

## **LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES**

### **Boue activée, essai d'inhibition de la respiration (oxydation du carbone et de l'ammonium)**

#### **INTRODUCTION**

1. La présente Ligne directrice (LD) décrit une méthode pour déterminer les effets d'une substance chimique sur les micro-organismes des boues activées (essentiellement des bactéries) en mesurant leur taux de respiration (oxydation du carbone et/ou de l'ammonium) dans des conditions données, en présence de différentes concentrations de la substance d'essai. Cette méthode a été établie à partir de l'essai mis au point par l'ETAD (Association écologique et toxicologique des fabricants de teintures) (1) (2), de l'ancienne Ligne directrice de l'OCDE pour les essais n° 209 (3) et de la norme ISO 8192 révisée (4). L'objectif de cet essai est de fournir une méthode d'évaluation rapide des effets de substances sur les micro-organismes des boues activées lors de l'étape biologique (aérobie) du processus de traitement des eaux usées en station d'épuration. Les résultats de l'essai peuvent également indiquer les concentrations non inhibitrices des substances d'essai à utiliser dans les essais de biodégradabilité (par exemple, la série de la LD 301, la LD 310, la série des LD 302 et de la LD 303 de l'OCDE). L'essai se déroule alors comme un essai de dépistage, similaire à un essai préliminaire de détermination des concentrations ou essai limite (voir paragraphe 39), seule la respiration totale étant prise en compte. Cependant, il convient de prendre cette indication en compte avec précaution pour les essais de biodégradation facile (série de la LD 301 et LD 310) pour lesquels la concentration de l'inoculum est nettement plus faible que celle prévue par cette Ligne directrice. En fait, l'absence d'inhibition dans cet essai de respiration ne se traduit pas automatiquement par des conditions non inhibitrices dans les essais de biodégradation facile de la série de la LD 301, ou de la LD 310.

2. Globalement, l'essai d'inhibition de la respiration semble avoir été appliqué avec succès depuis sa première publication, mais dans quelques cas des résultats erronés ont été rapportés (2) (4) (5). Ainsi, les courbes de respiration en fonction de la concentration sont parfois diphasiques, les tracés dose-effet peuvent être faussés et les  $CE_{50}$  sont parfois bien plus faibles que prévu (5). Des recherches ont montré que ces résultats apparaissent pour des boues activées fortement nitrifiantes et quand la substance d'essai affecte davantage l'oxydation de l'ammonium que l'oxydation générale hétérotrophe. Il est donc possible de rectifier les résultats faussés en procédant à un essai supplémentaire faisant appel à un inhibiteur spécifique de la nitrification. En quantifiant l'oxygène consommé en présence et en absence d'un inhibiteur de ce type, comme la N-allylthiourée (ATU), on peut calculer les consommations respectives de l'oxydation totale, hétérotrophe et de la nitrification (4) (7) (8). Il est alors possible de déduire l'inhibition induite par la substance d'essai sur les deux mécanismes, ainsi que les  $CE_{50}$  pour l'oxydation du carbone organique (hétérotrophe) et de l'ammonium (nitrification) d'après la méthode classique. Notons que dans certains cas rares, l'action inhibitrice de la N-allylthiourée peut être partiellement, voire complètement, annulée si elle forme des complexes avec des substances d'essai ou des adjuvants du milieu, par exemple les ions  $Cu^{2+}$  (6). Les ions  $Cu^{2+}$  sont essentiels aux *nitrosomonas*, mais toxiques à plus forte concentration.

© OCDE, (2010).

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

3. La nitrification est une étape nécessaire pour éliminer les composés azotés des eaux usées en produisant des espèces gazeuses. Les besoins d'un tel procédé sont aujourd'hui particulièrement pressants pour le traitement aérobie des eaux usées dans les pays de l'UE, les autorités européennes ayant en effet revu à la baisse les concentrations maximales d'azote dans les effluents traités et déversés dans les eaux réceptrices.

4. En général, la méthode consistant à évaluer seulement l'effet sur les mécanismes d'oxydation du carbone organique convient tout à fait. Certains cas exigent néanmoins d'examiner l'impact sur la nitrification seule, ou sur la nitrification et l'oxydation du carbone organique séparément, afin d'interpréter les résultats et de comprendre les effets observés.

### PRINCIPE DE L'ESSAI

5. Les taux de respiration d'échantillons de boue activée mis en contact pendant 3 heures avec une eau usée reconstituée sont mesurés dans une cellule hermétique contenant une électrode à oxygène. En fonction d'un scénario d'exposition réaliste, un temps de contact supérieur pourrait s'avérer pertinent. Si la substance d'essai est rapidement dégradée, notamment par hydrolyse abiotique, ou présente une volatilité ne permettant pas de maintenir une concentration fixe, il est possible d'utiliser en plus un temps d'exposition plus court, de 30 minutes par exemple. La sensibilité de chaque lot de boue activée est vérifiée à l'aide d'une substance de référence appropriée le jour de l'exposition. L'essai sert généralement à déterminer la  $CE_x$  (par exemple  $CE_{50}$ ) de la substance d'essai et/ou sa concentration sans effet observé (CSEO).

6. Il est possible de déterminer séparément l'inhibition de la consommation d'oxygène des micro-organismes qui oxydent le carbone organique et celle des micro-organismes qui oxydent l'ammonium en mesurant les taux de consommation d'oxygène en présence et en absence de N-allylthiourée, un inhibiteur spécifique de la première étape d'oxydation de l'ammonium en nitrites par les bactéries nitrifiantes. Dans ce cas, le pourcentage d'inhibition du taux de consommation d'oxygène est calculé par comparaison du taux de consommation d'oxygène en présence de la substance d'essai et du taux moyen de consommation d'oxygène des témoins associés ne contenant pas la substance étudiée, en présence et en absence d'un inhibiteur spécifique, la N-allylthiourée.

7. La quantification du taux de consommation d'oxygène pour un mélange aqueux comprenant la substance d'essai et une eau usée reconstituée, sans boue activée, permet de déterminer toute consommation d'oxygène découlant de mécanismes abiotiques.

### INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il est nécessaire de connaître les données concernant l'identification de la substance d'essai (de préférence son numéro CAS), son nom (IUPAC), et ses caractéristiques de pureté, de solubilité aqueuse, de pression de vapeur, de volatilité et d'adsorption, pour interpréter correctement les résultats. En général, cet essai ne convient pas aux composés volatils à moins de prendre certaines précautions (voir paragraphe 21).

### CHAMP D'APPLICATION DE LA MÉTHODE

9. Cette méthode convient aux substances hydrosolubles, peu solubles et volatiles. Il n'est toutefois pas toujours possible d'obtenir les  $CE_{50}$  de produits chimiques peu solubles, et les résultats ne seront valides que si la majeure partie (p. ex. plus de 80 %) des substances volatiles restent dans le mélange réactionnel à la fin de la (des) période(s) d'exposition. D'autres données d'analyse sont présentées pour affiner l'estimation de la  $CE_x$  (concentration efficace à x %) quand la stabilité ou la volatilité de la substance d'essai sont sujettes à caution.

## SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

10. Les substances de référence font l'objet d'essais périodiques afin de garantir la fiabilité de la méthode et des conditions d'essai, et de vérifier la sensibilité de chaque lot de boue activée utilisée comme inoculum microbien le jour de l'exposition. La substance de référence recommandée en matière d'inhibition est le 3,5-dichlorophénol (3,5-DCP): son action inhibitrice sur la respiration est bien connue, et elle est employée dans nombre d'essais d'inhibition/de toxicité (4). Le sulfate de cuivre (II) pentahydraté peut également servir de référence pour l'inhibition de la respiration totale (9). La N-méthylaniline peut servir de référence pour inhiber spécifiquement la nitrification (4).

## CRITÈRES DE VALIDITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ

11. Le taux de consommation d'oxygène des témoins à blanc (dépourvus de substance d'essai ou de référence) ne tombe pas en deçà de 20 mg d'oxygène par gramme de boue activée (en poids sec des solides en suspension) et par heure. Si cette valeur est inférieure, l'essai est répété avec une boue activée lavée ou une boue issue d'une autre source. Le coefficient de variation du taux de consommation d'oxygène dans les témoins répliqués ne dépasse pas 30 % à l'issue de l'essai final.

12. D'après les résultats d'un essai circulaire international organisé en 2004 par l'ISO (4) et faisant appel à une boue activée dérivée d'eaux usées domestiques, la  $CE_{50}$  du 3,5-DCP se situerait entre 2 mg/L et 25 mg/L pour la respiration totale, 5 mg/L et 40 mg/L pour la respiration hétérotrophe et entre 0.1 mg/L et 10 mg/L pour la respiration liée à la nitrification. Si la  $CE_{50}$  du 3,5-DCP est hors de la fourchette attendue, il convient de répéter l'essai avec une boue activée de source différente. La  $CE_{50}$  du sulfate de cuivre (II) pentahydraté est comprise entre 53 et 155 mg/L pour la respiration totale (9).

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

### *Récipients et appareils expérimentaux*

13. L'utilisation de matériel courant de laboratoire et de l'équipement suivant est nécessaire:

(a) Récipients d'essai – par exemple, béciers de 1 000 mL pour accueillir 500 mL de mélange réactionnel (voir élément 5 du graphique 1);

(b) Cellules et moyens de fixation pour mesurer la concentration de l'oxygène dissous; électrode à oxygène appropriée; cellule hermétique destinée à contenir l'échantillon sans laisser d'espace vide et équipée d'un enregistreur (par exemple éléments 7, 8, 9 du graphique 1 de l'annexe 2). Un flacon DBO est aussi envisageable, avec un adaptateur de rodage permettant de fixer hermétiquement l'électrode à oxygène au col du flacon (voir graphique 2 de l'annexe 3). Pour éviter de perdre du liquide par débordement lors de l'insertion de l'électrode à oxygène, il est conseillé d'introduire au préalable un entonnoir ou un tube de verre dans le flacon, ou d'utiliser des récipients à rebords évasés. Quelle que soit l'option retenue, il convient d'employer un agitateur magnétique ou un autre moyen d'agitation, par exemple une sonde auto-agitatrice;

(c) Agitateurs magnétiques et barreaux aimantés avec revêtement inerte, utilisables dans la chambre de mesure et/ou les récipients d'essai;

(d) Dispositif d'aération: s'il y a lieu, on fait circuler l'air comprimé à travers un filtre adapté pour éliminer les poussières et huiles, puis des bulleurs contenant de l'eau afin de l'humidifier. Le contenu des récipients est aéré à l'aide de pipettes Pasteur, ou de tout autre système d'aération n'entraînant pas l'adsorption des produits chimiques. Il est possible d'employer un agitateur orbital à une vitesse située

entre 150 et 250 rpm avec des flacons de 2 000 mL, par exemple, ce qui permet de répondre à la demande en oxygène des boues et de contourner les difficultés liées aux substances qui moussent trop, aux composés volatils s'échappant du milieu réactionnel, ou aux matières difficiles à disperser par bullage d'air. Le système d'essai se compose généralement d'un certain nombre de béciers aérés en continu et mis en place à intervalles réguliers (par exemple toutes les 10 – 15 minutes environ), puis analysés de manière séquentielle. Toute instrumentation validée permettant à la fois d'aérer les milieux réactionnels et de quantifier le taux de consommation d'oxygène des mélanges est également envisageable;

(e) pH-mètre;

(f) Centrifugeuse, centrifugeuse de laboratoire classique pour boue capable d'accélérer à 10 000 m/s<sup>2</sup>.

### **Réactifs**

14. On utilisera des réactifs de qualité analytique tout au long de l'essai.

### **Eau**

15. On emploiera de l'eau distillée ou désionisée contenant moins de 1 mg/L de COD, sauf mention contraire en faveur d'eau du robinet non chlorée.

### **Eau usée reconstituée**

16. La composition qualitative et quantitative du milieu sera la suivante :

- peptone	16 g
- extrait de viande (ou extrait végétal comparable)	11 g
- urée	3 g
- chlorure de sodium (NaCl)	0.7 g
- chlorure de calcium dihydraté (CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	0.4 g
- sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	0.2 g
- hydrogénophosphate de potassium anhydre (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.8 g
- eau distillée ou désionisée	q.s.p. 1 litre

17. Le pH de cette solution est de  $7.5 \pm 0.5$ . Si le milieu ainsi préparé n'est pas utilisé immédiatement, il convient de le conserver à l'abri de la lumière entre 0 °C et 4 °C, pendant une semaine maximum, ou dans des conditions n'altérant pas sa composition. Il est important de noter que cette eau usée reconstituée est 100 fois plus concentrée que celle qui est décrite dans le Rapport technique de l'OCDE du 11 juin 1976 « Méthode proposée pour la détermination de la biodégradabilité des agents tensio-actifs utilisés dans les détergents synthétiques », et contient en plus du phosphate dipotassique.

18. On peut également choisir de stériliser les composants du milieu séparément avant le stockage, ou d'ajouter la peptone et l'extrait de viande peu avant d'entamer l'essai. Préalablement à toute utilisation, le milieu sera soigneusement mélangé et son pH ajusté à  $7.5 \pm 0.5$ , s'il y a lieu.

### **Substance d'essai**

19. Une solution mère est préparée pour les substances d'essai facilement hydrosolubles, à une concentration n'excédant pas la limite de solubilité dans l'eau (pour éviter toute précipitation). Les produits peu solubles dans l'eau, les mélanges dont les composants présentent différentes solubilités aqueuses et les

substances adsorbantes sont pesés directement dans le récipient d'essai. Dans ces cas, le recours à des solutions mères peut constituer une option valable si les concentrations des solutés étudiés dans les récipients d'essai sont analysées (avant l'ajout de la boue activée). Si l'on prépare des fractions solubilisées dans l'eau [water accommodated fractions] (WAF), il est également essentiel de titrer la solution dans les récipients pour les différentes substances d'essai. On évitera d'employer des solvants organiques ou des dispersants/émulsifiants pour améliorer la solubilité. Il est possible de traiter les solutions mères aux ultrasons et d'agiter les suspensions préalablement, par exemple la nuit précédente, si la stabilité de la substance d'essai dans ces conditions est attestée par des données pertinentes.

20. La substance d'essai est susceptible d'affecter le pH du dispositif d'essai. Avant de procéder à l'essai, il convient donc de déterminer le pH de mélanges ayant reçu la même substance, au cours d'un essai préliminaire visant à s'assurer de l'opportunité d'un ajustement du pH préalablement à l'essai principal, puis le jour de son déroulement. Les solutions/suspensions aqueuses de la substance d'essai sont neutralisées avant l'ajout de l'inoculum, s'il y a lieu. Cependant, cette neutralisation étant susceptible de modifier les propriétés chimiques de la substance étudiée, des essais supplémentaires sont envisageables, selon la finalité de l'étude, afin d'évaluer l'effet de la substance d'essai sur la boue quand le pH n'est pas ajusté.

21. La toxicité des composés volatils, en particulièrement dans les dispositifs d'essai avec barbotage, peut varier en intensité en raison de pertes de substance pendant la période d'exposition. La prudence est donc de mise avec de telles espèces, ce qui se traduit par l'analyse spécifique des composés en question dans des mélanges témoins, et par une modification du régime d'aération.

#### ***Substance de référence***

22. Si le 3,5-dichlorophénol sert de référence, une dilution est préparée avec 1.00 g de 3,5-dichlorophénol dans 1 000 mL d'eau (15). La dissolution est accélérée par un traitement aux ultrasons ou une température de l'eau élevée, la solution n'étant portée à son volume final qu'après refroidissement à température ambiante. Il convient toutefois de s'assurer que la structure de la substance de référence n'est pas modifiée. Le pH de la solution est vérifié et ajusté à pH 7 – 8, le cas échéant, avec NaOH ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

23. Si le sulfate de cuivre (II) pentahydraté sert de référence, il est préparé dans des solutions concentrées à 58 mg/L, 100 mg/L et 180 mg/L (facteur de 1.8). La substance est pesée directement dans les récipients d'essai (29, 50 et 90 mg respectivement dans des récipients de 500 mL). Elle est ensuite dissoute dans 234 mL d'eau du robinet stérilisée par autoclave. Le sulfate de cuivre (II) pentahydraté se dissout facilement. Une fois l'essai lancé, on ajoute 16 mL d'eau usée reconstituée et 250 mL de boue activée.

#### ***Inhibiteur spécifique de la nitrification***

24. On prépare une solution mère de N-allylthiourée (ATU) concentrée à 2.32 g/L. Si l'on ajoute 2.5 mL de cette solution mère dans un mélange d'incubation de volume final 500 mL, la concentration résultante d'ATU est alors de 11.6 mg/L (10<sup>-4</sup> mol/L), une teneur suffisante (4) pour inhiber 100 % de la nitrification dans une boue activée nitrifiante contenant 1.5 g/L de solides en suspension.

#### ***Témoin abiotique***

25. Dans certaines conditions peu fréquentes, une substance d'essai fortement réductrice peut entraîner une consommation d'oxygène abiotique quantifiable. Des témoins abiotiques sont alors nécessaires pour distinguer la consommation d'oxygène abiotique due à la substance d'essai et la respiration microbienne. Les témoins abiotiques peuvent avoir la même composition que les mélanges d'essai à l'exception de l'inoculum. De façon similaire, il est possible d'inclure des témoins abiotiques

dépourvus d'inoculum lors de l'analyse de la concentration obtenue pendant la phase d'exposition de l'essai. C'est notamment le cas lorsqu'on a fait appel à des solutions mères de produits peu hydrosolubles ou à des mélanges de composés présentant des solubilités aqueuses différentes. Certains cas particuliers peuvent exiger la préparation d'un témoin abiotique contenant un inoculum stérilisé (par exemple par autoclave, ou par ajout d'agents toxiques stérilisants). Certaines substances sont susceptibles de synthétiser ou de consommer de l'oxygène, à condition que l'interface réactionnelle soit suffisamment importante, même si elles nécessitent normalement une température ou une pression bien supérieure pour que la réaction ait lieu. À cet égard, les composés de type peroxy feront l'objet d'une attention particulière. Un inoculum stérilisé présente une importante aire superficielle.

### *Inoculum*

26. Pour une utilisation courante, la boue activée est collectée à la sortie, ou près de la sortie, du bassin d'aération d'une station d'épuration fonctionnelle traitant essentiellement des eaux usées domestiques. En fonction de la finalité de l'essai, on peut aussi envisager d'employer d'autres types ou sources de boue activée adaptés, par exemple de la boue reconstituée en laboratoire, avec une concentration de solides en suspension située entre 2 g/L et 4 g/L. Les boues issues de différentes stations d'épuration sont cependant susceptibles de présenter des caractéristiques et sensibilités différentes.

27. La boue peut être utilisée telle quelle, mais les particules grossières seront éliminées en laissant reposer la boue entre 5 et 15 minutes, par exemple, afin de séparer la fraction supérieure contenant les particules fines après décantation ou tamisage (tamis de maille 1 mm<sup>2</sup>, par exemple). Une autre option consiste à homogénéiser la boue au mixer pendant environ 15 secondes ou plus, mais la prudence est alors de mise dans la mesure où un mixage trop long peut se traduire par des variations de température et des forces de cisaillement.

28. Il est souvent nécessaire de laver la boue, notamment quand le taux de respiration endogène est faible. Pour cela, la boue est d'abord centrifugée suffisamment longtemps pour faire apparaître un surnageant clair et des culots de résidus solides d'épuration, par exemple 10 minutes à environ 10 000 m/s<sup>2</sup>. La phase liquide surnageante est éliminée, puis la boue est remise en suspension par agitation dans de l'eau du robinet non chlorée. Cette eau de lavage est alors éliminée par centrifugation, comme précédemment. Si nécessaire, les étapes de lavage et de centrifugation sont répétées. On détermine le poids sec compris dans un volume donné de boue (constituée des solides remis en suspension), laquelle est alors concentrée par élimination de la fraction liquide ou au contraire diluée dans de l'eau du robinet non chlorée de façon à obtenir la concentration de solides requise, soit 3 g/L. La boue activée est aérée en continu (par exemple au débit de 2 L/min) à la température de l'essai et, si possible, utilisée le jour même de sa collecte. Dans le cas contraire, la boue est alimentée quotidiennement avec une eau usée reconstituée (50 mL d'eau usée reconstituée par litre de boue activée) pendant deux jours supplémentaires. On soumet alors la boue à l'essai, dont les résultats sont considérés comme valides si aucune variation significative de l'activité de la boue n'a été observée, d'après les taux de respiration hétérotrophe d'une part, et de respiration liée à la nitrification d'autre part.

29. Pendant l'incubation, l'apparition d'une mousse suffisamment abondante pour transporter les particules et déborder du récipient d'aération peut causer des difficultés. C'est parfois simplement la présence de l'eau usée reconstituée qui occasionne la formation de mousse, mais ce phénomène devrait être anticipé si la substance d'essai présente des propriétés tensio-actives ou contient un tensio-actif. La perte de résidus solides de la boue dans le mélange d'essai se traduit par des taux de respiration artificiellement réduits, susceptibles d'être faussement interprétés comme l'effet d'une inhibition. En outre, l'aération d'une solution de tensio-actifs concentre ces composés dans la couche de mousse ; si celle-ci est éliminée du dispositif d'essai, les concentrations d'exposition sont alors plus faibles. Ce moussage est maîtrisable à l'aide de méthodes mécaniques simples (par exemple en agitant le mélange à la main avec

une barre de verre, de temps en temps) ou en ajoutant une émulsion siliconée sans tensio-actifs contenant un agent antimoussant et/ou en choisissant un type d'aération par agitation des flacons. Si le problème est lié à la présence d'eau usée reconstituée, la composition de cette dernière est modifiée par ajout d'un agent antimoussant à une proportion de 50 µL/L, par exemple. Lorsque c'est la substance d'essai qui est à l'origine du moussage, la quantité nécessaire à l'effondrement de la mousse est déterminée pour la concentration maximale, chaque récipient étant ensuite traité avec cette même quantité (y compris ceux qui ne contiennent pas de mousse, comme les témoins à blanc et les récipients de référence). L'agent antimoussant éventuellement employé ne devrait pas interagir avec l'inoculum et/ou la substance d'essai.

## MODE OPÉRATOIRE

30. L'inhibition peut être quantifiée pour trois types de consommation d'oxygène : totale, hétérotrophe et liée à la nitrification. La mesure de la consommation d'oxygène totale est généralement suffisante. Néanmoins, il convient de déterminer les effets sur la consommation d'oxygène hétérotrophe liée à l'oxydation du carbone organique d'une part, et à l'oxydation de l'ammonium d'autre part, lorsque certaines substances spécifiques exigent l'évaluation de ces deux critères supplémentaires ou (le cas échéant) pour expliquer des courbes dose-effet atypiques en matière d'inhibition de la consommation d'oxygène totale.

### *Conditions d'essai*

31. L'essai est mené à une température de  $20 \pm 2$  °C.

### *Mélanges d'essai*

32. Les mélanges d'essai (notés flacons  $F_T$  au tableau 1) contenant de l'eau, de l'eau usée reconstituée et la substance d'essai, sont préparés de façon à obtenir différentes concentrations nominales de la substance d'essai (voir au tableau 1 des exemples de volume des composants). Le pH est ajusté à  $7.5 \pm 0.5$ , s'il y a lieu ; on dilue les mélanges avec de l'eau et on ajoute de l'inoculum pour obtenir les mêmes volumes finals dans les récipients et ensuite lancer l'aération.

### *Mélanges de référence*

33. La préparation des mélanges de référence (notés  $F_R$ ) est la même que celle des mélanges d'essai, la substance d'essai étant remplacée par le composé de référence, par exemple le 3,5-dichlorophénol.

### *Témoins à blanc*

34. Les témoins à blanc (notés  $F_B$ ) sont préparés au début et à la fin de la période d'exposition dans les essais pour lesquels les béchers sont mis en place en série, à intervalles réguliers. Pour les systèmes d'essai faisant appel à un équipement permettant de quantifier simultanément différentes consommations d'oxygène, on inclura au moins deux témoins à blanc dans chaque lot d'analyse simultanée. Les témoins à blanc contiennent un volume égal de boue activée et de milieu reconstitué, mais sont exempts de substance d'essai ou de référence. Le volume d'eau dilution est le même pour les mélanges témoins, d'essai et de référence.

### *Témoin abiotique*

35. Lorsque cela est nécessaire, notamment pour une substance d'essai fortement réductrice ou soupçonnée de présenter de telles propriétés, on préparera un mélange  $F_A$  afin de mesurer la consommation

d'oxygène abiotique. Ce mélange présentera les mêmes quantités de substance d'essai et d'eau usée reconstituée et le même volume que les mélanges d'essai, mais ne contiendra pas de boue activée.

### *Procédure générale et mesures*

36. Les mélanges d'essai et de référence ainsi que les témoins à blanc et abiotiques sont incubés à la température d'essai en conditions d'aération forcée (0.5 – 1 L/min) de manière à maintenir une concentration d'oxygène dissous supérieure à 60 – 70 % de la saturation, et assurer la dispersion correcte des flocons de boue. Il est aussi nécessaire d'agiter les cultures pour maintenir les flocons de boue en suspension. On considère que l'incubation débute à l'instant où l'inoculum de la boue activée entre en contact avec les autres constituants du mélange final. À la fin de l'incubation, c'est-à-dire à l'issue d'une période d'exposition généralement fixée à 3 heures, on retire les échantillons pour mesurer la vitesse de diminution de la concentration d'oxygène dissous dans la cellule prévue à cet effet (graphique 2 de l'annexe 3) ou dans un flacon DBO entièrement rempli. La façon dont les incubations commencent dépend aussi de la capacité de l'équipement choisi de mesurer les taux de consommation d'oxygène. Par exemple, si l'équipement comprend une seule sonde à oxygène, les mesures sont réalisées individuellement. Dans ce cas, on préparera les différents mélanges nécessaires à l'essai avec eau usée reconstituée sans y ajouter l'inoculum, les quantités de boue appropriées n'étant ajoutées qu'ensuite dans chaque récipient de la série. Les incubations sont donc lancées successivement aux intervalles adéquats, par exemple toutes les 10 à 15 minutes. Inversement, le dispositif de mesure peut comprendre plusieurs sondes facilitant les mesures multiples en parallèle ; dans ce cas, l'inoculum peut être ajouté au même moment dans les groupes de récipients appropriés.

37. La concentration nominale de solides en suspension dans la boue activée est de 1.5 g/L dans tous les mélanges d'essai, de référence et les témoins à blanc (mais pas dans le témoin abiotique). La consommation d'oxygène est mesurée après 3 heures d'exposition. Le cas échéant, il est envisageable de réaliser les mesures après 30 minutes d'exposition supplémentaires, dans les conditions détaillées au paragraphe 5.

### *Pouvoir nitrifiant de la boue*

38. Les éventuelles propriétés nitrifiantes de la boue seront mises en lumière et, le cas échéant, quantifiées à l'aide de mélanges ( $F_B$ ) similaires à ceux du témoin à blanc et des autres mélanges témoins ( $F_N$ ), avec pour composant supplémentaire la N-allylthiourée à 11.6 mg/L. Ces mélanges seront aérés et incubés à  $20 \pm 2$  °C pendant 3 heures. On calculera alors les taux de consommation d'oxygène, dont on déduira le taux de consommation d'oxygène liée à la nitrification.

### *Modèles d'essai*

#### *Essai de détermination de l'ordre de grandeur*

39. Il pourra être nécessaire de réaliser un essai préliminaire pour estimer l'ordre de grandeur des concentrations de substance d'essai à utiliser dans l'essai final d'inhibition de la consommation d'oxygène. Inversement, l'absence d'inhibition de la consommation d'oxygène par la substance étudiée lors de l'essai préliminaire peut démontrer que l'essai final est inutile. Cependant, des tripliquats présentant la concentration d'essai la plus élevée de celles utilisées dans l'essai préliminaire (généralement 1 000 mg/L, cette valeur dépendant toutefois des spécifications de l'équipement) sont inclus.

Tableau 1 Exemples de mélanges destinés à l'essai préliminaire

Réactif	Concentration d'origine				
Solution mère de la substance d'essai	10 g/L				
Solution mère de milieu reconstitué	Voir paragraphe 16				
Suspension mère de boue activée	3 g/L de solides en suspension				
Composants des mélanges	Quantité dans les récipients d'essai (a)				
	F <sub>T1</sub>	F <sub>T2</sub>	F <sub>T3-5</sub>	F <sub>B1-2</sub>	F <sub>A</sub>
Solution mère de la substance d'essai (mL) (paragraphe 19 à 21)	0.5	5	50	0	50
Solution mère de milieu reconstitué (mL) (paragraphe 16)	16	16	16	16	16
Suspension de boue activée (mL) (paragraphe 26 à 29)	250	250	250	250	0
Eau (paragraphe 15)	233.5	229	184	234	434
Volume total des mélanges (mL)	500	500	500	500	500
Concentrations dans le mélange					
Suspension d'essai (mg/L)	10	100	1 000	0	1 000
Boue activée (solides en suspension) (mg/L)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

(a) La même procédure sera suivie avec les substances de référence, pour préparer les flacons F<sub>R1-3</sub>

40. L'essai comprendra au moins trois concentrations de la substance étudiée, par exemple 10 mg/L, 100 mg/L et 1 000 mg/L avec un témoin à blanc et, si nécessaire, au moins trois témoins abiotiques à la concentration de substance d'essai maximum (voir un exemple tableau 1). Dans l'idéal, la concentration la plus basse employée ne devrait pas avoir d'effet sur la consommation d'oxygène. S'il y a lieu, on calculera les taux de consommation d'oxygène et le taux de nitrification, puis le pourcentage d'inhibition. En fonction de l'objectif de l'essai, il est aussi possible de déterminer simplement la toxicité d'une concentration limite, par exemple 1 000 mg/L. Si aucune toxicité n'est révélée de façon statistiquement significative à cette concentration, il ne sera pas nécessaire de réaliser de nouveaux essais à des concentrations supérieures ou inférieures. Il convient de noter que les produits peu solubles dans l'eau, les mélanges dont les composants présentent différentes solubilités aqueuses et les substances adsorbantes sont pesés directement dans le récipient d'essai. Dans ce cas, le volume réservé à la solution mère de la substance d'essai sera remplacé par de l'eau de dilution.

### Essai final

#### Inhibition de la consommation d'oxygène totale

41. La série de concentrations utilisée pour l'essai découle des résultats de l'essai préliminaire. Pour obtenir une CSEO et une CEx (par exemple CE<sub>50</sub>), il est recommandé, dans la plupart des cas, d'utiliser six témoins et cinq concentrations d'essai suivant une série géométrique, avec cinq répliquats. Le témoin abiotique n'a pas besoin d'être répété si l'essai préliminaire n'a révélé aucune consommation d'oxygène significative. Dans le cas contraire, il convient d'inclure des témoins abiotiques pour chaque concentration de substance d'essai. La sensibilité de la boue est évaluée à l'aide d'une substance de référence, le 3,5-dichlorophénol. Cette évaluation est effectuée sur chacune des séries de l'essai dans la mesure où la sensibilité est connue pour fluctuer. Dans tous les cas, on prélève des échantillons dans les récipients

d'essai au bout de 3 heures, ou 3 heures et demie s'il y a lieu, afin de mesurer le taux de consommation d'oxygène dans la cellule équipée d'une électrode à oxygène. Les taux de respiration respectifs des mélanges témoins et expérimentaux sont déduits des valeurs collectées, et le pourcentage d'inhibition est calculé d'après l'équation 7 ci-après.

#### Distinction entre l'inhibition de respiration hétérotrophe et la nitrification

42. En recourant à un agent qui inhibe spécifiquement la nitrification, l'ATU, il est possible d'évaluer directement l'effet inhibiteur d'une substance d'essai sur l'oxydation hétérotrophe. Par ailleurs, en soustrayant le taux de consommation d'oxygène en présence d'ATU au taux de consommation d'oxygène total (sans ATU), il est possible de déduire l'impact sur le taux de nitrification. Deux séries de mélanges réactionnels sont préparées conformément aux protocoles de détermination des  $CE_x$  ou CSEO décrits au paragraphe 41, avec toutefois un composant supplémentaire, l'ATU, qu'il convient d'ajouter à chaque mélange d'une des deux séries de manière à obtenir une concentration finale de 11.6 mg/L, dont il a été démontré qu'elle inhibe complètement la nitrification dans les boues contenant des concentrations de solides en suspension pouvant aller jusqu'à 3 000 mg/L (4). Les taux de consommation d'oxygène sont mesurés à l'issue de la période d'exposition ; ces valeurs directes représentent uniquement la respiration hétérotrophe, les différences entre ces résultats et les taux de respiration totale associés correspondant à la nitrification. On calcule alors les différents degrés d'inhibition.

#### *Mesures*

43. Après la ou les périodes d'exposition, un échantillon prélevé dans le premier récipient aéré est transféré dans la cellule équipée d'une électrode à oxygène (graphique 1 de l'annexe 2) pour une mesure immédiate de la concentration en oxygène dissous. Si l'on dispose d'un système à plusieurs électrodes, ces mesures peuvent être effectuées simultanément. Il est essentiel d'agiter (à l'aide d'un barreau aimanté inerte) à la même vitesse que celle appliquée lors de l'étalonnage de l'électrode de manière à assurer une réponse rapide de la sonde aux variations de concentration d'oxygène, et pour garantir la régularité et la reproductibilité de ces mesures dans la cellule. En général, un système comprenant une électrode à oxygène auto-agitatrice convient parfaitement. La cellule est rincée à l'eau entre chaque mesure. Une autre solution consiste à placer l'échantillon dans un flacon DBO (graphique 2 de l'annexe 3) équipé d'un agitateur magnétique. Une sonde à oxygène équipée d'un adaptateur est alors introduite par le col du flacon, puis l'agitation est lancée. Dans les deux cas, il convient de mesurer et d'enregistrer la concentration d'oxygène dissous en continu pendant une période de 5 à 10 minutes, en général, ou jusqu'à ce que cette concentration chute en deçà de 2 mg/L. L'électrode est alors retirée et l'échantillon reversé dans le récipient d'essai où l'aération et l'agitation se poursuivent si une mesure est nécessaire après une plus longue période d'exposition.

#### *Vérification de la concentration de la substance d'essai*

44. Dans certains cas, il peut être nécessaire de mesurer la concentration de la substance d'essai directement dans le récipient d'essai. Il convient de noter que si l'on utilise des solutions mères de:

- substances peu hydrosolubles,
- mélanges dont les composants présentent différentes solubilités aqueuses, ou
- substances bien solubles dans l'eau mais dont la solution mère offre une concentration proche de la limite de saturation,

la fraction dissoute est inconnue, et la concentration réelle de la substance étudiée transférée dans les récipients d'essai demeure indéterminée. Il est nécessaire d'analyser les concentrations de la substance d'essai dans les récipients afin de caractériser l'exposition. Pour des raisons de simplicité, cette analyse est réalisée avant d'ajouter l'inoculum. Dans la mesure où seules les fractions dissoutes sont transférées dans les récipients d'essai, les concentrations mesurées peuvent s'avérer très faibles.

45. Il est recommandé de peser directement la substance étudiée dans les récipients d'essai et de s'appuyer sur la concentration nominale initiale correspondant à cette masse dans les calculs suivants, pour éviter des analyses coûteuses et chronophages. La distinction entre les fractions dissoute, non dissoute et adsorbée de la substance d'essai est inutile puisque toutes ces fractions sont également présentes en pratique dans les stations d'épuration, et qu'elles peuvent varier selon la composition des eaux usées. L'objectif de la présente Ligne directrice est de produire une estimation réaliste de la concentration non inhibitrice ; elle ne convient pas pour étudier en détail quelles fractions contribuent à l'inhibition des organismes des boues activées. Enfin, les substances adsorbantes seront également pesées directement dans les récipients d'essai. On utilisera en outre de la verrerie silanisée pour limiter les pertes par adsorption.

## RÉSULTATS ET RAPPORTS

### *Calcul des taux de consommation d'oxygène*

46. Les taux de consommation d'oxygène sont calculés à partir de la moyenne des valeurs relevées, par exemple en utilisant la partie linéaire des courbes de concentration d'oxygène en fonction du temps, les calculs étant limités aux concentrations situées entre 2.0 mg/L et 7.0 mg/L, dans la mesure où des teneurs en oxygène supérieures ou inférieures sont susceptibles d'influencer la consommation. Il est cependant parfois inévitable et nécessaire de travailler avec des valeurs situées en dehors de cette fourchette, notamment quand la respiration est fortement inhibée et donc très lente, ou lorsqu'une boue activée respire très rapidement. Cette démarche est acceptable à condition que les parties de la courbe de consommation considérées soient linéaires et que leurs gradients ne varient pas aux limites de l'intervalle 2.0 mg/L – 7.0 mg/L d'O<sub>2</sub>. Toute partie non linéaire de la fonction traduit une stabilisation du système de mesure ou une modification du taux de consommation, et ne devrait donc pas être utilisée pour calculer des taux de respiration. Le taux de consommation d'oxygène est exprimé en milligrammes par litre et par heure (mg/Lh) ou en milligrammes par gramme de boue sèche et par heure (mg/gh). Le taux de consommation d'oxygène, R, en mg/Lh, peut être déduit ou interpolé à partir de la partie linéaire de la courbe de quantité d'oxygène décroissante, d'après l'équation 1 :

$$R = (Q_1 - Q_2) / \Delta_t \times 60 \quad (1)$$

Où :

Q<sub>1</sub> est la concentration d'oxygène au début de la partie de courbe linéaire sélectionnée (mg/L) ;

Q<sub>2</sub> est la concentration d'oxygène à la fin de la partie de courbe linéaire sélectionnée (mg/L) ;

Δ<sub>t</sub> est l'intervalle de temps entre ces deux mesures (min).

47. Le taux de respiration spécifique (R<sub>s</sub>) est exprimé comme la quantité d'oxygène consommée par gramme de boue sèche et par heure (mg/gh), d'après l'équation 2 :

$$R_s = R / SS \quad (2)$$

où SS est la concentration des solides en suspension dans le mélange d'essai (g/L).

48. R peut être précisé par divers indices aux significations suivantes :

S	taux spécifique
T	taux de respiration totale
N	taux de respiration liée à la nitrification
H	taux de respiration hétérotrophe

- A       taux correspondant aux processus abiotiques  
 B       taux des essais à blanc (moyenne)

**Calcul du taux de consommation d'oxygène liée à la nitrification**

49. La relation entre la respiration totale ( $R_T$ ), la respiration liée à la nitrification ( $R_N$ ) et la respiration hétérotrophe ( $R_H$ ) est fournie par l'équation 3 :

$$R_N = R_T - R_H \quad (3)$$

Où :

$R_N$  est le taux de consommation d'oxygène liée à la nitrification (mg/Lh) ;

$R_T$  est le taux mesuré de consommation d'oxygène du témoin à blanc (sans ATU ;  $F_B$ ) (mg/Lh).

$R_H$  est le taux mesuré de consommation d'oxygène du témoin à blanc avec ATU ( $F_N$ ) (mg/Lh).

50. Cette équation demeure valable pour les valeurs des témoins à blanc ( $R_{NB}$ ,  $R_{TB}$ ,  $R_{HB}$ ), des témoins abiotiques ( $R_{NA}$ ,  $R_{TA}$ ,  $R_{HA}$ ) et des essais avec la substance étudiée ( $R_{NS}$ ,  $R_{TS}$ ,  $R_{HS}$ ) (mg/gh). Les taux de respiration spécifiques sont déduits de la manière suivante :

$$R_{NS} = R_N / SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T / SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H / SS \quad (6)$$

51. Si  $R_N$  n'est pas significatif (par exemple  $< 5\%$  du  $R_T$  des témoins à blanc) dans l'essai préliminaire, on peut supposer que la consommation d'oxygène hétérotrophe est égale à la consommation totale et qu'aucune nitrification ne se produit. Si l'essai doit prendre en compte les effets sur les micro-organismes hétérotrophes et nitrifiants, une autre source de boue activée est nécessaire. L'essai final n'est mis en œuvre qu'en cas de variation de l'inhibition du taux de consommation d'oxygène en fonction des concentrations de la substance étudiée.

**Calcul du pourcentage d'inhibition**

52. Le pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène totale,  $I_T$ , déterminé pour chaque concentration de la substance d'essai, est calculé d'après l'équation 7 :

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA}) / R_{TB}] \times 100 \% \quad (7)$$

53. De la même façon, le pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène hétérotrophe,  $I_H$ , déterminé pour chaque concentration de la substance d'essai, est calculé d'après l'équation 8 :

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA}) / R_{HB}] / 100 \% \quad (8)$$

54. Enfin, l'inhibition de la consommation d'oxygène liée à la nitrification,  $I_N$ , déterminée pour chaque concentration de la substance d'essai, est calculée d'après l'équation 9 :

$$I_N = [1 - (R_T - R_H) / (R_{TB} - R_{HB})] \times 100 \% \quad (9)$$

55. On tracera la courbe du pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène en fonction du logarithme de la concentration de substance d'essai (désignée courbe d'inhibition, voir graphique 3 de l'annexe 4). Les courbes d'inhibition sont tracées pour chaque phase d'aération de 3 h, ou après 30 min supplémentaires. La concentration de la substance d'essai correspondant à une inhibition de 50 % de la

consommation d'oxygène ( $CE_{50}$ ) est calculée ou interpolée à partir de cette courbe. Si les données nécessaires sont disponibles, on calculera ou interpolera aussi les limites de confiance à 95 % de la  $CE_{50}$ , la pente de la courbe et les valeurs pertinentes représentant le début de l'inhibition (par exemple,  $CE_{10}$  ou  $CE_{20}$ ) et sa fin (par exemple,  $CE_{80}$  ou  $CE_{90}$ ).

56. Il convient de noter qu'en raison de la fréquente variabilité des résultats observée, il suffit, dans de nombreux cas, d'exprimer les concentrations par ordre de grandeur, par exemple :

$CE_{50} < 1$  mg/L  
 $CE_{50}$  1 mg/L à 10 mg/L  
 $CE_{50}$  10 mg/L à 100 mg/L  
 $CE_{50} > 100$  mg/L

### ***Interprétation des résultats***

$CE_x$

57. On calcule les valeurs de  $CE_x$  et leurs limites de confiance à 95 % supérieures et inférieures correspondant au paramètre en utilisant des méthodes statistiques adéquates [par exemple, analyse probit, fonction logistique ou de Weibull, méthode simplifiée de Spearman-Kärber ou simple interpolation (11)]. Une  $CE_x$  est obtenue en intégrant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation retenue. Pour calculer la  $CE_{50}$  ou tout autre  $CE_x$ , il faut soumettre les moyennes par traitement (X) à une analyse de régression.

### ***Estimation de la CSEO***

58. Lorsqu'une analyse statistique est appliquée pour déterminer la CSEO, il faut disposer de statistiques par récipient (chaque récipient individuel étant considéré comme une expérience distincte). Il convient alors d'utiliser des méthodes statistiques adéquates conformément au Document d'orientation de l'OCDE intitulé *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (11). En général, les effets indésirables de la substance d'essai par rapport au témoin sont étudiés en procédant à une vérification de l'hypothèse unilatérale (plus faible) pour  $p \leq 0.05$ .

### ***Rapport d'essai***

59. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

#### ***Substance d'essai***

- nom courant, nom chimique, numéro CAS, pureté ;
- propriétés physico-chimiques de la substance d'essai (par exemple log K<sub>ow</sub>, hydrosolubilité, pression de vapeur, constante de Henry (H) et information éventuelle sur le devenir de la substance d'essai, p. ex. adsorption sur la boue activée) ;

#### ***Système d'essai***

- source, conditions de fonctionnement de la station d'épuration et nature des effluents traités, concentration, prétraitement et maintenance de la boue activée ;

#### ***Conditions d'essai***

- température et pH de l'essai, durée de la ou des phases d'exposition ;

*Résultats*

- consommation d'oxygène spécifique des témoins (mg d'O<sub>2</sub>/(g boue x h) ;
- ensemble des données collectées, courbe(s) d'inhibition et méthode de calcul de la CE<sub>50</sub> ;
- CE<sub>50</sub> et, si possible, intervalle de confiance à 95 %, le cas échéant CE<sub>20</sub>, CE<sub>80</sub> ; éventuellement CSEO et méthodes statistiques employées, si la CE<sub>50</sub> ne peut être déterminée ;
- résultats de l'inhibition totale, et, s'il y a lieu, des inhibitions hétérotrophe et liée à la nitrification ;
- consommation d'oxygène abiotique dans le témoin physico-chimique (le cas échéant) ;
- nom des substances de référence et résultats obtenus avec ces substances ;
- tout écart par rapport à la procédure normalisée ou toute observation susceptible d'influencer le résultat.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Brown, D., Hitz, H.R. et Schäfer, L. (1981), The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test, *Chemosphere* 10 (3): 245-261.
2. King, E. F. et Painter H. A. (1986), Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results, *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.
3. OCDE (1984), *Boue activée, essai d'inhibition de la respiration*, Ligne directrice No. 209, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
4. ISO (2007), Norme ISO 8192 (1986), Qualité de l'eau. Essai d'inhibition de la consommation d'oxygène par des boues activées pour l'oxydation du carbone et de l'ammonium, *Organisation internationale de normalisation*.
5. Bealing, D. J. (2003), Document ISO/TC147/WGI/N.18, *Organisation internationale de normalisation*.
6. Painter, H A, Jones K (1963), The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms, *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3) 471-483.
7. Painter, H. A. (1986), Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge, *Toxicity Assessment* 1:515-524.
8. Robra, B. (1976), *Wasser/Abwasser* 117, 80.
9. Fiebig S. et Noack, U. (2004), The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test, acc. to the OECD guideline 209, *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.
10. ISO (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, *Organisation internationale de normalisation*.
11. OCDE (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, Paris.

## ANNEXE 1

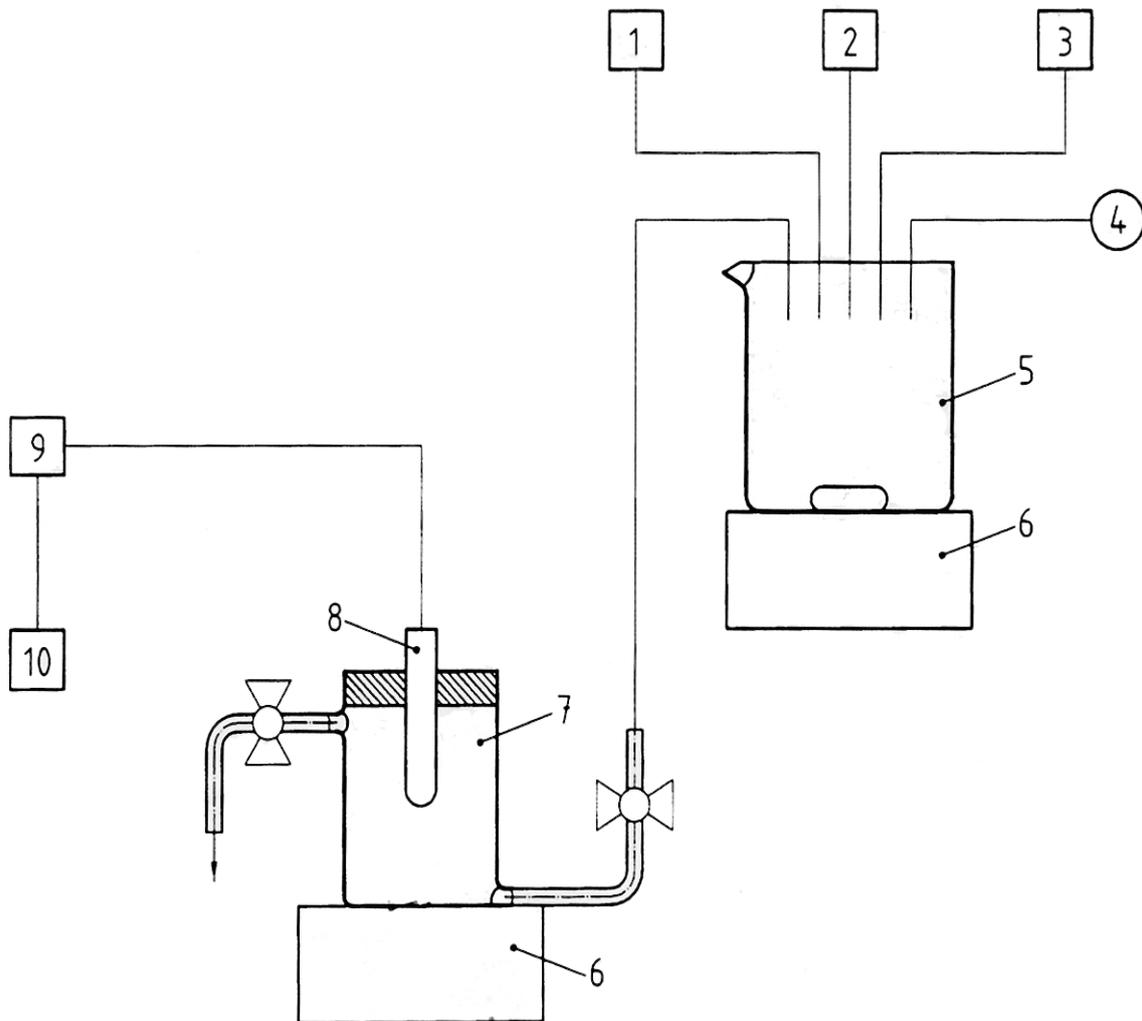
**DÉFINITIONS**

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente Ligne directrice :

La CSEO (concentration sans effet observé) désigne la concentration de la substance d'essai à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ( $p < 0.05$ ) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

La CE<sub>x</sub> (concentration efficace à x %) est la concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE<sub>50</sub> est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

## ANNEXE 2

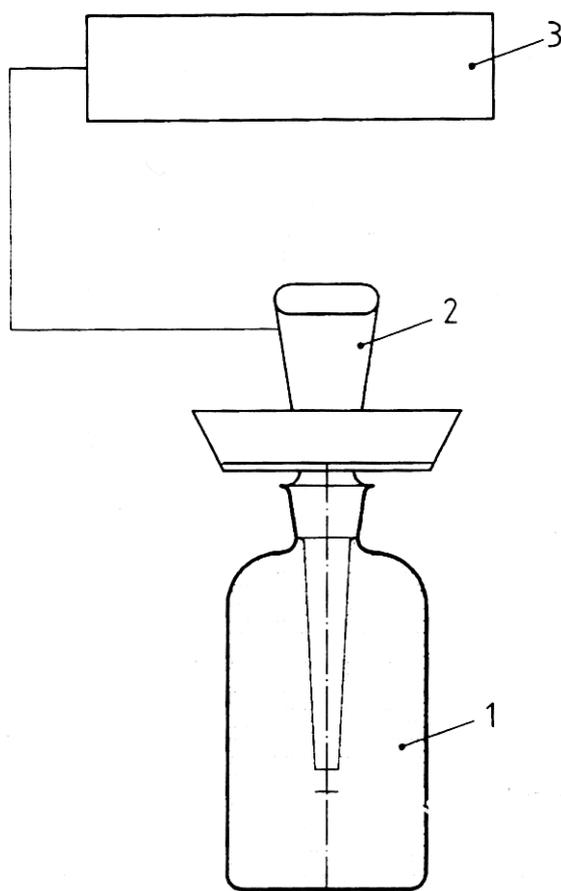


## Légende

1	boue activée	6	agitateur magnétique
2	milieu reconstitué	7	cellule de mesure de l'oxygène
3	substance d'essai	8	électrode à oxygène
4	air	9	instrument de mesure de l'oxygène
5	bécher du mélange	10	dispositif d'enregistrement

Graphique 1 Exemple de dispositif de mesure

## ANNEXE 3.

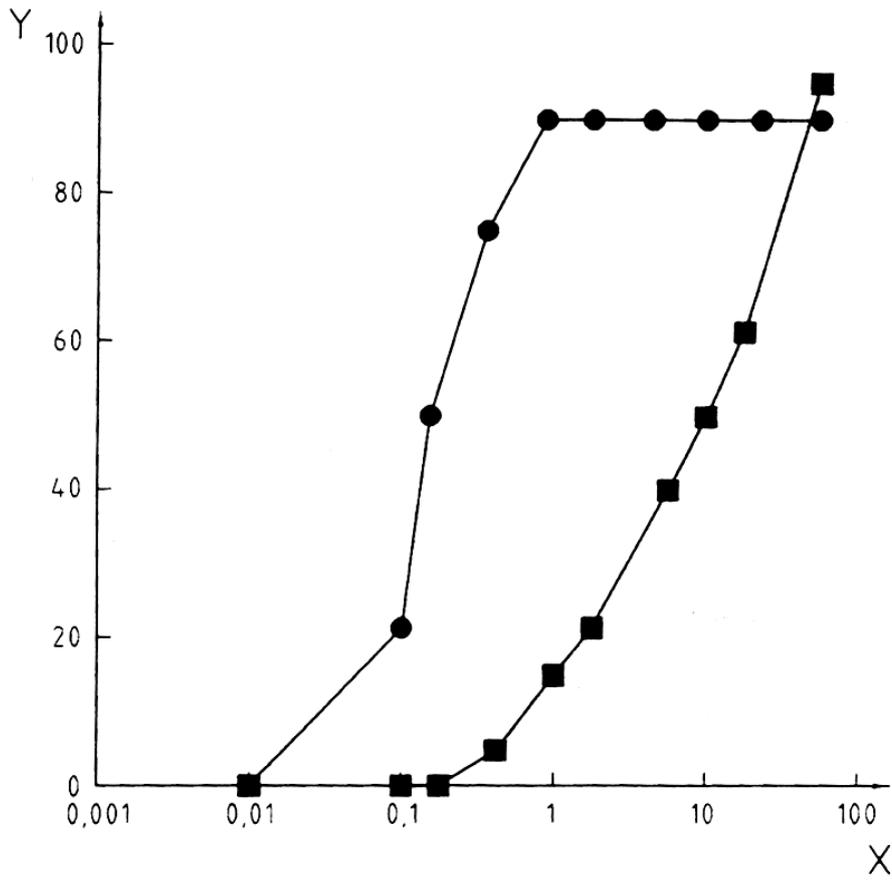


## Légende

- 1 récipient d'essai
- 2 électrode à oxygène
- 3 instrument de mesure de l'oxygène

**Graphique 2 Exemple de dispositif de mesure avec flacon DBO**

ANNEXE 4.



- Légende
- X concentration de 3,5-dichlorophénol (mg/L)
  - Y inhibition (%)
  - inhibition de la respiration hétérotrophe
  - inhibition de la nitrification
- } avec une boue nitrifiante

Graphique 3 Exemple de courbes d'inhibition