

# L'innovation métrologique pour l'analyse réglementaire des eaux

## Retour d'expérience sur la demande biochimique en oxygène à 5 jours (DBO<sub>5</sub>)

### Metrological innovation in regulatory water analysis

Feedback on the 5-days Biochemical Oxygen Demand (BOD<sub>5</sub>)

■ M. MULLER<sup>1\*</sup>, S. BELLATON<sup>1</sup>, A. YORIS<sup>1</sup>, S. GUÉRIN-RECHDAOUI<sup>2</sup>, L. CLOUSIER<sup>1,3</sup>, V. ROCHER<sup>2</sup>

<sup>1</sup> AMS Envolution – Cap Delta – Grabels

<sup>2</sup> Syndicat interdépartemental pour l'assainissement de l'agglomération parisienne (Siaap) – Service expertise et prospective – Direction du développement et de la prospective – Colombes

<sup>3</sup> AMS France – Frépillon

#### Mots-clés :

Eau  
Assainissement  
DBO  
Innovation  
Frein réglementaire  
Expérimentation  
réglementaire

#### RÉSUMÉ

Cet article constitue un retour d'expérience sur un projet d'innovation dans le domaine de l'analyse réglementaire des eaux ; plus précisément, sur la demande biochimique en oxygène (DBO). De l'idée originale vers l'adoption du produit par les utilisateurs, sont mis en lumière les freins auxquels se confronte un tel projet, mais aussi les leviers permettant à celui-ci d'aboutir. L'analyse innovante dont il est question a été développée par la société AMS Envolution, en collaboration avec le service public de l'assainissement francilien (Syndicat interdépartemental pour l'assainissement de l'agglomération parisienne – Siaap). Le produit résultant est un kit prêt-à-l'emploi, au format microplaque, couplé à une détection par fluorescence de l'activité respiratoire bactérienne. Bien que reprenant les fondements biochimiques de la méthode standard, le concept de la méthode développée rompt fortement avec l'approche traditionnelle. Il en résulte, notamment, la possibilité d'obtenir un résultat en 2 jours seulement contre 5 jours avec la méthode classique (DBO<sub>5</sub>). Évaluées selon les normes en vigueur, les performances de la méthode apparaissent comparables à celles de la méthode normée NF EN 1899-1 et compatibles avec les exigences réglementaires relatives à cette mesure. De plus, sur près de 400 échantillons d'eaux résiduaires urbaines, les valeurs de DBO<sub>5</sub> obtenues sont équivalentes à celles obtenues via la méthode classique. Néanmoins, l'utilisation en routine de cette nouvelle méthode par les laboratoires reste contrainte par la rigidité du cadre réglementaire. Ces obstacles réglementaires tendent à fragiliser la santé économique des petites et moyennes entreprises (PME) innovantes et peuvent significativement ralentir les progrès analytiques du domaine concerné. C'est pourquoi il apparaît essentiel de concéder, de manière contrôlée, une certaine flexibilité aux laboratoires quant au choix des méthodes d'analyse utilisées. Les pouvoirs publics français ont ainsi autorisé par arrêté dérogatoire, dans un cadre bien défini, la substitution de la méthode standard par la méthode innovante pour la mesure de la DBO<sub>5</sub> sur les stations d'épuration urbaine.

#### Keywords:

Water  
Wastewater treatment  
BOD  
Innovation  
Regulatory obstacle  
Regulatory experiment

#### ABSTRACT

This article is a feedback about an innovative project in the regulatory water analysis field, more especially regarding the Biochemical Oxygen Demand (BOD). From the original idea to the adoption of the product by end-users, we highlight the obstacles met by such a project but also the different supports which help to succeed. The innovative method which is at issue here was developed by the AMS Envolution company in collaboration with the Public Sewerage Service of the Greater Paris (Siaap). The final product is a ready-to-use analytical kit, under the microplate format, combined with a fluorescence detection of the bacterial respiration. Even though, the biochemical principle is similar, the analytical approach drastically differs from the classical method. As a consequence, the result can be obtained after only 2 days instead of 5 days with the classical method (BOD<sub>5</sub>). According to the standards in force, the specifications of the innovative method are comparable with the ones of the European standard method and are in agreement with the regulatory requirements for BOD<sub>5</sub> measurement. Moreover, the BOD<sub>5</sub> values obtained for almost 400 municipal wastewater samples are equivalent to the ones obtained using standard methods. However, the current rigidity of the regulatory framework drastically limits the routine use of the invention by laboratories. Such regulatory obstacles, hardly weakens the innovative small and medium-sized enterprises (SMEs) at the economical level and could significantly slowdown the analytical progress in this field. Consequently, it is vital that the public authorities concede a regulated and well-defined flexibility to laboratories regarding the choice of the analytical methods used. Aware of these issues and thanks to an experimental derogatory decree, the French authorities have allowed, with some precautions, the substitution of the standard method by the innovative one for BOD<sub>5</sub> measurement in urban sewage treatment plants.

## Introduction

La demande biochimique en oxygène (DBO) est un paramètre global permettant d'apprécier la qualité des eaux douces et résiduaires. À ce titre, elle est

comparable à d'autres paramètres de suivi tels que la demande chimique en oxygène (DCO) ou les matières en suspension (MES) [HENZ, 2008 ; RODIER, 2009]. Plus particulièrement, la DBO reflète le degré de pollution des eaux par les matières organiques biodégradables (MOB). Il s'agit d'un indice défini par la méthode de mesure à laquelle il se rattache, elle-même fortement

\* Auteur correspondant – Courriel : mathieu.muller@envolution.com

inspirée par les processus de minéralisation bactérienne de la MOB qui s'opèrent naturellement dans les milieux aquatiques. Cet indice et sa méthode de mesure ont été suggérés au début du XX<sup>e</sup> siècle, au Royaume-Uni, par la Commission royale sur l'assainissement [ROYAL COMMISSION ON SEWAGE DISPOSAL, 1915]. La MOB apportée aux milieux aquatiques naturels est en effet rapidement minéralisée par les bactéries hétérotrophes aérobies présentes dans ces milieux. Il en résulte une baisse de la teneur en oxygène des eaux. Ce mécanisme naturel est appelé processus d'autoépuration. Toutefois, si l'apport de MOB est excessif (en quantité ou en fréquence), l'oxygène dissous se maintient à des niveaux de concentration faibles. Cette asphyxie du milieu conduit à des modifications significatives de la biodiversité et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques. La capacité d'autoépuration des milieux en est altérée rendant l'eau impropre à la consommation et aux activités humaines [HARRISON, 2001].

Ainsi, la méthode d'analyse qui fut proposée il y a un siècle reflétait l'impact de la MOB sur les milieux aquatiques naturels. Il s'agissait de mesurer la quantité d'oxygène dissous « absorbée » par l'eau analysée lorsque celle-ci était maintenue pendant 5 jours à 18,3 °C, en flacons fermés et à l'obscurité. Il fut compris plus tard que cet oxygène était consommé par des bactéries pour minéraliser la MOB présente dans l'échantillon [MARA et HORAN, 2003]. Le choix des conditions de mesure (durée et température d'incubation) fut très tôt soumis à des critiques [CALVERT, 1913]. Des périodes plus courtes (2 jours) ou plus longues (7 jours), de même que des températures plus faibles (15 °C) ou plus élevées (27 °C), furent proposées, soit pour plus de représentativité de l'analyse, soit pour des raisons pratiques de mise en œuvre de la méthode au sein des laboratoires. Toutefois, même si la température d'incubation a été standardisée à 20 °C depuis, la durée du test est restée de 5 jours; il s'agit, dans ces conditions, du paramètre DBO<sub>5</sub>.

Aujourd'hui, ce test est utilisé à l'échelle mondiale et le paramètre DBO<sub>5</sub> est devenu la référence [JOUANNEAU et al., 2014]. Toutefois, en Europe, dans certains pays nordiques (Suède, Finlande) et baltiques (Lituanie), la température du test est de 20 °C, mais sa durée a été portée à 7 jours [LIU et MATTIASSON, 2002]; le résultat d'une analyse DBO<sub>7</sub> vaut entre 1,1 et 1,2 fois celui d'une analyse DBO<sub>5</sub>. Les conditions standardisées de mesure de la DBO<sub>5</sub> et de la DBO<sub>7</sub> sont décrites dans différentes normes telles les normes ISO 5815, EN 1899 ou SM 5210 B (États-Unis). La norme indienne IS 3025-44 décrit pour sa part une DBO en 3 jours à 27 °C; dans ces

conditions le résultat de l'analyse est équivalent à celui d'une analyse DBO<sub>5</sub>. Cela se démontre tant expérimentalement que théoriquement en considérant le modèle biochimique suivant, largement admis au sein de la communauté scientifique [DE MATOS et al., 2014] :

$$DBO(t, T) = DBO_u \cdot (1 - e^{-k(T)t})$$

Avec : DBO(t, T) = DBO après le temps t, à la température T, en mg d'O<sub>2</sub>/L

DBO<sub>u</sub> = DBO ultime, intrinsèque à l'échantillon analysé, en mg d'O<sub>2</sub>/L

k(T) = constante de la réaction de minéralisation bactérienne, en jour<sup>-1</sup>

t = durée de l'incubation, en jour

La constante de réaction dépend de la température, selon l'équation :

$$k(T) = k(20\text{ °C}) \cdot \theta^{(T-20\text{ °C})}$$

Avec : k(20 °C) = constante de la réaction de minéralisation bactérienne à 20 °C, en jour<sup>-1</sup>

θ = coefficient de température, sans unité

T = température d'incubation, en °C

Selon ce modèle, quand la température d'incubation augmente, jusqu'à un optimum d'environ 30-35 °C pour les bactéries hétérotrophes mésophiles, alors la constante de minéralisation augmente également [ZANONI, 1967; VAN HAANDEL et VAN DER LUBBE, 2012; DE MATOS et al., 2014]. Il en résulte que la valeur de DBO obtenue dans les conditions standard du test (5 jours/20 °C) est atteinte plus rapidement (en 3 jours seulement), à une température de 27 °C. Sur le plan expérimental, cet aspect est largement étayé par la littérature scientifique (figure 1). Toutefois, sauf quand les conditions climatiques locales le permettent, comme c'est le cas en Inde, il est plutôt délicat et coûteux de maintenir des centaines de flacons de 100 à 300 mL de

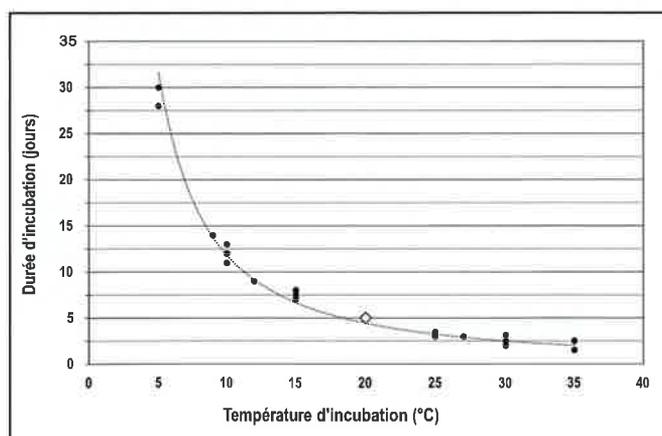


Figure 1. Binômes « durée-température » permettant d'aboutir à un résultat DBO similaire au résultat de la méthode standard (5 jours, 20 °C). D'après des résultats précédemment publiés [THERIAULT, 1926, 1927; GOTAAAS, 1948; ZANONI, 1967; DHAGE et al., 2012; DE MATOS et al., 2014]

contenance à une température supérieure à 25 °C, et ce pendant plusieurs jours.

Outre les conditions d'incubation, les différentes normes précisent également les traitements à apporter aux échantillons (conservation, dilution, neutralisation du pH, etc.), la composition du milieu tamponné, le mode d'inoculation des échantillons par un consortium bactérien adapté, la nature et la valeur de référence des contrôles qualité, ainsi que les méthodes autorisées pour mesurer l'oxygène dissous. Initialement mesuré par titrimétrie, l'oxygène dissous est aujourd'hui plus généralement mesuré via des sondes électrochimiques [JOUANNEAU *et al.*, 2014]. La révision en cours de la norme ISO prévoit l'introduction de la mesure par sonde optique. D'autres normes, telles les normes NS 4758 (Norvège) ou SM 5210 D (États-Unis), proposent une méthode manométrique qui repose sur la consommation bactérienne de l'oxygène dissous, mais aussi, par déplacement des équilibres physico-chimiques, de l'oxygène gazeux présent dans l'espace de tête du flacon de mesure [JOUANNEAU *et al.*, 2014]. Cette approche analytique qui ne limite plus l'apport d'oxygène à la phase dissoute semble également permettre d'atteindre la valeur de la DBO<sub>5</sub> traditionnelle plus rapidement (en 2 à 3 jours à 20 °C selon la norme SM 5210 D).

Dans les années 2000, des chercheurs français (INRA, CNRS, universités Aix-Marseille et Reims-Champagne-Ardenne) ont développé et breveté une méthode innovante pour mesurer la biodégradabilité de matières organiques par les bactéries hétérotrophes aérobies d'un sol [DUDAL *et al.*, 2006, 2007]. Cette méthode introduit l'utilisation à cette fin d'un bioréactif dérivé de la résazurine, une molécule sensible à l'activité respiratoire des cellules, fréquemment utilisé dans le domaine du biomédical et de l'agroalimentaire [O'BRIEN *et al.*, 2000; RAMPERSAD, 2012]. Lors du processus de minéralisation de la MOB (*figure 2*), cette molécule est convertie, au niveau de la chaîne respiratoire des bactéries impliquées, en une forme hautement fluorescente [LARSON *et al.*, 1997; KARAKASHEV *et al.*, 2003]. L'activité respiratoire des bactéries, et donc leur consommation d'oxygène, peut ainsi être mesurée par fluorimétrie [MCNICHOLL *et al.*, 2007; GONZALEZ-PINZON *et al.*, 2012, 2016]. Plus la teneur en MOB de l'échantillon testé et donc la respiration bactérienne qui en résulte sont élevées, plus l'intensité de fluorescence mesurée, dans des conditions fixées, est élevée.

De ce résultat a émergé l'idée d'étendre cette méthode à la mesure de la DBO des eaux. Cette possibilité fut étudiée dans le cadre d'un projet de création d'entreprise, avec le soutien de l'INRA, de l'école d'agronomie

de Montpellier, de la ville de Montpellier, de la région Languedoc-Roussillon (aujourd'hui Occitanie), mais aussi de l'État français avec l'attribution d'une aide à la création d'entreprises de technologies innovantes. En bénéficiant d'une licence exclusive d'exploitation du brevet déposé par le consortium public, la start-up Envolution, créée en 2010, a ainsi pu transformer l'idée initiale en un produit robuste et commercialisable. Les quatre années de recherche et développement nécessaires à l'atteinte de cet objectif n'ont pu être menées que grâce aux soutiens locaux (ville, région) et aux politiques nationales et européennes d'aide à l'innovation (Banque publique d'investissement, crédit d'impôt recherche et innovation, statut Jeune entreprise innovante, Fonds européen de développement régional, etc.) dont a bénéficié la start-up. Au total, près de 400 000 euros d'aides publiques et environ autant de fonds privés ont été investis dans ce projet d'innovation. Le succès technique du projet réside aussi dans la mise en place de collaborations avec des utilisateurs finaux, en particulier, dès 2012, avec le Service public de l'assainissement francilien (Siaap), notamment dans le cadre du programme de recherche Mocopée<sup>4</sup> (2014-2017), piloté par le Siaap, l'Université technologique de Compiègne et l'Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (Irstea). Les premiers prototypes développés ont ainsi pu être testés, optimisés et validés en partenariat avec les équipes du département développement et perspectives du Siaap.

Au final, ces travaux de recherche et développement ont conduit à de nouvelles innovations et au dépôt de deux nouvelles demandes de brevet par la société Envolution, devenue depuis AMS Envolution [PAUTREMAT *et al.*, 2013; MULLER *et al.*, 2016]. Le produit résultant

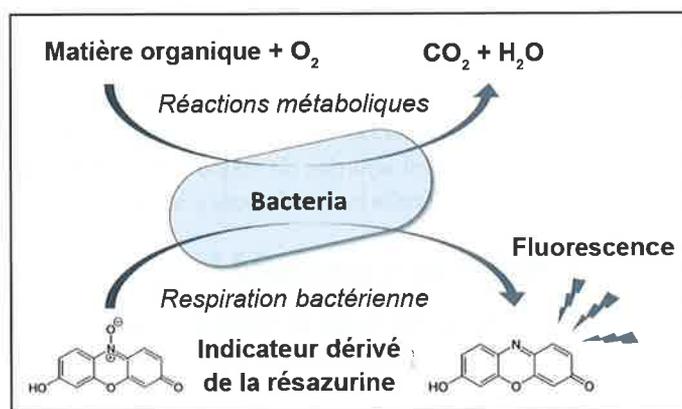


Figure 2. Schéma simplifié du principe réactionnel de la méthode innovante (Enverdi)

<sup>4</sup> www.mocopee.com

(nommé Enverdi), désormais commercialisé par le groupe AMS Alliance, prend la forme d'un kit d'analyse prêt-à-l'emploi couplé à un lecteur de fluorescence pour microplaque 96 puits, format analytique sous lequel est mise en œuvre cette nouvelle méthode. Le principe biochimique exploité est le même que la méthode normée, à savoir la minéralisation bactérienne de la MOB, mais l'activité respiratoire résultant de cette minéralisation est ici mesurée via la méthode développée précédemment par le consortium public. Ce choix, qui permet de fortement miniaturiser l'analyse (volume réactionnel divisé par un facteur 1000), rend également possible d'incuber les échantillons à une température davantage optimale pour le métabolisme des bactéries mésophiles, soit 30 °C. Comme démontré précédemment, à cette température, le métabolisme bactérien est grandement accéléré et 2 jours seulement sont nécessaires pour déterminer une valeur de DBO<sub>5</sub>. Autre point important, puisqu'il s'agit d'une mesure directe de l'activité respiratoire au niveau cellulaire, et non d'une mesure de l'oxygène dissous environnant, les puits de la microplaque ne sont pas hermétiquement clos et la réaction n'est pas limitée par l'oxygène dissous disponible. L'oxygène atmosphérique alimente continuellement le milieu réactionnel. Enfin, le résultat final est exprimé en mgO<sub>2</sub>/L, comme dans la méthode de référence, grâce à l'analyse simultanée de solutions étalons de DBO<sub>5</sub> connue, préalablement déterminée selon la méthode NF EN 1899-1. Ces solutions étalons, constituées de différents pools de matière organique plus ou moins facilement et rapidement biodégradables [MULLER *et al.*, 2016], visent à miner la MOB d'échantillons réels, en particulier celle des eaux résiduaires urbaines (ERU).

Cet article présente les performances de la méthode innovante en comparaison de la méthode classique issue des normes en vigueur et au regard des exigences réglementaires actuelles. Sont mis en lumière également les avantages de la méthode, les limites identifiées à ce jour et les améliorations à venir. Enfin, les obstacles réglementaires limitant son adoption par les laboratoires sont abordés de même que les solutions adoptées à l'échelle nationale pour y remédier.

## 1. Matériels et méthodes

### 1.1. Échantillonnage et sites d'essais

Les échantillons d'ERU utilisés pour la validation de la méthode innovante proviennent de six bassins de collecte différents. Cinq des bassins se trouvent en France (deux au nord, un au centre et deux au sud du territoire métropolitain); le sixième bassin se trouve au nord des États-Unis. Chacun de ces bassins compte plusieurs

stations d'épuration (STEP), majoritairement situées en zone urbaine ou semi-urbaine, avec pour certaines des apports industriels significatifs. Les tailles des STEP s'échelonnaient de quelques dizaines de milliers à plus d'un million d'équivalent-habitant. Dans chaque bassin de collecte, les mesures DBO<sub>5</sub>, selon la méthode classique et selon la méthode innovante, ont été réalisées en collaboration avec un laboratoire local accrédité sur la méthode normée utilisée. Au total, plus de 400 échantillons d'ERU ont été collectés et analysés. Le nombre d'échantillons et la diversité des bassins et sites de collecte ont permis d'assurer une représentativité accrue des ERU analysées. Par ailleurs, la multiplicité des sites d'analyse a permis de prendre en compte la reproductibilité de la méthode innovante au regard de celle de la méthode classique, de la diversité des pratiques et de la variabilité biologique des inocula bactériens utilisés.

### 1.2. Méthode classique de mesure de la DBO<sub>5</sub>

Les mesures classiques de DBO<sub>5</sub> ont été réalisées selon la norme en vigueur dans le pays concerné, soit NF EN 1899-1 pour la France et Standard Method 5210 B pour les États-Unis.

### 1.3. Méthode innovante de mesure de la DBO<sub>5</sub>

Le kit d'analyse Enverdi (AMS Alliance, France) contient le bioréactif, le tampon pH nutritif, huit solutions d'étalonnage, des microplaques et du petit matériel nécessaire à la réalisation du test (seringues, filtres, films pour microplaque). Les lecteurs de fluorescence utilisés sur chacun des sites étaient des FLX 800 (Biotek, États-Unis) équipés d'une lampe halogène, de filtres d'excitation/émission à 540/600 nm et d'un photomultiplicateur.

La procédure d'analyse comprend les étapes préliminaires suivantes : dilution éventuelle des échantillons en fonction de la DCO dans du tampon dilué au 1/50; vérification et, si nécessaire, ajustement du pH entre 6 et 8. Les échantillons subissent ensuite un prétraitement en microplaque afin d'inhiber les bactéries endogènes (10 min à 120 ± 1 °C en étuve sèche puis 10 min à 4 ± 1 °C en chambre froide). L'intérêt de ce prétraitement est de permettre, par la suite, une inoculation bactérienne homogène entre les différents échantillons et entre les échantillons et les solutions d'étalonnage (ou contrôles qualité). L'inoculum bactérien est préparé à partir d'une entrée brute de STEP urbaine filtrée à 1,2 µm; le filtrat ainsi produit est récupéré et éventuellement dilué dans du tampon dilué au 1/50. La microplaque est ensuite remplie avec 20 µL de bioréactif, 60 µL de tampon brut, 170 µL d'un échantillon prétraité, d'une solution d'étalonnage ou d'une solution

de contrôle. Enfin, 20 µL de filtrat brut ou dilué sont ajoutés en tant qu'inoculum bactérien. La microplaque est immédiatement scellée avec un film poreux, limitant l'évaporation mais permettant les échanges gazeux, puis introduite dans le lecteur de fluorescence. La fluorescence est mesurée toutes les 30 min pendant 48 heures. Le lecteur assure aussi l'agitation et l'incubation de la microplaque à  $30 \pm 1$  °C.

La composition du tampon est proche de celle de la norme EN NF 1899-1 et la composition des contrôles qualité est identique (acide glutamique et glucose à 150 mg/L chacun – DBO<sub>5</sub> = 210 mgO<sub>2</sub>/L en Europe et 198 mgO<sub>2</sub>/L aux États-Unis). L'ensemble du protocole analytique pour 40 échantillons et huit points d'étalonnage en duplicat (soit 96 puits) prend moins de 60 min. Le traitement des résultats (construction des courbes étalons et quantification des échantillons et contrôles) est automatisé *via* un programme informatique et ne prend que quelques minutes.

#### 1.4. Procédures de validation

La validation de la méthode a respecté les normes suivantes : ISO/TS 16489 pour tester l'équivalence des résultats entre la méthode innovante et les méthodes normées ; NF T90-210 pour tester le domaine d'étalonnage, la limite de quantification et l'exactitude des résultats ; NF ISO 11352 pour déterminer les incertitudes étendues de la méthode en fonction de la valeur DBO<sub>5</sub> mesurée. Par ailleurs, la méthode innovante a été confrontée à la méthode normée dans le cadre de quatre essais interlaboratoires (EIL) basés sur des échantillons

réels non dopés (trois cas) ou préalablement dopé (un cas). Ces EIL ont été pilotés selon la norme NF EN ISO 16140-2 par deux organismes accrédités différents (A et B). Le risque à concéder lors des tests statistiques utilisés pour évaluer l'équivalence des résultats fut de 5% systématiquement.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Équivalence des résultats

En 2014, les résultats de premiers travaux furent publiés concernant l'équivalence des résultats entre la méthode innovante et les principales méthodes normées de mesure de la DBO<sub>5</sub>, NF EN 1899-1 et SM 5210 B [MULLER *et al.*, 2014]. Une centaine d'échantillons d'ERU furent collectés et analysés par le Siaap (France) et le Milwaukee Metropolitan Sewage District (MMSD, États-Unis). Les résultats obtenus par la méthode innovante et les méthodes normées furent comparés *via* différents tests statistiques suggérés par la norme ISO/TS 16489. Tous ces tests montraient qu'il n'existait pas de différences significatives entre ces résultats. Cette conclusion fut confirmée plus tard à travers une autre étude comparative dont les résultats furent publiés en 2015 [MAGNIN *et al.*, 2015]. En considérant cette fois 261 échantillons d'ERU, collectés et analysés par quatre laboratoires (trois en France et un aux États-Unis), aucune différence significative ne fut à nouveau détectée.

Les résultats obtenus pour 393 échantillons d'ERU collectés et analysés de 2013 à 2016 par six laboratoires (cinq en France et un aux États-Unis) sont présentés sur la *figure 3*. En utilisant les mêmes tests statistiques

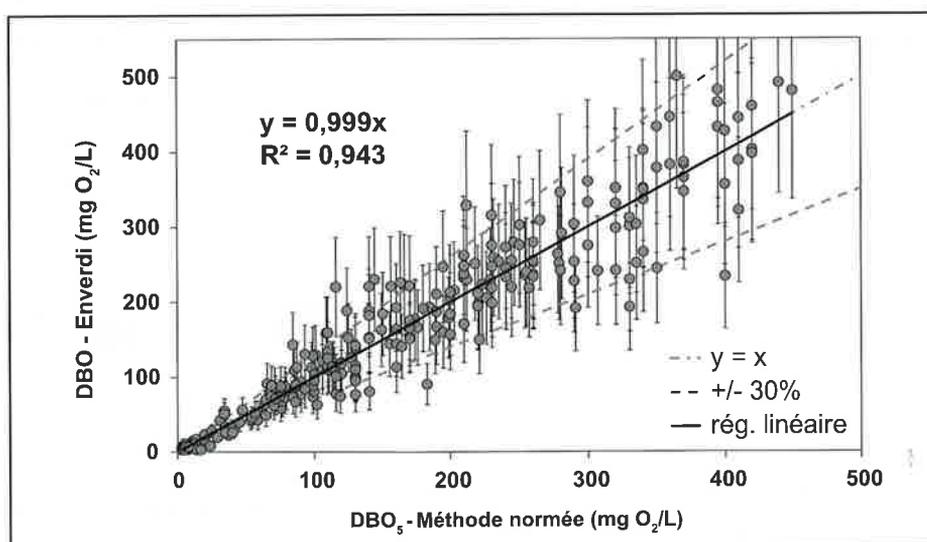


Figure 3. Corrélation entre les résultats de la méthode innovante (Enverdi) et les résultats de la méthode normée résultant de l'analyse de 393 eaux résiduaires urbaines (entrées et sorties de stations d'épuration). Les lignes en pointillés intitulées « +/- 30% » illustrent l'incertitude étendue de la méthode normée ; les barres d'erreurs verticales illustrent l'incertitude étendue de la méthode innovante

que lors des précédents travaux, nous avons montré que l'ordonnée à l'origine de la droite de régression ( $r^2 > 0,94$ ) n'est pas significativement différente de 0, avec un intervalle de confiance de  $[-3; 5]$ . De même, le coefficient directeur de la droite n'est pas significativement différent de 1, avec un intervalle de confiance de  $[0,98; 1,02]$ . Ce résultat prouve l'absence de biais systématique ou proportionnel entre les résultats  $DBO_5$  issus des deux approches analytiques. Sur la base du test de Bland et Altman, des conclusions similaires sont obtenues. La droite de régression entre les erreurs normalisées de la méthode innovante et les valeurs moyennes de  $DBO_5$  retrouvées ( $r^2 < 0,01$ ; non illustré) présente un coefficient directeur non significativement différent de 0 (intervalle de confiance =  $[-0,0002; 0,0424]$ ). Par ailleurs, l'erreur normalisée médiane est égale à 0 et l'erreur normalisée moyenne n'est pas significativement différente de 0 (intervalle de confiance =  $[-5,0; 0,3]$ ). En conséquence, cela indique qu'en utilisant la méthode innovante, la valeur  $DBO_5$  obtenue n'est ni sous-estimée, ni surestimée. Enfin, avec une valeur-p de 0,8, le test de Wilcoxon renforce le constat que les différences entre les résultats issus des deux approches analytiques peuvent être considérées comme négligeables.

Ainsi, les résultats de cette nouvelle étude comparative portant sur près de 400 échantillons d'ERU montrent clairement une équivalence des résultats entre la méthode innovante et les méthodes normées. Il en ressort que, pour 98% des échantillons analysés, le résultat obtenu avec la méthode innovante tombe dans le domaine d'incertitude des méthodes normées (le plus souvent  $\pm 30\%$ , voire plus pour des  $DBO_5$  inférieurs à  $10 \text{ mgO}_2/\text{L}$  et jusqu'à  $60\%$  à la limite de quantification). À noter que cette démonstration est basée sur des analyses effectuées sur de longues périodes (de quelques mois à 1 an selon les sites), sur différents sites en France et aux États-Unis, et avec des échantillons dont les valeurs de  $DBO_5$  s'échelonnent de 3 à  $500 \text{ mgO}_2/\text{L}$ . Par conséquent, cette comparaison prend en compte les éventuelles variabilités géographiques et temporelles des caractéristiques des ERU, incluant les capacités métaboliques du consortium bactérien utilisé comme inoculum, de même que la diversité des pratiques et compétences au sein des laboratoires. Enfin, l'équivalence des résultats entre la méthode innovante, dont les conditions d'incubation sont 2 jours à  $30^\circ\text{C}$ , et les méthodes normées, dont les conditions d'incubation sont 5 jours à  $20^\circ\text{C}$ , est en adéquation avec les travaux effectués par d'autres chercheurs sur le couple « durée-température » dans le cadre de la méthode classique (figure 1). Cette équivalence confirme également des

travaux récents démontrant que la fluorescence résultant de la réduction de ce type de bioréactif par des bactéries est bien corrélée à la consommation d'oxygène de ces mêmes bactéries pour la minéralisation de la MOB [MCNICHOLL *et al.*, 2007; GONZALEZ-PINZON *et al.*, 2012, 2016].

En complément de cette vaste étude comparative, quatre analyses ont été réalisées dans le cadre d'EIL conduits par deux organismes accrédités (A et B), dans le respect de la norme NF EN ISO 16140-2. Les analyses  $DBO_5$  des échantillons tests ont été effectuées par le Siaap, selon la méthode innovante et selon la norme NF EN 1899-1. Trois de ces échantillons tests étaient des ERU brutes, non dopées, présentant des  $DBO_5$  de 6,67 et  $168 \text{ mgO}_2/\text{L}$ . Dans ces conditions, des z-scores hautement satisfaisants ( $< \pm 1$ ) ont été obtenus par les deux méthodes d'analyse (figure 4). Pour une raison inconnue, l'analyse du quatrième échantillon test, une ERU préalablement dopée pour atteindre une  $DBO_5$  finale de  $40 \text{ mgO}_2/\text{L}$ , a conduit à un z-score incorrect pour la méthode innovante alors que le résultat obtenu par la méthode normée était cohérent avec la valeur moyenne résultant de l'ensemble des laboratoires (non illustré). Toutefois, des études ultérieures, impliquant quatre inocula bactériens collectés en différents lieux en France (deux au nord et deux au sud) et à différentes saisons (été et hiver), ont démontré l'efficacité de la méthode innovante pour quantifier de manière exacte de telles ERU dopées, et ce pour des  $DBO_5$  finales de 25 et  $50 \text{ mgO}_2/\text{L}$  (non illustré).

## 2.2. Performances analytiques

Outre l'équivalence de résultat avec les principales méthodes standard, les performances analytiques de la

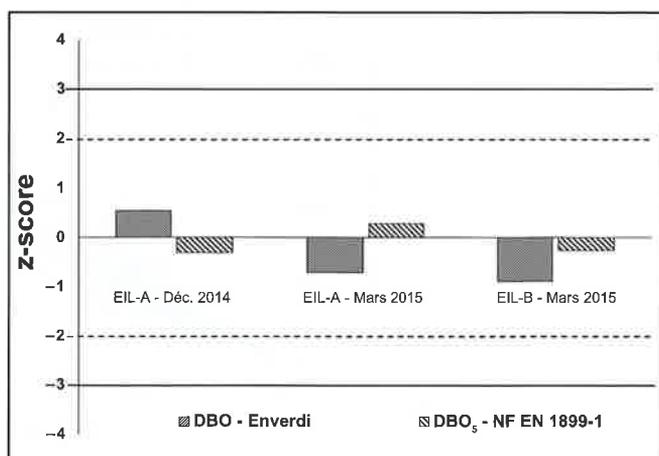


Figure 4. Résultats d'essais interlaboratoires portant sur l'analyse d'eaux résiduaires urbaines réelles, non dopées, selon la méthode innovante (Enverdi) et selon la méthode normée (NF EN 1899-1). Les résultats sont jugés satisfaisants lorsque le z-score obtenu est compris entre -2 et 2

méthode innovante ont été évaluées. Ce travail a été mené par deux laboratoires en France selon les normes en vigueur pour la validation des méthodes physico-chimiques d'analyse de l'eau (NF T90-210 et ISO 11352). Les performances de la méthode sont résumées dans le *tableau I*.

Ces résultats, notamment la limite de quantification à 3 mgO<sub>2</sub>/L, répondent aux exigences réglementaires françaises et européennes pour l'analyse de la DBO<sub>5</sub> des ERU. Les performances de la méthode innovante sont par ailleurs tout à fait comparables à celles de la méthode normée NF EN 1899-1 opérée en routine, sous accréditation, par les laboratoires partenaires. L'attention doit toutefois être attirée sur le domaine d'étalonnage de la méthode innovante, jusqu'à 90 mgO<sub>2</sub>/L, soit dix fois plus étendu que le domaine de linéarité de la méthode normée qui lui se trouve limité par la solubilité de l'oxygène dissous (environ 9 mgO<sub>2</sub>/L à 20 °C). Ainsi, avec la méthode innovante, les analyses peuvent être effectuées sans dilution jusqu'à 90 mgO<sub>2</sub>/L alors que, pour une telle DBO<sub>5</sub>, une dilution au 1/20 est recommandée dans le cadre de la méthode normée. La non-limitation par l'oxygène dissous dans le cadre de la méthode innovante, caractéristique intrinsèque au mode de détection utilisé, limite le recours aux dilutions d'échantillon et réduit par un facteur 20 les taux de dilution appliqués. Cet avantage pourrait permettre de réduire significativement les erreurs de dilution susceptibles de subvenir avec la méthode normée.

### 2.3. Périmètre d'application et améliorations envisagées

Habituellement, la DBO<sub>5</sub> mesurée est la DBO<sub>5</sub> carbonée puisqu'un inhibiteur de nitrification (N-allyl-thiourée ou ATU) est ajouté pour supprimer cette activité bactérienne

et la consommation d'oxygène qui en résulte. Dans le cas de la méthode innovante, des essais comparatifs avec ou sans ATU furent menés sur des échantillons réels (entrée et sortie de STEP) et sur des solutions standard. Il en a résulté qu'aucune différence significative n'avait été constatée entre les résultats issus de ces deux protocoles (non illustré). Cela signifierait que les bactéries nitrifiantes, même sans ATU, montrent une activité négligeable avant 48 h à 30 °C, dans les conditions de la méthode innovante. Cette conclusion est cohérente avec des données de la littérature qui indiquent que, même si 30 °C est une température optimale pour les bactéries nitrifiantes, la nitrification ne débute pas avant le 7<sup>e</sup> jour, lors d'une incubation à 30 °C selon la méthode classique [ZANONI, 1967].

Par ailleurs, aucune interférence chimique significative avec le bioréactif n'a été constatée à la suite de l'analyse d'un large panel de substances chimiques aux concentrations attendues dans les ERU (entrée et sortie de STEP). Ce panel incluait des métaux et sels divers ainsi que des surfactants organiques (non illustré). Toutefois, dans des eaux résiduaires industrielles (ERI), on ne peut exclure la présence de certaines de ces substances à des concentrations suffisantes pour potentiellement interférer avec le bioréactif. Pour ce type d'échantillons, des études préliminaires minutieuses devraient être menées avant d'utiliser la méthode innovante en routine. Néanmoins, des résultats satisfaisants ont été obtenus à la suite de l'analyse d'échantillons du type effluents papetiers, effluents agro-industriels et lixiviats de décharge. De même, la méthode innovante a été utilisée avec succès pour mesurer la DBO<sub>5</sub> sur des échantillons de lisier porcin [NEHMTOW *et al.*, 2016]. Les échantillons présentant de très fortes teneurs en particules, comme les lisiers porcins, doivent être

Paramètre testé	Méthode innovante	NF EN 1899-1 / Réglementation
Limite de quantification <i>selon NF T90-210</i>	3 mgO <sub>2</sub> /L	3 mgO <sub>2</sub> /L (exigence réglementaire)
Domaine d'étalonnage <i>selon NF T90-210</i>	Jusqu'à : 90 mgO <sub>2</sub> /L	Jusqu'à : 9 mgO <sub>2</sub> /L
Exactitude <i>selon NF T90-210</i>	Satisfaisante à : 3, 9, 15, 37, 50, 160 mgO <sub>2</sub> /L	Réputée satisfaisante jusqu'à : 6 000 mgO <sub>2</sub> /L
Incertitude étendue <i>selon ISO 11352</i>	De 3 à 6 mgO <sub>2</sub> /L : inférieure à ±1,8 mgO <sub>2</sub> /L  Au-delà de 6 mgO <sub>2</sub> /L : inférieure à ±30%	De 3 à 6 mgO <sub>2</sub> /L : ±1,2 à ±1,8 mgO <sub>2</sub> /L  Au-delà de 6 mgO <sub>2</sub> /L : ±20 à ±30%

**Tableau I. Performances analytiques de la méthode innovante déterminées selon les normes en vigueur. Les exigences réglementaires françaises ou les performances de la méthode normée sont données à titre comparatif**

préalablement homogénéisés par broyage avant analyse selon la méthode innovante (tel que recommandé également par la norme NF EN 1899-1). Toutefois, un tel prétraitement s'est révélé inutile pour les ERU. En effet, étant donné les microvolumes utilisés avec la méthode innovante, la question de la représentativité de l'échantillon test était pertinente. Cependant, les résultats obtenus avec la méthode innovante sur différentes fractions granulométriques (< 0,1 µm, < 1 µm et totale) d'une ERU collectée par le Siaap à trois dates différentes (I = février, II = mars et III = avril) sont tout à fait comparables à ceux obtenus par la méthode normée sur ces mêmes fractions (figure 5). Ce résultat indique que la méthode innovante est parfaitement sensible aux MOB particulières qui contribuent à la DBO<sub>5</sub> obtenue via la méthode normée. Les microvolumes utilisés dans la méthode innovante sont donc suffisamment représentatifs pour l'analyse d'échantillons de type ERU, même sans broyage préalable.

À ce jour, la méthode innovante développée n'est pas suffisamment sensible pour l'analyse des eaux douces. Pour de tels échantillons, la limite de quantification devrait être de 0,5 mgO<sub>2</sub>/L (contre 3 mgO<sub>2</sub>/L actuellement). Cependant, une version plus sensible du kit, spécialement conçue pour les eaux douces, est en cours de validation en interne ; un premier prototype sera disponible mi-2018 pour des premiers essais chez des utilisateurs pilotes. Deux autres améliorations sont également en cours d'investigation. Il s'agit, d'une part, de l'automatisation du protocole analytique, incluant

l'étape de dilution des échantillons et l'étape de préparation des microplaques. En sus du temps économisé, une telle perspective pourrait grandement contribuer à réduire les erreurs d'opérateurs et de dilution, conduisant ainsi à une meilleure exactitude des résultats. Le second sujet concerne le développement d'un inoculum bactérien standardisé et performant. En effet, les inocula lyophilisés actuellement disponibles sur le marché pour l'analyse de la DBO<sub>5</sub> (ex. : PolySeed, distribué par InterLab, États-Unis, étant un des plus utilisés en France) ne sont pas suffisamment performants pour être utilisés avec la méthode innovante. Même si ces produits fonctionnent correctement sous la méthode normée, les bactéries contenues dans ces produits ne sont probablement pas adaptées aux conditions analytiques de la méthode innovante (durée d'incubation courte à 30 °C). De plus, des périodes préliminaires d'acclimatation ne semblent pas améliorer significativement leur efficacité. En conséquence, un inoculum standardisé performant pour la méthode innovante a été développé et est disponible depuis fin 2017 pour des premiers essais chez des utilisateurs pilotes. Une seconde version de cet inoculum standard sera développée courant 2018 pour une utilisation avec la méthode normée.

#### 2.4. Limites réglementaires et solution adoptée

En dépit de ces résultats scientifiques et techniques satisfaisants, et malgré les atouts majeurs que présente la méthode innovante, son adoption et son utilisation en routine par les laboratoires demeurent contraintes

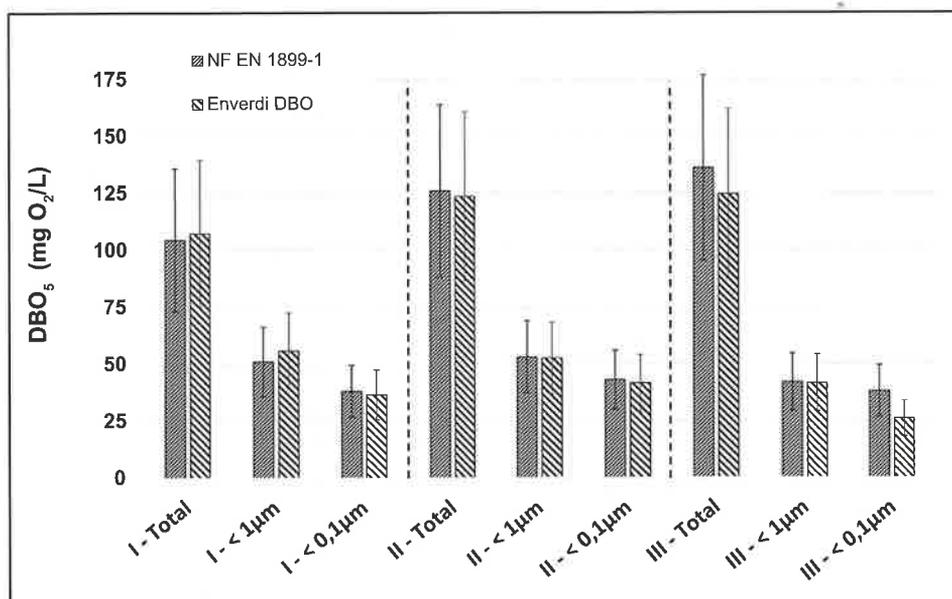


Figure 5. Résultats DBO<sub>5</sub> obtenus par la méthode normée et la méthode innovante sur différentes fractions granulométriques (< 0,1 µm, < 1 µm et totale) de la même eau résiduaire urbaine prélevée à trois dates différentes (I, II et III). Les barres d'erreurs verticales illustrent l'incertitude étendue des méthodes, soit ± 30 %

par le contexte réglementaire en vigueur. En effet, en France, les arrêtés ministériels mentionnent explicitement que la DBO doit être mesurée sur 5 jours à 20°C selon la norme NF EN 1899-1 ou -2, notamment pour le contrôle des eaux en entrée et sortie de STEP urbaines [ARRÊTÉ du 21 juillet 2015]. À l'échelle européenne, les directives mentionnent la durée de 5 jours et la température de 20°C sans pour autant imposer l'utilisation de normes particulières [DIRECTIVE DU CONSEIL EUROPÉEN, 1991]. De plus, au niveau européen, comme évoqué précédemment, certains pays ont opté pour la DBO<sub>7</sub>. Dans d'autres pays, comme en Italie, la réglementation nationale accepte plusieurs normes, dont celles relatives à la méthode manométrique, telle la norme 5210 D émanant des États-Unis [CAVALIERI *et al.*, 2000]. Par ailleurs, aucune procédure officielle n'existe pour faire évaluer et reconnaître par les pouvoirs publics une méthode d'analyse innovante pour le contrôle réglementaire des eaux. Cet obstacle réglementaire à l'innovation dans ce domaine induit deux risques majeurs : d'une part, un risque de fragilisation économique des petites et moyennes entreprises (PME) innovantes, voire de faillite de ces entreprises<sup>5</sup> et, d'autre part, un risque de ralentissement des progrès analytiques pour le contrôle réglementaire des eaux.

Conscients de ces enjeux, à la fois environnementaux et économiques, les pouvoirs publics français cherchent aujourd'hui à définir une procédure officielle d'acceptation réglementaire des méthodes d'analyse de l'eau innovantes. À cette fin, un groupe de travail a été formé sous l'égide de l'Agence française pour la biodiversité (AFB) et du Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE). En outre, un programme novateur a été lancé en 2016 par la France dans le but précis de lever les obstacles réglementaires à l'innovation et cela dans divers domaines. Ce programme, dénommé « France Expérimentation », repose sur l'article 37-1 de la Constitution française et est piloté par le Ministère de l'Économie et des finances via la Direction générale des entreprises<sup>6</sup>. Grâce à ce programme, les pouvoirs publics peuvent prendre des mesures réglementaires dérogoires, sur demande justifiée des acteurs économiques, afin d'expérimenter des produits, procédés ou services innovants et d'évaluer à grande échelle les effets de l'évolution réglementaire que ces innovations requièrent.

Parmi les 85 propositions soumises à l'appel à projets de 2016, six conduiront prochainement à une expérimentation réglementaire, dont une portera sur la méthode

innovante Enverdi. Pour ce faire, un arrêté expérimental a été publié en septembre 2017 [ARRÊTÉ du 10 août 2017], en dérogation à l'arrêté du 21 juillet 2015 portant sur les systèmes d'assainissement collectif et non collectif recevant plus de 1,2 kg/j de DBO<sub>5</sub>. Cet arrêté expérimental permet, pendant une durée de 2 ans, de substituer la méthode normée de mesure de la DBO<sub>5</sub> (NF EN 1899-1) par la méthode innovante (code Sandre 991) pour le contrôle réglementaire des eaux en entrée et sortie de STEP urbaine. À ce stade, seules les STEP urbaines situées sur les bassins hydrographiques Artois-Picardie, Seine-Normandie, Rhône-Méditerranée et Adour-Garonne sont concernées. Les laboratoires réalisant la mesure peuvent se situer n'importe où en France, mais devront être accrédités sur la méthode NF EN 1899-1 (code Sandre 316) pour la mesure du paramètre DBO<sub>5</sub> (code Sandre 1313) sur les eaux résiduaires. De même, avant toute substitution de méthode, le laboratoire devra avoir 1) caractérisé la méthode innovante par lui-même, selon les normes NF T90-210 et ISO 11352, 2) démontré l'équivalence de résultat avec la méthode normée sur au moins 30 échantillons représentatifs, selon la norme ISO/TS 16489, et 3) avoir participé avec succès à au moins un EIL, organisé par un organisme accrédité selon la norme NF EN ISO 16140-2. À la suite de ces travaux préalables, la méthode innovante pourra être utilisée en lieu et place de la méthode normée pour environ 50% des contrôles réglementaires exigés sur les STEP éligibles; cela permettant à la France de rester en conformité vis-à-vis de la réglementation européenne actuelle. La méthode normée continuera à être utilisée pour les 50% de contrôles réglementaires restants. Durant l'expérimentation, les deux méthodes devront être alternées au moins mensuellement pour chaque STEP contrôlée. L'expérimentation sera supervisée par un comité spécial qui se réunira semestriellement. À l'issue de l'expérimentation, les performances de la nouvelle méthode et l'impact de son utilisation par les laboratoires seront évalués conjointement par les Ministères de l'Environnement, de la Santé et de l'Économie. Si l'expérimentation est concluante, la mesure dérogoire pourra être pérennisée, étendue et généralisée à l'ensemble du territoire national. En outre, les résultats de l'expérimentation pourront être exploités par la France pour proposer une évolution de la réglementation européenne à ce sujet.

## Conclusion et perspectives

Les résultats des travaux de validation présentés dans cet article montrent clairement que la méthode innovante de mesure de la DBO<sub>5</sub> développée et commercialisée au format kit analytique constitue une alterna-

<sup>5</sup> Ce fut le cas pour la société Envolve dont la survie est due au rachat par le groupe AMS Alliance fin 2015.

<sup>6</sup> [www.entreprises.gouv.fr/politique-et-enjeux/france-experimentation](http://www.entreprises.gouv.fr/politique-et-enjeux/france-experimentation)

tive sérieuse à la méthode classique. En particulier, les résultats obtenus sur un large panel d'échantillons de type ERU sont statistiquement similaires à ceux obtenus par la méthode classique. De plus, les performances du kit sont comparables à celles de la méthode normée européenne et en accord avec les exigences réglementaires à ce sujet. Même si des améliorations sont possibles et prévues (automatisation, adaptation aux eaux douces, inoculum standardisé) ou que certaines précautions sont parfois requises (cas des ERI), la méthode est d'ores et déjà suffisamment mature pour être utilisée en routine pour le contrôle des STEP urbaines. Pour cette application, la méthode présente en sus l'avantage d'être plus rapide que la méthode classique (2 jours contre 5 jours) offrant par conséquent plus de réactivité aux opérateurs en vue du pilotage des procédés épuratoires. Parmi les autres avantages de la méthode innovante comparativement à la méthode classique, nous pouvons citer : un moindre investissement en équipement, une compacité accrue et une grande facilité d'utilisation ; soit des économies financières, d'espace et de temps. En plus, la méthode ne nécessite pas d'ajout d'ATU, requiert moins de dilutions d'échantillons ou des taux de dilution plus faibles. Elle permet également une inoculation plus homogène entre échantillons et entre échantillons et contrôles qualité.

L'expérimentation réglementaire des méthodes innovantes d'analyse de l'eau, telle que rendue possible par le programme « France Expérimentation », semble être une perspective intéressante et encourageante pour

lever les blocages réglementaires à l'innovation dans ce domaine. Cet outil national, qui existe également dans d'autres pays (Royaume-Uni, Japon, Australie), pourrait clairement favoriser le développement économique lié à l'innovation et contribuer à dynamiser les progrès analytiques relatifs au suivi de la qualité des eaux. Il serait souhaitable à l'avenir que cet outil inspire d'autres pays européens ou bien s'inscrive dans un cadre communautaire. En attendant, il semble évident que cette initiative française est le complément indispensable aux aides publiques de financement de l'innovation qui encouragent elles-mêmes l'implication de PME sur des sujets de recherche innovants et risqués, à forte valeur économique et industrielle. Or financer de tels programmes sans rendre ultérieurement possible la valorisation économique et industrielle des résultats obtenus serait grandement improductif.

## Remerciements

Les auteurs sont reconnaissants à Laure Menjou, Jean-Francois Moisan, Audrey Janot et Perrine Meche du Siaap pour leur contribution scientifique et technique majeure à ce travail. Nous souhaitons aussi remercier Yves Dudal, Romy-Alice Goy, Nathalie Pautremat et Audrey Magnin qui furent des collaborateurs précieux et indispensables au succès de ce projet. Nous adressons également notre gratitude au programme de recherche « Mocopée » (MOfélisation, Control et Optimisation des Procédés d'Épuration des Eaux) pour son soutien financier.

## Bibliographie

ARRÊTÉ du 21 juillet 2015 (DEVL1429608A) relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif, à l'exception des installations d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique inférieure ou égale à 1,2 kg/j de DBO<sub>5</sub>. *JORF* 0190, p. 14457.

ARRÊTÉ du 10 août 2017 (TREL1703795A) relatif à l'expérimentation d'une méthode de détermination de la demande biochimique en oxygène par mesure fluorimétrique de la respiration bactérienne dans les stations de traitement des eaux usées urbaines. *JORF* 0223.

CALVERT H.T. (1913) : « The eighth report of the Royal Commission on sewage disposal ». *Journal of the Society of Chemical Industry*; 32(6) : 265-74.

CAVALIERI S., GIACOMELLI V., MAZZONI M. (2000) : *I macrodescrittori del decreto legislativo 152/99. Rassegnat Dei Metodi Analitici e di camionamento* (Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, Roma).

DE MATOS M.P., BORGES A.C., DE MATOS A.T., DA SILVA E.F., MARTINEZ M.A. (2014) : « Effect of time-temperature binomial

in obtaining biochemical oxygen demand of different wastewaters ». *Engenharia Agrícola*; 34 : 332-40.

DIRECTIVE DU CONSEIL EUROPÉEN 91/271/EEC (1991) : *Urban wastewater treatment*. *JO L135*, p. 40-52.

DHAGE S.S., DALVI A.A., PRABHU D.V. (2012) : « Reaction kinetics and validity of BOD test for domestic wastewater released in marine ecosystems ». *Environmental Monitoring and Assessment*; 184(9) : 5301-10.

DUDAL Y., HOLGADO R., KNOTH K., DEBROUX M. (2006) : « A fluorescence-based microplate assay to quantify DOM-induced catabolic activity ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 384(1) : 175-9.

DUDAL Y., GUILLON E., DUPONT L., QUIQUANPOIX H., BOUDENNE J.L. (2007) : European Patent n° 1844330.

GONZALEZ-PINZON R., HAGGERTY R., MYROLD D.D. (2012) : « Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system ». *Journal of Geophysical Research*; 117(G3) : 1-10.

GONZALEZ-PINZON R., PEIPOCH M., HAGGERTY R., MARTI E., FLECKENSTEIN J.H. (2016) : « Nighttime and daytime respiration in a headwater stream ». *Ecohydrology*; 9(1) : 93-100.

GOTAAS H.B. (1948) : « Effect of temperature on biochemical oxidation of sewage ». *Sewage Works Journal*; 20 : 441-77.

HARRISON R.M. (2001) : *Pollution: Causes, Effects and Control*. Cambridge : Royal Society of Chemistry.

HENZ M. (2008) : *Biological wastewater treatment: Principles modelling and design*. Londres : IWA Publishing.

JOUANNEAU S., RECOULES L., DURAND M.J., BOUKABACHE A., PICOT V., PRIMAULT Y., LAKE L., SENDELIN M., BARILLON B., THOUAND G. (2014) : « Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD) : A review ». *Water Research*; 49 : 62-82.

KARAKASHEV D., GALABOVA D., SIMEONOV I. (2003) : « A simple and rapid test for differentiation of aerobic from anaerobic bacteria ». *World Journal of Microbiology & Biotechnology*; 19 : 233-8.

LARSON E.M., DOUGHMAN D.J., GREGERSON D.S., OBRITSCH W.F. (1997) : « A new, simple, nonradioactive, non-toxic *In Vitro* assay to monitor corneal endothelial cell viability ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 38(10) : 1929-33.

LIU J., MATTIASSON B. (2002) : « Microbial BOD sensors for wastewater analysis ». *Water Research*; 36 : 3786-802.

MAGNIN A., MULLER M., YORIS A., GUERIN S., ROCHER V., DUDAL Y. (2015) : « Validation of a BOD<sub>5</sub> alternative method ». In : *17th International Congress of Metrology*. Les Ulis : EDP Sciences.

MARA D., HORAN N.J. (2003) : *Handbook of water and wastewater microbiology*. Londres : Academic Press/Elsevier.

MCNICHOLL B.P., MCGRATH J.W., QUINN J.P. (2007) : « Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management ». *Water Research*; 41 : 127-33.

MULLER M., BOUGUELIA S., GOY R.A., YORIS A., BERLIN J., MECHE P., ROCHER R., MERTENS S., DUDAL Y. (2014) : « International cross-validation of a BOD<sub>5</sub> surrogate ». *Environmental Science and Pollution Research*; 21(23) : 13642-5.

MULLER M., GOY R.A., YORIS A., MAGNIN A., DUDAL Y. (2016) : International Patent application n° 2016184848.

NEHMTOW J., RABIER J., GIGUEL R., COULOMB B., FARNET A.M., PERISSOL C., ALARY A., LAFFONT-SCHWOB I. (2016) : « Evaluation of an integrated constructed wetland to manage pig manure under Mediterranean climate ». *Environmental Science and Pollution Research*; 23(16) : 16383-95.

O'BRIEN J., WILSON I., ORTON T., POGNAN F. (2000) : « Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity ». *European Journal of Biochemistry*; 267(17) : 5421-6.

PAUTREMAT N., GOY R.A., EL AMRAOUI Z., DUDAL Y. (2013) : European Patent Application n° 2597461.

RAMPERSAD S.N. (2012) : « Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays ». *Sensors*; 12(9) : 12347-60.

RODIER J. (2009) : *L'analyse de l'eau*; 9<sup>e</sup> édition. Paris : Dunod.

ROYAL COMMISSION ON SEWAGE DISPOSAL (1915) : *Treating and disposing of sewage: Final report* (Her Majesty's Stationery Office, London, 1915).

THERIAULT E.J. (1926) : « The rate of deoxygenation of polluted waters ». *US Public Health Reports*; 41 : 207-17.

THERIAULT E.J. (1927) : « The dissolved oxygen demand of polluted waters ». *US Public Health Bulletin*; 173.

VAN HAANDEL A., VAN DER LUBBE J. (2012) : *Handbook of biological wastewater treatment: Design and optimisation of activated sludge systems*. Londres : IWA Publishing.

ZANONI A.E. (1967) : « Waste water deoxygenation at different temperatures ». *Water Research*; 1 : 543-66.

