

NORME
INTERNATIONALE

ISO
20136

IULTCS/IUC 37

Deuxième édition
2020-06

**Cuir — Détermination de la
dégradabilité par les micro-
organismes**

Leather — Determination of degradability by micro-organisms

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 20136:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/4176daad-4322-4e36-ba5c-e964110183a8/iso-20136-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/4176daad-4322-4e36-ba5c-e964110183a8/iso-20136-2020>



Numéros de référence
ISO 20136:2020(F)
IULTCS/IUC 37:2020(F)

© ISO 2020

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 20136:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/4176daad-4322-4e36-ba5c-e964110183a8/iso-20136-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/4176daad-4322-4e36-ba5c-e964110183a8/iso-20136-2020>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2020

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Symboles et termes abrégés	2
5 Principe	2
5.1 Généralités.....	2
5.2 Évaluation de la biodégradation par titrage manuel: méthode A.....	3
5.3 Évaluation de la biodégradation par détection infrarouge (IR): méthode B.....	3
6 Substances chimiques	3
7 Appareillage et matériel	4
8 Mode opératoire	7
8.1 Collecte et préparation de l'inoculum.....	7
8.2 Préparation du matériau d'essai et du matériau de référence.....	7
8.3 Conditions d'essai et période d'incubation.....	8
8.4 Fin de l'essai.....	8
9 Quantification	8
9.1 Évaluation de la biodégradation par titrage manuel (méthode A).....	8
9.1.1 Détermination de la teneur en carbone organique.....	8
9.1.2 Détermination de la quantité de dioxyde de carbone (CO ₂) produite.....	9
9.1.3 Correction tenant compte de la normalité de HCl.....	9
9.1.4 Pourcentage de biodégradation à partir du dioxyde de carbone (CO ₂) dégagé.....	9
9.2 Évaluation de la biodégradation par détection infrarouge (IR) (méthode B).....	10
9.2.1 Détermination de la teneur en carbone organique.....	10
9.2.2 Détermination de la quantité de dioxyde de carbone (CO ₂) produite.....	10
9.2.3 Pourcentage de biodégradation à partir des données de CO ₂	10
10 Expression des résultats	15
11 Validité des résultats	15
12 Rapport d'essai	15
Annexe A (informative) Détermination du degré et de la vitesse de dégradation du matériau	16
Annexe B (informative) Détermination quantitative de la biodégradation du cuir	19
Annexe C (informative) Données comparatives de biodégradabilité utilisant différentes eaux résiduaires de tannerie ou eaux usées	23
Bibliographie	24

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par la Commission des essais chimiques de l'Union internationale des sociétés de techniciens et chimistes du cuir (commission IUC, IULTCS), en collaboration avec le comité technique du Comité européen de normalisation (CEN) CEN/TC 289, *Cuir*, dont le secrétariat est tenu par l'UNI, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

L'IULTCS est une organisation mondiale de sociétés professionnelles des industries du cuir fondée en 1897 ayant pour mission de favoriser l'avancement des sciences et technologies du cuir. L'IULTCS a trois commissions, qui sont responsables de l'établissement des méthodes internationales d'échantillonnage et d'essai des cuirs. L'ISO reconnaît l'IULTCS en tant qu'organisme international à activités normatives pour l'élaboration de méthodes d'essai relatives au cuir.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 20136:2017), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- dans la première édition, la méthode B décrivait un système à circuit d'oxygène (O₂) fermé. L'inconvénient de ce système résidait dans la diminution de la concentration en oxygène avec le temps, qui se traduisait par la diminution de l'activité des micro-organismes. Un système à circuit d'oxygène ouvert a désormais été mis au point; dans ce système où l'oxygène n'est pas limité, l'activité des micro-organismes est toujours optimale;
- une explication concernant la méthode de calcul menant aux résultats complète la méthode B. Le dioxyde de carbone (CO₂) accumulé durant l'essai (zone située sous la courbe illustrant les moles de CO₂ en fonction du temps) est calculé;
- la possibilité d'utiliser des eaux usées municipales comme inoculum à la place des eaux résiduaires de tannerie a été incluse;

- une nouvelle annexe, l'[Annexe C](#), qui compare la biodégradabilité en présence d'inoculum de différentes origines, a été ajoutée.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 20136:2020](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/4176daad-4322-4e36-ba5c-e964110183a8/iso-20136-2020>

Introduction

L'un des problèmes importants auxquels est confrontée l'industrie de la chaussure est le traitement des déchets. Ces déchets, et notamment le cuir, bien que considérés comme non dangereux par la réglementation actuelle, sont produits en grandes quantités et finissent pour la plupart en décharge, où leur temps de dégradation naturelle dépasse de loin la durée de vie utile des produits.

Face à ce problème, la recherche s'oriente de plus en plus vers des agents de tannage alternatifs qui confèrent au cuir les mêmes propriétés que celles obtenues au moyen des agents actuellement employés, en réduisant toutefois le temps de biodégradation dans la nature.

Le présent document permet le mesurage de la biodégradabilité du cuir dans un système liquide en utilisant des micro-organismes comme inoculum. L'essai est considéré comme valide lorsque le pourcentage de dégradation du collagène (témoin positif) est d'au moins 70 % sur une période de cinquante jours (50 d) au maximum. Le degré de biodégradabilité d'un échantillon de cuir (matériau d'essai) est déterminé par comparaison de sa valeur de dégradabilité, en pourcentage, avec la valeur de dégradabilité, en pourcentage, obtenue avec du collagène soumis au même essai pendant la même durée. Plus les pourcentages de dégradabilité sont proches, plus le temps de biodégradation dans la nature est court. Par conséquent, les matériaux d'essai dont les pourcentages de dégradabilité sont très inférieurs à celui du collagène mettront plus de temps à se biodégrader dans la nature.

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 20136:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/4176daad-4322-4e36-ba5c-e964110183a8/iso-20136-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/4176daad-4322-4e36-ba5c-e964110183a8/iso-20136-2020>

Cuir — Détermination de la dégradabilité par les micro-organismes

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode d'essai pour déterminer le degré et la vitesse de biodégradation aérobie de peaux de différents animaux, tannées ou non, par la détermination indirecte du CO₂ produit par la dégradation du collagène.

Le matériau d'essai est exposé à un inoculum (boues activées d'eaux résiduelles de tannage) dans un milieu aqueux. En l'absence de tannerie à proximité, des eaux usées urbaines peuvent servir d'inoculum.

Les conditions établies dans le présent document correspondent aux conditions de laboratoire optimales pour obtenir le niveau maximal de biodégradation. Il se pourrait toutefois qu'elles ne correspondent pas aux conditions optimales ou au niveau maximal de biodégradation dans le milieu naturel.

De manière générale, le mode opératoire expérimental inclut la détermination du degré et de la vitesse de dégradation du matériau dans des conditions contrôlées, ce qui permet d'analyser le dégagement de dioxyde de carbone tout au long de l'essai. À cet effet, l'équipement d'essai répond à des exigences strictes concernant le contrôle du débit, de la température et de l'agitation.

La présente méthode s'applique aux matériaux suivants:

- les polymères naturels de stromas animaux (tissus/peaux d'animaux);
- les peaux d'animaux qui ont été tannées (cuir) en utilisant des agents de tannage organiques ou inorganiques;
- les cuirs qui, dans les conditions d'essai, n'ont pas d'effet inhibiteur sur l'activité des micro-organismes présents dans l'inoculum.

2 Référence normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

3.1

filtre poreux n° 1

diffuseur à taille de pores comprise entre 100 µm et 160 µm

Note 1 à l'article: Il s'agit du mesurage normal.

3.2

inoculum

boues activées d'eaux résiduaires de tannage

Note 1 à l'article: En l'absence de tannerie à proximité, des eaux usées urbaines peuvent servir d'inoculum.

4 Symboles et termes abrégés

AMP	adsorption modulée en pression
atm	atmosphère normale, unité de pression définie comme égale à 101 325 Pa
[Ba(OH) ₂]	hydroxyde de baryum
C	carbone
CO ₂	dioxyde de carbone
GL18	pas de vis utilisé avec des fioles Erlenmeyer H-SA V40/45 (capacité 5 000 ml)
GL14	pas de vis utilisé avec des fioles Erlenmeyer H-SA V29/32 (capacité 2 000 ml)
H-SA V 29/32	dimensions intérieure et extérieure, en millimètres, de l'embouchure des fioles Erlenmeyer
H-SA V H40/45	dimensions intérieure et extérieure, en millimètres, de l'embouchure des fioles Erlenmeyer
IR	infrarouge
ppm	parties par million (10 ⁻⁶), par exemple 1 mg par kilogramme (mg.kg ⁻¹)
Q _{nar}	débit d'air, en moles, passant à travers le système en une heure (mol.h ⁻¹)
Q _{ncO2}	débit de CO ₂ , en moles, passant à travers le système en une heure (mol.h ⁻¹)

5 Principe

5.1 Généralités

La méthode consiste à quantifier le CO₂ dégagé au cours de la dégradation du collagène, polymère constitué d'acides aminés polymérisés, sous l'action de micro-organismes présents dans les boues des cuves de traitement biologique des tanneries. Le CO₂ est dégagé dans des proportions stœchiométriques par rapport à la quantité de carbone (C) présente dans ledit polymère. Le pourcentage initial de carbone présent dans chacun des échantillons soumis à essai est déterminé par une analyse élémentaire. Le CO₂ accumulé durant l'essai est converti en pourcentage de biodégradation à l'aide d'équations mathématiques. Les essais doivent être réalisés en double en présence d'un témoin positif, constitué d'un milieu d'essai minimum (6.3), d'un inoculum (boues activées d'eaux résiduaires de tannage) et de collagène, et d'un témoin négatif, constitué seulement d'un milieu d'essai minimum et d'un inoculum. L'essai doit être considéré comme valide si le degré de biodégradation du témoin positif (collagène pur) est égal ou supérieur à 70 %.

Les essais doivent être effectués en utilisant un équipement capable de fournir les conditions nécessaires à la réalisation de l'essai. Il convient que l'agitation, la température et le débit d'air exempt de CO₂ soient contrôlés.

Le pourcentage initial de carbone (C) présent dans le collagène étudié est déterminé par l'analyse élémentaire de l'éprouvette. Le pourcentage de biodégradation n'inclut pas la quantité de carbone

convertie en une nouvelle biomasse cellulaire qui n'a pas été métabolisée en dioxyde de carbone au cours de l'essai.

5.2 Évaluation de la biodégradation par titrage manuel: méthode A

Cette méthode d'essai détermine le pourcentage de biodégradation de peaux, tannées ou non tannées, par le mesurage indirect du CO₂ dégagé au cours de la dégradation du collagène, le principal constituant de la peau, sous l'action des micro-organismes présents dans les eaux résiduelles de tannage.

Le CO₂ dégagé durant l'essai est déterminé de façon indirecte par le biais de la réaction de l'hydroxyde de baryum [Ba(OH)₂] avec le CO₂, qui donne un précipité, le carbonate de baryum (BaCO₃). La quantité de CO₂ dégagée est déterminée par titrage du [Ba(OH)₂] restant, non précipité, avec une solution d'acide chlorhydrique à 0,05 mol.l⁻¹. Ces mesurages sont effectués quotidiennement tout au long de l'essai.

Pour évaluer la biodégradabilité, on procède au mesurage indirect du CO₂ dégagé en fonction du temps et on calcule le degré de biodégradation par la différence entre le pourcentage initial de carbone présent dans le collagène et la teneur résiduelle en carbone organique soluble n'ayant pas été transformé en CO₂ au cours du processus (voir [Annexe A, Figures A.1 à A.3](#)).

5.3 Évaluation de la biodégradation par détection infrarouge (IR): méthode B

Cette méthode consiste à déterminer la biodégradation en quantifiant le CO₂ dégagé tout au long de la dégradation du collagène, au moyen de la détection infrarouge directe et de la surveillance continue de la concentration de CO₂, en utilisant un équipement pouvant évaluer simultanément douze fioles Erlenmeyer (voir [Annexe B, Figures B.1 à B.5](#)).

L'équipement (voir [Annexe B, Figure B.1](#)) est apte à mesurer la valeur de CO₂ de plusieurs échantillons contenus dans différentes fioles Erlenmeyer. La quantité de CO₂ dégagée au cours de la dégradation de l'échantillon sous l'action des micro-organismes est mesurée par un détecteur infrarouge. Ce détecteur est géré par un système de multiplexage comprenant un tambour rotatif comportant douze canaux d'entrée, de sorte que chaque sortie d'air des fioles Erlenmeyer est reliée à une entrée d'air du système de multiplexage. Le tambour est pourvu d'une sortie directement reliée à un débitmètre d'air qui mesure le débit (l.h⁻¹) et, ensuite, à une cuve étanche à l'air qui contient le capteur de CO₂. L'[Annexe B](#) (voir [Tableau B.1](#)) résume les paramètres, les unités de mesure et la plage des valeurs de détection. Les valeurs du débit d'air et de la concentration de CO₂ sont sauvegardées dans un système d'acquisition de données relié à un ordinateur.

6 Substances chimiques

6.1 Eau déionisée ou ultrapure (Milli Q[®]1), exempte de matières toxiques, d'une résistivité supérieure à 18 MΩ/cm.

6.2 Solutions mères, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique. Les solutions mères employées dans les essais sont les mêmes pour les deux méthodes utilisées dans le présent document. Préparer des solutions mères synthétiques par dissolution dans de l'eau distillée ([6.1](#)), au volume de 1 l et dans des fioles séparées, des substances suivantes:

6.2.1 Chlorure ferrique (FeCl₃·6H₂O), 1,00 g.

6.2.2 Sulfate de magnésium (MgSO₄·7H₂O), 22,50 g.

6.2.3 Chlorure de calcium (CaCl₂·2H₂O), 36,43 g.

1) Milli Q[®] est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

6.2.4 Tampon phosphate:

- dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), 8,50 g;
- potassium phosphate dibasique trihydraté ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 28,50 g;
- di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4), 17,68 g;
- chlorure d'ammonium (NH_4Cl), 1,70 g.

6.2.5 Sulfate d'ammonium [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], 40,00 g.

6.3 Milieu d'essai minimum

Le milieu d'essai minimum doit contenir les solutions mères suivantes, diluées à 1 l avec de l'eau déionisée:

6.3.1 Solution mère de chlorure ferrique (6.2.1), 2 ml.

6.3.2 Solution mère de sulfate de magnésium (6.2.2), 2 ml.

6.3.3 Solution mère de chlorure de calcium (6.2.3), 2 ml.

6.3.4 Solution mère de tampon phosphate (6.2.4), 4 ml.

6.3.5 Solution mère de sulfate d'ammonium (6.2.5), 2 ml.

6.4 **Éprouvettes:** utiliser du collagène de type I (Sigma®²) ou similaire) comme témoin positif. Les éprouvettes doivent être constituées, pour l'essentiel, de polymères naturels ou de cuir de tannerie utilisés pour la fabrication de vêtements en cuir.

6.5 **Pour la méthode A seulement:** préparer une solution d'hydroxyde de baryum [$\text{Ba}(\text{OH})_2$] à $0,025 \text{ mol.l}^{-1}$ par dissolution de 4,0 g de [$\text{Ba}(\text{OH})_2$] par litre d'eau distillée. Filtrer pour éliminer la matière solide, vérifier la molarité par titrage avec un acide standard. Stocker la solution claire obtenue dans un récipient scellé pour éviter l'absorption du CO_2 de l'air. Il est conseillé de préparer 5 l de solution en une fois lors de la réalisation d'une série d'essais.

6.6 **Acide chlorhydrique**, à $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$.

7 Appareillage et matériel

Équipement courant de laboratoire et, notamment:

7.1 **Balance analytique**, permettant une lecture à 0,000 1 g près.

7.2 **Pipettes**, d'une capacité de 5 ml à 25 ml.

7.3 **Micropipettes**, d'une capacité de 500 μl et 1 000 μl .

7.4 **Fioles de pré-traitement et fioles** (pour la méthode A seulement), de différentes capacités.

2) Sigma® est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

7.5 **Burettes**, d'une capacité de 100 ml.

7.6 **Source d'air exempt de CO₂ autonome**, constituée d'un compresseur silencieux relié à un système d'adsorption modulée en pression (AMP) muni d'un tamis moléculaire.

7.7 **Sépiolite** pour filtrer les impuretés et l'humidité du système de ventilation.

7.8 **Bouchons**, tuyau en plastique souple, imperméable au CO₂.

7.9 Récipients d'essai

7.9.1 **Méthode A**: huit fioles Erlenmeyer de 5 l (fioles de réaction) pour chaque essai (deux témoins et deux éprouvettes par essai). Des fioles Erlenmeyer H-SA V H40/45 d'une capacité de 5 000 ml doivent être utilisées, ainsi que des têtes de distillation V2 à pas de vis GL18 et un filtre poreux n° 1 (diffuseur). Le volume total de liquide (milieu de culture + inoculum) doit être de 2,5 l.

7.9.2 **Méthode B**: douze fioles d'un volume d'essai de 1 l (fioles de réaction) pourvues d'une tête de distillation et d'un diffuseur d'air, utilisées pour effectuer les essais (deux témoins et quatre échantillons, en double). Les fioles Erlenmeyer doivent avoir une capacité de 2 000 ml et 3 traits. Il doit s'agir de modèles du type H-SA V 29/32 (SQ13). Elles doivent être pourvues de têtes de distillation V2 à pas de vis GL14 (entrée d'air de 6 mm et sortie d'air de 8 mm) et d'un filtre poreux n° 1 (diffuseur). Le volume total de liquide (milieu de culture + inoculum) doit être de 1 l.

7.10 Équipement d'essai

7.10.1 Évaluation de la biodégradation par titrage manuel (équipement A)

L'équipement A fonctionne de façon à faire buller l'air exempt de CO₂ à travers une série de sept fioles Erlenmeyer (fioles de pré-traitement) qui piègent le dioxyde de carbone résiduel présent dans l'écoulement d'air provenant du dispositif AMP (7.6). Le système se divise ensuite en huit lignes contrôlées par huit robinets qui permettent un contrôle indépendant de l'écoulement; ces huit lignes alimentent à leur tour huit fioles Erlenmeyer (fioles de réaction) situées à l'intérieur de la cuve. La sortie de chacune des huit fioles Erlenmeyer est directement reliée à une série de trois fioles Erlenmeyer en verre (fioles d'analyse) reliées entre elles, chacune contenant 100 ml de [Ba(OH)₂] à 0,025 mol.l⁻¹, d'où seront tirés les résultats (voir [Annexe A, Figures A.2 et A.3](#)).

L'équipement comprend également un thermostat qui permet de réguler la température des fioles de réaction grâce à un système de recirculation d'eau en circuit fermé. L'essai est réalisé à (23 ± 1) °C. Les fioles de réaction sont constamment agitées à 24 r.min⁻¹ (mouvement de va-et-vient) pendant toute la durée de l'essai.

Le volume d'inoculum de chaque fiole varie en fonction de son degré d'activité, représentant entre 10 % et 20 % du volume total (inoculum + milieu d'essai minimum), qui est de 2,5 l. Si l'inoculum provient d'eaux usées urbaines, le volume total (inoculum + milieu minimum) peut augmenter de jusqu'à 40 %.

L'air quittant le générateur doit passer par le système AMP, lequel devra avoir fonctionné pendant 16 h (toute la nuit) avant le début de l'essai afin de garantir l'obtention d'une concentration de CO₂ stable, inférieure à 1 ppm, dans l'écoulement d'air.

Pendant l'essai, un écoulement d'air exempt de CO₂ de débit constant, égal à 150 ml.min⁻¹, alimente chaque fiole de réaction. Le débit d'air est régulièrement vérifié au niveau de chaque sortie au moyen de débitmètres gradués afin de s'assurer que le système ne présente aucune fuite.

Le CO₂ dégagé par la digestion aérobie des éprouvettes par les micro-organismes est quantifié en mesurant le niveau de carbonatation de l'hydroxyde de baryum [Ba(OH)₂] à 0,025 mol.l⁻¹ contenu dans les trois fioles d'analyse reliées à chaque fiole de réaction. Les fioles d'analyse sont remplacées toutes