

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
9509

Première édition  
1989-10-15

---

---

**Qualité de l'eau — Méthode pour l'évaluation de  
l'effet inhibiteur sur la nitrification par des  
micro-organismes de boues activées par des  
produits chimiques ou des eaux résiduaires**

**iTeh STANDARD PREVIEW**

**(standards.iteh.ai)**

*Water quality — Method for assessing the inhibition of nitrification of activated  
sludge micro-organisms by chemicals and waste waters*

ISO 9509:1989

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35b2529f-1e9b-4f5c-aacc-  
ce34233f6a96/iso-9509-1989](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35b2529f-1e9b-4f5c-aacc-ce34233f6a96/iso-9509-1989)

INTERNATIONAL

ISO



Numéro de référence  
ISO 9509 : 1989 (F)

## Avant-propos

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

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 9509 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35b2529f-1e9b-4f5c-aacc-ce34233f6a96/iso-9509-1989>

Les annexes A et B font partie intégrante de la présente Norme internationale. L'annexe C est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1989

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

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

Imprimé en Suisse

# Qualité de l'eau — Méthode pour l'évaluation de l'effet inhibiteur sur la nitrification par des micro-organismes de boues activées par des produits chimiques ou des eaux résiduaires

**AVERTISSEMENT** — Les boues activées peuvent contenir des organismes pathogènes. Par conséquent, des précautions appropriées doivent être prises pour les manipuler.

Les produits pour essais toxiques et ceux dont les propriétés sont inconnues doivent être manipulés avec soin.

## 1 Domaine d'application

**1.1** La présente Norme internationale prescrit une méthode pour l'évaluation des effets inhibiteurs à court terme des produits à expérimenter sur les bactéries nitrifiantes dans de la boue activée. L'effet inhibiteur est évalué sur une période d'exposition de 4 h.

**1.2** La méthode est applicable aux boues activées nitrifiantes provenant des eaux d'égout domestiques. On peut également utiliser des boues nitrifiantes provenant d'eaux d'égout synthétiques.

**1.3** Dans un premier temps, l'activité nitrifiante des boues activées est vérifiée en ajoutant un inhibiteur spécifique (par exemple de l'allylthiouree).

Si le taux de nitrification (voir 8.1) se situe à l'intérieur d'une plage qui convient pour l'essai [2 à 6,5 milligrammes d'azote par gramme de masse à sec par heure (2 mg de N/(g·h) à 6,5 mg de N/(g·h)], on utilise la boue directement, sinon il faut procéder à des ajustements (voir article 9).

**1.4** Elle s'applique à des produits chimiques non volatils qui sont solubles dans l'eau et également à des eaux résiduaires. On peut utiliser des substances insolubles, pourvu qu'on prenne soin d'assurer la meilleure homogénéité possible.

**1.5** Il convient de signaler que des boues provenant de sources différentes réagissent différemment à une concentration donnée d'un inhibiteur et ceci est dû probablement, au moins en partie, à une réaction entre l'inhibiteur et les constituants de la boue ayant pour résultat une annulation partielle de l'effet toxique.

Puisque l'essai ne dure que 4 h, il ne faut pas oublier non plus que les effets inhibiteurs peuvent diminuer ou augmenter sur une période plus longue, par exemple, dans le système de traitement des boues activées en continu.

## 2 Références normatives

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

ISO 6107-1: 1986, *Qualité de l'eau — Vocabulaire — Partie 1.*

ISO 6107-3: 1985, *Qualité de l'eau — Vocabulaire — Partie 3.*

## 3 Définitions

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

**3.1 produits chimiques pour essai:** Substances chimiques pures, mélanges, produits chimiques et eaux résiduaires.

**3.2 boue activée:** Amas biologique (floc) formé, au cours du traitement d'une eau résiduaire, par la croissance de bactéries et d'autres micro-organismes en présence d'oxygène dissous [ISO 6107-1].

**3.3 matières solides en suspension dans la liqueur mixte:** Concentration des matières solides dans la liqueur mixte, exprimée en matière sèche déterminée dans des conditions définies [ISO 6107-3].

NOTE — Dans la présente Norme internationale, la concentration de boue activée est déterminée en tant que masse à sec, dans un volume, après filtration et séchage à environ 100 °C à masse constante. Elle est exprimée en milligrammes par litre ou en grammes par litre.

**3.4 CE 50:** Concentration d'un produit à expérimenter déduite par calcul ou interpolation produisant une inhibition de nitrification de 50 % par rapport à un mélange témoin sans produit à expérimenter.

**3.5 nitrification:** Oxydation des sels d'ammonium par les bactéries. Généralement, les produits ultimes d'une telle oxydation sont des nitrates [ISO 6107-1].

NOTE — Des nitrites peuvent être formés comme produits intermédiaires.

## 4 Principe

Exécution de l'essai à une température constante généralement comprise entre 20 °C et 25 °C dans une atmosphère exempte de poussière et de vapeurs toxiques. Aération parallèle d'une boue nitrifiante en présence et en l'absence d'un produit à expérimenter. Évaluation de la différence en concentration d'azote oxydé (nitrite N plus nitrate N) produite par l'oxydation des sels d'ammonium. Calcul de l'inhibition de la nitrification des micro-organismes des boues activées par le produit à expérimenter.

## 5 Réactifs et matériaux

**5.1 Eau,** déminéralisée ou distillée.

**5.2 Boue activée nitrifiante**

Prélever une quantité de boue d'une installation de traitement nitrifiant qui reçoit les eaux d'égout domestiques ou d'une installation à l'échelle laboratoire qui traite les eaux d'égout domestiques ou synthétiques. Maintenir la boue en aérobie et l'utiliser de préférence dans les 24 h suivant le prélèvement.

Avant utilisation, centrifuger la boue (à titre d'exemple, 1 100 g pendant 5 min) et jeter le liquide surnageant. Laver le résidu avec le même volume du milieu (5.3), diluer le mélange résultant à 1 : 10 avec de l'eau (5.1), centrifuger à nouveau et jeter de nouveau le liquide surnageant. Remettre enfin en suspension la boue dans un volume approprié du milieu (5.3) pour obtenir la concentration requise de matières solides en suspension dans la liqueur mixte (à titre d'exemple, 3 g/l) et aérer jusqu'à l'utilisation.

**5.3 Milieu**

Dissoudre 5,04 g de monohydrogencarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) et 2,65 g de sulfate d'ammonium [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] dans 1 litre d'eau (5.1).

NOTE — Ce milieu, lorsqu'il est dilué à 1 : 10, contient 56 mg/l de N et a un pH d'environ 7,6. Il permet la production d'au moins 25 mg/l d'azote oxydé sans modifier le pH.

**5.4 Inhibiteur de référence**

Dissoudre 1,16 g d'allylthiourée (ATU) dans 1 litre d'eau (5.1).

NOTE — D'autres inhibiteurs peuvent être utilisés, par exemple la 2-chloro-6-(trichlorométhyl)pyridine, mais il convient d'étudier la concentration requise et le mode d'addition.

**5.5 Solution mère du produit à expérimenter**

Préparer une solution mère du produit à expérimenter ou mettre en suspension celui-ci dans de l'eau distillée (5.1) de façon à obtenir une concentration satisfaisante, par exemple, 1 g/l ou 10 g/l. Les eaux résiduaires peuvent être utilisées sans dilution.

## 6 Appareillage

**6.1 Fioles coniques,** par exemple d'un volume nominal de 500 ml.

**6.2 Pipettes Pasteur,** ou un autre système pour l'aération.

**6.3 Alimentation en air comprimé humidifié,** en faisant passer l'air à travers un flacon de lavage rempli d'eau.

**6.4 Agitateur** (variante de l'aération pendant l'incubation des mélanges à expérimenter).

**6.5 Appareillage,** nécessaire à la détermination analytique de l'ammoniac et de l'azote oxydé présents en solution.

**6.6 Appareillage de filtration.**

**6.7 Filtre,** en papier ou en fibre de verre, ne dégageant pas d'azote.

## 7 Mode opératoire

**7.1** Utiliser des boues ayant des taux de nitrification compris entre 2 mg de N/(g.h) et 6,5 mg de N/(g.h). Si le taux se situe en dehors de cette plage, il est indispensable de modifier le mode opératoire (voir article 9).

**7.2** Ajouter le même volume de boue nitrifiante lavée (5.2) à une série de fioles coniques de 500 ml (6.1) de façon à obtenir une concentration finale de matières solides en suspension dans la liqueur mixte de 1 500 mg/l (voir tableau B.1).

Ajouter 25 ml du milieu (5.3) à chaque récipient d'essai et ajouter une gamme de volumes de la solution à expérimenter (5.5) (en général 5) ainsi qu'une quantité suffisante d'eau distillée (5.1) pour obtenir un volume final de 250 ml (voir annexe B).

Inclure un récipient d'essai avec de la boue, du milieu et de l'eau, mais sans produit à expérimenter, et un récipient d'essai de référence avec de la boue, du milieu, de l'eau et 2,5 ml de l'inhibiteur de référence (5.4). Si cela s'avère nécessaire (comme contrôle supplémentaire), prélever un échantillon d'essai témoin afin de déterminer la concentration d'azote ammoniacal.

**7.3** Incuber tous les récipients d'essai pendant 4 h à une température constante (voir article 4) et aérer soit avec de l'air comprimé humidifié (6.3), au moyen de pipettes Pasteur (6.2), soit en agitant pour maintenir la boue en suspension et la concentration de l'oxygène dissous au-dessus de 2 mg/l. L'incubation doit avoir lieu à l'obscurité ou sous un éclairage diffus.

NOTE — Il se peut que des eaux résiduaires fortes requièrent une aération supplémentaire pour maintenir la concentration d'oxygène dissous au-dessus de 2 mg/l.

**7.4** Après 4 h, prélever un échantillon, de volume adéquat, de chaque récipient d'essai pour analyser l'azote oxydé et les concentrations d'azote ammoniacal. Filtrer les échantillons, avant l'analyse, sur un filtre en fibre de verre ou en papier lavé (6.7).

**7.5** Un exemple des volumes nécessaires à la mise en place de l'essai figure en annexe B.

## 8 Calcul et expression des résultats

**8.1** Calculer le pourcentage d'inhibition de formation d'azote oxydé N comme suit:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{C_c - C_t}{C_c - C_b} \times 100 \quad \dots (1)$$

où

$C_c$  est la concentration, en milligrammes par litre, d'azote oxydé N dans le récipient d'essai témoin, sans inhibiteur, après incubation;

$C_t$  est la concentration, en milligrammes par litre, d'azote oxydé N dans le récipient contenant le produit à expérimenter, après incubation;

$C_b$  est la concentration, en milligrammes par litre, d'azote oxydé N dans le récipient contenant l'inhibiteur de référence, après incubation.

Si l'échantillon contient du nitrate, par exemple, de l'eau usée d'une région où l'eau du robinet présente des concentrations significatives de nitrates, il est nécessaire de soustraire de  $C_t$  les concentrations des nitrates des milieux réactionnels provenant de l'échantillon.

NOTE — Bien qu'il soit préférable de mesurer l'azote oxydé, le calcul suivant du pourcentage d'inhibition à partir de la disparition d'azote ammoniacal peut être substitué au calcul ci-dessus, mais il est important de noter que la disparition de l'ammoniaque n'est pas nécessairement due à la nitrification.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{C_i - C_e}{C_o - C_e} \times 100 \quad \dots (2)$$

où

$C_i$  est la concentration, en milligrammes par litre, d'azote ammoniacal dans le récipient d'essai après incubation;

$C_e$  est la concentration, en milligrammes par litre, d'azote ammoniacal dans l'essai témoin après incubation;

$C_o$  est la concentration, en milligrammes par litre, d'azote ammoniacal au début de l'essai.

**8.2** Tracer la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration d'inhibiteur et calculer la CE 50 par interpolation.

En variante, utiliser un programme de régression linéaire pour évaluer la CE 50.

## 9 Validité des résultats

Vérifier l'activité nitrifiante de la boue en comparant les résultats de l'essai témoin avec ceux du récipient contenant l'inhibiteur de référence. Après la période d'incubation de 4 h, il est indispensable que la concentration d'azote oxydé n'ait pas augmenté en présence de l'inhibiteur de référence, puisque celui-ci inhibe spécifiquement la nitrification. (Voir annexe A.)

Si c'est le cas, refaire l'essai en s'assurant que la concentration exacte d'inhibiteur a été ajoutée. Si l'inhibition n'a toujours pas eu lieu, il faut prélever de la boue d'une source différente.

Le fait que la nitrification ait eu lieu dans l'essai témoin est important, mais il est indispensable qu'il reste à la fin de la période d'essai une quantité suffisante de sel d'ammonium pour s'assurer que le substrat n'avait pas eu d'effet limitateur sur le taux. Pour l'évaluation de l'inhibition avec ce mode opératoire, on considère des taux de nitrification compris entre 2 mg de N/(g.h) et 6,5 mg de N/(g.h) comme étant satisfaisants. Si le taux de nitrification est inférieur à 2 mg de N/(g.h), utiliser de la boue provenant d'une autre source, ou bien augmenter la proportion d'agents nitrifiants dans la boue, par exemple, en procédant à des cultures avec de la boue pendant quelques semaines avec les eaux d'égout synthétiques pendant un temps de séjour approprié (par exemple 6 h) dans une installation de traitement des boues activées à l'échelle de laboratoire (voir [4]).

Si le taux de nitrification est supérieur à 6,5 mg de N/(g.h), utiliser soit une période d'incubation plus courte, soit un volume plus important de milieu concentré (5.3) pour s'assurer que la concentration de sel d'ammonium n'a pas d'effet limitateur sur le taux et que le pH ne diminue pas. Si nécessaire, effectuer un essai préliminaire pour déterminer le volume approprié de milieu à utiliser.

NOTE — Il est à noter, cependant, qu'avec une proportion plus importante d'agents nitrifiants, le rapport agent nitrifiant/inhibiteur sera modifié et pourra donner lieu à une CE 50 différente.

## 10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

- nom et spécifications du produit à expérimenter;
- taux de nitrification spécifique de la boue activée;
- origine, concentration de la boue activée et toute indication de son prétraitement;
- résultats de l'essai, le CE 50 et toutes les données issues des mesures, la courbe d'inhibition;
- inhibition provoquée par l'inhibiteur de référence spécifique;
- température d'essai, en indiquant ses limites;
- autres faits non précisés dans la présente Norme internationale, concernant le mode opératoire utilisé.

## Annexe A (normative)

### Détermination de l'activité nitrifiante des boues activées

Prendre deux fioles coniques de 500 ml et ajouter dans chacune le même volume de boue activée lavée (à titre d'exemple 125 ml) d'une concentration de matières en suspension déterminée (approximativement 3 g/l). Ajouter 25 ml du milieu (5.3) dans chaque récipient et 2,5 ml de l'inhibiteur de référence (5.4) dans un des récipients seulement. Rajouter ensuite de l'eau distillée (5.1) pour avoir un volume de 250 ml dans chacun des récipients. Aérer et agiter les récipients pendant 4 h de façon à obtenir un bon mélange et à maintenir les solides en suspension et que la concentration d'oxygène dissous soit au moins de 2 mg/l.

Au bout de 4 h, prélever un échantillon de chaque récipient et le filtrer, par exemple sur des filtres en papier ou en fibre de verre et garder les filtrats pour déterminer la concentration d'ammoniac et d'azote oxydé (nitrite plus nitrate).

À partir de ces résultats, calculer le taux de nitrification spécifique, en milligrammes d'azote par gramme heure, comme suit:

$$\frac{C_t - C_b}{MLSS \times 4}$$

où

$C_t$  est la concentration, en milligrammes par litre, d'azote oxydé dans le mélange réactionnel après 4 h;

$C_b$  est la concentration, en milligrammes par litre, d'azote oxydé dans le mélange contenant l'inhibiteur de référence après 4 h;

$MLSS$  est la concentration, en grammes par litre, de matières solides en suspension dans la liqueur mixte dans le récipient d'essai.

NOTE — En variante, la concentration d'azote ammoniacal après 4 h peut être utilisée comme suit, mais il est important de noter que la disparition de l'azote ammoniacal n'est pas nécessairement due à la nitrification.

Le taux de nitrification spécifique, en milligrammes d'azote ammoniacal par gramme heure, est

$$\frac{C_b(\text{NH}_4) - C_f(\text{NH}_4)}{MLSS \times 4}$$

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

$C_b(\text{NH}_4)$  est la concentration, en milligrammes par litre, d'azote ammoniacal dans le mélange contenant un inhibiteur de référence;

$C_f(\text{NH}_4)$  est la concentration, en milligrammes par litre, d'azote ammoniacal dans le mélange réactionnel.

ISO 9509:1989  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35b2529f-1e9b-4f5c-aacc-ce34233f6a96/iso-9509-1989>

## Annexe B (normative)

### Exemple pour la préparation de l'essai

Tableau B.1

N° du récipient	1	2	3	4	5	6	7
Milieu (5.3) (ml)	25	25	25	25	25	25	25
Boue activée (ml)	125	125	125	125	125	125	125
Inhibiteur de référence ATU (5.4) (ml)	0	0	0	0	0	0	2,5
Eau distillée (5.1) (ml)	100	99,75	99,2	97,5	92	75	97,5
Solution mère <sup>1)</sup> du produit à expérimenter (ml)	0	0,25	0,8	2,5	8,0	25	0
Concentration de la subs- tance à expérimenter (mg/l)	0	1	3,2	10	32	100	0
Volume total (ml)	250	250	250	250	250	250	250

Concentration de boue activée = 3,0 g de matières en suspension par litre.

1) Solution mère: 1 g de substance à expérimenter par litre.

NOTE — La substance à expérimenter non diluée ne doit pas entrer en contact avec la boue.

(standards.iteh.ai)

[ISO 9509:1989](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35b2529f-1e9b-4f5c-aacc-ce34233f6a96/iso-9509-1989)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35b2529f-1e9b-4f5c-aacc-  
ce34233f6a96/iso-9509-1989](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35b2529f-1e9b-4f5c-aacc-ce34233f6a96/iso-9509-1989)

**Annexe C**  
**(informative)**

**Bibliographie**

- [1] ISO 6777 : 1984, *Qualité de l'eau — Dosage des nitrites — Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire.*
- [2] ISO 7150-1 : 1984, *Qualité de l'eau — Dosage de l'ammonium — Partie 1: Méthode spectrométrique manuelle.*
- [3] ISO 7890-1 : 1986, *Qualité de l'eau — Dosage des nitrates — Partie 1: Méthode spectrométrique au diméthyl-2,6-phénol.*
- [4] EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITIES, *Activated sludge simulation tests. EEC Directive 79/831 Annex V, DG XI/605/82 (1986).*
- [5] PAINTER, H.A., *A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in micro-organisms Wat. Res. 4, 393-450 (1970).*

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

[ISO 9509:1989](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35b2529f-1e9b-4f5c-aacc-ce34233f6a96/iso-9509-1989)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35b2529f-1e9b-4f5c-aacc-ce34233f6a96/iso-9509-1989>

---

---

**CDU 628.356 : 66.097.8**

**Descripteurs :** eau, qualité, boue de traitement des eaux, micro-organisme, analyse microbiologique, détermination, inhibition.

Prix basé sur 6 pages

---

---