec de l'eau distillée pour porter au total le volume à 1000 ml, compte tenu du volume d'acide chlorhydrique ajouté.

Pour extraire les acides gras, placer la solution dans une ampoule à décanter de dimension appropriée, et l'agiter une fois avec 500 ml et deux fois avec 200 ml d'n-hexane. L'extraction peut aussi s'effectuer dans plusieurs petites ampoules à décanter. S'il se forme des couches intermédiaires troubles, les ajouter à la phase inférieure lors des deux premières extractions, et à la phase supérieure lors de la dernière extraction. En cas de très forte teneur en savon, si le volume de solvant ne suffit pas pour assurer la dissolution et l'extraction, utiliser des quantités plus importantes.

Rassembler les fractions d'n-hexane et les laver avec 200 ml d'un mélange de méthanol et d'eau (dans la proportion de 80 à 20). Laisser les couches intermédiaires troubles dans la phase d'n-hexane et les jeter.

Réunir les fractions méthanol/eau et en porter le pH à 9 par addition de lessive de soude 1N en vérifiant à la phénolphtaléine. Concentrer la solution au bain-marie jusqu'à évaporation du méthanol. Dissoudre de nouveau l'extrait dans l'eau au bain-marie. Déterminer la teneur en B.S de cette solution par la méthode précédemment décrite.

5.3 SEPARATION DES AGENTS DE SURFACE NON IONIQUES

5.3.1 Principe

Cette méthode s'applique différemment selon qu'il s'agit de détergents liquides et pâteux d'une part, et de détergents en poudre, d'autre part. Après adjonction de méthanol ou de méthanol et d'eau, et après extraction du précipité de sels inorganiques et de dérivés de la cellulose qui a pu éventuellement se former, les produits liquides et pâteux sont soumis à un échangeur d'ions. On peut aussi séparer tous les constituants ioniques du détergent. Le filtrat contient les éléments non ioniques que l'on récupère par évaporation.

On prépare, tout d'abord, un extrait à l'isopropanol à partir des produits en poudre. Cet extrait est concentré par évaporation, additionné de méthanol et introduit dans l'échangeur d'ions. L'éthanol peut être utilisé au lieu de méthanol.

5.3.2 Appareillage

- 5.3.2.1 bechers de 5.000 ml
- 5.3.2.2 bechers de 600 ml
- 5.3.2.3 agitateur à pales
- 5.3.2.4 fiole à vide de 5.000 ml
- 5.3.2.5 Buchner en porcelaine de 185 mm de diamètre
- 5.3.2.6 flacon à large col de 5.000 ml
- 5.3.2.7 ampoule à décantier de 5.000 ml
- 5.3.2.8 échangeur à colonnes :
 - 5.3.2.8.1 pour l'échangeur de cations :
colonne standard de 40 mm de diamètre et 500 mm de hauteur munie d'une embouchure conique et d'un robinet d'arrêt.
 - 5.3.2.8.2 pour l'échangeur d'anions :
de même qu'en 5.3.2.8.1, mais 50 mm de diamètre.
- 5.3.2.9 bain-marie
- 5.3.2.10 évaporateur rotatif
- 5.3.2.11 étuve.

5.3.3 Réactifs

De l'eau distillée ou d'une qualité équivalente doit être utilisée.

- 5.3.3.1 Méthanol, qualité commerciale
- 5.3.3.2 Isopropanol, qualité commerciale
- 5.3.3.3 Carbonate de potassium, qualité analytique
- 5.3.3.4 Résine pour échange de cations Dowex 50, WX2, maille 50-100
- 5.3.3.5 Résine pour échange d'anions Dowex 21, K, maille 50-100
- 5.3.3.6 Solution d'acide chlorhydrique à 10 % (1 volume d'acide concentré pour 2 volumes d'eau)
- 5.3.3.7 Solution méthanolique d'acide chlorhydrique à 10 % : 250 ml d'acide chlorhydrique concentré + 750 ml de méthanol
- 5.5.3.8 Solution de soude caustique à 5 %

5.3.4 Préparation des colonnes d'échange

5.3.4.1 Colonne d'échange de cations

Faire passer un nouvel échantillon de résine échangeuse de la forme Na^+ à H^+ au moyen d'acide chlorhydrique comme suit.

Ajouter 1.000 ml d'échangeur de cations à 1.000 ml de solution méthanolique d'acide chlorhydrique dans un becher et agiter pendant 50 minutes. Décanter la plus grande partie du liquide, le remplacer par 1.000 ml d'une solution d'acide chlorhydrique et agiter de nouveau pendant 50 minutes. Filtrer la résine sur buchner, en utilisant un filtre en papier à filtration rapide et rincer à l'eau jusqu'à ce que le produit obtenu ne contienne aucune trace de chlorure.

Transférer par entraînement au méthanol 500 ml de résine dans la colonne de l'échangeur de cations, préalablement

munie, à sa partie inférieure d'un tampon de laine de verre. Laver à nouveau avec 500 ml de méthanol. Le lit de résine doit être constamment recouvert de liquide.

5.3.4.2 Colonne d'échange d'anions

Faire passer un nouvel échantillon de résine échangeuse de la forme chlorure à la forme OH à l'aide de soude caustique comme suit :

Pour purifier le produit obtenu, ajouter 750 ml de solution méthanolique d'acide chlorhydrique à 750 ml de résine dans un becher et agiter pendant 30 minutes. Soutirer l'acide, le remplacer par une solution d'acide chlorhydrique et agiter à nouveau pendant 30 minutes.

Après décantation, transférer la résine dans la colonne d'échange d'anions au moyen d'eau, laver avec 1.000 ml d'eau et régénérer la résine à l'aide de 2.000 ml de soude caustique à 5 %. Rincer ensuite le produit obtenu à l'aide d'eau jusqu'à neutralité à la phénolphthaléine (incolore). Enfin, introduire 1.000 ml de méthanol dans la colonne de l'échangeur.

Le changement de solvant, en particulier lorsque l'on remplace l'eau par du méthanol, provoque dans le lit de l'échangeur la formation de bulles d'air qui peuvent être facilement éliminées comme suit : fermer la colonne de l'échangeur dès que la quantité de méthanol ajoutée est telle que le lit de l'échangeur soit recouvert d'une couche de plusieurs centimètres de solvant, agiter vigoureusement et retourner la colonne. Répéter cette opération plusieurs fois. Les bulles d'air adhérent aux particules de résine se détachent et montent à la surface. L'application de cette méthode est recommandée pour les deux colonnes de l'échangeur.

Une fois effectuées les préparations décrites ci-dessus, les colonnes sont alors prêtes à fonctionner. Réunir solidement les deux colonnes par des bouchons en caoutchouc, la colonne d'échange d'anions étant placée au-dessus de la colonne d'échange de cations. Ouvrir en grand le robinet de la colonne d'anions. Le contrôle du débit se fait uniquement au moyen du robinet de la colonne de cations.

5.3.5 Procédure

5.3.5.1 Produits liquides et pâteux

L'échantillon doit contenir 30 grammes environ d'agent de surface non ionique. Dans le cas de produits liquides, ajouter 2.000 ml de méthanol à l'échantillon dans un becher de 5.000 ml et agiter le mélange pendant 30 minutes. Dans le cas de produits pâteux, délayer l'échantillon en ajoutant une quantité d'eau chaude aussi faible que possible. Ajouter ensuite 2.000 ml de méthanol et agiter le mélange pendant 30 minutes. Séparer le précipité (sels et dérivés de la cellulose) qui peut éventuellement se former. Faire passer le filtrat dans l'échangeur à raison de 10 ml par minute environ. Rincer les colonnes avec 1.500 ml de méthanol au total et les laisser parfaitement égoutter. Réduire le volume du filtrat (3 ou 4 litres) au bain-marie ou dans l'évaporateur rotatif jusqu'à ce qu'il puisse être placé, après rinçage au méthanol, dans un becher de 600 ml où il est amené à sec. Sécher dans l'étuve à 100° C jusqu'à ce que les pesées de contrôle effectuées toutes les heures ne diffèrent que de 1 gramme au maximum.

5.3.5.2 Produits en poudre

Dissoudre un échantillon de détergent contenant 30 grammes environ d'agent de surface non ionique dans un flacon d'une capacité de 5.000 ml, en utilisant une quantité d'eau telle que le mélange, une fois agité, ait une faible viscosité. Utiliser à cet effet 2 à 3 litres d'eau environ. Le volume est noté. Agiter pendant 15 minutes, ajouter 1.500 ml d'isopropanol et agiter à nouveau le mélange pendant 15 minutes. Ajouter alors 60 grammes de carbonate de potassium par 100 ml d'eau et agiter à nouveau pendant 30 minutes.

Filter le mélange sous vide à l'aide d'un filtre à filtration rapide. Rincer le flacon et l'entonnoir avec une petite quantité d'isopropanol. Arrêter

l'opération si on obtient une trop grande quantité de filtrat et vider le contenu du flacon à filtrer dans l'ampoule à décanter de 5.000 ml. Continuer la filtration, si nécessaire après la mise en place d'un nouveau filtre. Transférer le filtrat dans l'ampoule à décanter, soutirer la phase inférieure et éliminer celle-ci. Réduire le volume de l'isopropanol par évaporation jusqu'à 500 ml environ. Laisser dans la solution le précipité qui peut éventuellement se former. Ajouter 1.000 ml de méthanol et agiter, pendant une courte durée, la solution ou le mélange obtenu. Traiter ensuite la solution ainsi qu'il est décrit au paragraphe 5.3.5.1 ci-dessus.

5.3.6 Essai de l'agent de surface non ionique isolé

Cet essai intervient lors de la préparation de la solution d'agent de surface (10 ppm) qui est nécessaire pour l'essai de biodégradabilité. La solution est analysée conformément à la méthode d'analyse des traces utilisée pour les agents non ioniques (voir Chapitre 5).

5.3.7 Note

Les quantités de résine utilisées ont une capacité effective de 500 mg environ ce qui permet d'éliminer 100 grammes d'allylbenzène sulfonate ou 80 grammes de savon. Déterminer par analyse des détergents devant faire l'objet des essais de biodégradabilité si la capacité disponible est suffisante pour la quantité d'agent de surface ionique contenue dans le détergent.

5.3.8 Régénération des résines utilisées pour l'échange d'ions

Les échangeurs peuvent être régénérés après usage. Séparer les deux colonnes et traiter chacune d'elles comme suit :

5.3.8.1 Colonne de cations

La colonne de cations égouttée ainsi qu'il est décrit au paragraphe 5.3.5.1 ci-dessus est remplie d'une solution d'acide chlorhydrique à 10 % d'où l'air est éliminé en retournant la colonne fermée selon la méthode décrite au paragraphe 5.3.4.2. Laver la colonne à

l'aide de 1 litre d'acide chlorhydrique environ en utilisant un débit de 10 ml/minute. Laver la colonne à l'eau distillée en utilisant la même vitesse de filtration jusqu'à ce que le liquide sortant soit exempt de chlorure. Ajouter 500 ml de méthanol dans la colonne afin d'obtenir un nouveau solvant, Les bulles d'air sont éliminées de la façon décrite au paragraphe 5.3.4.2 ci-dessus.

5.3.8.2 Colonne d'anions

La colonne d'anions égouttée de la façon décrite au paragraphe 5.3.5.1 est remplie avec la solution méthanolique d'acide chlorhydrique à 10 %. L'air est éliminé de la même façon que pour la colonne de cations. Verser 1 litre environ de la solution méthanolique d'acide chlorhydrique dans la colonne à raison de 10 ml/minute environ. Rincer en utilisant tout d'abord un litre de méthanol puis de l'eau jusqu'à élimination de toute trace de chlorure. Transférer à un débit constant 1 litre de solution de soude caustique à 5 % dans la colonne, puis laver à l'eau jusqu'à ce que le produit ne contienne plus de soude caustique (la phénol-phtaléine doit être incolore). Pour changer le milieu, verser 1 litre de méthanol dans la colonne. Les bulles d'air doivent être éliminées de la façon décrite au paragraphe 5.3.4.2 ci-dessus.

La durée de vie de l'échangeur d'anions est limitée lorsque la résine se présente sous la forme OH. Les résines ne doivent pas demeurer sous cette forme pendant plus de deux jours. En cas de stockage de plus longue durée, il est recommandé d'utiliser la forme plus stable du chlorure.

6. DOSAGE DES AGENTS DE SURFACE NON IONIQUES DANS LES EAUX ET LES EAUX RESIDUAIRES

6.1 Principe

Les agents de surface sont extraits du milieu et isolés, la prise d'essai devant contenir de 250 à 800 microgrammes d'agents de surface non ioniques.

Les agents de surface sont dissous dans de l'acétate d'éthyle.

Après séparation des phases et évaporation du solvant, les agents de surface non ioniques mis en solution aqueuse sont précipités par le réactif de Dragendorff modifié (KBi I4 + BaCl₂ + acide acétique).

Le précipité est séparé par filtration, lavé à l'acide acétique, et dissous dans le tartrate d'ammonium. Le bismuth en solution est titré par potentiométrie à pH 4 - 5 par une solution de pyrrolidine - dithiocarbamate avec une électrode indicatrice en platine poli et une référence au calomel ou à l'argent-chlorure d'argent.

Le résultat de la titration est multiplié par le facteur empirique 54, correspondant au produit étalon, nonylphénol éthoxylé à 10 moles d'oxyde d'éthylène*.

Les agents de surface non ioniques qui ont des groupes hydrophobes différents ou des longueurs de chaînes éthoxylées différentes peuvent avoir d'autres facteurs empiriques, par exemple 30 pour le nonylphénol à 6 OE, et 48 pour le produit à 30 OE. On utilisera cependant systématiquement le facteur 54 dans les cas où la structure réelle du BIAS est inconnue.

6.2 Domaine d'application

La méthode est applicable à des agents de surface commerciaux non ioniques de types alkylphénols éthoxylés ou alcools éthoxylés, contenant de 6 à 30 groupes d'oxyde d'éthylène.

Elle convient pour doser les produits :

- introduits dans les dispositifs expérimentaux biologiques selon les méthodes proposées par les tests de biodégradabilité de l'OCDE,

* Le produit étalon Marlophen 810 est disponible chez Chemische Werke Muls, Marl BRD.

- présents à l'entrée et à la sortie des stations d'épuration biologiques,
- contenus dans les eaux de surface et les eaux résiduaires.

Les agents de surface anioniques, présents dans des proportions jusqu'à 10 fois supérieures à celles des non ioniques ne gênent pas. Les agents de surface cationiques titrent en même temps. Ils doivent, le cas échéant, être éliminés par des résines échangeuses d'ions.

6.3 Réactifs et matériel

Tous les réactifs doivent être de pureté analytique. Leurs solutions doivent être préparées avec de l'eau déionisée.

- 6.3.1 Acétate d'éthyle pur, éventuellement fraîchement distillé.
- 6.3.2 Carbone acide de sodium Na HCO₃.
- 6.3.3 Acide chlorhydrique dilué (20 ml HCl p.a. par litre).
- 6.3.4 Méthanol pur, fraîchement distillé, conservé en flacon de verre.
- 6.3.5 Solution de pourpre de bromocrésol - 0,1 g de colorant dissous dans 100 ml de méthanol pur.
- 6.3.6 Réactif de précipitation : le réactif de précipitation est un mélange de deux volumes de solution A avec un volume de solution B. Le mélange doit être conservé dans un flacon de verre. Il est utilisable pendant une semaine environ.

6.3.6.1 Solution A

Dissoudre 1,7 g de nitrate de bismuth* (BiO.NO₃.H₂O) dans 20 ml d'acide acétique et compléter à 100 ml avec de l'eau. Par ailleurs dissoudre 65 g d'iode de potassium dans environ 200 ml d'eau. Reunir les deux solutions dans un ballon jaugé de 1.000 ml, ajouter 200 ml d'acide acétique 6.3.7 et compléter avec de l'eau jusqu'à la marque. On a ainsi préparé la solution A.

* Spécification allemande "Basich, reinst D/B 7".

6.3.6.2 Solution 3

Dissoudre 290 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans un litre d'eau.

- 6.3.7 Acide acétique 99-100 %* (ne pas utiliser d'acide de concentration inférieure à 99 % qui risque de dissoudre partiellement le précipité).
- 6.3.8 Solution de tartrate d'ammonium : mélanger 12,4 g d'acide tartrique et 12,4 ml de solution ammoniacale p.a. ($d = 0,910$) et porter à 1.000 ml avec de l'eau.
- 6.3.9 Solution ammoniacale diluée (40 ml de solution ammoniacale p.a. par litre).
- 6.3.10 Tampon acétate standard : placer 40 g d'hydroxyde de sodium dans un ballon jaugé de 1 litre et dissoudre avec 500 ml environ d'eau. Ajouter 120 ml d'acide acétique (6.3.7). Après mélange et refroidissement, compléter à 1.000 ml.
- 6.3.11 Solution 0,0005 n de dithiocarbanate de pyrrolidine (abréviation "carbate"). Dissoudre 103,0 mg de pyrrolidine dithiocarbanate de sodium (Merck: $\text{C}_5\text{H}_9\text{NHS}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans environ 500 ml d'eau, ajouter 10 ml d'alcool amylique normal et 0,5 g NaHCO_3 et compléter à 1.000 ml.
- 6.3.12 Solution étalon 0,0005 n de sulfate de cuivre (pour contrôle de facteur paragraphe 6.3.11).

Solution 1

Dissoudre 1.249 g de sulfate de cuivre pour analyse ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans environ 200 ml d'eau ajouter 50 ml H_2SO_4 normal et compléter à 1.000 ml. Ne pas utiliser de cristaux efflorescents.

Solution étalon

Placer 50,0 ml de solution 1 et 10 ml H_2SO_4 normal dans un ballon de 1 litre. Compléter à 1 litre avec de l'eau.

6.3.13 Chlorure de sodium.

6.3.14 Appareil d'extraction pour les agents de surface** (voir Figure 5). Le diamètre du fritté doit être le même que celui de l'ampoule.

* Spécification allemande DAB 7.

** L'appareil est fabriqué par la Sté RICHARD KUHN K.G., Hagen, Westphalie,, Jägerstrasse 32/33 a.

- 6.3.15 Ampoule à décanter de 250 ml.
- 6.3.16 Système d'agitation magnétique avec barreau de 25-30 mm.
- 6.3.17 Creuset de Gooch, diamètre de la surface perforée 25 mm : type G 4.
- 6.3.18 Filtre rond en fibre de verre, diamètre 27 mm (n° 6 de Schleicher et Schüll ou 954 AH de Rieve-Angel).
- 6.3.19 2 fioles à vide avec tulipe et manchette de caoutchouc pour creuset filtrant, volume 500 et 250 ml.
- 6.3.20 Potentiomètre enregistreur avec chaîne d'électrode platine poli avec référence au calomel ou à l'argent-chlorure d'argent, zone d'utilisation 250 mV, burette automatique 20-25 ml, vitesse de titration 2 ml/mn, ou matériel correspondant pour titration manuelle.
- 6.3.21 Colonne échangeuse d'ions, capacité 10 ml, avec Dowex 50, MK2, maille 50-100.

6.4 Mode opératoire

6.4.1 Extraction et récupération de l'agent de surface

Filtrer la prise d'essai sur papier filtre rapide.

Introduire dans l'appareil d'extraction un volume de solution contenant de 250 à 300 microgrammes d'agent de surface non ionique.

Ajouter 100 grammes de chlorure de sodium et 5 g de bicarbonate de sodium pour améliorer l'extraction.

Si le volume de la prise d'essai dépasse 500 ml, ajouter le sel sous forme solide. Il se dissoudra au cours de l'aération.

Si le volume est inférieur à 500 ml, dissoudre le sel dans environ 400 ml d'eau, et ajouter la solution.

Compléter le volume jusqu'au robinet de vidange supérieur.

Ajouter précautionneusement 100 ml d'acétate d'éthyle sur la couche aqueuse

Remplir aux 2/3 environ avec de l'acétate d'éthyle le flacon laveur de gaz.

Envoyer un courant gazeux (air ou azote) dans l'appareil à un débit de 50-60 l/h (le contrôle par débit-mètre est recommandé). Au début de l'opération le débit de gaz doit être augmenté progressivement puis réglé pour que les phases restent visiblement séparées. On minimise ainsi le mélange des phases et la dissolution de l'acétate d'éthyle. Arrêter le courant gazeux après 5 minutes.

Si plus de 20 % du volume de la phase organique se sont dissous dans l'eau, recommencer l'essai en faisant particulièrement attention au débit de gaz.

Transférer la phase organique dans l'ampoule à décanter. Séparer la phase aqueuse (il ne doit pas y en avoir plus de quelques ml) et la replacer dans l'extracteur. Filtrer la phase organique à travers un filtre rapide sec et la recueillir dans un becher de 250 ml.

Recommencer l'extraction avec 100 ml d'acétate d'éthyle et envoyer à nouveau l'azote ou l'air pendant 5 minutes. Transférer la phase organique dans la même ampoule que précédemment, jeter la phase aqueuse et faire passer la phase organique sur le même filtre. Rincer l'extracteur, l'ampoule et le filtre avec environ 20 ml d'acétate d'éthyle.

Evaporer la phase organique au bain-marie sous la hotte, jusqu'à siccité. Il est recommandé d'envoyer pendant l'évaporation un léger courant d'air sur la surface du solvant pour accélérer l'évaporation.

6.4.2 Séparation des agents de surface cationiques*

Les agents de surface cationiques interfèrent dans la précipitation et se comportent comme des non ioniques. De ce fait, ils doivent être séparés.

Prendre l'extrait sec par 20 ml de méthanol environ. Faire passer cette solution sur une colonne échangeuse d'ions remplie de 10 ml d'échangeur cationique à larges pores Dovex 50W2, forme H. Régler la vitesse du passage pour avoir un goutte à goutte rapide. Rincer avec 50-60 ml de méthanol**.

* A appliquer uniquement en présence d'agents de surface cationiques.

** Si on sait que l'agent de surface contient 25, ou plus de 25, groupes d'oxyde d'éthylène, remplacer le méthanol par un mélange de 30 % de méthanol et 20 % de chlorure de méthylène. Ce mélange est plus efficace que le méthanol seul.

Evaporer à sec sur bain-marie la solution méthanolique.

Régénérer l'échangeur de cations avant chaque emploi avec une solution d'acide chlorhydrique à 5 % dans le méthanol. Rincer au méthanol jusqu'à absence de réaction acide au rouge de méthyle. Conserver la résine dans du méthanol.

6.4.3 Précipitation et filtration

Reprendre le résidu sec 6.4.1 ou 6.4.2 avec 5 ml de méthanol. Ajouter 40 ml d'eau et 0,5 ml d'acide chlorhydrique dilué ; agiter la solution avec le système magnétique.

Dans la solution ainsi préparée, verser 30 ml de réactif de précipitation (6.3.6) placés dans une éprouvette graduée. Le précipité se forme en poursuivant l'agitation. Arrêter l'agitation au bout de 10 mn, et laisser reposer encore au moins 5 minutes.

Filtrer sur creuset de Gooch (6.3.17) garni d'un filtre en fibre de verre (6.3.18) préalablement humecté de 2 ml d'acide acétique (6.3.7) et essorer.

Rincer soigneusement le becher, le barreau magnétique et le creuset avec 40 à 50 ml d'acide acétique (6.3.7). Il n'est pas nécessaire de transférer quantitativement le précipité adhérent au becher, étant donné que la titration est faite dans ce même becher, et que le précipité restant est alors dissous.

6.4.4 Dissolution du précipité

Transférer le creuset sur la fiole à vide de 250 ml. Afin d'éviter les projections de solution, le placer dans une allonge de verre. Pour éviter les erreurs dues à des apports de réactifs de précipitation, ne pas employer la manchette de caoutchouc utilisée pour la filtration (6.4.3). Tenir toujours séparées les manchettes utilisées pour les stades de précipitation et de dissolution.

Dissoudre le précipité en ajoutant une solution chaude de tartrate (6.3.8) en trois fractions de 10 ml chacune. Transférer le contenu de la fiole à vide dans le becher de précipitation. Ajouter, en faisant couler le long de ses parois, 20 ml de solution de tartrate pour dissoudre le reste du précipité.

Rincer soigneusement le creuset, l'allonge et la fiole à vide avec 100 - 150 ml d'eau, et verser cette eau dans le becher de précipitation.

6.4.5 Titration

Agiter la solution avec le système d'agitation magnétique (6.3.16), ajouter quelques gouttes de pourpre de bromocrésol et la solution ammoniacale diluée jusqu'au virage au violet (la solution très acidifiée par les restes d'acide acétique provenant du lavage doit être ramenée à une faible acidité).

Ajouter 10 ml de tampon acétate standard, introduire les électrodes ou le dispositif de dosage (6.3.20) et titrer, la pointe de la burette étant immergée, par potentiométrie avec la solution de "carbate" (6.3.11).

Vitesse de titration 2 ml/mn, avance du papier environ 2 cm/ml.

Utiliser comme point final le point d'intersection des tangentes tracées sur les deux branches de la courbe de potentiel. Si l'on observe un aplatissement du point d'inflexion, on revient aux conditions normales par un nettoyage soigneux de l'électrode de platine.

6.4.6 Essai à blanc

Parallèlement à la détermination (6.4.3), effectuer un essai à blanc de la procédure complète, avec 5 ml de méthanol et 40 ml d'eau, selon le processus indiqué. Il doit utiliser moins de 1 ml de solution titrée de mesure sinon la pureté des réactifs 6.3.3 - 6.3.8 - 6.3.9 - 6.3.10 doit être vérifiée, spécialement en ce qui concerne les métaux lourds. La consommation de réactif c interviendra dans le calcul*.

6.4.7 Contrôle du facteur de la solution de carbate

Au début de chaque série ou chaque jour, avant d'effectuer les dosages, titrer sur 10 ml de solution de sulfate de cuivre (6.3.12), après addition de 100 ml d'eau et 10 ml de tampon acétate standard (6.3.10). Soit a ml consommés. Calculer alors le facteur f selon l'équation :

$$f = \frac{10}{a}$$

Multiplier tous les résultats de titration par ce facteur f.

* Il a été indiqué que les résultats de l'essai à blanc pouvaient être abaissés par chauffage des filtres en fibre de verre à 500° C pendant 5 minutes avant utilisation.

6.5 Calcul des résultats

Etant donné que chaque agent de surface non ionique a un facteur correctif qui dépend de la longueur de la chaîne oxyde d'éthylène, se rapporter à une substance de référence. Le nonylphénol avec 10 oxydes d'éthylène (abréviation NP 10) a été choisi. Pour ce corps, on a obtenu empiriquement un facteur de correction de 54. On obtient ainsi la quantité d'agent de surface en microgrammes, exprimée en NP 10, contenue dans la prise d'essai. On a ainsi :

microgrammes d'agent de surface non ioniques = $54 (b - c) f$.

mg d'agent de surface non ionique = $0,054 (b - c) f$.

où b = ml de "carbate" consommés

c = ml de "carbate" pour l'essai à blanc

f = facteur du "carbate".

6.6 Expression des résultats

Exprimer les résultats en ng de produit standard par litre de solution, de la manière suivante :

Moins de 1 ng/l avec deux décimales

Au-dessus de 1 ng/l avec une décimale.

Figure 1
CALCULATION OF BIODEGRADABILITY - STATIC TEST
CALCUL DE LA BIODEGRADABILITE - TEST STATIQUE

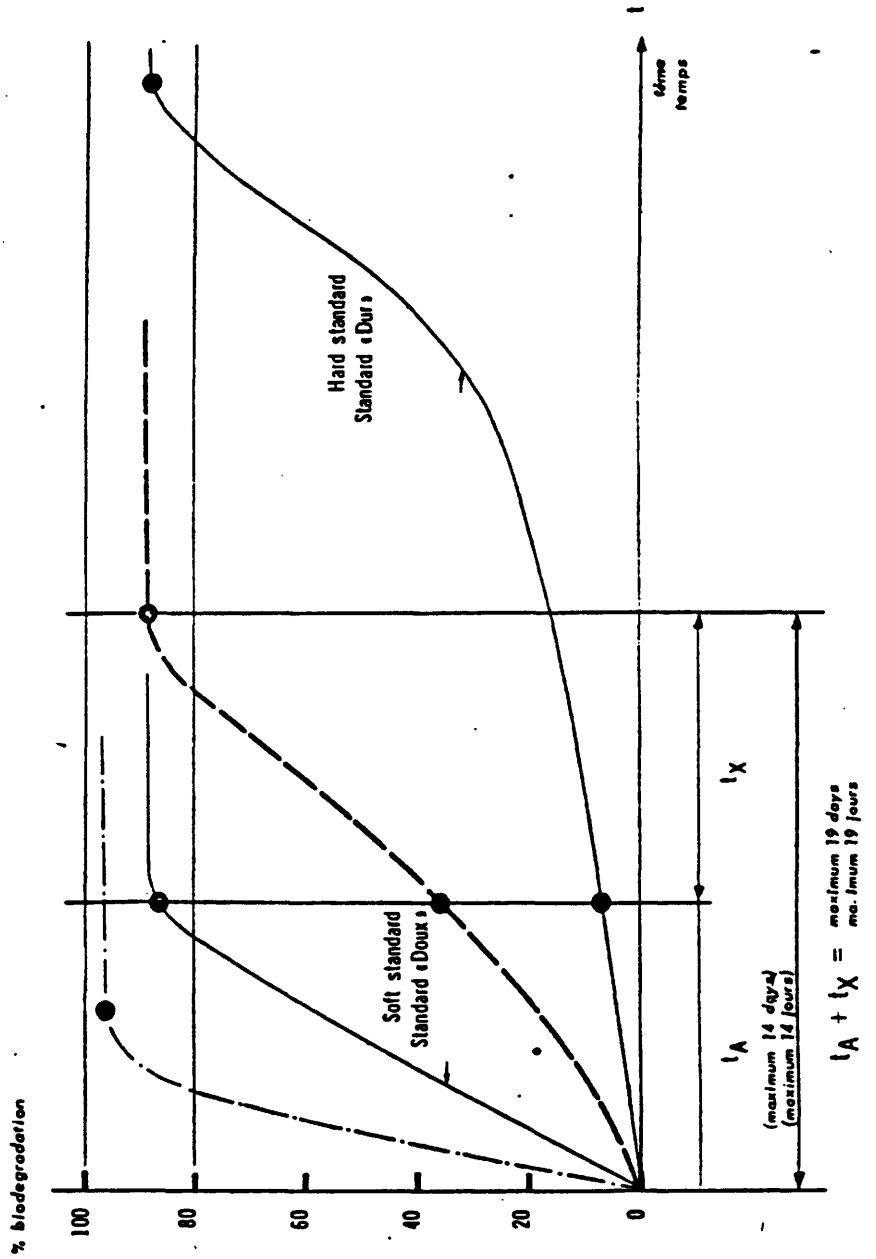
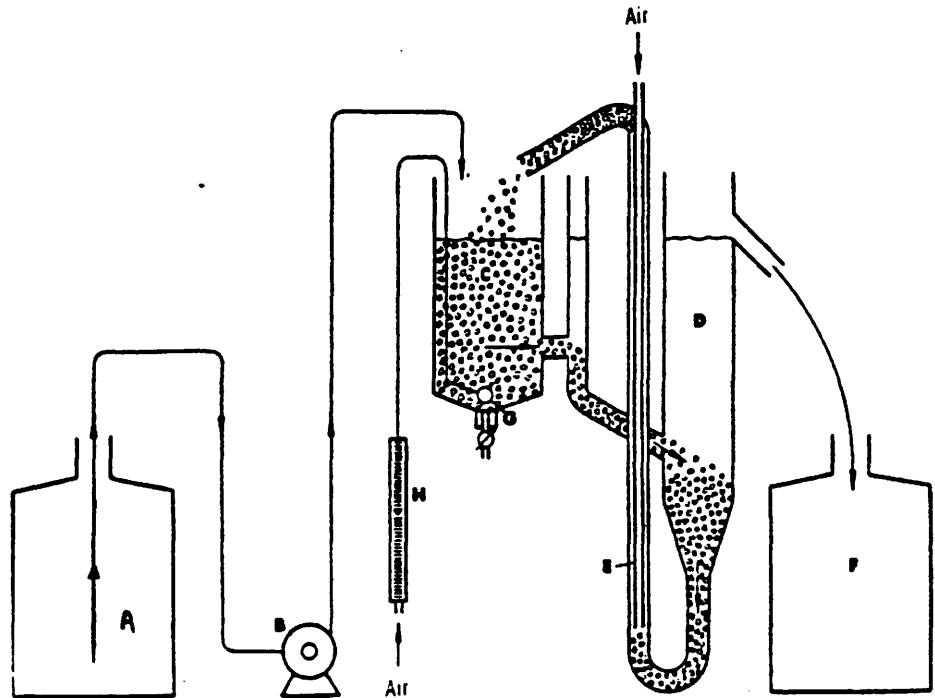


Figure 2



A. Storage vessel
Récipient de stockage

B. Dosing device
Pompe doseuse

C. Aeration chamber (3 l. capacity)
Bac d'aération (capacité 3 l.)

D. Settling vessel
Séparateur

E. Air lift pump
Pompe à air comprimé

F. Collector
Collecteur

G. Aerator
Aérateur

H. Air flow meter
Débitmètre à air

Figure 4
CALCULATION OF BIODEGRADABILITY - DYNAMIC SIMULATION TEST
CALCUL DE LA BIODEGRADABILITE - TEST DYNAMIQUE DE SIMULATION

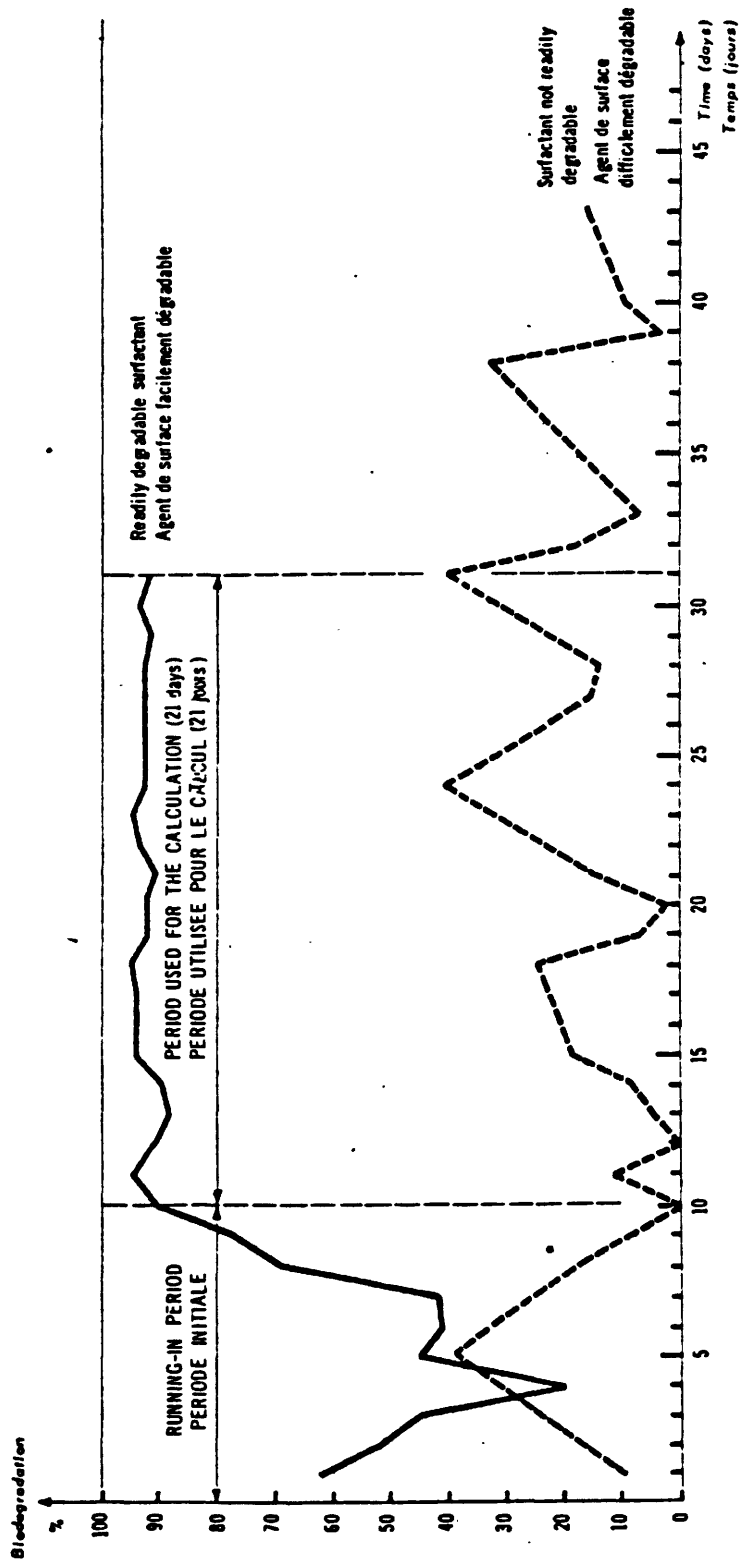
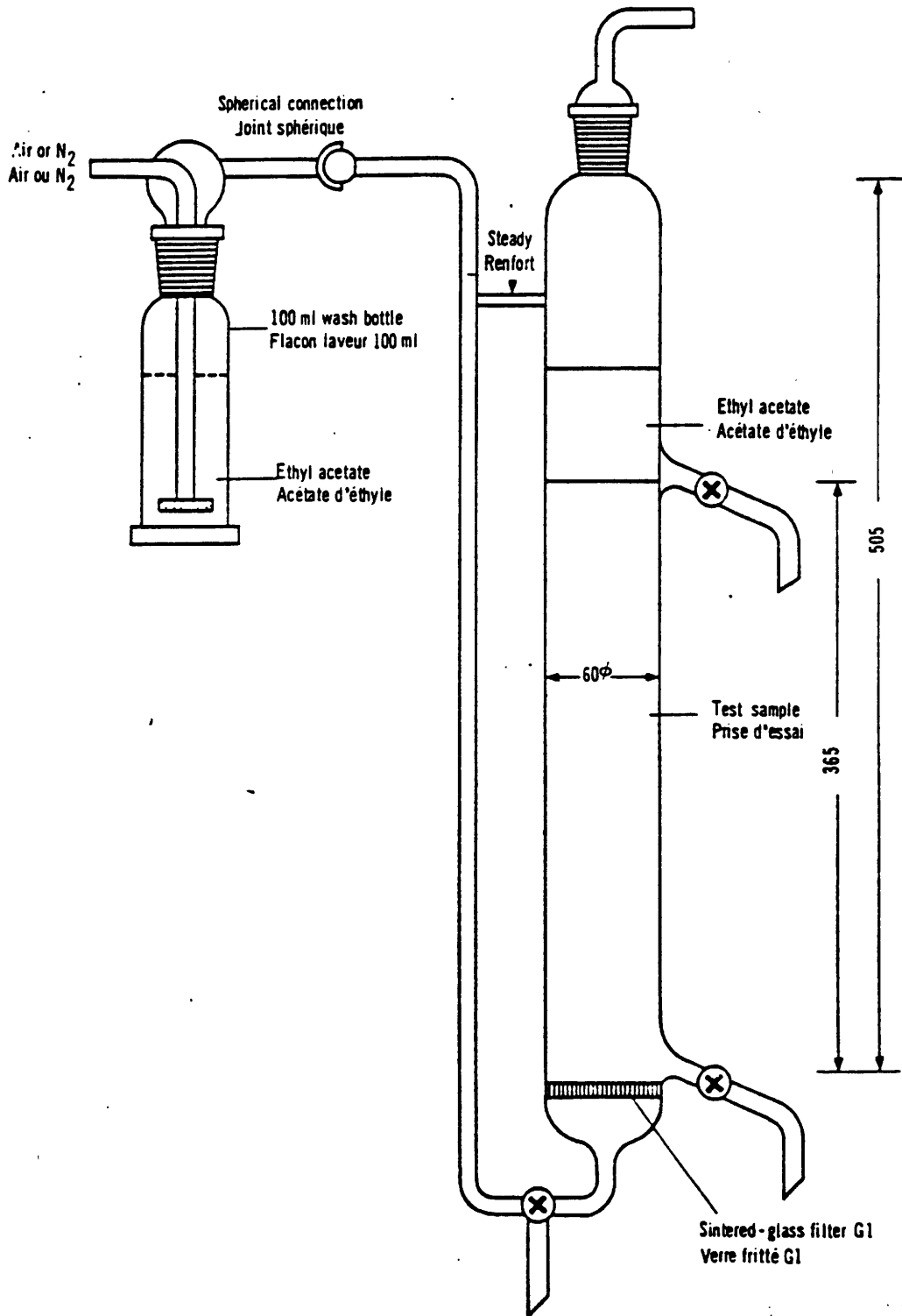


Figure 5
GAS - STRIPPING APPARATUS
APPAREIL D'EXTRACTION DES AGENTS DE SURFACE



APPENDIX

APPENDICE

LIST OF MEMBERS OF THE GROUP OF EXPERTS

LISTE DES MEMBRES DU GROUPE D'EXPERTS

<u>AUSTRALIA</u> <u>AUSTRALIE</u>	Dr. D. CRANFORD Development laboratories Organic Chemicals Group ICI (Australia) Ltd. <u>Ascot Vale Vic.</u>	(2)
<u>AUSTRIA</u> <u>AUTRICHE</u>	Prof. Dipl. Ing. Dr. R. LIEPOLT Dr. Lambert OTTENDORFER Bundesanstalt für Wasserbiologie und Abwasserforschung <u>1225 Wien 22</u>	{1} {2}
<u>BELGIUM</u> <u>BELGIQUE</u>	M. J. BOUQUIAUX Dr. D. QUAGHEBEUR Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie <u>Bruxelles 5</u>	
	M. A. THIRION Ministère de la Santé Publique et de l'Environnement Département du Génie Sanitaire <u>Bruxelles</u>	(2)
<u>CANADA</u>	Dr. S. BARABAS Canada Centre for Inland Waters <u>Burlington, Ontario</u>	(2)
<u>DENMARK</u> <u>DANEMARK</u>	Mr. B. FENGER Danish Water Quality Research Institute <u>Søborg</u>	(2)

(1) Anionics only / anioniques uniquement.

(2) Nonionics only / non ioniques uniquement.

FINLAND
FINLANDE

Mrs. K. HAAPALA (2)
National Board of Waters
Helsinki 84

Mr. Sakari KERMINEN (1)
Water Pollution Control Office
Helsinki 17

FRANCE

M. R. CABRIDENC
Ingénieur au Service de
Microbiologie et Fermentation
Centre de Recherche de l'IRCHA
91 - Vert-le-Petit

M. DELANAIN (2)
Ministère de l'Environnement
75 - Paris

GERMANY
ALLEMAGNE

Dr. Karl Jurgen BOCK
Hauptausschuss Detergentien und Wasser
c/o Chemische Werke Huls
457 Marl

Prof. Dr.-Ing. W. HUSMANN (1)
Retired Chief Chemist of
Emschergenossenschaft
Essen

Dr. JANICKE (1)
Wiss. Oberrat
Institut für Wasser-, Boden-, und
Lufthygiene Bundesgesundheitsamt
Berlin

Dr. Franz MALZ
Hauptausschuss Detergentien und Wasser
45 - Essen-Steele

IRELAND
IRLANDE

Dr. Denis DICKINSON (2)
Consultant on Water Pollution
Control Institute for Industrial
Research Standards
Dublin

ITALY
ITALIE

Prof. Giovanni JACINI
Stazione Sperimentale per l'Industria
degli Olii e dei Grassi
20133 Milano

(1) Anionics only / anioniques uniquement.

(2) Nonionics only / non ioniques uniquement.

- ITALY (Cont.) Prof. Vittorio TRECCANI (2)
Director of the Institute of
Technical and Agrarian Microbiology
of the University of Milan
20133 - Milano
- NETHERLANDS
PAYS-BAS Dr. P.K. BAAIJ
Dr. P.H.A. HOOGBEG
Rijksinstituut voor Zuivering
van Afvalwater
Voorburg
- SPAIN
ESPAGNE Mr. Eduardo DEWISIE GONZALEZ (1)
Ingeniero del Servicio
de Aplicaciones Industriales
Comisaría de Aguas del Norte de España
Bilbao
- Dr. Pedro MIRO (2)
Comité Español de la Detergencia,
Tensioactivos y Afines
Barcelona - 17
- Dr. Joaquin RUIZ CRUZ
Instituto de la Grasa
Sevilla
- Mr. José Martín MENDILUCE, Director, (1)
Mr. José GONZALEZ-NICOLAS PEREZ
Centro de Estudios Micrográficos
Madrid 5
- SWEDEN
SUEDE Dr. Techn. Hans O. BOUVENG
Swedish Water and Air Pollution
Research Laboratory
S-114 28 Stockholm
- Dr. E. VASSEUR (1)
Head of Research Laboratory
National Nature Conservancy Office
17011 Drottningholm
- SWITZERLAND
SUISSE Dr. Hans BRÜSCHWEILER (2)
Eidg.-Materialprüfungs - und
Versuchsanstalt EPA
9001 St Gallen
- Dr. E. NIELSEN
Institut Fédéral pour l'Aménagement,
l'Épuration et la Protection des Eaux
8500 Dübendorf

(1) Anionics only / anioniques uniquement.

(2) Nonionics only / non ioniques uniquement.

UNITED KINGDOM
ROYAUME-UNI

Mr. G.E. EDEW
Mr. STIFF
Water Research Centre
Stevenage Laboratory
Stevenage, Herts

Dr. Stella J. PATTERSON (2)
Laboratory of the Government
Chemist
London

UNITED STATES
ETATS-UNIS

Dr. Robert L. BUNCH (2)
U.S. Environmental Protection
Agency
Robert A Taft Water Laboratory
Cincinnati, Ohio 45268

Commission of the
European Communities
Commission des
Communautés
Européennes

M. G. SERRINI (2)
Div. Chimie
Centre Commun de Recherche EURATOM
21020 - Ispra
Italie

M. Georges PECHOVITCH (2)
C.C.E. - DG XI
1040 Bruxelles
Belgique

A.I.S.*

M. J. BERGERON
Colgate-Palmolive
92 - Courbevoie
France

Dr. A.L. DE JONG
Unilever Research
Vlaardingen
Netherlands

Dr. Wilhelm K. FISHER
Henkel & Cie GmbH
4000 Düsseldorf 1
Germany

M. J.A. THIERNAGAND
S.A. Procter & Gamble Benelux
European Technical Center
Stronbeek-Bever
Belgique

(2) Nonionics only / non ioniques uniquement.

* Association Internationale de la Savonnerie et de la Détergence.

C.I.D.*

H. L. COLAS
Rhône Progil
69 - Decines

France

Dr. G. DÜRIG
CIBA - Geigy AG.
4000 Bâle

Suisse

Mr. V.N. REID
Shell Research Ltd.
Egham

United Kingdom

Dr. Reinhold WICKBOLD
Chemische Werke Huls
437 - Marl

Germany

S.D.A.**

Dr. R.D. SWISHER
Monsanto Company
St Louis, Missouri 63166

United States

OECD Secretariat
Secretariat OCDE

Ing. P. LIEBEN
Direction de l'Environnement

* Comité International des Dérivés Tensio-Actifs.

** Soap and Detergent Association.

ANNEX 9.2

FRENCH STANDARD PR., T 73-280

PROJET DE NORME EXPERIMENTALE	AGENTS DE SURFACE - DETERGENTS AGENTS DE SURFACE CATIONIQUES DETERMINATION DE LA BIODEGRADABILITE	Pr T 73-280
-------------------------------------	---	----------------

AVANT-PROPOS

A la date de publication de la présente norme expérimentale, il n'existe aucun document sur le même sujet en provenance des diverses organisations internationales concernées.

L'AFNOR a estimé souhaitable que la présente norme, dont l'essai biologique est basé sur la norme NF T 73-260, soit mise en expérimentation afin de confirmer objectivement la validité de la méthode.

Les observations que pourrait susciter la présente norme doivent être adressées à l'AFNOR TOUR EUROPE CEDEX 7 92080 PARIS LA DEFENSE avant :

INTRODUCTION

La détermination de la biodégradabilité des agents de surface vise à reconstituer en laboratoire les phénomènes de dégradation telles qu'ils peuvent apparaître dans l'environnement ou dans les stations d'épuration. Le processus de la méthode faisant intervenir entre autres des actions biologiques n'a pas un caractère rigoureux.

Dans la mesure où la validité du système biologique est vérifiée, les résultats obtenus permettent d'évaluer la biodégradabilité de l'agent de surface.

1 OBJET

La présente norme expérimentale a pour objet la description d'une méthode statique permettant de déterminer la biodégradabilité des agents de surface cationiques tels quels ou contenus dans les produits de lavage et de nettoyage. Elle se compose de deux parties, la première concerne l'analyse du produit à examiner, et la seconde l'essai biologique proprement dit.

2 REFERENCES

NF T 73-000 Agents de surface - Vocabulaire

NF T 73-009 Agents de surface - Détergents - Méthodes de division d'un échantillon

NF T 73-258 Détergents - Détermination de la teneur en matière active anionique (Méthode par titrage direct dans deux phases).

NF T 73-260 Agents de surface - Détergents - Agents de surface anioniques - Détermination de la biodégradabilité

--	--	--

Surface active agents - Detergents - Cationic surface active agents - Determination of biodegradability.

Tenside - Waschmittel - Cationischen oberflächenaktiven Substanzen - Bestimmung der Biodegradabilität

3 PRINCIPE GENERAL

Après extraction, si nécessaire, de la matière active sur un échantillon représentatif du produit à examiner, détermination de la teneur en agent de surface cationique. Puis essais biologiques simultanés par ensemencement bactérien d'une solution d'essai de concentration connue en agents de surface cationiques, d'une solution étalon de biodégradabilité, et essai d'une solution témoin du milieu ayant servi à l'ensemencement bactérien.

Détermination du taux de biodégradation par mesure de la teneur en agents de surface cationiques présente après sept jours d'incubation avant addition d'une même quantité d'agents de surface anioniques et en fin d'essai après dix jours d'incubation.

4 ECHANTILLONNAGE

4.1 Agents de surface cationiques en l'état

Préparer un échantillon pour essai d'environ 20 g selon les prescriptions de la NF T 73-009.

4.2 Détergent (*)

4.2.1 Produit en poudre

Préparer un échantillon réduit de 250 g environ selon les prescriptions de la norme NF T 73-009. Passer cet échantillon dans un broyeur à couteaux de type ménager, de manière à ce que la poudre obtenue ne présente pas de grains d'une grosseur supérieure à 0,2 mm. Homogénéiser convenablement la poudre, la placer dans un poudrier.

4.2.2 Produit liquide

Prélever un échantillon pour essai d'environ 500 g de produit préalablement homogénéisé.

5 EXTRACTION DE LA MATIERE ACTIVE ORGANIQUE ET PREPARATION DE LA SOLUTION D'ESSAI

5.1 Principe

Extraction par l'éthanol d'une quantité de produit suffisante pour entreprendre les dosages des agents de surface cationiques ainsi que les essais biologiques. Evaporation à sec de la solution éthanolique, puis obtention de la solution d'essai par mise en solution aqueuse du résidu sec.

(*) - Terme défini dans la norme NF T 73-000

.../...

5.2 - Réactif

Au cours de l'analyse, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

Ethanol 95 - 96 % (V/V)

5.3 - Appareillage

Matériel courant de laboratoire.

5.4 - Mode Opérateur

5.4.1 - Prise d'essai

Peser, à 0,1 g près, dans un ballon de 1 l à 40 g + 1 g de l'échantillon réduit de produit en poudre (4.2.1) ou prendre l'extrait sec du produit liquide (4.2.2) préparé comme suit : peser, à 0,1 g près, dans un ballon de 1 l, 200 g environ de produit, y ajouter 50 ml d'éthanol (5.2), évaporer à sec au bain d'eau bouillante en aspirant les vapeurs sous faible dépression jusqu'à ce deux pesées consécutives faites à 0,01 g près ne diffèrent pas plus de 0,1 g.

5.4.2 - Extraction

Dissoudre la prise d'essai (5.4.1) en ajoutant 500 ml d'éthanol (5.2) dans le ballon de 1 l, y adopter un réfrigérant droit, puis faire bouillir à reflux durant 15 min. Filtrer sous faible dépression sur un filtre en verre fritté de porosité P 16 (10 à 16 μ m) NF B 35-016 la solution surnageante chaude. Répéter deux fois l'extraction sur le résidu demeuré dans le ballon avec, chaque fois, 200 ml d'éthanol (5.2).

Réunir quantitativement les extraits et l'éthanol de lavage du filtre dans un ballon de 1 l.

5.4.3 - Solution d'essai

Éliminer par distillation la majeure partie de l'éthanol afin qu'il ne reste que 100 à 150 ml de solution dans le ballon.

Transvaser à chaud dans une fiole conique de 250 ml préalablement tarée, rincer le ballon à l'éthanol (5.2) et ajouter les solutions de rinçage au contenu de la fiole conique. Faire évaporer sur un bain d'eau bouillante la majeure partie du solvant. Terminer le séchage à $103^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ jusqu'à masse constante.

.../...

Dissoudre dans l'eau le résidu de la fiole conique. Chauffer au voisinage de l'ébullition, jusqu'à dissolution complète. Refroidir et transvaser quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 1 l. Rincer la fiole conique et ajouter les eaux de rinçage à la solution. Compléter au volume et homogénéiser. Soit (L₁) la solution ainsi obtenue.

6/ - DETERMINATION DE LA TENEUR EN AGENTS DE SURFACE CATIONIQUES

Effectuer la détermination de la teneur en agents de surface cationiques, selon la méthode spécifiée dans l'annexe II, directement sur une partie aliquote de la solution (L₁).

7/ - ESSAI BIOLOGIQUE

7.1 - Principe

Ensemencement bactérien d'une solution à 5 mg/l d'agent de surface cationique, enrichie en matières nutritives. Aération. Mesure du taux de biodégradation par dosage de la matière active au bleu disulfine après 7 jours d'incubation puis, après addition d'une même quantité d'agent de surface cationique, en fin du 10^e jour de l'essai biologique. Vérification de la validité du système biologique par essai simultané d'un produit étalon de biodégradabilité connue.

7.2 - Ensemencement bactérien et incubation

7.2.1 - Matériel biologique

Milieu de culture, obtenu à partir d'une eau d'égout contenant entre 10⁵ et 10⁷ micro-organismes par millimètre cube. Le stock bactérien ainsi constitué n'est valable que 24 h.

7.2.1.1 - Préparation

Utiliser de l'eau d'égout prélevée à la sortie d'un grand collecteur urbain. Il est indispensable d'aérer constamment l'eau d'égout si la durée du transport est supérieure à 3 h.

Dès réception au laboratoire, ajouter 0,5 g d'extrait de viande et 10 g de peptone par litre d'eau d'égout.

Placer ensuite dans un récipient en verre, muni d'un dispositif d'aération assurant le passage de 0,5 l d'air par minute au travers d'un tube muni à sa partie inférieure d'un verre fritté de porosité P 160 (100 à 160 μm) NF B 35-016 plongeant jusqu'au fond du récipient.

Mettre en incubation dans une enceinte thermorégulée à une température de 25 °C + 1 °C, cette enceinte étant celle où s'effectue l'essai proprement dit. Il est également possible d'opérer à une température constante comprise entre 20 °C et 26 °C.

Après quelques jours (généralement 2 à 4 jours) la population bactérienne doit atteindre 10^6 à 10^7 micro-organismes par millimètre cube. Cette valeur peut être vérifiée par dénombrement.

7.2.1.2 - Dénombrement

Une méthode de dénombrement est décrite en annexe I.

7.2.2 - Réactifs

7.2.2.1 - Eau de dilution

a) - Préparation d'une solution d'oligo-éléments :

Ajouter à de l'eau distillée ou de qualité équivalente les quantités (*) suivantes de produits de qualité analytique reconnue :

Molybdate de potassium	0,5 g
Borate de sodium	0,2 g
Sulfate de cobalt	0,2 g
Sulfate d'aluminium	0,1 g
Sulfate de cuivre	0,1 g
Sulfate de cadmium	0,1 g
Iodure de potassium	0,1 g
Bromure de sodium	0,01 g
Chlorure de zinc	0,05 g
Sulfate de manganèse	0,01 g
Fluorure de sodium	0,01 g

Amener le volume à 1 l avec de l'eau distillée. Porter à ébullition et filtrer.

b) - Préparation de l'eau de dilution

Ajouter à de l'eau distillée ou de qualité équivalente les quantités (*) suivantes de produits de qualité analytique reconnue :

Chlorure de calcium	0,220 g
Monohydrogénophosphate de sodium	0,010 g
Sulfate de magnésium	0,010 g
Nitrate de potassium	0,050 g

Ajouter 0,5 ml de la solution d'oligo-éléments (7.2.2.1.a) et amener le volume à 1 l avec de l'eau distillée.

Ajuster le pH final à une valeur comprise entre 7 et 7,2, puis filtrer sur papier filtre et maintenir cette eau de dilution à la température de l'essai.

7.2.2.2 - Solution étalon de biodégradabilité

Solution de produit étalon dans l'eau distillée à 400 mg de matière active par litre. L'étalon doit être préalablement titré selon la méthode spécifiée dans la norme NF T 73-258.

(*) - Les masses indiquées correspondent aux sels anhydres

L'agent de surface étalon (*) est un alkylbenzène sulfonate de sodium, de formule générale $R - C_6H_4 SO_3 Na$, où R représente des chaînes de longueur moyenne C_{12} . Il est constitué par un lot particulier caractérisé par son analyse physico-chimique. Son taux de biodégradation déterminé par la présente méthode est supérieur à 87 %.

7.2.3 - Appareillage

7.2.3.1 - Description

- Flacons ou contenants équivalents à col large de capacité d'environ 20 l, munis d'un bouchon (dimensions indicatives : diamètre extérieur 250 mm, hauteur du corps 400 mm, hauteur du col 80 mm, largeur du col 100 mm).
- Tubes en verre (par exemple diamètre intérieur 5 mm, longueur 500 mm) prolongés par une pastille en verre fritté de porosité P 160 (100 à 160 μm) NF B 35-016
- Enceinte thermostatée à $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ou permettant d'obtenir une température constante comprise entre $20 \text{ }^\circ\text{C}$ et $26 \text{ }^\circ\text{C}$, éclairée en lumière diffuse.
- Dispositif d'alimentation d'air non pollué permettant un débit de 0,5 l/min par flacon.

7.2.3.2 - Nettoyage

Tout le matériel en verre doit être nettoyé avec un mélange "sulfochromique" (mélange à parties égales d'une solution saturée de dichromate de potassium et d'acide sulfurique concentré), suivi d'un rinçage abondant avec de l'eau.

L'utilisation de tout agent de surface est à proscrire.

7.2.4 - Mode Opératoire

7.2.4.1 - Préparation de la solution d'essai (L₂)

Diluer la solution L₁ (5.4.3) avec de l'éthanol jusqu'à obtention d'une concentration en agent de surface cationique de 1 g/l. Soit (L₂) cette solution.

(*) - L'agent de surface étalon est disponible à l'Institut National de Recherche Chimique Appliquée 91710 VERT LE PETIT, étant donné ses propriétés hygroscopiques prendre les précautions d'usage pour sa conservation.

7.2.4.2 - Première période d'incubation (7 jours)

Introduire successivement dans trois flacons de 20 l :

	Flacon Y Témoin du milieu d'ensemencement (en litres)	Flacon E Essai proprement dit (en litres)	Flacon Z Etalon de biodégradabilité (en litres)
Eau de dilution (7.2.2.1)	9	9	8
Milieu de culture (7.2.1)	1	1	1
Solution d'essai (L ₂) (7.2.4.1)		0,050	
Solution étalon (7.2.2.2)			0,5
Eau distillée			0,5

L'eau distillée ajoutée en dernier est éventuellement l'eau utilisée pour rincer les récipients ayant servi à contenir la solution étalon.

Placer les trois flacons dans l'enceinte thermorégulée et aérer avec un débit d'air de 0,5 l/min par flacon.

Après 1, 2, 3 et 7 jours d'incubation, homogénéiser soigneusement le milieu après avoir détaché mécaniquement les dépôts présents sur les parois internes des flacons.

A la fin de la période d'incubation de 7 jours, effectuer un prélèvement de 500 ml en vue du dosage de la matière active au bleu disulfine (voir Annexe II).

7.2.4.3 - Deuxième période d'incubation (8° au 10° jour)

Après le premier prélèvement effectuer en 7.2.4.2, procéder de la manière suivante :

Flacon Y: Ajouter 0,5 l d'eau distillée.

.../...

Flacons E et Z : en vue du rinçage, prélever respectivement 200 ml de la solution des flacons E et Z et les placer dans des récipients appropriés. Ajouter alors dans le flacon E 50 ml de la solution d'essai (L₂) (7.2.4.1) et dans le flacon Z 0,5 l de la solution étalon (7.2.2.2). Rincer respectivement les récipients ayant contenu les solutions d'agents de surface avec les 200 ml précédemment mis à part et les réintroduire dans les flacons correspondants.

Homogénéiser le contenu de chacun des trois flacons et poursuivre l'incubation et l'aération. A la fin du 10^e jour homogénéiser le contenu comme indiqué en 7.2.4.2 et effectuer un prélèvement de 500 ml en vue du dosage de la matière active respectivement au bleu de méthylène (voir 7.3) et au bleu disulfine (voir annexe II). Si les dosages ne sont pas effectués immédiatement, il est possible, pour quelques heures, d'inhiber l'action bactérienne en conservant les prélèvements à 4 °C.

7.3 - Dosages

7.3.1. Dosage des agents de surface cationiques

Sur les prélèvements correspondants aux flacons Y et E, effectuer deux déterminations selon la méthode décrite en annexe II.

7.3.2 - Dosage des agents de surface anioniques

Sur les prélèvements correspondants aux flacons Y et Z, procéder à la détermination des agents de surface anioniques selon le chapitre 6 de la norme NF T 73-260

8 TAUX DE BIODEGRADATION

8.1 - Calculs préliminaires

En vue de calculer la biodégradabilité des agents de surface cationiques contenu dans l'échantillon soumis à l'essai, calculer au préalable divers taux de biodégradation selon les données indiquées ci-après.

8.1.1 - Définitions

Les paramètres résultant des déterminations analytiques sont définis de la manière suivante :

T_{E,0} est la teneur en agents de surface cationiques en milligrammes par litre de la solution contenant la matière active cationique soumise à l'essai biologique, au début de l'essai.

T_{E,7} est la teneur en agents de surface cationiques en milligrammes par litre de la solution contenant la matière active cationique soumise à l'essai biologique après 7 jours, avant nouvel ajout de matière active cationique.

T
E,7,7 est la teneur en agents de surface cationiques en milligrammes par litre de la solution contenant la matière active cationique soumise à l'essai biologique après 7 jours, et après nouvel ajout de matière active cationique.

T
E,10 est la teneur en agents de surface cationiques en milligrammes par litre de la solution contenant la matière active cationique soumise à l'essai biologique après 10 jours.

T T et T
O 7 10 sont les teneurs en agents de surface cationiques de la solution témoin du milieu d'ensemencement : au début de l'essai, après 7 jours et après 10 jours.

C et C
Z,7 Z,10 sont les teneurs en agents de surface anioniques, en milligrammes par litre, de la solution étalon de biodégradabilité après 7 jours et après 10 jours.

C et C
2,Y,7 2,Y,10 sont les teneurs en agents de surface anioniques, en milligrammes par litre, de la solution témoin du milieu d'ensemencement bactérien après 7 jours et après 10 jours, déterminées par rapport à la courbe d'étalonnage de la solution étalon de biodégradabilité.

Les taux de biodégradation sont définis de la manière suivante :

B
F,7 est le taux de biodégradation de l'agent de surface cationique soumis à l'essai biologique à la fin de la période de 7 jours.

B
Z,7 est le taux de biodégradation du produit étalon de biodégradabilité soumis à l'essai biologique à la fin de la période de 7 jours.

B
E,10 est le taux de biodégradation de l'agent de surface cationique soumis à l'essai biologique à la fin de la période de 10 jours.

B
Z,10 est le taux de biodégradation du produit étalon de biodégradabilité à la fin de la période de 10 jours.

8.1.2 - Taux de biodégradation dès la fin de la période de 7 jours

Les taux de biodégradation de l'agent de surface cationique soumise à l'essai biologique et du produit étalon sont donnée respectivement par les formules suivantes :

$$B_{E,7} = 100 \frac{(T_{E,0} - T_0) - (T_{E,7} - T_7)}{E_{0-0} - 0}$$

$$B_{Z,7} = 100 - 5 (C_{Z,7} - C_{2,Y,7})$$

8.1.3 - Taux de biodégradation à la fin de la période de 10 jours

Les taux de biodégradation de l'agent de surface cationique soumis à l'essai biologique et du produit étalon sont donnés respectivement par les formules suivantes :

$$B_{E,10} = 100 \frac{(T_{E,0} - T_0) + (T_{E,7,7} - T_{E,7}) - (T_{E,10} - T_{10})}{(T_{E,0} - T_0) + (T_{E,7,7} - T_{E,7})}$$

$$B_{Z,10} = 100 - 2,5 (C_{Z,10} - C_{2,Y,10})$$

8.2 - Taux de biodégradation pondéré

8.2.1 - Produit soumis à l'essai

Le taux de biodégradation pondéré D_E des agents de surface cationiques soumis à l'essai est calculé par la formule suivante :

$$D_E = \frac{0,5 B_{E,7} + B_{E,10}}{1,5}$$

8.2.2 - Produit étalon

Le taux de biodégradation pondéré D_Z du produit étalon déterminé au cours de l'essai est calculé par la formule suivante :

$$D_Z = \frac{0,5 B_{Z,7} + B_{Z,10}}{1,5}$$

8.3 - Validité des essais

Les résultats de l'essai biologique sont définitivement retenus dans les deux cas suivants :

- 1° - pour un produit dont le taux de biodégradation au 10° jour est inférieur à 60 lorsque le taux de biodégradation pondéré D_2 de l'étalon est supérieure à 87 %.
- 2° - pour un produit dont le taux de biodégradation au 10° jour est supérieur ou égal à 60, lorsque l'écart entre les taux de biodégradation du produit soumis à l'essai à 7 jours et 10 jours ne dépasse pas 6 et lorsque le taux de biodégradation pondéré D_2 de l'étalon est supérieur à 87 %.

Dans le cas contraire, l'essai sera répété deux fois au plus.

9/ - BIODEGRADABILITE

La biodégradabilité des agents de surface cationiques contenus dans l'échantillon soumis à l'essai est exprimée par le taux de biodégradation pondéré.

10/ - PROCES-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit mentionner les indications suivantes :

- a) - tous renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon
- b) - la méthode utilisée (référence à la présente norme)
- c) - les résultats obtenus
- d) - les conditions de l'essai
- e) - tous les détails opératoires non prévus dans la présente norme ou facultatifs, ainsi que tous les incidents susceptibles d'avoir eu une influence sur les résultats.

.../...

ANNEXE I

DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES

1. Diluant

Eau distillée récemment préparée additionnées de 1 ml de solution d'aldéhyde formique à 30 % (V/V). Cette solution doit être exempte de micro-organismes et de particules; dans le cas contraire, la filtrer sur une membrane de 0,2 μ m de porosité.

2. Appareillage

La verrerie et le matériel utilisés doivent être rigoureusement propres, mais il n'est pas indispensable qu'ils soient stérilisés.

- Microscope binoculaire et accessoires permettant des observations en fond clair, éventuellement en fond noir et en contraste de phase à des grossissements permettant d'inscrire un rectangle de quadrillage de la cellule de Malassez dans le champ microscopique (grossissements 400 à 600).
- Pipettes 5/A et 10/A, NF B 35-305.
- Fioles jaugées 100/A et 1000/A, NF B 35-307 contenant une vingtaine de billes de verre de 5 mm de diamètre maximale.
- Cellule à numération de Malassez comportant un quadrillage de 100 rectangles dont 25 sont divisés en 20 carrés. Deux butées latérales permettent de supporter une lamelle spéciale optiquement plane et suffisamment épaisse pour ne pas se déformer. Dans ces conditions, le volume compris entre le quadrillage et la lamelle est de 1 mm³ pour la totalité de la cellule, soit 0,01 mm³ pour un rectangle.

3. Dilution

Effectuer une dilution permettant de compter 100 à 300 micro-organismes dans la section de volume ayant pour base 1 rectangle (0,01 mm³). Suivant le cas, réaliser les dilutions au 1/50, 1/100, 1/200, ou exceptionnellement 1/500.

Pour augmenter la précision de la méthode, utiliser la dilution la plus faible compatible avec les possibilités de dénombrement.

Selon la dilution désirée, mesurer avec précision le volume du liquide à analyser; l'introduire dans une fiole jaugée et compléter au volume à l'aide du diluant. Agiter énergiquement pendant 5 min avant d'introduire la dilution dans la cellule à numération.

.../...

4. Dénombrement

Procéder au montage de la cellule; disposer la lamelle sur le bord des deux tubées légèrement humidifiées et la centrer en la faisant glisser par légère pression jusqu'à obtention des anneaux de Newton.

Procéder ensuite au remplissage de la cellule dans les conditions suivantes : après homogénéisation, introduire la dilution dans la cellule jusqu'à écoulement dans les rigoles.

Laisser ensuite la cellule sur la platine du microscope pendant 30 min à 1 h de façon à laisser sédimenter les micro-organismes. Au cas où le dénombrement ne pourrait être effectué dans ces délais, il est indispensable de maintenir les cellules horizontalement dans une chambre humide à l'abri des vibrations.

Confirmer par un examen microscopique sommaire l'absence de bulles d'air ou d'agglutinats importants, une homogénéité et une densité de populations normales (100 à 300 micro-organismes par rectangle). Dans le cas contraire, procéder à une nouvelle dilution.

Procéder ensuite au dénombrement proprement dit en comptant les micro-organismes présents dans les 25 rectangles quadrillés en faisant légèrement varier la mise au point (ne pas tenir compte des particules ou micro-organismes de grande taille tels que les protozoaires).

Effectuer sur chaque échantillon à analyser deux numérations, chacune à partir d'une dilution différente.

5. Expression des résultats

Le nombre de micro-organismes présents par millimètre cube de milieu de culture est égal à :

$$N \times \frac{100 \times d}{25}$$

où :

N est le nombre de micro-organismes trouvé dans les 25 rectangles quadrillés,

d est le facteur de dilution de la dilution utilisée.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique de deux dénombrements.

=====

ANNEXE II

DOSAGE DES AGENTS DE SURFACE CATIONIQUES

1 DOMAINE D'APPLICATION

La méthode est applicable aux solutions aqueuses contenant des agents de surface cationiques en présence d'autres agents de surface.

Elle permet de doser des teneurs en agents de surface cationiques supérieures à 0,1 mg/l.

2 PRINCIPE

Concentration des agents de surface contenus dans la solution d'essai par évaporation, extraction par l'éthanol de ces agents de surface.

Séparation des agents de surface cationiques des agents de surface anioniques par passage sur une résine échangeuse d'anions.

Formation, en milieu tamponné du complexe bleu disulfine - agents de surface cationiques; extraction de ce complexe par le chloroforme et mesure spectrophotométrique de l'absorbance de la solution chloroformique.

3 REACTIFS

Au cours de l'analyse utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou de pureté équivalente.

3.1 - Méthanol

3.2 - Chloroforme

3.3 - Propanol-2

3.4 - Solution tampon : pH 5,0 à 20 °C

Préparer une solution d'acétate de sodium à 164 g/l et ajuster son pH à 5,0 par addition d'une solution d'acide acétique à 120 g/l.

3.5 - Bleu disulfine VN 150, (CI 42045), sel disodique de l'acide disulfonique-2,4 dinitrilodiéthyl-4'4" triphényl méthane, solution à 0,64 g/l.

Dissoudre 0,16 g de bleu disulfine VN 150, dans 20 ml d'éthanol à 10 % (V/V). Transvaser dans une fiole jaugée de 250 ml et compléter au volume.

3.6 - Alkylbenzène sulfonate de sodium (par exemple tétrapropylènebenzènesulfonate de sodium), solution à 1 g/l.

3.7 - Chlorure de cetyltriméthylammonium, solution méthanolique à 1 g/l.

3.8 - Chlorure de benzéthonium ¹⁾, solution étalon à 10 mg/l

Peser, à 0,001 g près, 1,000 g de chlorure de benzyldiméthyl[4 - tétraméthyl-1,1,3,3 butyl)-2 phénoxy-éthoxy] -2 éthyl ammonium, monohydraté, le dissoudre dans de l'eau. Transvaser quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 1 l et compléter au volume.

Prélever 10,0 ml de la solution obtenue et les diluer en fiole jaugée à 1000 ml. (1 ml correspond à 10 µg de chlorure de benzéthonium).

3.9 - Résine échangeuse d'ions, anionique, fortement basique (groupement ammonium quaternaire), avec un taux de réticulation de 2 % de divinylbenzène, de granulométrie comprise entre 150 et 300 µm.

4 APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et :

4.1 - Colonnes pour chromatographie en verre: diamètre 10 mm environ, longueur 250 mm environ, munie à son extrémité supérieure d'un joint rodé permettant d'adapter une ampoule à décanner servant de réservoir de solvant.

4.2 - Centrifugeur, pouvant créer une accélération de 15000 m/s².

4.3 - Tubes à centrifuger de capacité 40 ml environ (voir figure).

4.4 - Tube capillaire, deux fois coudé à angle droit (voir figure)

4.5 - Ampoules à décanner de capacité 100 ml.

4.6 - Spectrophotomètre, muni de cuves optiques de 10 mm d'épaisseur

4.7 - Agitateur décanteur mécanique pour ampoules à décanner.

Remarque importante : Les tubes à centrifuger (4.2), le tube capillaire (4.3), les ampoules à décanner (4.5), ainsi que les béchers et fioles jaugées à utilisés doivent être conditionnés avant l'essai en y laissant séjourner la solution d'agent de surface cationique (3.7) puis être abondamment rincés à l'eau.

5 MODE OPERATOIRE

5.1 - Extraction des agents de surface

Prélever un volume (V) de solution tel qu'il contienne entre 50 et 1000 µg de l'agent de surface cationique à doser, le placer dans un bécher de capacité convenable et ajouter une quantité d'alkylbenzène sulfonate (3.6) telle que la concentration finale en ce produit soit de 20 mg/l.

Faire évaporer à sec, avec précaution, sur un bain d'eau bouillante. Ajouter 20 ml de méthanol (3.1) bouillant, agiter avec une baguette de verre et filtrer l'extrait sur un petit tampon de laine de verre en recueillant le filtrat dans un bécher de 250 ml. Laver le tampon avec 10 ml de méthanol froid.

1) - L'un des noms commerciaux de ce produit est "Hyamine 1622."

Répéter l'extraction avec deux autres portions de 20 ml de méthanol bouillant. Rincer enfin le bécher, le tampon de laine de verre et l'entonnoir avec 10 ml de méthanol froid.

Evaporer à sec.

5.2 - Séparation des agents de surface cationiques

5.2.1 - Passage sur colonne

5.2.1.1 - Préparation de la colonne échangeuse d'anions

Remplir la colonne (4.1) au tiers avec du méthanol (3.1), placer au-dessus du robinet un petit tampon de laine de verre et introduire lentement 12 ml de résine (3.9) mouillée avec du méthanol.

Éliminer les bulles d'air de la résine puis placer un petit tampon de laine de verre à son sommet.

Conditionner la colonne ainsi préparée en faisant passer 10 ml de la solution méthanolique d'agent de surface cationique (3.7) à raison de 2 ml/min. Laver ensuite la colonne avec 600 ml de méthanol (3.1) passant à raison de 2 à 3 ml/min.

Recueillir séparément les derniers millilitres d'éluat, en prélever 5 ml et vérifier en les traitant comme l'un des termes de la gamme d'étalonnage (voir 5.3.1) qu'ils ne conduisent pas à une absorbance supérieure à celle du terme zéro de cette gamme. Poursuivre éventuellement le lavage de la résine avec du méthanol (3.1) jusqu'à ce que ce résultat soit atteint.

Préparer de la même manière une série de colonne en vue d'une série de déterminations.

5.2.1.2 - Élimination des agents de surface anioniques

Reprendre le résidu obtenu en 5.1 par 10 ml de méthanol (3.1), agiter avec une baguette de verre puis transvaser la totalité de l'extrait dans la colonne de résine conditionnée et la faire passer lentement, à raison de moins de 1 ml par minute en recueillant l'éluat dans un bécher de 250 ml.

Rincer le bécher ayant contenu le résidu avec deux fois 10 ml de méthanol et faire passer ce méthanol sur la résine.

Laver la colonne avec 100 ml de méthanol à raison de 2 à 3 ml/min.

Evaporer à sec l'ensemble des éluats.

NOTE : Après chaque séparation et avant ré-emploi, laver la colonne de résine avec 150 ml de méthanol (3.1). Les colonnes peuvent être utilisées au moins 3 ou 4 fois.

5.2.2 - Traitement en bécher

5.2.2.1 - Préparation de la résine

Dans un bécher de 250 ml peser 20 g environ de résine (3.9) et ajouter 200 ml de propanol-2 (3.3), puis agiter lentement avec un agitateur magnétique durant 15 min à 200 °C.

Filtrer la résine sur un filtre en verre fritté de porosité P 16 (10 à 16 μm) NF B 35-016 et la laver avec le propanol-2 (3.3).

Conditionner la résine ainsi préparée en ajoutant 50 ml de la solution méthanolique d'agents de surface cationiques (3.7). Filtrer la résine et laver de nouveau avec 200 ml de propanol-2 et filtrer. Poursuivre le lavage de la résine jusqu'à ce que le propanol-2 soit incolore.

Conserver la résine ainsi préparée dans le propanol-2.

5.2.2.2 - Élimination des agents de surface anioniques

Dans un bécher de 250 ml dissoudre le résidu obtenu en 5.1 avec 50 ml de propanol-2 (3.3).

Introduire 10 g de résine conditionnée (5.2.2.1) et compléter à environ 100 ml avec le propanol-2. Agiter avec un agitateur magnétique durant 2 à 5 h. Filtrer ensuite la résine sur un filtre en verre fritté de porosité P 16 (10 à 16 μm) NF B 35-016, rincer le bécher et la résine avec 100 ml de propanol-2.

Recueillir la totalité des filtrats dans un ballon et les évaporer à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif.

NOTE : Après chaque séparation et avant ré-emploi, laver la résine avec le propanol-2 (3.3). La résine peut être utilisée au moins 3 ou 4 fois.

5.3 - Dosage

5.3.1 - Gamme d'étalonnage

a) - Méthode utilisant des tubes à centrifuger

Dans une série de tubes à centrifuger (5.4), introduire :

0 - 0,1 - 1 - 2 - 3 - 4 et 5 ml de la solution de chlorure de benzéthonium (3.8) soit :

0 - 1 - 10 - 20 - 30 - 40 et 50 μg d'agent de surface cationique.

Amener le volume à 15 ml avec de l'eau, puis ajouter :

- 2,5 ml de la solution tampon (3.4)
- 1,0 ml de la solution de bleu disulfine (3.5)
- 10 ml de chloroforme (3.2).

Agiter vigoureusement le contenu du tube pendant 90 s de façon à mélanger intimement les deux phases, puis centrifuger pendant 30 s.

Adapter une poire à l'une des extrémités du tube capillaire (4.4) et introduire l'autre extrémité dans la phase chloroformique (au travers de la couche aqueuse) en exerçant une légère pression sur la poire de façon à produire un lent dégagement de bulles d'air.

Fixer le bouchon sur le tube à centrifuguer, enlever la poire, et transférer l'extrait chloroformique dans une cuve optique en augmentant, par exemple à l'aide d'une seringue, la pression de l'air au-dessus de la phase aqueuse.

Rincer la cuve avec l'extrait chloroformique, puis mesurer, dans les 5 min qui suivent, son absorbance, à la longueur d'onde de 628 nm, après avoir réglé le zéro d'absorbance avec le chloroforme (3.2).

Tracer une courbe d'étalonnage à partir des valeurs ainsi obtenues.

NOTE : Après usage, laver les tubes à centrifuger plusieurs fois avec de l'eau, rincer le tube capillaire et les cuves optiques avec du méthanol (3.1) puis du chloroforme (3.2).

b) - Méthode utilisant des ampoules à décanter

Dans une série d'ampoules à décanter de 100 ml (4.5), introduire :

0 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2,5 et 5 ml de la solution de chlorure de benzéthonium (3.8) soit :

0 - 2 - 5 - 10 - 25 et 50 µg d'agent de surface cationique.

Amener le volume à 15 ml avec de l'eau, puis ajouter :

- 2,5 ml de la solution tampon (3.4)
- 1,0 ml de la solution de bleu disulfine (3.5)
- 10 ml de chloroforme (3.2)

Agiter les ampoules avec l'appareil (4.7) durant 4 à 6 min, à la fin de l'agitation et après décantation soutirer la phase chloroformique dans les tubes à centrifuger, puis centrifuger durant 60 s environ.

A l'aide d'une pipette équipée d'un dispositif d'aspiration, transvaser une partie de la phase chloroformique dans une cuve optique d'épaisseur 10 mm, rincer la cuve avec l'extrait chloroformique, puis mesurer, dans les 5 min qui suivent, son absorbance, à la longueur d'onde de 628 nm, après avoir réglé le zéro d'absorbance avec le chloroforme (3.2).

- 13 -

Tracer une courbe d'étalonnage à partir des valeurs ainsi obtenues :

NOTE : Après usage, laver le matériel avec du méthanol (5.1) puis du chloroforme (3.2).

5.3.2 - Détermination

a) - Méthode utilisant des tubes à centrifuger

Ajouter dans le bécher ou le ballon contenant le résidu sec obtenu en 5.2.1.2 ou 5.2.2.2, 20 ml de chloroforme (3.2) saturé d'eau et transvaser dans une fiole jaugée d'une capacité (V_1) telle que 10 ml de la solution finale contienne entre 5 et 50 μg d'agent de surface cationique.

Rincer le bécher ou le ballon avec le chloroforme (3.2) et compléter le volume de la fiole jaugée avec ce chloroforme.

Introduire dans un tube à centrifuger :

- 15 ml d'eau
- 2,5 ml de la solution tampon (3.4)
- 1,0 ml de la solution de bleu disulfine (3.5)
- 10,0 ml de la solution chloroformique obtenue.

Poursuivre selon les indications du paragraphe "gamme d'étalonnage" (5.3.1.a) à partir du 3ème alinéa jusqu'au 6ème alinéa inclus.

b) - Méthode utilisant des ampoules à décanter

Remplacer dans le 3ème alinéa du paragraphe (5.3.2.a) le tube à centrifuger par une ampoule à décanter de 100 ml contenant les mêmes quantités de réactifs prescrites en 5.3.2.a et poursuivre selon les indications du paragraphe "gamme d'étalonnage" (5.3.1.6) à partir du 3ème alinéa jusqu'au 4ème alinéa inclus.

5.4 - Essai à blanc

Effectuer, parallèlement au dosage et en suivant le même mode opératoire, un essai à blanc en employant les mêmes quantités de tous les réactifs que celles utilisées pour le dosage, mais en omettant le résidu obtenu en 5.2.1.2 ou 5.2.2.2.

6 EXPRESSION DES RESULTATS

Au moyen de la courbe d'étalonnage (5.3.1) et compte-tenu de l'essai à blanc (5.4) déterminer la quantité d'agent de surface cationique, exprimée en microgrammes de chlorure de benzéthonium, contenue dans 10 ml de la solution chloroformique obtenue en 5.3.2.

La teneur en agents de surface cationique exprimée en milligramme par litre est donnée par la formule :

$$\frac{m \times V}{10 \times V}$$

où :

m est la masse, en microgrammes, d'agents de surface cationique trouvée lors du dosage d'une partie aliquote obtenue en 5.3.2.

V est le volume, en millilitres, de la fiole jaugée utilisée en 5.3.2.

V est le volume, en millilitres, de la solution soumise à l'essai.

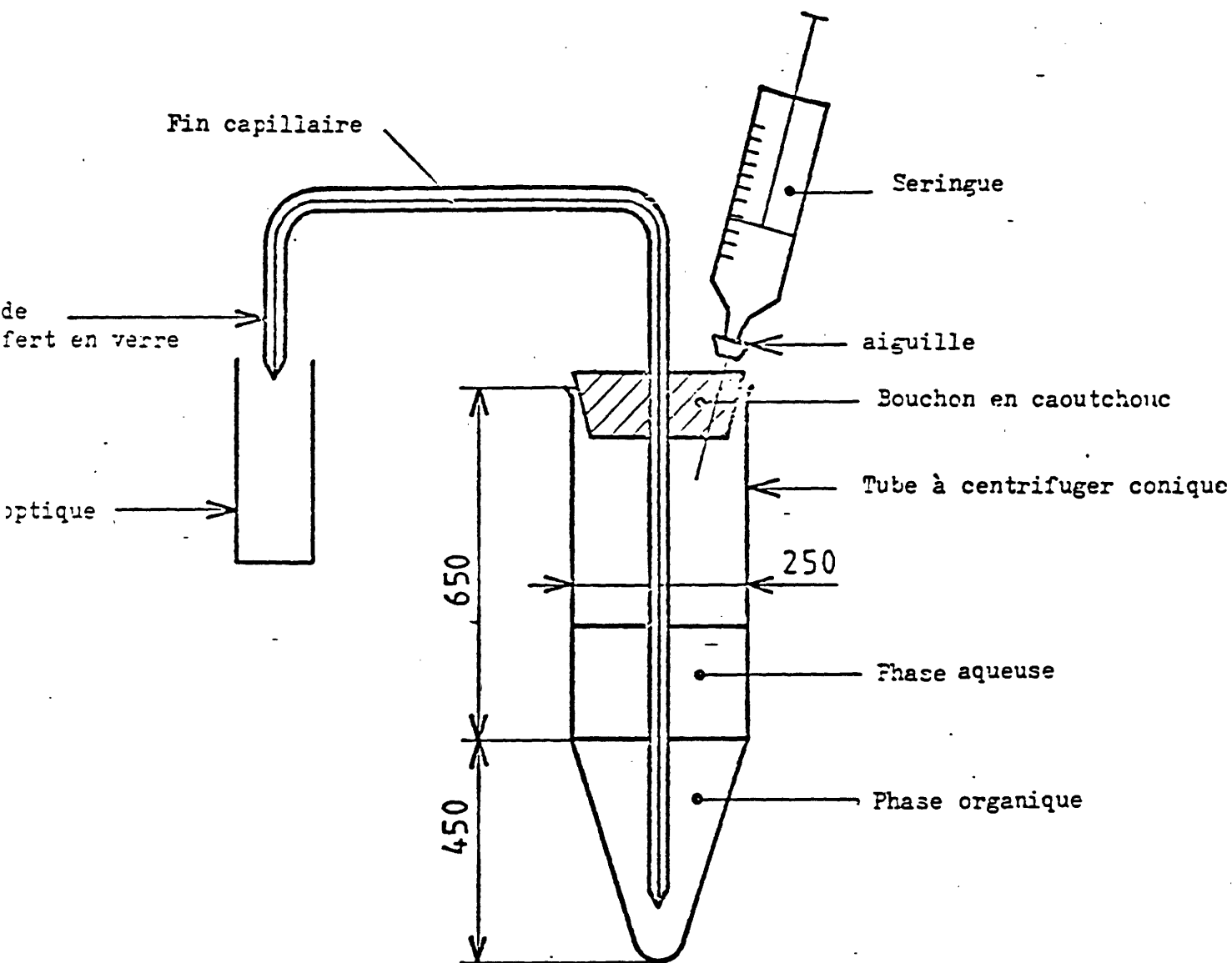


FIGURE : Dispositif de transfert des extraits

ANNEX 9.3

ISO/DIS 14593 HEAD SPACE METHOD

Commissie: 390 014 05 01 Biodegradatie in water

Secretaris: drs. R.W. Wieleman

Datum: 1997-04-04

Geleideblad

Bij document [REDACTED] "Water quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Method by analysis of released inorganic carbon in sealed flasks"

van:

d.d.:

-
- ter kennisneming
 - ter goedkeuring; einddatum (geen tegenbericht betekent akkoord)
 - voor commentaar; einddatum voor 1 augustus 1997
 - ter behandeling op komende vergadering

Opmerkingen secretaris:



ISO/TC 147/SC 5

Secretariat: BSI

Voting begins on
1997-03-27Voting terminates on
1997-08-27

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION · МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ · ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Water quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Method by analysis of released inorganic carbon in sealed flasks

Qualité de l'eau — Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques en milieu aqueux — Méthode par analyse du carbone inorganique libéré dans des flacons fermés

ICS 13.060.01

Descriptors: water, quality, water pollution, organic compounds, tests, water tests, determination, biodegradability, aerobic bacteria.

In accordance with the provisions of Council Resolution 15/1993 this document is circulated in the English language only.

Conformément aux dispositions de la Résolution du Conseil 15/1993, ce document est distribué en version anglaise seulement.

To expedite distribution, this document is circulated as received from the committee secretariat. ISO Central Secretariat work of editing and text composition will be undertaken at publication stage.

Pour accélérer la distribution, le présent document est distribué tel qu'il est parvenu du secrétariat du comité. Le travail de rédaction et de composition de texte sera effectué au Secrétariat central de l'ISO au stade de publication.

THIS DOCUMENT IS A DRAFT CIRCULATED FOR COMMENT AND APPROVAL. IT IS THEREFORE SUBJECT TO CHANGE AND MAY NOT BE REFERRED TO AS AN INTERNATIONAL STANDARD UNTIL PUBLISHED AS SUCH.

IN ADDITION TO THEIR EVALUATION AS BEING ACCEPTABLE FOR INDUSTRIAL, TECHNOLOGICAL, COMMERCIAL AND USER PURPOSES, DRAFT INTERNATIONAL STANDARDS MAY ON OCCASION HAVE TO BE CONSIDERED IN THE LIGHT OF THEIR POTENTIAL TO BECOME STANDARDS TO WHICH REFERENCE MAY BE MADE IN NATIONAL REGULATIONS.

WARNING AND SAFETY PRECAUTIONS

Activated sludge and sewage may contain potentially pathogenic organisms. Therefore appropriate precautions should be taken when handling them. Hazardous test substances and those whose properties are unknown should be handled with care.

1. Scope

This International Standard specifies a method, by analysis of released inorganic carbon, for the evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic substances at a given concentration of micro-organisms. The conditions described in this International Standard do not always correspond to the optimal conditions for allowing the maximum degree of biodegradation to occur. For alternative biodegradation methods see ISO 14462.

The method can be applied to organic compounds which are:

- (a) soluble under the test conditions;
- (b) insoluble under the test conditions, in which case special measures may be necessary to achieve a good dispersion of the compound (see, for example, ISO 10634: 1995);
- (c) volatile;

Note 1. With highly volatile substances, losses to the gaseous phase can be minimised by reducing the volume of the headspace. However, there should be sufficient oxygen in the test system to prevent biodegradation being oxygen-limited.

- (d) not inhibitory to the test micro-organisms at the concentration chosen for the test. The presence of an inhibitory effect can be determined as specified in 8.3, or by using any other method for determining the inhibitory effect of a substance on bacteria (see, for example, ISO 8192: 1986).

2. Normative references

The following standards contain provisions which, through reference in this text, constitute provisions of this International Standard. At the time of publication, the editions indicated were valid. All standards are subject to revision, and parties to agreements based on this

International Standard are encouraged to investigate the possibility of applying the most recent editions of the standards indicated below. Members of IEC and ISO maintain registers of currently valid International Standards.

ISO 7827: 1994 Water quality - Evaluation in an aqueous medium of the 'ultimate' aerobic biodegradability of organic compounds - Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC).

ISO 8192: 1986 Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption of activated sludge.

ISO 8245: 1987 Water quality - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC).

ISO 9439: 1990 Water quality - Evaluation in an aqueous medium of the 'ultimate' aerobic biodegradability of organic compounds - Method by analysis of released carbon dioxide.

ISO 9887: 1992 Water quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium - Semi-continuous activated sludge method (SCAS).

ISO 9888: 1991 Water quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium - Static test (Zahn-Wellens method).

ISO 10634: 1995 - Water quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

ISO 11923 Water quality - Determination of suspended solids - Method by glass fibre filtration (in preparation).

ISO 14462 Water quality - ISO Tests on biodegradability (in preparation)

3. Definitions

For the purposes of this International Standard the following definitions apply:

3.1 Ultimate aerobic biodegradation: The breakdown of an organic chemical compound by micro-organisms in the presence of oxygen to carbon dioxide, water and mineral salts of any other elements present (mineralisation) and new biomass.

3.2 Primary biodegradation: The structural change (transformation) of an organic chemical compound by micro-organisms resulting in the loss of a specific property.

3.3 Activated sludge: Biomass produced in the aerobic treatment of wastewater by the growth of bacteria and other micro-organisms in the presence of dissolved oxygen.

3.4 Concentration of suspended solids of an activated sludge: The amount of solids obtained by filtration or centrifugation of a known volume of activated sludge and drying at about 105 °C to constant weight.

3.5 Dissolved organic carbon (DOC): That part of the organic carbon in water which cannot be removed by specified phase separation, for example by centrifugation or by membrane filtration.

3.6 Total organic carbon (TOC): Within this standard method it is the amount of organic carbon added as the test substance to the test vessels.

3.7 Inorganic carbon (IC): Within this standard method the amount of inorganic carbon measured during the test in the test vessels.

3.8 Total inorganic carbon (TIC): Within this standard method it is the total mass of inorganic carbon deriving from the mineralization of the test compound to carbon dioxide, bicarbonate and carbonate.

3.9 Dissolved inorganic carbon (DIC): That part of the inorganic carbon in water which cannot be removed by specified phase separation, for example by centrifugation or by membrane filtration.

3.10 Theoretical maximum inorganic carbon (ThIC): The theoretical maximum amount of inorganic carbon released by oxidizing a chemical compound completely, calculated from the molecular formula; expressed as mg per g test compound.

3.11 Lag phase: The time in days from the start of a test until adaptation and selection of the degrading micro-organisms is achieved and the biodegradation degree of a chemical compound or organic matter has increased to about 10 % of the theoretical maximum biodegradation.

3.12 Maximum level of biodegradation: The maximum biodegradation degree of a chemical compound or organic matter in a test noted in per cent above which no further biodegradation takes place during the test.

3.13 Biodegradation phase: The time in days from the end of the lag phase of a test until about 90 % of the maximum level of biodegradation has been reached.

3.14 Plateau phase: The time in days from the end of the biodegradation phase when the maximum level of biodegradation is reached until the end of the test.

3.15 Pre-exposure: The pre-incubation of an inoculum in the presence of the test compound, with the aim of enhancing the ability of the inoculum to biodegrade the test compound by adaptation and selection of the micro-organisms.

3.16 Pre-conditioning: The pre-incubation of an inoculum under the conditions of the test in the absence of the test compound, with the aim of improving the performance of the test by acclimatisation of the micro-organisms to the test conditions.

4. Principle

Determination of the ultimate biodegradation of organic compounds by micro-organisms, using an aqueous aerobic test medium. The test substance, as the sole source of carbon and energy, is added to a mineral salts medium inoculated with a mixed population of micro-organisms and incubated in sealed vessels with a headspace of air. The concentration of the compound used normally yields an initial organic carbon concentration

in the medium of 2 to 40 mg/l (20 mg/l is recommended). Biodegradation (mineralisation to CO_2) is determined by measuring the net increase in inorganic carbon (IC) levels over time compared with unamended blanks. The test generally runs for 28 days. The extent of biodegradation is expressed as a percentage of the theoretical IC production based on the amount of test substance (as organic carbon) added initially.

For sufficiently water-soluble substances, dissolved organic carbon (DOC) removal during the test may also be determined.

If a suitable analytical method is available, then the primary biodegradation (removal of parent test substance) during the test may also be determined.

5. Test environment

Incubation shall take place in the dark, or in diffused light, in an enclosure which is maintained at a constant temperature (within ± 2 °C) between 20 °C and 25 °C.

6. Reagents

Use only reagents of recognised analytical grade.

6.1 Distilled or de-ionised water

Containing less than 10% of the initial organic carbon content introduced by the test compound in any case, however, less than 1 mg/l DOC.

6.2 Test medium

6.2.1 Composition

6.2.1.1 Solution a)

Anhydrous potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	8.50 g
Anhydrous dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	21.75 g
Disodium hydrogen phosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33.40 g
Ammonium chloride (NH_4Cl)	0.50 g
Water (6.1) (quantity necessary to make up to)	1 l

The pH of this solution should be 7.4. (± 0.2)

6.2.1.2 Solution b)

Dissolve 36.40 g of calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in 1 l of water (6.1).

6.2.1.3 Solution c)

Dissolve 22.50 g of magnesium sulphate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in 1 l of water (6.1).

6.2.1.4 Solution d)

Dissolve 0,25 g iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in water (6.1), quantity necessary to make up to 1000 ml. Prepare this solution freshly before use to avoid precipitation or add a drop of concentrated hydrochloric acid (HCl).

6.2.2 Preparation of the test medium

For 1 l of test medium mix 10 ml of solution a) with 800 ml water (6.1) and then add 1 ml each of solutions b), c) and d) and make up to 1 l with water (6.1).

6.3 Concentrated orthophosphoric acid (H_3PO_4) ($\geq 85\%$ w/v)

6.4 Sodium hydroxide solution

Dissolve 280 g of sodium hydroxide (NaOH) in 1 l of water (6.1) to obtain a solution of 2 mol/l. Either use freshly prepared solution or determine the DIC of this solution and consider this value when calculating the test result (see 9).

7. Apparatus

Ensure that all glassware is thoroughly cleaned and, in particular, free from organic or toxic matter.

Usual laboratory equipment, and

7.1 Instrument for measuring inorganic carbon (IC) such as the inorganic channel of a total organic carbon (TOC) analyser or a gas chromatograph.

7.2 Gas-tight glass vessels of known volume, for example, serum bottles of 160 ml capacity sealed with butyl rubber septa and aluminium crimp seals or any other gas-tight system.

7.3 Orbital shaker

7.4 Syringes of high precision for aqueous and gaseous samples.

7.5 Glass bottles to take, for example 5 l medium.

7.6 Centrifuge

7.7 pH-meter

7.8 Device for filtration, with membrane filters of suitable porosity (nominal aperture diameter between 0.20 μm and 0.45 μm) which adsorb organic substance or release organic carbon to a minimum degree.

7.9 Instrument for the determination of dissolved organic carbon (DOC) concentration

7.10 Carbon dioxide-free air production system

Prepared by passing air through soda lime granules or a solution of sodium hydroxide (see, for example, ISO 9439). Alternatively, a mixture of 80% N₂/20% O₂ may be used. The absence of CO₂ in the air can be confirmed by passage through barium hydroxide solution (a white precipitate indicates the presence of CO₂).

8. Procedure

8.1 Preparation of the test solutions

8.1.1 Test compound

Prepare a stock solution of a sufficiently water-soluble test compound in water (6.1) or the test medium (6.2.2) at a concentration preferably 100-fold greater than the final concentration to be used in the test. Add the stock solution to the test medium (6.2.2) to give a final organic carbon concentration of between 2 and 40 mg/l (see 8.3); 20 mg/l organic carbon is recommended.

Add substances of low water-solubility added directly, in solid or liquid form to the inoculated medium in the appropriate test vessels. Liquid test substances, including those which are volatile, may be injected directly into sealed vessels using a high precision microsyringe. Determine the added amount exactly

Note 2. Poorly-soluble substances can often be dispensed as a dispersion produced using non-biodegradable emulsifying agent and/or ultrasonication. Refer to ISO 10634 for guidance on the preparation and treatment of poorly water-soluble substances.

8.1.2 Solution of the reference substance

Prepare a stock solution of the reference substance (an organic substance of known biodegradability such as aniline or sodium benzoate) in water (6.1) in the same way as in 8.1.1, and then dilute in test medium (6.2.2) to give a final organic carbon concentration of 20 mg/l.

8.2 Preparation of the inoculum

Prepare the inoculum using the following sources described in 8.2.1, 8.2.2 and 8.2.3, or using a mixture of these sources, to obtain a microbial population that offers sufficient biodegradative activity. Check this activity by means of the reference substance (8.1.2). Based on experience the recommended inoculum is activated sludge at a dry solids concentration of 4 mg/l. The carbon dioxide production of the blanks should be as low as possible (see 11). To reduce the influence of the blanks, it may be helpful to pre-condition the inoculum by aeration for up to one week before it is used. Use a suitable volume for inoculation (see Note 4)

Note 3. In certain circumstances, pre-exposed inocula may be used, provided that this is clearly stated in the test results (e.g. *biodegradation = x %, using pre-exposed inocula*) and the method of the pre-exposure is detailed in the test report. Pre-exposed inocula can be

obtained from laboratory biodegradation tests conducted under a variety of conditions (e.g. ISO 9888: 1991 Zahn-Wellens test; ISO 9887: 1992 SCAS test) or from samples collected from locations where relevant environmental conditions exist (e.g. treatment plants dealing with similar substances, contaminated areas, etc.).

Note 4 Based on experience suitable volume means:

- sufficient to give a population which offers enough biodegradation activity;
- degrades the reference compound by the stipulated percentage (see 10);
- gives between 10^3 to 10^6 colony forming units per ml in the final mixture;
- gives not greater than the equivalent of 4 mg/l suspended solids of activated sludge in the final mixture;
- the quantity of dissolved organic carbon provided by the inoculum should be less than 10 % of the initial concentration of organic carbon introduced by the test compound;
- generally 1 to 10 ml of inoculum are sufficient for 1000 ml of test solution.

8.2.1 Inoculum from an activated sludge plant

Collect activated sludge from the aeration tank of a full-scale or a laboratory waste water treatment plant treating predominantly domestic sewage. If necessary, remove coarse particles by filtration through a sieve (for example, 1 mm² mesh size) and keep the sludge aerobic thereafter. Since it is necessary for the inoculum blank to have as low an evolution of CO₂ as possible, the sludge may need further treatment. For example, settle or centrifuge (e.g. at 10,800 m s⁻² for 10 minutes) the sludge, discard the supernatant and re-suspend the settled or centrifuged solids in test medium (6.2.2) to give a suspended solids concentration of about 3 g/l (see, for example, ISO 11923). Alternatively or additionally, aerate the sludge overnight before use. To reduce the blank value still further, the sludge can be pre-conditioned to the test conditions prior to use by diluting in test medium (6.2.2) to give 4 to 30 mg dry solids/l and aerating with moist air for up to one week at the test temperature. Use 4 to 30 mg/l dry solids as the inoculum in a test; 4 mg/l is recommended as higher concentrations of activated sludge may give rise to high blank IC values.

8.2.2. Inoculum from waste water

Take a sample of the influent or the effluent from a full-scale or laboratory waste water treatment plant dealing with predominantly domestic sewage. Keep this sample under aerobic conditions and use on the day of collection (or pre-condition if necessary). Coarse-filter the effluent to remove gross particulate matter and measure its pH. Before use, sparge the filtrate with CO₂-free air (6.5) for about one hour while maintaining the pH at 6.5 using orthophosphoric acid (6.2), restore the pH to its original value and finally let the sample settle for 1 h and take a suitable volume of the supernatant for inoculation.

Note 5. This procedure reduces the IC content of the inoculum. For example, when the maximum of 100 ml filtered effluent per l test volume is used as the inoculum, the amount of IC produced in blank vessels in 28 d should lay in the range 0.4 to 1.3 mg/l. The IC values in the blanks may be different for the various inocula used.

8.2.3. Inoculum from a surface water

Take a sample of an appropriate surface water. Keep under aerobic conditions and use on the day of collection. If necessary, the surface water can be concentrated by filtration or centrifugation. Use a suitable volume as inoculum.

8.3 Test

Provide a number of test vessels (7.2) sufficient for requirements in order to have

- test vessels (symbol F_T) for the test compound;
- blank vessels (symbol F_B) containing test medium and inoculum;
- vessels for checking the procedure (symbol F_C) containing the reference compound;
- if needed, vessels for checking a possible inhibitory effect of the test compound (symbol F_I),
- if needed vessels for checking a possible abiotic elimination (symbol F_S) containing the test compound but no inoculum, sterilized by addition of a suitable inorganic toxic compound to prevent microbial activity. Use, for example, 5 ml/l of a solution containing 10 g/l of mercury (II) chloride ($HgCl_2$). Add the same amount of the toxic substance two weeks after the test was begun.

The number of vessels needed will depend on the frequency of analysis and the confidence limits required for the final extent of biodegradation (see Annex 2). It is recommended that at least five bottles from sets F_T , F_B and F_C are analysed at the end of the test.

To separate large glass vessels (7.5), make the following additions:

Contents	Symbol	Mineral salts medium (6.2.2)	Inoculum (8.2)	Solutions	Water (6.1) to give the same volume in each vessel
Test substance	F_T	+	+	8.1.1 to give the required test concentration	+
Blank	F_B	+	+	-	+
Reference	F_C	+	+	8.1.2 to give 20 mg/l organic carbon	+
Abiotic elimination control (optional)	F_S	+	-	As F_T and $HgCl_2$ to give 50 mg/l (for example)	+
Inhibition check (optional)	F_I	+	+	As F_T and 8.1.2 to give test concentration and 20 mg/l organic carbon	+

Thoroughly mix the contents of each of the large bottles (7.5) in turn and dispense suitable aliquots (for example, 100 ml) into labelled test vessels (7.2). Add poorly-water soluble test substances directly to the test vessels (see Note 2). Ensure that the liquid to headspace

ratio and the test substance concentration are such that sufficient oxygen is available in the headspace to allow complete biodegradation (for example, avoid using a high substrate concentration and a small headspace). A headspace to liquid ratio of 1 : 2 is recommended. Seal the vessels when all additions have been made, for example, with butyl rubber septa and aluminium caps, place on an orbital shaker in the dark or diffuse light at 20 to 25 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), and start the shaker.

On the days of analysis, calibrate the IC analyser as required (see 8.4). Take samples at least weekly and more frequently if a complete biodegradation curve is required. Remove the requisite number of replicate vessels from the shaker, representing F_T , F_B , and F_C , and, if used, F_I . At the end of the test also take off bottles representing F_S , if used. The test shall normally run for 28 days but can be prolonged if degradation has started. The test may be finished before 28 days have elapsed if biodegradation has reached a plateau.

8.4 Determination of inorganic carbon (IC)

There are two methods available for measuring the amount of IC produced in the test. The methods can give slightly different results and therefore only one method should be used in a test run.

8.4.1 Acidification to pH <3

Calibrate the IC analyser (7.1) using appropriate IC standards (for example, 1% w/w CO_2 in N_2). Inject concentrated orthophosphoric acid (8.1.3) through the septum of each test vessel sampled to lower the pH of the medium to < 3 (for example, add 1 ml to 100 ml test medium). Replace the vessels on the shaker. After shaking for one hour, remove the vessels from the shaker, withdraw 1 ml aliquots of gas from the headspace in each vessel and inject into the IC analyser. Read off, and record, the concentration of IC (mg/l carbon).

Note 6. The principle of this method is that after acidification to pH < 3 and equilibration, the equilibrium constant for the distribution of CO_2 between the liquid and gaseous phases in the test vessels is approximately equal to one (for example, 0.95 at 20 °C). This should be checked for the test system as follows: Set up test vessels containing between 0.5 and 10 mg/l IC, using a solution of anhydrous sodium carbonate (Na_2CO_3) in CO_2 -free water (prepared by acidifying water (6.1) with concentrated orthophosphoric acid (8.1.3), sparging overnight with CO_2 -free air (6.3) and raising the pH to neutrality with alkali). Ensure that the ratio of the headspace volume to the liquid volume is the same as for the test (for example, 1 : 2). Acidify the vessels by injecting in an appropriate volume (for example, 1 ml) of concentrated orthophosphoric acid (8.1.3), shake for one hour, withdraw samples from the headspace and the liquid and analyse for IC. Check that the two concentrations are the same within experimental error.

Note 7. If DOC removal is to be measured (soluble test substances only) use the test mixture of the test vessels if no significant change is to be expected by the acidification (e.g. influence on the solubility of the test compound or disintegration of the inoculum) or use separate vessels for this purpose. Take samples of the liquid phase at least at the start and end of the test, filtrate or centrifuge and inject into the DOC analyser (see ISO 8245). If primary biodegradation is to be measured use the sample for substance specific analyses as well.

8.4.2 Conversion of CO_2 to carbonate

Calibrate the IC analyser (7.1) using appropriate standards. For example, by injecting solutions of sodium bicarbonate (NaHCO_3) in CO_2 -free water (see 8.4.1) in the range 0 to 20 mg/l IC. Inject 1 ml sodium hydroxide (6.3) through the septum of each test vessel

sampled and shake for one hour. Remove vessels from the shaker, allow to settle and withdraw, by syringe, suitable volumes (for example, 50 to 200 µl) from the liquid phase in each vessel. Alternatively, when using an IC-analyser connected to an automatic sampler the small beakers of the sampler are carefully filled to the brim, covered with a suitable cap to prevent CO₂ exchange with the air, e.g. aluminium foil and analyzed within 6 hours. Inject the samples into the IC analyser directly by syringe or with the help of an automatic sampler and read off the concentration of IC from the calibration curve.

Note 8. The principle of this method is that after the addition of alkali and shaking, the concentration of IC in the headspace is negligible. This should be checked for the test system.

Note 9. If DOC removal is to be measured (soluble test substances only) use the test mixture of the test vessels if no significant change is to be expected by bringing to alkaline conditions (e.g. influence on the solubility of the test compound or disintegration of the inoculum) or use separate vessels for this purpose. Take samples of the liquid phase at least at the start and end of the test, acidify to remove IC, filtrate or centrifuge and inject into the DOC analyser (see ISO 8245). If primary biodegradation is to be measured use the sample for substance specific analyses as well.

9. Calculation and expression of results

Assuming 100% mineralisation of the test substance, the theoretical maximum inorganic carbon (*ThIC*) in excess of that produced in the blank controls (i.e. endogenous respiration) equals the amount of organic carbon (*TOC*) added as the test substance to each test vessel at the start of the test, that is:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}$$

The total mass of inorganic carbon (*TIC*) in the test vessel is:

$$\text{TIC} = (\text{mg C in the liquid phase} + \text{mg C in the gas phase})$$

$$\text{that is:} \quad \text{TIC} = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad (\text{Equation 1})$$

where:

V_L = volume of liquid in the test vessel (l)

C_L = concentration of IC in the liquid phase (mg/l carbon)

V_H = volume of the headspace (l)

C_H = concentration of IC in the headspace (mg/l carbon)

The calculation of *TIC* for the two analytical methods used for measuring IC in this test are described below in clauses 9.1 and 9.2.

Percentage biodegradation D_m in each case is given by:

$$D_m = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100$$

where:

TIC_t = mg *TIC* in test bottle at time *t*

TIC_b = mean mg TIC in blank control bottles at time t

TOC = mg TOC initially added to the test vessel.

Calculate in the same way the biodegradation degree of the reference compound in the inoculum check vessels (F_C) and the inhibition check vessels (F_I) and without subtracting the blanks, of the test compound in the abiotic degradation control F_S if they were included, from the amounts of IC produced up to each sampling time.

Note 10. If there has been a significant increase in the TIC content of the sterile controls (F_S) over the test period, then abiotic degradation of the test substance has occurred.

Note 11. The determination of DOC at the start and end of the test and in between can be used to determine the final percentage biodegradation for water-soluble test substances based on DOC removal (see ISO 7827 and 8245).

Note 12. If specific analysis was performed at the start and end of the test then the primary biodegradation of parent test substance during the test may also be determined.

9.1 Acidification to pH <3

Acidification to pH <3 and equilibration results in the equalisation of the concentration of IC in the liquid and gaseous phases. Hence only the concentration of IC in the gas phase needs to be measured as $C_L = C_H$ (see Equation 1).

9.2 Conversion of CO₂ to carbonate

In this method calculations are performed as described in Equation 1 but the negligible amount of IC in the gaseous phase is ignored (that is, $(V_H \times C_H) \approx 0$ in Equation 1).

10. Expression of results

Compile a table of inorganic carbon measured (TIC) and percentage biodegradation (D_m) for each determination interval and each test vessel. Plot a biodegradation curve in per cent as a function of time and indicate lag phase and degradation phase if possible. If comparable results are obtained for the parallel test vessels F_T (<20 % difference) plot a mean curve, otherwise plot curves for each vessel (see example in Annex 1). Determine the mean value of per cent biodegradation in the plateau phase and indicate this maximum level of biodegradation as "degree of biodegradation of the test compound" in the test report. If the number of test vessels was not sufficient to indicate a plateau phase use the measured data of the last day of the test and calculate a mean value.

Plot in the same way a curve of the reference compound F_C and, if included of the abiotic degradation check F_S and the inhibition control F_I .

Record the amount of IC released in the blank controls (F_B), and in the vessels for checking abiotic degradation (F_S) and for checking any inhibitory effect of the test substance (F_I), if these vessels were included in the test.

Information on the toxicity of the test compound may be useful in the interpretation of test results showing a low biodegradation. If in vessels F_1 the degradation percentage is <25 % at the end of the test and insufficient degradation of the test compound is observed, it can be assumed that the test compound is inhibitory. In this case the test should be repeated using a lower test concentration, however, it should be noted that this will reduce the precision of the method. Alternatively another inoculum may be used. If in flask F_5 (abiotic degradation check if included) a significant amount (>10%) of released carbon dioxide is observed, abiotic degradation processes may have taken place.

11. Validity of results

The test is considered as valid if:

- the mean percentage degradation in the vessels F_C , containing the reference compound, is $\geq 60\%$ on the 14th day of incubation;
- the mean amount of IC produced from the blank controls at the end of the test is $\leq 15\%$ of the organic carbon added initially as the test compound.

12. Precision of the method

In the 1995/96 ring test of the method, the inter-laboratory variability (*reproducibility*) was as follows:

Test compound	Mean % D	Coefficient of variation	Number of laboratories
Aniline	90	16%	17
1-Octanol	85	12%	14

Variability between replicates in the same test run (*replicability*) was generally $\leq 5\%$ with aniline and $\leq 10\%$ with 1-octanol.

For ring test participants who determined IC by the acidification method, the mean ratio of IC in the headspace to that in the liquid phase after equilibration was 1.0 (coefficient of variation = 12%, n = 9).

Laboratories using the alkali method generally found negligible (that is, $\leq 0.01\%$ w/w) IC in the headspace after equilibration.

Note 13. The ring test conditions were as follows:

- Test concentration - 20 mg/l organic carbon
- Inoculum - Activated sludge (washed and/or aerated prior to use) at a final concentration of 4 mg/l dry solids
- Headspace to liquid ratio - 1 : 2

- Replication - Five bottles from F_T and F_B on Day 28.

13. Test report

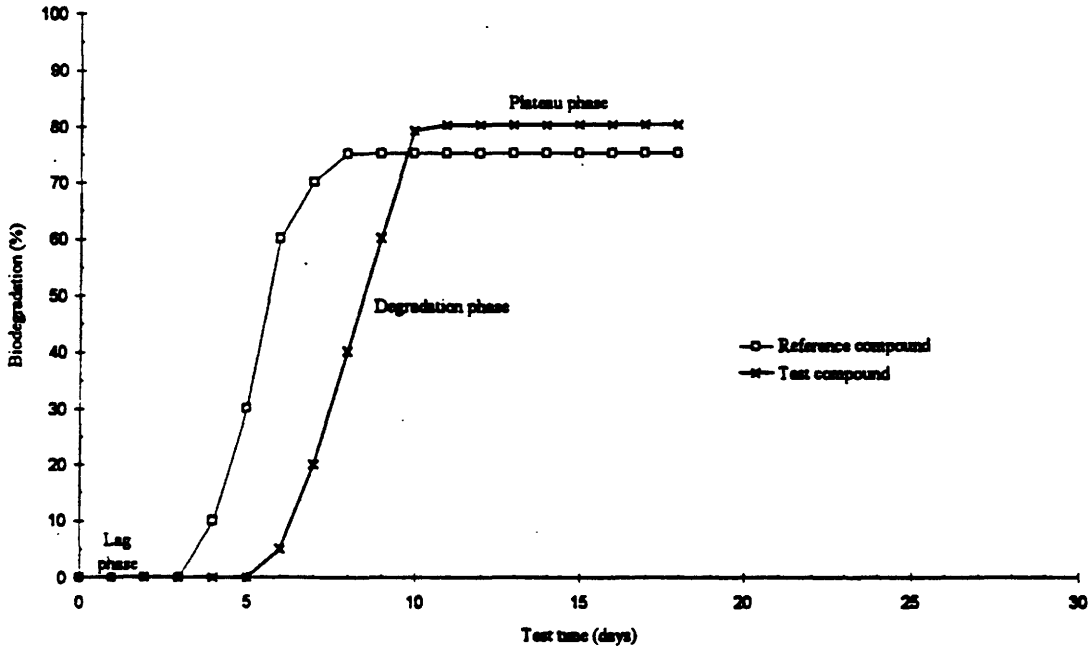
The test report shall provide all pertinent information, particularly the following:

- a) a reference to this International Standard;
- b) any information necessary to identify the substance subjected to the test;
- c) the name and concentration of the reference substance used;
- d) all the results obtained (in tabular form) and the degradation curve, including the results obtained for the inoculum activity check tests (vessel F_C) and for the inhibition check tests (vessel F_I) and biotic degradation check tests (vessel F_S) if they were included;
- e) the main characteristics of the inorganic carbon (IC) analyser employed (and if used, organic carbon analyser and/or method of specific analysis for the test substance);
- f) the method of IC analysis employed;
- g) a brief description of the test vessel used;
- h) the reasons for any rejection of the test results (see clause 11);
- i) any pre-conditioning or pre-exposure of the inoculum;
- j) the concentration of the test substance used and the organic carbon content of this concentration;
- k) the source, characteristics and amount of inoculum used;
- l) any other facts that are relevant to the procedure followed.

ANNEX 1

(informative)

Biodegradation curves (reference substance aniline)



ANNEX 2

(informative)

Statistical treatment of results

If it is required to know the precision with which percentage biodegradation (% D) is determined, take at least five replicate test bottles and the same number of blank control bottles on a single occasion.

Calculate the mean IC in the blank bottles (TIC_b) and % D for each individual test bottle.

Calculate the mean of the separate % D values and their standard deviation.

Calculate the confidence limits for the mean value of % D as:

$$\pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$$

where:

t = Student's 't' value for (n-1) degrees of freedom at the selected probability level (e.g. 95%)

s = standard deviation (σ_{n-1})

n = number of individual values used to determine % D.

ANNEX 3

(informative)

References

Birch, R.R. and Fletcher, R.J. (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. *Chemosphere* 23, 507-524.

Struijs, J. and Stoltenkamp, J. (1990). Headspace determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 19, 204-211.

Struijs, J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. and Dekkers, A.L.M. (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6, 319-327.



EXPLANATORY REPORT
RAPPORT EXPLICATIF

ISO/ CD 14593

will supersede:
remplacera: -

ISO/TC 147 /SC 5

Secretariat

IRTU-UK

This form should be sent to the ISO Central Secretariat, together with the English and French versions of the committee draft, by the secretariat of the technical committee or subcommittee concerned (see 2.5.9 of part 1 of the ISO/IEC Directives)

Ce formulaire doit être envoyé au Secrétariat central de l'ISC en même temps que les versions anglaise et française du projet de comité, par le secrétariat du comité technique ou du sous-comité concerné (voir 2.5.9 de la partie 1 des Directives ISO/CEI)

The accompanying document is submitted for circulation to member body vote as a DIS, following consensus of the P-members of the committee obtained

Le document ci-joint est soumis, pour diffusion comme DIS, au vote comité membre, suite au consensus des membres (P) du comité obtenu

on 19.....
le

at the meeting of TC...../SC..... see resolution No. in document.....
à la réunion du voir résolution n° dans le

by postal ballot initiated on 20-6-19.96.....
par un vote par correspondance démarré le

P-members in favour: Belgium, Czech Republic, Finland, France, Germany, Italy, Mexico
Membres (P) approuvant le projet: The Netherlands, Norway, Poland, Romania, Russian Federation, Slovakia, Turkey, United Kingdom, USA

P-members voting against:
Membres (P) désapprouvant:

P-members abstaining: Switzerland
Membres (P) s'abstenant:

P-members who did not vote: Austria, Canada, Denmark, Hungary, Islamic Republic of Iran, Japan, Sweden
Membres (P) n'ayant pas voté:

Remarks/Remarques

Recommended by the convenor and secretary for DIS enquiry.

I hereby confirm that this draft meets the requirements of part 3 of the ISO/IEC Directives
Je confirme que ce projet satisfait aux prescriptions de la partie 3 des Directives ISO/CEI

Date 1996-12-12

Name and signature of the secretary
Nom et signature du secrétaire