
**Qualité de l'eau — Évaluation en milieu
aqueux de la biodégradabilité aérobie
ultime des composés organiques —
Détermination de la demande biochimique
en oxygène en fiole fermée à deux phases**

*Water quality — Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic
biodegradability of organic compounds — Determination of biochemical
oxygen demand in a two-phase closed bottle test*

ISO 10708:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/794ba1d1-724b-4e42-8d00-2b103144a433/iso-10708-1997>



Sommaire

1 Domaine d'application	1
2 Référence normative	1
3 Définitions	2
4 Principe.....	3
5 Environnement d'essai	3
6 Réactifs.....	3
7 Appareillage	4
8 Mode opératoire.....	5
9 Calcul et expression des résultats.....	9
10 Validité de l'essai.....	11
11 Rapport d'essai.....	11
Annexe A (informative) Calcul de la demande théorique en oxygène (DThO).....	13
Annexe B (informative) Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO).....	14
Annexe C (informative) Correction de la consommation en oxygène pour éliminer l'interférence avec la nitrification	15
Annexe D (informative) Exemple de courbe de dégradation	17
Annexe E (informative) Bibliographie	18

© ISO 1997

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

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse
Internet central@iso.ch
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

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 vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 10708 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Les annexes A, B, C, D et E de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10708:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/794ba1d1-724b-4e42-8d00-2b103144a433/iso-10708-1997>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10708:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/794ba1d1-724b-4e42-8d00-2b103144a433/iso-10708-1997>

Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Détermination de la demande biochimique en oxygène en fiole fermée à deux phases

AVERTISSEMENT – PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ – Les boues activées et les eaux usées peuvent contenir des organismes potentiellement pathogènes. Il convient donc de prendre des précautions appropriées en les manipulant. Il convient également de manipuler avec précaution les composés d'essai toxiques et ceux dont on ne connaît pas les propriétés.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour l'évaluation de la biodégradabilité ultime des composés organiques, sous l'action de micro-organismes aérobies, notamment les composés peu solubles dans l'eau, présents à une concentration donnée.

NOTE 1 Les conditions décrites dans la présente Norme internationale ne correspondent pas nécessairement aux conditions optimales d'obtention du niveau maximal de biodégradation.

La présente méthode est applicable aux composés organiques qui

- sont solubles dans l'eau ou peu solubles dans l'eau à la concentration utilisée dans les conditions de l'essai;
- n'adsorbent pas, ou n'ont pas d'effet sur l'électrode à oxygène (voir 8.1.2 et 8.3.4);
- ne sont pas inhibiteurs vis-à-vis des micro-organismes d'essai à la concentration choisie pour l'essai.

NOTE 2 Concernant les mesures spéciales permettant d'introduire, dans les récipients d'essai, des composés à expérimenter peu solubles dans l'eau, voir l'ISO 10634.

NOTE 3 Les effets inhibiteurs peuvent être déterminés comme décrit en 8.1.4 et 8.3.1, ou à l'aide de toute autre méthode permettant de déterminer l'effet inhibiteur d'une substance sur les bactéries (voir par exemple l'ISO 8192).

2 Références normatives

La norme suivante contient 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, l'édition indiquée était 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 l'édition la plus récente de la norme indiquée ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 10634:1995, *Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.*

3 Définitions

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

3.1 biodégradation ultime

transformation totale d'un composé chimique organique par les micro-organismes, en présence d'oxygène, en dioxyde de carbone, eau, sels minéraux de tout autre élément présent (minéralisation) et nouveaux constituants cellulaires microbiens (biomasse)

3.2 biodégradation primaire

transformation structurelle d'un composé chimique organique par les micro-organismes, résultant en la perte d'une propriété spécifique

3.3 demande biochimique en oxygène (DBO)

concentration en masse d'oxygène dissous consommé, dans des conditions définies, lors de l'oxydation biologique aérobie d'un composé chimique ou d'une matière organique dans l'eau; exprimée ici en milligrammes d'oxygène consommé par milligramme ou par gramme de composé à expérimenter

3.4 demande théorique en oxygène (DThO)

quantité maximale théorique d'oxygène nécessaire pour oxyder complètement un composé chimique, calculée à partir de la formule moléculaire; exprimée ici en milligrammes d'oxygène requis par milligramme ou par gramme de composé à expérimenter

3.5 demande chimique en oxygène (DCO)

concentration en masse d'oxygène, équivalente à la quantité d'oxydant spécifié consommé par un composé chimique ou une matière organique lorsqu'un échantillon d'eau est traité avec cet oxydant dans les conditions définies; exprimée ici en milligrammes d'oxygène consommé par milligramme ou par gramme de composé à expérimenter

3.6 carbone organique dissous (COD)

partie du carbone organique dans l'eau qui ne peut être éliminé par la séparation des phases spécifiée, par exemple par centrifugation à $40\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ pendant 15 min, ou par filtration sur membrane d'un diamètre de pores de $0,2\ \mu\text{m}$ à $0,45\ \mu\text{m}$

3.7 concentration des matières en suspension dans une boue activée

quantité de matière solide obtenue par filtration ou centrifugation d'un volume connu de boue activée après filtration ou centrifugation puis séchage à environ $105\ ^\circ\text{C}$ jusqu'à masse constante

3.8 phase de latence

durée comprise entre le début d'un essai et la fin de l'adaptation et de la sélection des micro-organismes de dégradation, ainsi que l'augmentation du taux de biodégradation d'un composé chimique ou d'une matière organique jusqu'à environ 10 % du niveau théorique maximal de biodégradation; exprimée en jours

3.9 niveau maximal de biodégradation

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

3.10 phase de dégradation

durée comprise entre la fin de la phase de latence d'un essai et l'instant où environ 90 % du niveau maximal de biodégradation est atteint; exprimé en pourcentage

3.11 phase de plateau

durée comprise entre la fin de la phase de biodégradation, lorsque le niveau maximal de biodégradation a été atteint, et la fin de l'essai

3.12 préexposition

préincubation d'un inoculum en présence du composé à expérimenter, destinée à accroître l'aptitude de l'inoculum à dégrader le composé par adaptation et sélection des micro-organismes

3.13 préconditionnement

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

4 Principe

La biodégradation des composés organiques par des micro-organismes aérobies est déterminée dans un milieu aquatique. Le composé organique constitue la seule source de carbone et d'énergie dans ce milieu. Le milieu inoculé est agité ou remué dans des fioles fermées, contenant des volumes connus de milieu et d'air, afin d'assurer un état stable de la répartition de l'oxygène entre les phases liquide et gazeuse. La dégradation est suivie par des mesurages réguliers de la concentration en oxygène dissous dans la phase aqueuse sur une période pouvant atteindre 28 jours. La quantité totale d'oxygène consommée dans les fioles d'essai est calculée à partir de la différence entre les concentrations en oxygène dissous mesurées dans la fiole d'essai à blanc et dans les fioles d'essai, divisée par la valeur de saturation de l'oxygène dans des conditions normales, et multipliée par la teneur totale en oxygène présent à l'origine dans les phases gazeuse et liquide. La biodégradabilité est calculée à partir de la consommation totale en oxygène, divisée par la demande théorique en oxygène (DThO) ou la demande chimique en oxygène (DCO), exprimée en pourcentage.

5 Environnement d'essai

L'incubation doit être menée à l'obscurité ou sous lumière diffuse, dans une enceinte maintenue à une température constante ($\pm 0,5$ °C) comprise entre 20 °C et 25 °C.

6 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

6.1 Eau

Eau distillée ou déionisée contenant moins de 2 mg/l de COD et/ou moins de 10 % de la teneur initiale en carbone organique introduite par le composé à expérimenter.

6.2 Milieu d'essai

6.2.1 Composition

6.2.1.1 Solution A

Dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4)	8,5 g
Monohydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4)	21,75 g
Monohydrogénophosphate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33,4 g
Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)	0,5 g
Eau (6.1) q.s.p.	1 litre

NOTE – La composition correcte du milieu peut être vérifiée en mesurant la valeur du pH. Il est recommandé que cette valeur soit de 7,4.

6.2.1.2 Solution B

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

6.2.1.3 Solution C

Dissoudre 27,5 g de chlorure de calcium anhydre (CaCl_2) dans 1 000 ml d'eau (6.1).

6.2.1.4 Solution D

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

NOTE – Pour éviter d'avoir à préparer cette solution juste avant l'emploi, ajouter une goutte d'acide chlorhydrique concentré (HCl) ou 0,4 g/l d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA).

6.2.2 Préparation du milieu d'essai

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

- 10 ml de la solution A;
- 1 ml de chacune des solutions B à D.

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau (6.1).

6.3 Solution d'hydroxyde de sodium

Dissoudre de l'hydroxyde de sodium (NaOH) dans l'eau (6.1) pour obtenir une solution entre 0,1 mol/l et 0,5 mol/l.

6.4 Solution d'acide chlorhydrique

Dissoudre de l'acide chlorhydrique (HCl) dans l'eau (6.1) pour obtenir une solution entre 0,1 mol/l et 0,5 mol/l.

7 Appareillage

S'assurer que la verrerie est totalement propre, et plus particulièrement, qu'elle est exempte de matières organiques ou toxiques. Utiliser le matériel courant de laboratoire, et ce qui suit.

7.1 Fioles d'incubation, étanches aux gaz, par exemple des fioles à col étroit, de 200 ml à 300 ml de volume, munies de bouchons appropriés (tels que des bouchons en verre rodé, bouchons à vis ou bouchons en caoutchouc butyle), protégées de la lumière (par exemple réalisées en verre brun). Il est recommandé d'utiliser des bouchons à pinces.

Marquer chacune des fioles de façon indélébile. Si l'électrode à oxygène utilisée n'a pas d'agitateur incorporé, équiper chaque fiole d'un agitateur magnétique recouvert de polytétrafluoroéthylène. Présélectionner des fioles d'un volume type tel que l'écart-type de part et d'autre du volume moyen du lot de fioles soit inférieur à 1 ml, ou mesurer puis enregistrer les volumes individuels des fioles numérotées avec une exactitude de 1 ml. Graisser soigneusement les bouchons des fioles avec une graisse silicone neutre afin d'assurer une fermeture correcte tout en permettant de retirer le bouchon facilement.

7.2 Électrode à oxygène, destinée à mesurer dans la gamme allant de 0 mg/l à 10 mg/l, avec une précision de 1 %.

L'état stable doit être atteint en 2 min environ. Monter l'électrode, par exemple dans un bouchon inerte s'adaptant parfaitement dans le col en verre rodé de la fiole d'incubation. Utiliser de préférence des électrodes à agitateur incorporé.

7.3 Agitateurs magnétiques, à régulation de vitesse, si nécessaire.

Les agitateurs fixés à l'électrode à oxygène doivent être réalisés en un matériau tel qu'aucun des composants des revêtements plastiques ne vienne contaminer le milieu d'essai et qu'aucune adsorption des composés à expérimenter ne se produise. Chauffer les récipients d'essai en les agitant et en augmentant la température d'essai doit être évité.

7.4 Dispositif d'agitation, si nécessaire.

7.5 **Bain d'eau**, ou tout dispositif garantissant un contrôle exact de la température, à $\pm 0,5$ °C dans la gamme allant de 20 °C à 25 °C.

7.6 pH-mètre.

7.7 **Analyseur de carbone organique dissous (COD)** (seulement dans les cas spécifiques, voir la note 3 en 8.3.4).

8 Mode opératoire

8.1 Préparation du composé à expérimenter et du composé de référence

8.1.1 Composés à expérimenter solubles dans l'eau

Préparer dans l'eau (6.1) ou dans le milieu d'essai (6.2), une solution mère des composés à expérimenter solubles dans l'eau. Diluer une quantité suffisante de cette solution dans le milieu d'essai (6.2) afin d'obtenir une concentration d'essai finale correspondant à 100 mg/l de DThO (voir 8.3.3). Pour le calcul de la DThO, voir l'annexe A. S'il n'est pas possible de calculer la DThO à partir de la formule, utiliser les analyses élémentaires ou déterminer la DCO (voir l'annexe B). Il faut être conscient du fait que la détermination de la DCO des substances peu solubles dans l'eau peut s'avérer difficile. Lorsque la réduction de la DCO doit être déterminée, mesurer la concentration équivalente de l'essai DCO (en milligrammes par litre) ou la calculer à partir de la solution mère mesurée.

8.1.2 Composés à expérimenter non solubles dans l'eau

Broyer les matières solides sèches dans un mortier, les peser sur une plaque de verre puis les placer directement dans les fioles d'essai. Étaler les substances de type huileux ou paraffineux sur une plaque de verre puis, après avoir pesé de nouveau, les placer directement dans les fioles d'essai.

Lorsque des dispersions ou des émulsions sont utilisées, disperser le composé à expérimenter dans de l'eau (6.1) à l'aide d'un traitement par ultrasons, ou l'émulsionner à l'aide d'un émulsifiant non biodégradable, ou bien utiliser les deux techniques combinées. L'éthoxylate de nonylphénol (environ 10 EO) et le propoxylate (environ 3 à 7 PO) constituent des émulsifiants adaptés. S'assurer que la dispersion ou l'émulsion est homogène en cas d'utilisation d'une aliquote pour obtenir la concentration d'essai souhaitée.

S'assurer que la quantité finale de composé à expérimenter dans le récipient d'essai est à environ 100 mg/l de DThO (voir l'annexe A). Il n'est pas nécessaire d'obtenir exactement 100 mg/l, mais noter la quantité exacte pour chaque fiole numérotée.

Pour toute information complémentaire concernant la manipulation des composés à expérimenter peu solubles dans l'eau, voir l'ISO 10634.

NOTE – Si le composé à expérimenter (par exemple une substance de type huileux ou gras) adsorbe sur l'électrode à oxygène, le mesurage de l'oxygène peut être réduit et les résultats d'essai peuvent être influencés. Une adsorption peut

également se produire sur les parois du flacon ou sur les bouchons. Si tel est le cas, choisir une autre méthode d'essai [par exemple l'essai respirométrique (ISO 9408) ou l'essai de dégagement de CO₂ (ISO 9439)].

8.1.3 Solution du composé de référence

Préparer une solution mère du composé de référence (un composé organique de biodégradabilité connue, tel que l'acétate de sodium, le benzoate de sodium ou l'aniline) de la même façon qu'en 8.1.1, afin d'obtenir une concentration d'essai finale correspondant à 100 mg/l de DThO.

8.1.4 Solution de contrôle de l'inhibition

Si l'on souhaite obtenir des informations sur le risque d'inhibition de l'inoculum par le composé à expérimenter, préparer, dans le milieu d'essai (6.2), une solution contenant le composé à expérimenter et le composé de référence aux concentrations respectives indiquées en 8.1.1, 8.1.2 et 8.1.3.

8.2 Préparation de l'inoculum

Préparer l'inoculum à partir des sources décrites en 8.2.1 à 8.2.3 ou d'un mélange de ces sources, afin d'obtenir une population microbienne offrant une activité de biodégradation suffisante. Stabiliser l'inoculum comme décrit en 8.3.2 avant de l'utiliser dans l'essai.

8.2.1 Inoculum provenant d'un effluent secondaire

Prélever un échantillon provenant d'un effluent secondaire d'une usine de traitement des eaux ou d'un laboratoire traitant principalement des eaux usées domestiques. Si la densité de micro-organismes dans l'inoculum est si faible qu'elle ne remplit pas les exigences de volume convenable [voir b)], concentrer l'échantillon par filtration ou centrifugation. Bien mélanger, conserver l'échantillon dans des conditions aérobies et l'utiliser de préférence le jour du prélèvement.

À partir de cet échantillon, préparer un inoculum comme suit.

- a) Laisser décanter l'échantillon d'effluent pendant 1 h.
- b) Prélever un volume convenable du liquide surnageant afin de l'utiliser comme inoculum; un volume est dit convenable,
 - s'il permet d'obtenir une population offrant une activité de biodégradation suffisante;
 - s'il assure la dégradation du composé de référence au pourcentage spécifié;
 - s'il fournit entre 10⁴ et 10⁸ cellules actives par millilitre;
 - s'il ne fournit pas, dans le mélange final, plus de l'équivalent de 30 mg/l de matières solides en suspension dans les boues activées.

8.2.2 Inoculum provenant d'une usine de traitement des boues activées

Prendre un échantillon de boue activée prélevé dans le réservoir d'aération d'une usine de traitement des eaux ou d'un laboratoire traitant principalement des eaux usées domestiques. Bien mélanger, conserver l'échantillon dans des conditions aérobies et l'utiliser de préférence le jour du prélèvement.

Avant l'emploi, déterminer la concentration de matières solides en suspension (utiliser par exemple l'ISO 11923). Si la concentration de matières en suspension est très faible, concentrer la boue par décantation, de sorte que le volume de boue ajouté à l'échantillon d'essai soit le plus faible possible. Si de nombreuses particules grossières sont présentes dans la boue, une séparation est nécessaire. Filtrer la boue à travers un filtre fin et rincer plusieurs fois à l'aide du milieu d'essai (6.2). Puis centrifuger ou laisser décanter la boue, rejeter la phase liquide et remettre les matières solides en suspension dans le milieu d'essai afin d'obtenir une concentration de matières solides d'environ 3 g/l. Utiliser un volume tel qu'il ne fournit pas plus de 30 mg/l de matières en suspension dans le mélange final.

8.2.3 Inoculum provenant d'une eau de surface

Prélever un échantillon d'une eau de surface appropriée. Si la quantité de micro-organismes dans l'inoculum est trop faible et ne remplit pas les exigences de volume convenable indiquées en 8.2.1, concentrer l'échantillon par filtration ou centrifugation. Conserver l'échantillon dans des conditions aérobies et l'utiliser de préférence le jour du prélèvement. Prendre un volume d'inoculum convenable (voir 8.2.1).

NOTE – Dans certaines circonstances, il est admis d'utiliser des inocula préexposés, à condition que cela soit clairement mentionné dans les résultats d'essai (par exemple, pourcentage de biodégradation = x %, avec inocula préexposés) et que la méthode de préexposition soit détaillée dans le rapport d'essai. Des inocula préexposés peuvent être obtenus à partir d'essais de biodégradation en laboratoire effectués dans différentes conditions [par exemple, essai de Zahn-Wellens (ISO 9888) ou essai SCAS (ISO 9887)] ou à partir d'échantillons prélevés à des emplacements où sont réunies les conditions d'environnement appropriées (par exemple usine assurant le traitement de composés identiques ou zones contaminées).

8.3 Mode opératoire d'essai

8.3.1 Préparation des fioles d'essai

Préparer un nombre suffisant de fioles d'incubation (7.1) afin d'obtenir

- au moins trois fioles contenant le composé à expérimenter (8.1.1 ou 8.1.2) et le milieu d'essai inoculé (6.2 et 8.2) (fioles F_T);
- au moins trois fioles d'essai à blanc contenant le milieu d'essai inoculé (6.2 et 8.2) (fioles F_B);
- au moins trois fioles de vérification du mode opératoire, contenant le composé de référence (8.1.3) et le milieu d'essai inoculé (6.2 et 8.2) (fioles F_C);
- si nécessaire, au moins une fiole destinée à vérifier un éventuel effet inhibiteur du composé à expérimenter, contenant la solution de 8.1.4 et le milieu d'essai inoculé (6.2 et 8.2) (fiole F_I);
- si nécessaire, au moins une fiole destinée à vérifier une éventuelle élimination abiotique, contenant le composé à expérimenter (8.1.1 ou 8.1.2), mais sans inoculum, stérilisée par ajout de, par exemple, 1 ml/l d'une solution contenant 10 g/l de chlorure mercure(II) ($HgCl_2$), ou de tout autre composé inorganique toxique propre à empêcher l'activité microbienne (fiole F_S). Si des substances très facilement dégradables sont soumises à l'essai, ajouter la même quantité de substance toxique deux semaines après le début de l'essai.

8.3.2 Stabilisation du milieu inoculé

Préparer un milieu d'essai (6.2) suffisant pour réaliser l'essai complet, l'inoculer et le répartir entre les fioles d'essai. Si par exemple de la boue activée est utilisée comme inoculum, prendre environ 800 ml du milieu d'essai (6.2), ajouter 10 ml d'inoculum (8.2.2), puis compléter à 1 000 ml avec le milieu d'essai (6.2). La concentration de matières solides en suspension ne doit pas excéder 30 mg/l.

Placer un agitateur magnétique dans chaque fiole (si un dispositif d'agitation n'est pas utilisé et/ou si l'électrode à oxygène n'est pas équipée d'un agitateur incorporé) et ajouter un volume bien mélangé de milieu inoculé, correspondant aux deux tiers du volume libre de la fiole (par exemple 200 ml de liquide dans des fioles de 300 ml). Placer les fioles fermées sur le dispositif d'agitation ou les agiter, et incuber entre 20 °C et 25 °C pendant une semaine. Pendant cette période, les bactéries utiliseront leur matériau de réserve et l'inoculum se stabilisera.

8.3.3 Début de l'essai

Aérer les fioles d'essai contenant le milieu inoculé stabilisé (8.3.2) avec de l'air comprimé saturé en eau et un diffuseur d'air, pendant environ 15 min. Mesurer la concentration initiale en oxygène, ce qui est recommandé, ou la calculer (voir 8.3.4). Ajouter aux fioles F_T une quantité appropriée de la solution mère du composé à expérimenter (8.1.1), ou ajouter directement les substances d'essai peu solubles dans l'eau (8.1.2) afin d'obtenir la concentration d'essai souhaitée qui est normalement de 100 mg/l de DThO par fiole. Ajouter aux fioles F_C une quantité appropriée de solution mère du composé de référence (8.1.3) et, à la fiole F_I , les mêmes quantités de composé à expérimenter et de composé de référence (8.1.4). Pour la fiole F_S , utiliser un milieu d'essai non inoculé (6.2) et ajouter la même